

蛋氨酸酶联合顺铂协同抑制人肺腺癌细胞 GLC 生长作用

胡月新¹⁾, 徐天勇¹⁾, 张钰雯¹⁾, 赵瑜²⁾, 田长富²⁾

(1) 昆明医科大学科研实验中心; 2) 生物医学工程研究中心, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 纯化重组蛋氨酸酶并探讨其联合化疗药物顺铂对人肺腺癌 GLC 细胞生长的协同抑制效应. **方法** 对原核表达体系 pGEX-4T-1-Met/Dh5a 菌液破碎后上清过纯化柱 (GST) 纯化后, 采用 MTT 比色法测定重组蛋氨酸酶与顺铂联合应用对 GLC 细胞增殖的抑制作用, 采用金正均法计算 q 值判断两药合用是否具有协同作用. **结果** 重组蛋氨酸裂解酶浓度为 0.22 mg/mL, 纯度达 95%, 活性为 0.568 IU/mg. 给药 72 h 后单用顺铂对 GLC 细胞抑制率为 24.80%, 单用蛋氨酸酶抑制率为 27.49%, 两药合用抑制率为 66.80%. $q=1.47 > 1.15$, 表现出明显协同作用. **结论** 蛋氨酸酶及顺铂均有抑制 GLC 增殖作用, 并且两者联合使用存在协同作用.

[关键词] 抑制; 蛋氨酸裂解酶; 协同; 顺铂; 肺腺癌细胞

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 01 - 0005 - 04

Synergetic Inhibition Effects of Methioninase and Cisplatin against the Growth of Human Lung Adenocarcinoma Cell Line GLC

HU Yue-xin¹⁾, XU Tian-yong¹⁾, ZHANG Yu-wen¹⁾, ZHAO Yu²⁾, TIAN Chang-fu²⁾

(1) Experiment Center for Medical Science Research, Kunming Medical University; 2) Biomedical Engineering Research Center, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To purify recombinant methioninase and investigate the synergetic inhibitory effect of methioninase and cisplatin on the proliferation of human lung adenocarcinoma cell line GLC. **Methods** Recombinant methioninase was purified with GST-column from supernatant after ultrasonic disruption of cultured Escherichia coli in the prokaryotic expression system pGEX-4T-1-Met/Dh5a. MTT assay was used to determine the inhibition rate of methioninase in combined with cisplatin on cell proliferation, and their synergistic effect was evaluated by using the q value judge method. **Results** The concentration of recombinant methionine cleaving enzyme was 0.22 mg/mL, the purity was 95%, and the activity was 0.568 IU/mg. After 72 h culturing, the inhibition rate of cisplatin methionine was 24.80% and 27.49% respectively, while the inhibition rate of the combined drugs was 66.80% ($q = 1.47 > 1.15$) which showed a significant synergistic effect. **Conclusion** Both methioninase and cisplatin have the inhibition effect, and the combined drugs display a significant synergistic effect on the proliferation of GLC

[Key words] Inhibition; Methionine lyase; Synergy; Cisplatin; Lung adenocarcinoma cell

研究发现, 人类主要肿瘤细胞株的生长和繁殖都依赖蛋氨酸. 蛋氨酸是人体的必需氨基酸, 人体自身不能合成必须从食物中摄取. 与正常细胞相比, 肿瘤细胞生长所需蛋氨酸, 最低水平较正常细

胞高. 肿瘤细胞的这种特性被称为蛋氨酸依赖性, 淋巴细胞例外^[1,2]. 尽管现在蛋氨酸饥饿疗法已经被运用于体内肿瘤治疗实验, 但仍不足以防止肿瘤的生长和转移^[3,4].

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30760287); 云南省科技厅自然科学基金资助项目 (2009CC022)

[作者简介] 胡月新 (1984~), 女, 云南大理州人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗的研究工作.

[通讯作者] 田长富. E-mail: tiancf@21cn.com

蛋氨酸酶可以从许多微生物中被分离和纯化出来, 例如恶臭假单胞菌、产芽胞梭状芽胞杆菌、气单胞菌属、柠檬酸杆菌属等。目前主要通过分子克隆技术获得重组蛋氨酸裂解酶 (rMETase), 从而特异地裂解细胞内外的蛋氨酸, 动物实验和临床试验发现蛋氨酸酶可以明显减少血浆中蛋氨酸含量而且没有发现不良副作用^[5]。单纯使用持久限制饮食中的蛋氨酸不适于临床应用, 蛋氨酸酶同化疗药物结合治疗结果优于单纯化疗结果。

据上述研究表明, 蛋氨酸酶有望成为新一代的抗肿瘤药物。本研究旨在探讨通过分子克隆技术构建的 pGEX-4T-1-Met/Dh5a 高效原核体系表达的蛋氨酸酶上纯化后和一线抗癌药顺铂联合应用对人肺腺癌细胞 GLC 的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要仪器

宣威人肺腺癌细胞 GLC (昆明医科大学第一附属医院中心实验室保存), 酶标仪 (MD SpectraMax190), 微量核酸蛋白检测仪 (美国 NanoDrop ND-1000)。

1.2 主要试剂

顺铂注射液 (个旧生物药业), 1640 培养液 (GIBCO), 小牛血清 (TBD), MTT (Solarbio), GST 纯化柱 (上海生工), 蛋氨酸酶标准品 (Sigma)。

1.3 实验方法

1.3.1 重组蛋氨酸酶纯化及活性测定方法 将收集好的菌液超声破碎后离心收集上清用上海生工纯化柱纯化目的蛋白, 用微量核酸蛋白定量仪 ND-1000 在最大吸收波长 $\lambda_{\max} = 315 \text{ nm}$ 处测定 α -酮丁酸的吸光度值来进行活性测定, 详细步骤参见文献^[6,7]方法。

1.3.2 细胞培养 宣威人肺腺癌肿瘤细胞培养于含 10% 小牛血清的 1640 培养液中, 置 37 °C、5% CO₂ 的培养箱培养至 70% ~ 80% 后常规消化备用。

1.3.3 MTT 法测定细胞增殖抑制率 取接种 24 h 后上述 GLC 细胞, 将单细胞悬液稀释至 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板, 每孔加液量为 100 μL 。设对照组及实验组 1 (顺铂的终浓度为 20.8 $\mu\text{g/mL}$)、实验组 2 (蛋氨酸酶终浓度为 0.02 IU/mL)、实验组 3 (顺铂 20.8 $\mu\text{g/mL}$ + rMETase 0.02 IU/mL), 实验组分别加入 20 μL 培养液稀释的药物, 对照组只加入等量的培养液, 每组设 5 个复孔。蛋氨酸酶组每 8 h 补加 1 次, 其余组每 2 d 换

液 1 次, 培养 72 h 后, 每孔加入 10 μL MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后小心吸出上清液, 每孔加 150 μL DMSO, 振荡器振荡 10 min, 使 MTT 还原产物完全溶解, 酶标仪上测波长 490 nm 处各孔吸光度 (A) 值。计算细胞生长的抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{1 - \text{实验组平均 A 值}}{\text{对照组平均 A 值}} \times 100\%$$

1.3.4 药物联合作用评价 参照文献^[8]采用金正均法判断两药合用是否具有协同作用。公式:

$$\frac{Ea + b}{Ea + Eb - Ea \times Eb}$$

公式中 $Ea + b$ 为联合处理组的抑制率, Ea 、 Eb 分别为 a 药 (药为蛋氨酸酶) 和 b 药 (药为顺铂) 单独处理的抑制率。若 q 值在 0.85~1.15 间为两药合用单纯相加, 若 $q > 1.15$ 为有协同作用, 若 $q < 0.85$ 表示两药合用有拮抗作用。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多个样本均数比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA); 实验组之间的两两比较用最小显著差法 (the least significant difference, LSD) 分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组蛋氨酸酶纯化及活性测定结果

纯化上清液中得到的重组蛋氨酸裂解酶浓度为 0.22 mg/mL, 纯度达 95%, 活性为 0.568 IU/mg。

2.2 显微镜观察凋亡形态

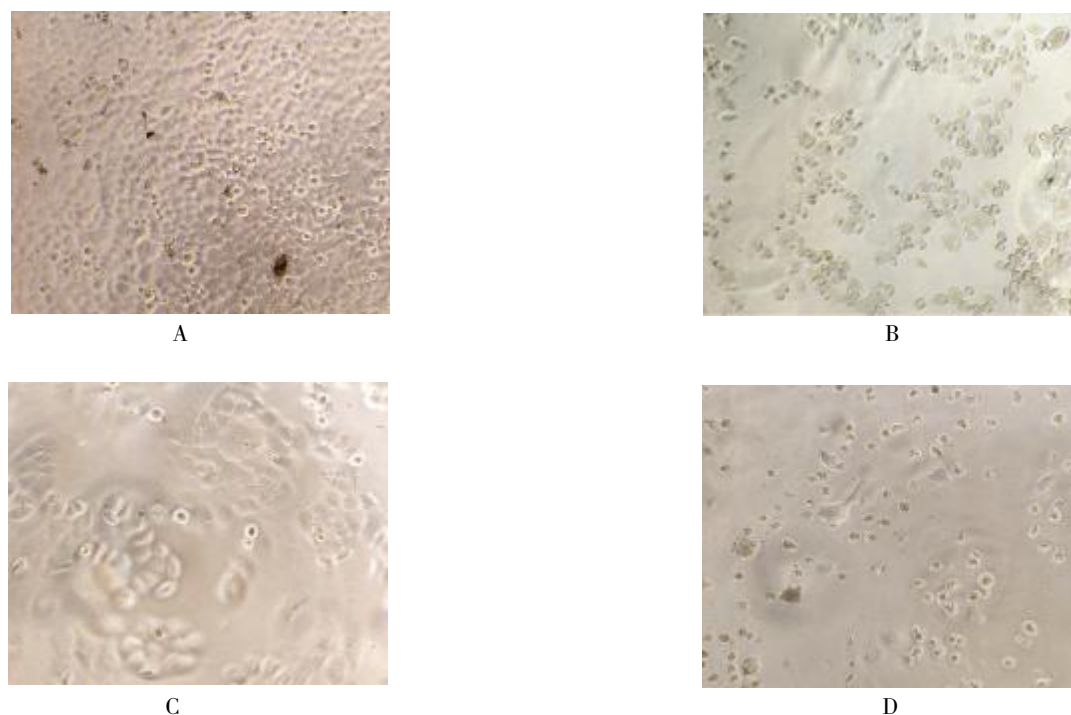
药物处理 1 d 后各实验组细胞增殖减缓, 2 d 后细胞凋亡增多, 细胞皱缩, 3 d 后细胞数目明显减少, 细胞凋亡明显, 共同作用组细胞几乎全部凋亡, 见图 1。

2.3 MTT 法测不同组 GLC 细胞增殖情况

给实验组不同药物处理 72 h 后, 观察到顺铂单药组、蛋氨酸酶组、两药联合组对 GLC 细胞的抑制率分别为 24.80%, 27.49%, 66.80%。

2.4 药物联合作用评价

采用金正均法判断两药合用是否具有协同作用, 可见顺铂与蛋氨酸酶联合用药, $q = 1.47 > 1.15$, 协同作用显著。联合用药与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 与单药组比较, 联合用药组对 GLC 的生长抑制率差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

图 1 给药 72 h 后细胞形态 ($\times 20$)Fig. 1 The cell morphology after 72 h culturing with drugs ($\times 20$)

A: 对照组细胞; B: 蛋氨酸酶组细胞; C: 顺铂组细胞; D: 联合用药组细胞.

表 1 对照组和实验组抑制率 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 The inhibition rate of the control and experimental group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	抑制率 (%)	q
对照组	5	-	-
蛋氨酸酶组	5	27.49 \pm 2.47*	-
顺铂组	5	24.79 \pm 2.98*	-
联合用药组	5	66.80 \pm 6.33*#	1.47

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与单药组比较, # $P < 0.01$.

3 讨论

顺铂是目前最有效的一线化疗药物之一, 但由于其毒副作用和耐药性等问题, 临床应用受到很大限制. 近年来, 随着人们对肿瘤的认识在细胞、分子水平的加深, 通过体外重组的方法, 克隆出蛋氨酸酶基因, 在大肠杆菌中表达, 用克隆出的重组蛋氨酸酶去减少体内血浆或肿瘤中的蛋氨酸, 成为肿瘤基因治疗的新热点.

国外对蛋氨酸酶应用研究较多集中在蛋氨酸酶与其他抗肿瘤药物联合应用上, 体外细胞培养试验及动物体内试验证明蛋氨酸酶与 5-氟尿嘧啶及顺铂等对人结肠肿瘤裸小鼠抗肿瘤化学药物联合应用时具有协同作用^[9]. Zhao 研究表明, 蛋氨酸酶联合硒代蛋氨酸提高蛋氨酸酶的抗癌活性^[10].

Machover D 报道 rMetase 在人类白血病细胞研究中, 证实产生小剂量水平蛋氨酸酶与氟尿嘧啶协同效应, 探讨 rMetase 作为单独影响因素肿瘤细胞低 DNA 甲基化, 增加 DNA 合成水平^[11], 抑制肿瘤细胞增殖分化和凋亡机理. Hu 报道 rMetase 和长春新碱或阿霉素酮有协同作用^[12].

本实验运用 MTT 法观察蛋氨酸酶和顺铂单独、联合应用时对人肺腺癌细胞株的增殖抑制作用, 研究发现在适当的浓度范围内, 二者联合应用有协同抑制作用, 蛋氨酸酶 (0.02 IU/mL)、顺铂 (20.8 $\mu\text{g/mL}$) 联合应用时, 协同作用最明显 ($q = 1.47 > 1.15$), 由此提示在合适的剂量下蛋氨酸酶与顺铂联用可起到降低用药剂量, 提高疗效的作用. 然而其抗肿瘤的具体机制还有待于分子水平的进一步研究. 本实验为蛋氨酸酶的临床应用提供了一定的实验依据, 随着探索其机制的逐步深入, 蛋氨酸酶能否应用于各类肿瘤的临床治疗, 最终联合其他药物成为一线抗癌制剂还有待更深入的研究.

[参考文献]

- [1] BORCHARDT R T. S-Adenosyl-L-methionine-dependent macromolecule methyltransferases: potential targets for

(下转第 20 页)

- with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. *J Blood*, 2001, 98 (4):1 255 - 1 257.
- [4] EELLS J T, HENRY M M, SUMMERFELT P, et al. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (6): 3 439 - 3 444.
- [5] 徐春阳, 李爽, 邵坤, 等. 单核细胞趋化蛋白1及其受体 CCR2 mRNA 在急性酒精中毒大鼠脑组织的表达[J]. *中国应用生理学杂志*, 2011, 27(3):274 - 275, 283, 379.
- [6] MARTINASEVIC M K, GREEN M D, BARON J, et al. Folate and 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in human and rat retina: relation to methanol toxicity[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 141(2):373 - 381.
- [7] SEFIDBAKHT S, RASEKHI A R, KAMALI K, et al. Methanol poisoning: acute MR and CT findings in nine patients [J]. *Neuroradiology*, 2007, 49(5):427 - 435.
- [8] VARES M, ALVAREZ-ROCHA L, LOPEZ-RIVADULLA M, et al. Sequelae-free survival in a case of potentially fatal methanol poisoning using CVVHDF as dialysis technique [J]. *Med Intensiva*, 2012, 36(5):379 - 380.
- [9] PETERS A S, SCHWARZE B, TOMANDL B, et al. Bilateral striatal hyperintensities on diffusion weighted MRI in acute methanol poisoning [J]. *Eur J Neurol*, 2007, 14(9): 1 - 2.
- [10] BESSELL-BROWNE R, BYNEVELT M. Two cases of methanol poisoning: CT and MRI features [J]. *Australas Radiol*, 2007, 51(2):175 - 178.
- [11] 陈冰. 单核细胞趋化蛋白-1与代谢综合征[J]. *内科*, 2011, 6(5):473 - 475.
- [12] 吴四海, 楼跃, 黄磊. 单核细胞趋化蛋白-1的作用机制研究进展 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2012, 6(10):2 773 - 2 775.
- [13] 罗美蓉, 王正伟, 安志星. 人血管内皮生长因子研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(17):3 835 - 3 837.
- [14] 刘兰. 血管内皮生长因子对肿瘤血管生成影响的研究进展 [J]. *中华临床医学研究杂志*, 2007, 13(13): 1 918 - 1 919.
- [15] 赵忠泽. 血管内皮生长因子(VEGF)及其受体在胶质瘤血管生成及侵袭中的作用 [J]. *中国医药导报*, 2008, 5(3):18 - 20.

(2013-12-04 收稿)

(上接第 7 页)

- the design of chemotherapeutic agents [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1980, 23(4):347 - 357.
- [2] SCANLON K J, BERKOWITZ K, PALLAI M E, et al. Inhibition of methionine transport by methotrexate in mitogen-stimulated human lymphocytes [J]. *Cancer Treatment Reports*, 1983, 67(7-8):631 - 639.
- [3] BREILLOUT F, ANTOINE E, POUAPON M F. Methionine dependency of malignant tumors: a possible approach for therapy [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, 82(20):1 628 - 1 632.
- [4] GOSEKI N, YAMAZAKI S, ENDO M, et al. Antitumor effect of methionine depleting total parenteral nutrition with doxorubicin administration on Yoshida sarcoma bearing rats [J]. *Cancer*, 1992, 69(7):1 865 - 1 872.
- [5] TAKAKURA T, ITO T, YAGI S, et al. High-level expression and bulk crystallization of recombinant L-methionine γ -lyase, an anticancer agent [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(2):183 - 192.
- [6] 胡振良, 张芳, 田腊梅, 等. 重组蛋氨酸裂解酶原核体系的表达及纯化 [J]. *昆明医学院学报*, 2012, 33(6): 3 - 7.
- [7] 彭江丽, 赵瑜, 张晓芳, 等. METase 在不同原核表达系统中的表达和活性比较 [J]. *中国民族民间医药杂志*, 2009, 18(7):20 - 23.
- [8] 刘勇, 方勇. 雷帕霉素在顺铂诱导 HeLa 细胞凋亡中的协同作用 [J]. *Central China Medical Journal*, 2009, 33(6):300 - 303.
- [9] DURANDO X, FARGES M C, BUC E, ABRIAL C, et al. Dietary methionine restriction with FOLFOX regimen as first line therapy of metastatic colorectal cancer: a feasibility study [J]. *Oncology*, 2010, 78(3-4):205 - 209.
- [10] ZHAO R, DOMANN F E, ZHONG W. Apoptosis induced by selenomethionine and methioninase is superoxide mediated and p53 dependent in human prostate cancer cells [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5(12):3 275 - 3 284.
- [11] MACHOVER D, ZITTOUN J, SAFFROY R, et al. Treatment of cancer cells with methioninase produces DNA hypomethylation and increases DNA synthesis [J]. *Cancer Research*, 2002, 62(16):4 685 - 4 689.
- [12] HU J, CHEUNG N K. Methionine depletion with recombinant methioninase: in vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutic drugs [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(7):1 700 - 1 706.

(2013-12-10 收稿)