

核苷二磷酸激酶 A 亚基的纯化、鉴定及其对顺铂抗癌作用的增强

王一飞*, 邢少璟, 张美英, 钱垂文, 林 锋, 罗 勇, 李久香
(暨南大学生物医药研究开发基地, 广东 广州 510632)

摘要:目的 了解核苷二磷酸激酶 A 亚基(NDPK-A)能否提高顺铂的抗癌效果。方法 利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western 印迹杂交来监测和鉴定目标蛋白 NDPK-A, 利用离子交换、亲和层析结合高效液相色谱纯化分离目标蛋白; MTT 比色法测定药物对细胞生长抑制率的影响。结果 获得 NDPK-A 单体蛋白, 酶比活为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白质; 细胞生长抑制率显示, NDPK-A 单独处理细胞时未见明显的细胞毒性, 但与顺铂联合处理却能大大加强后者对鼠肺腺癌细胞 LA795 和人喉癌细胞 Hep-2 的细胞毒性。结论 NDPK-A 与顺铂联用能增强顺铂对体外培养的鼠肺腺癌细胞 LA795 和人喉癌细胞 Hep-2 的杀伤作用。**关键词:**核苷二磷酸激酶类; 顺铂; 癌, LA795; 癌, Hep-2; 化学治疗

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)01-0040-04

常见的实体瘤如肺癌、肝癌、宫颈癌等大都对化疗药的反应较差。近年来发现, 许多化合物体外能增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。*nm23-H1* 被认为是一种癌转移抑制基因, 其编码的蛋白核苷二磷酸激酶 A (nucleoside diphosphate kinase A, NDPK-A), 与细胞增殖分化有关。NDPK-A 与化疗药物结合使用对体外培养的癌细胞的作用, 到目前为止, 尚未见有关报道。顺铂(cisplatin)是一种常用的化疗药, 特别是对于肺癌、黑素瘤等肿瘤有明显疗效。有实

验表明细胞中, *nm23-H1* 的表达能增强卵巢癌、乳腺癌等肿瘤对顺铂的敏感性^[1~3]。作者纯化并鉴定所获 NDPK-A, 采用噻唑蓝(MTT)药敏试验探讨 NDPK-A 在体外对肺癌细胞 LA795、人喉癌细胞 Hep-2 的作用及其联合顺铂对两株肿瘤细胞的协同杀伤作用, 探讨 NDPK-A 与顺铂联用对肺癌细胞、人喉癌细胞 Hep-2 的作用。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

分离纯化蛋白 NDPK-A 的阴离子层析填料 DEAE 购自美国 Bio-Rad 公司; 亲和层析填料 Cibacron Blue 3GA Sepharose 4B 购自 Sigma 公司。免疫弗氏完全佐剂, Gibco BRL 公司; 顺铂, 锦州九泰药业有限公司; 细胞培养基 RPMI 1640, 美国 HyClone 公司; 小牛血清, 杭州四季青公司; MTT, Sigma 公司。

1.2 细胞株(工程菌)

工程菌 DH5 α -pBVnm23-H1 和人喉癌 Hep-2 细胞由广州暨南生物医药研究开发基地保存, 鼠肺腺癌 LA795 细胞购自军事医学科学院。

1.3 NDPK-A 的鉴定、分离、纯化及抗血清效价测定

裂解工程菌 DH5 α -pBVnm23-H1, 连续离心 ($10\,000 \times g$, 30 min), 取上清, 15% SDS-PAGE 电泳。然后将蛋白从凝胶转移至硝酸纤维膜上, 洗涤, 封闭, 加抗 NDPK-A 一抗, 洗涤, 封闭, 加酶标二抗, 洗涤, 显色, 加 H₂O 终止反应^[4]。拍照。

工程菌发酵所获菌体经破碎, 离心 ($18\,000 \times g$, 15 min), 取上清过阴离子交换层析 DEAE, 收集到的溶液再上 Cibacron Blue 3GA Sepharose 4B 亲和层析柱^[5], 最后排阻 HPLC 纯化^[6,7], 获得纯的 NDPK-A 单体蛋白, Bradford 法测定 NDPK-A 的活性^[8]。NDPK-A 免疫新西兰大白兔^[4], ELISA 法测定抗血清效价^[9]。

1.4 MTT 法检测癌细胞生长抑制率^[10]

将终密度为 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 对数生长期的细胞接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C , 体积分数为

收稿日期: 2001-11-05 接受日期: 2002-08-29

基金项目: 国家十五 863 项目(2001AA215041); 广东省科委重大攻关项目(A1090207)

作者简介: 王一飞(1963-), 男, 河南人, 医学博士, 副教授, 从事中药化学、药理、基因工程药物研究。

* 联系作者 Tel: (020)85223426, Fax: (020)85222706-309, E-mail: twangyf@jnu.edu.cn

5%的 CO₂ 孵箱中培养 24 h。设 5 组,空白对照组(不加任何液体),阴性对照组(不加药物),NDPK-A 组(终浓度为 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 和 0.025 g·L⁻¹),顺铂组(终浓度为 2, 1, 0.5, 0.25 和 0.125 g·L⁻¹)和 NDPK-A + 顺铂组,顺铂的终浓度同顺铂组,NDPK-A 的终浓度均为 0.025 g·L⁻¹(肺癌细胞)或 0.013 g·L⁻¹(人喉癌细胞 Hep-2),NDPK-A 与顺铂同时加入,CO₂ 孵箱中继续培养 24 h。取出培养板,每孔加 5 g·L⁻¹ MTT 10 μL,4 h 后每孔加 10% SDS 100 μL,CO₂ 孵箱中培养过夜,取出测吸光度值(A),测量波长为 570 nm,参比波长为 630 nm,计算癌细胞生长抑制率,绘制曲线,求出细胞生长抑制 50% 时的药物浓度,即 IC₅₀,表示细胞对药物的药敏性。

细胞生长抑制率 = (1 - 实验组 A₅₇₀₋₆₃₀/阴性对照组 A₅₇₀₋₆₃₀) × 100%

1.5 统计学处理

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用成组 *t* 检验。

2 结果

2.1 nm23-H1 基因的表达检测及产物 NDPK-A 的纯化

Western 印迹法显示 NDPK-A 和工程菌 DH5α-pBVnm23-H1 裂解液在几乎一致的水平位置有杂交带(图 1),表明 nm23-H1 基因成功表达(泳道 2)。纯化得到的 NDPK-A,蛋白含量为 0.8 g·L⁻¹,酶比活为 8 mmol·min⁻¹·g⁻¹蛋白质。

2.2 NDPK-A 抗血清效价测定

兔抗 NDPK-A 抗血清经 ELISA 测定,抗血清稀释度为 1:6400 时,A_{490 nm} 仍明显高于正常血清(表 1)。

2.3 NDPK-A 联用顺铂对肺癌细胞的作用

顺铂在体外对鼠肺癌细胞 LA795 有一定的杀伤

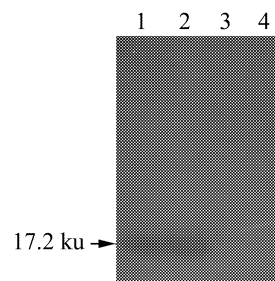


Fig 1. Expression of nm23-H1 gene detected by Western blot hybridization. Lane 1 is nucleoside diphosphate kinase A (NDPK-A) marker, lane 2 is the lysate of engineering bacterium induced, lane 3 and lane 4 are the lysate of engineering bacterium non-induced.

作用,2, 1, 0.5, 0.25 和 0.125 g·L⁻¹对 LA795 细胞的生长抑制率分别为 (65.7 ± 4.6)%, (43.4 ± 4.9)%, (36.4 ± 1.7)%, (20.9 ± 1.1)% 和 (4.8 ± 0.6)%, 其 IC₅₀ 为 1.03 g·L⁻¹。顺铂浓度为 0 g·L⁻¹ 时,NDPK-A 最高浓度 0.41 g·L⁻¹ 对肺癌细胞的抑制率为 25.3%,随着浓度的逐步下降,细胞生长抑制率也随之降低,当 NDPK-A 浓度为 0.025 g·L⁻¹ 时,对细胞生长的抑制率只有 10.8%,可见 NDPK-A 对肺癌细胞无明显毒性作用。

NDPK-A 在 0.025 g·L⁻¹ 浓度以上具有增强顺铂对肺癌细胞的杀伤作用。0.025 g·L⁻¹ NDPK-A 和顺铂同时作用于肺癌细胞,顺铂浓度为 2, 1, 0.5, 0.25 和 0.125 g·L⁻¹ 对 LA795 细胞的生长抑制率分别为 (85.9 ± 3.9)%, (66.2 ± 2.6)%, (53.1 ± 3.9)%, (28.7 ± 2.5)% 和 (15.8 ± 1.5)%,顺铂对肺癌细胞的 IC₅₀ 值从 1.03 g·L⁻¹ 降为 0.5 g·L⁻¹,杀伤作用增强至 2.06 倍(图 2)。

2.4 NDPK-A 联用顺铂对人喉癌细胞 Hep-2 的作用

顺铂在体外对人喉癌细胞 Hep-2 有一定的杀伤

Tab 1. The titer of rabbit anti-NDPK-A antiserum determined by ELISA

Group	A _{490 nm}							
	1:10	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400 (Serum dilution)
Rabbit anti-NDPK-A antiserum	≥2.000	1.548	1.496	1.338	0.956	0.740	0.550	0.455
Normal serum	0.560	0.537	0.498	0.416	0.385	0.364	0.358	0.323
Control	0							

The value of absorbance was evaluated with a BIO Model 550 microplate reader.

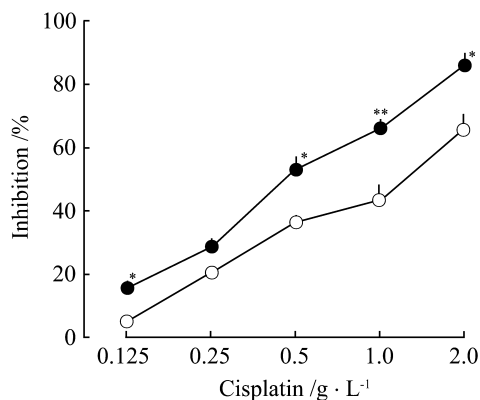


Fig 2. Inhibitory effects of cisplatin alone (○) or combined with NDPK-A (●) on the growth of LA795 mouse lung adenocarcinoma cell. MTT bioassay was used to test the cytotoxicity. Different concentration of cisplatin and NDPK-A $0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ were added at the same time. Cell survival was evaluated by measuring the absorbance at double wavelength 570 nm/630 nm. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the corresponding cisplatin alone group.

作用, 2, 1, 0.5, 0.25 和 $0.125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 LA795 细胞的生长抑制率分别为 $(68.1 \pm 3.0)\%$, $(64.8 \pm 4.8)\%$, $(60.8 \pm 5.6)\%$, $(55.9 \pm 6.9)\%$ 和 $(47.7 \pm 4.7)\%$, IC_{50} 为 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。顺铂浓度为 $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, NDPK-A 最高浓度 $0.41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 Hep-2 细胞的抑制率为 30.1% , 当浓度为 $0.013 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对细胞生长的抑制率降为 10.5% , 可见 NDPK-A 对 Hep-2 细胞无明显毒性作用。

NDPK-A 在 $0.0065 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度以上具有增强顺铂对人喉癌细胞 Hep-2 的杀伤作用。 $0.013 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NDPK-A 和顺铂同时作用于人喉癌细胞 Hep-2, 顺铂浓度 2, 1, 0.5, 0.25 和 $0.125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 LA795 细胞的生长抑制率分别为 $(72.2 \pm 1.3)\%$, $(69.0 \pm 1.7)\%$, $(63.0 \pm 3.4)\%$, $(59.1 \pm 1.5)\%$ 和 $(53.3 \pm 3.1)\%$ 。顺铂对人喉癌细胞 Hep-2 的 IC_{50} 值从 $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 降为 $0.094 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 杀伤作用增强至 1.6 倍(图 3)。

3 讨论

NDPK-A 是 152 个氨基酸组成的多肽, 分子量约为 17 ku。作者纯化、鉴定了 NDPK-A, 并将其作用于癌细胞, 发现 NDPK-A 最高浓度 $0.41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对鼠肺腺癌 LA795 细胞的抑制率只有 25.3% , 对人喉癌 Hep-2 细胞的抑制率也只有 30.1% , 并随着浓度下

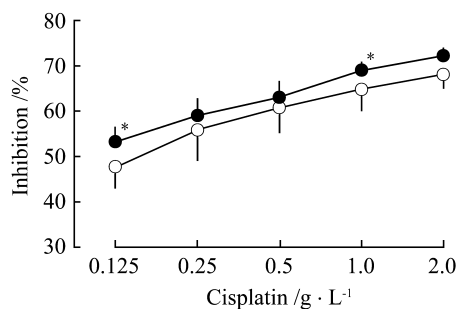


Fig 3. Inhibitory effects of cisplatin alone (○) or combined with NDPK-A (●) on the growth of Hep-2 human laryngeal carcinoma cell. MTT bioassay was used to test the cytotoxicity. Different concentrations of cisplatin and NDPK-A $0.013 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ were added at the same time. Cell survival was evaluated by measuring the absorbance at double wavelength 570 nm/630 nm. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with the corresponding cisplatin alone group.

降, 抑制率也降低, 当浓度为 $0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 LA795 细胞的抑制率只有 10.8% , 当浓度为 $0.013 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 Hep-2 细胞的抑制率也只有 10.5% 。这说明 NDPK-A 对细胞没有明显毒性。NDPK-A 联合顺铂作用则能增强顺铂对 LA795 细胞和 Hep-2 细胞的细胞毒性, 分别增强至 2.06 倍和 1.6 倍。这提示, NDPK-A 能增强顺铂对癌细胞的杀伤作用。

NDPK-A 通过其可逆的丝氨酸磷酸化反应参与细胞信号传导系统的运作, 控制癌细胞对周围环境的反应。因此作者推测, NDPK-A 增强顺铂对细胞的细胞毒作用可能与此有关。但是具体作用机制有待进一步的研究。

传统的肿瘤化学治疗着眼于用药物来杀伤癌细胞。由于肿瘤细胞群体的非均一性, 同一细胞株的不同克隆对药物的敏感性不同, 且对化疗剂易产生抗药性^[11]。因此, 寻求化疗敏化剂 (sensitizer) 或多种药物联用来加强细胞毒药物的杀伤作用或改变肿瘤细胞的抗药性已成为今后肿瘤化学治疗的一个新策略。本研究发现 NDPK-A 联合顺铂在体外能增强顺铂对肺癌细胞、人喉癌细胞的治疗作用。用 NDPK-A 来增强顺铂杀伤肿瘤细胞的作用, 是否能在今后抗肺癌、人喉癌治疗中发挥作用有待进一步研究。目前, 作者正在进行动物实验。

4 参考文献:

- [1] Iizuka N, Tangoku A, Hazama S, Yoshino S, Mori N, Oka

- M. Nm23-H1 gene as a molecular switch between the free-floating and adherent states of gastric cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2001, **174**(1):65–71.
- [2] Iizuka N, Hirose K, Noma T, Hazama S, Tangoku A, Hayashi H, *et al.* The *nm23-H1* gene as a predictor of sensitivity to chemotherapeutic agents in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 1999, **81**(3):469–475.
- [3] Iizuka N, Miyamoto K, Tangoku A, Hayashi H, Hazama S, Yoshino S, *et al.* Downregulation of intracellular *nm23-H1* prevents cisplatin-induced DNA damage in oesophageal cancer cells: possible association with Na^+ , K^+ -ATPase [J]. *Br J Cancer*, 2000, **83**(9):1209–1215.
- [4] Towbin HT. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets[A]. In: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, ed. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*(分子克隆实验指南)[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1992. 889–897.
- [5] Lascu I, Pop RD, Porumb H, Presecan E, Proinov I. Pig heart nucleoside diphosphate kinase. Phosphorylation and interaction with Cibacron blue 3GA[J]. *Eur J Biochem*, 1983, **135**(3):497–503.
- [6] Robert K. Protein purification[A]. In: Snide LR, Kelan JJ, ed. *The Introduction of Modern Liquid Chromatography* [M]. 2nd ed. London: Chemistry Industry Press, 1988. 225–231.
- [7] Lambeth DO, Muhonen WW. The direct assay of kinases and acyl-CoA synthetases by HPLC: application to nucleoside diphosphate kinase and succinyl-CoA synthetase [J]. *Anal Biochem*, 1993, **209**(1):192–198.
- [8] London M. Measurement of activity using Bradford method [A]. In: Frederick MA, eds. *Current Protocols in Molecular Biology* [M]. New York: Wiley Interscience, 1986. 115–124.
- [9] Campeller T. The titer of antiserum determined by ELISA [A]. In: Frederick MA, Roger EK, David DM, John AS, Kevin S, ed. *Short Protocols in Molecular Biology*[M]. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995. 415–416.
- [10] Chen BA, Chen J, Gao F, Dai MM, Jin BC, Ding JH, *et al.* Chemosensitive and reversal effect of verapamil on non-p-gp expressed cells[J]. *J Nanjing Railway Medical College*(南京铁道医学院学报). 2000, **19**(2):83–85.
- [11] Ferguson AW, Flatow U, MacDonald NJ, Larminat F, Bohr VA, Steeg PS. Increased sensitivity to cisplatin by nm23-transfected tumor cell lines [J]. *Cancer Res*, 1996, **56**(13):2931–2935.

Purification, identification of nucleoside diphosphate kinase A and its potentiation on antitumor effect of cisplatin

WANG Yi-Fei, XING Shao-Jing, ZHANG Mei-Ying, QIAN Chui-Wen, LIN Feng, LUO Yong, LI Jiu-Xiang
(Guangzhou Jinan Biomedical Research and Development Center, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **AIM** To explore if nucleoside diphosphate kinase A (NDPK-A) can potentiate the antitumor action of cisplatin. **METHODS** For testing and identifying, SDS-PAGE and Western blot were used. A feasible method for obtaining purified NDPK-A was successfully established by using ion-exchange chromatography, affinity chromatography and size exclusive high-performance liquid chromatography techniques. MTT bioassay was used to test the growth of the tumor cell. **RESULTS** The activity of the purified NDPK-A was $8 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ protein; NDPK-A itself had no significant cytotoxicity on tumor cells but it

enhanced the cytotoxicity of cisplatin on tumor cells. **CONCLUSION** NDPK-A can potentiate the antitumor action of cisplatin on LA795 mouse lung adenocarcinoma cells and Hep-2 human laryngeal carcinoma cells.

Key words: nucleoside diphosphate kinases; cisplatin; carcinoma, LA795; carcinoma, Hep-2; chemical therapy

Foundation item: The project supported by Tenth “Five years” project of 863(2001AA215041); and Key Research Project of Guangdong Province(A1090207)

(本文编辑 乔虹)