

# 羟基喜树碱对小鼠肝癌细胞腺苷酸环化酶活力的影响

凌义和 俞伟娟 胥彬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 羟基喜树碱(羟基)是从我国特有植物喜树(*Camptotheca acuminata* Decne)中分得的抗癌有效成分, 体外实验羟基 $1\ \mu\text{M}$ - $5\ \text{mM}$ 对小鼠肝癌细胞腺苷酸环化酶活力影响不明显; 但体内 ip 羟基  $10\ \text{mg}/\text{kg}\ \text{qd} \times 3\ \text{d}$  既能增加肝癌细胞内 cAMP 水平, 又能提高腺苷酸环化酶的活力。

**关键词** 10-羟基喜树碱; 小鼠腹水肝癌细胞; 环腺苷酸; 腺苷酸环化酶; 多巴胺

cAMP 不仅参与细胞的多种代谢调节过程, 而且也细胞的增殖、分化有关。肿瘤细胞的快速增殖, 异常分化和体外生长的接触抑制缺陷等恶性行为与肿瘤细胞内 cAMP 水平下降有关<sup>(1)</sup>。而 cAMP 水平又受膜上的腺苷酸环化酶及细胞内磷酸二酯酶调节。为了研究抗肿瘤药物与肿瘤细胞内环核苷酸变化的关系, 我们实验室曾观察羟基对小鼠肝癌细胞内 cAMP 水平的变化<sup>(2)</sup>。本文进一步研究该药对腺苷酸环化酶活力的影响。

## 材料和方法

**试剂和药物** [ $^3\text{H}$ ]cAMP( $28\ \text{Ci}/\text{mmol}$ ); 中国科学院原子能研究所供应。兔蛋白激酶; 中国科学院生物物理研究所供应, ATP 二钠盐; 中国科学院上海生化所东风试剂厂出品。羟基: 我所植化室提供。多巴胺: 英国 Light 厂出品。

**瘤株和匀浆的制备** 取体重  $18\text{--}20\ \text{g}$  的杂种小鼠, ip 接种肝癌细胞 7-9 d 后抽取肿瘤腹水,  $400 \times g$  离心, 所得细胞沉淀用冷生理盐水洗 1-2 次, 然后加入 10 倍容量  $50\ \text{mM}$  Tris-HCl,  $4\ \text{mM}$  EDTA 缓冲液 (pH 7.5) 做成细胞悬液, 上述操作在  $0\text{--}4\ ^\circ\text{C}$  下进行, 操作越快越好, 一般为  $10\ \text{min}$  左右。置于玻璃匀浆器做成匀浆。

**腺苷酸环化酶活力的测定** 按文献方法<sup>(3)</sup>

稍作改进。于一试管内加入  $0.9\ \text{ml}$  含  $0.05\ \text{M}$  Tris,  $4\ \text{mM}$  EDTA,  $2\ \text{mM}$  ATP· $2\ \text{Na}$ ,  $1.2\ \text{mM}$   $\text{MgAC}_2$ ,  $5\ \text{mM}$  茶碱及  $5\ \text{mM}$  巯基乙醇, pH 7.5 反应液。在另一管内加入等容量 Tris-EDTA 缓冲液作对照。反应从加入  $0.1\ \text{ml}$  细胞匀浆时开始, 于  $30\ ^\circ\text{C}$  温育  $5\ \text{min}$ 。然后置于沸水浴内  $5\ \text{min}$ 。冷却后于  $2000 \times g$  离心  $10\ \text{min}$ 。吸取  $0.5\ \text{ml}$  上清液, 按文献方法<sup>(4)</sup>测定 cAMP 量。最后将加有反应液管内的 cAMP 量减去未加反应液的对照管内的 cAMP 量即为由腺苷酸环化酶生成的 cAMP。酶活力以生成  $\text{pmol cAMP}/\text{mg 蛋白}/5\ \text{min}$  表示。蛋白质测定按文献方法<sup>(5)</sup>。

## 结 果

**肝癌细胞匀浆量和腺苷酸环化酶活力的关系** 取约  $2\text{--}6\ \text{mg}$  蛋白匀浆作酶活力测定, 在该范围内活力基本上处于线性区域, 因此本实验均取  $2\text{--}6\ \text{mg}$  蛋白的匀浆量作酶活力测定。见图 1。

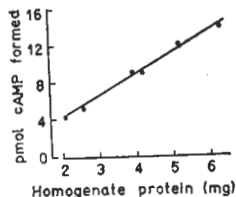


Fig 1. Relationship between adenylate cyclase activity and homogenate amounts of hepatoma cells

**羟基对体外肝癌细胞腺苷酸环化酶活力的影响** 用  $1\ \mu\text{M}$ - $5\ \text{mM}$  羟基, 在体外与肝癌细胞匀浆作用  $5\ \text{min}$ , 然后测定腺苷酸环化酶的活力, 结果见图 2。羟基浓度从  $1\ \mu\text{M}$  到  $1\ \text{mM}$

时, 各点酶活力基本在基础范围内波动, 只有在 5 mM 时酶活力才提高 0.9 倍, 表明羟喜对腺苷酸环化酶的直接影响不大. 为了检验实验的可靠性, 同时平行观察等克分子浓度的多巴胺对腺苷酸环化酶活力的影响. 当多巴胺浓度从 1  $\mu$ M 增加到 0.1 mM 时, 酶活力提高了 1.27 倍, 浓度增加到 1 mM 时, 酶活力提高了 3.8 倍. 此结果一方面说明多巴胺也能活化肝癌细胞腺苷酸环化酶, 另一方面还说明本实验所用方法是可靠的.

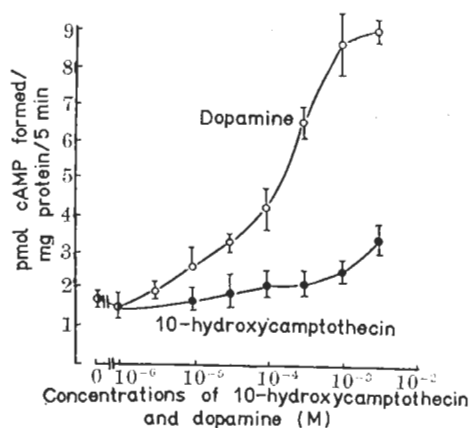


Fig 2. Effects *in vitro* of 10-hydroxycamptothecin and dopamine on adenylate cyclase activity in hepatoma cells.  $n = 4$ .  $\bar{x} \pm SD$

**肝癌小鼠 ip 羟喜 qd  $\times$  3 d, 对肝癌细胞内 cAMP 含量和腺苷酸环化酶活力的影响** 取接种腹水肝癌 5 d 小鼠, ip 羟喜 10 mg/kg 或 7 mg/kg 多巴胺, 对照组注射等容量生理盐水, qd  $\times$  3 d. 于末次给药后 4 h 处死, 迅速

Table 1. cAMP levels (pmol/mg protein) and adenylate cyclase activity (pmol cAMP formed/mg protein/5 min) in murine hepatoma cells after ip 10-hydroxycamptothecin 10 mg/kg or dopamine 7 mg/kg, qd  $\times$  3 d ( $\bar{x} \pm SD$ )

Groups	cAMP level	Enzyme activity
Control	1.5 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.6
10-Hydroxycamptothecin	2.5 $\pm$ 0.7***	3.1 $\pm$ 1.4**
Dopamine	2.2 $\pm$ 0.6***	4.0 $\pm$ 1.5***

\*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$

测定肝癌细胞内的 cAMP 量和腺苷酸环化酶活力. 羟喜组 cAMP 量和腺苷酸环化酶活力分别较对照组增加 67% 和 82%, 多巴胺的 cAMP 量和腺苷酸环化酶活力较对照组增加 47% 和 135%.

## 讨 论

关于测定膜上腺苷酸环化酶活力的方法, 文献上多采用 [ $\alpha^{32}P$ ]ATP 为底物, 直接测定该酶反应后生成的 [ $^{32}P$ ]cAMP 量以示酶活力的高低. 这一方法灵敏度较高, 误差较小, 但需用 [ $\alpha^{32}P$ ]ATP 为底物, 而该标记化合物目前国内不易获得. 文献报道也有用非标记 ATP 为底物, 再用蛋白竞争结合方法测定生成的 cAMP 量. 这种方法是间接测定, 加上细胞内原有的 cAMP 水平也有波动, 其结果有一定误差. 但从我们的实验结果看, 此方法已能测出肿瘤细胞腺苷酸环化酶的活力和研究抗肿瘤药物对该酶活力的影响. Rodbell 等认为在测定腺苷酸环化酶时, 应在反应系统内加入一定量磷酸肌酸激酶和磷酸肌酸作 ATP 再生系统<sup>(6)</sup>, 但 Kelley 等认为如果在该酶反应系统内加入的酶量较少, 反应液内的底物浓度又远远大于酶所需的底物量, 在反应的时间短暂时, 可以省去 ATP 再生系统<sup>(7)</sup>. 在本工作中也省去了 ATP 再生系统, 实验结果表明在 2 mM ATP 底物浓度下, 加入 2-6 mg 蛋白量匀浆, 5 min 内生成的 cAMP 量基本上呈线性关系.

过去发现羟喜能抑制肿瘤细胞的 DNA 和 RNA 合成, 提高肝癌细胞内 cAMP 水平. 从本文的结果看, 羟喜对肝癌细胞的腺苷酸环化酶也有一定的激活作用, 特别是 ip 给药 3 针后, 对该酶活力影响较明显, 这表明羟喜提高细胞内 cAMP 水平可能和激活膜上的腺苷酸环化酶有关. 目前认为, 膜上的腺苷酸环化酶是一个复杂的系统, 除了相应的受体外, 还需 GTP 结合蛋白及各种因子参与, 而且和膜的结构和功能状态有关<sup>(8)</sup>. 从本实验结果

看, 羟喜作用要比多巴胺弱, 我们设想它可能不象多巴胺那样直接作用于膜上受体, 而是影响其它的因子进而影响该酶的活力. 此外, 羟喜增加肿瘤细胞内 cAMP 量还可能和抑制磷酸二酯酶有关.

### 参 考 文 献

- 1 Anderson WB, Pastan I. Altered adenyl cyclase activity: its role in growth regulation and malignant transformation of fibroblasts. In: Drummond GI, Greengard P, Robison GA, eds. *Advances in cyclic nucleotide research*, vol 5. NY: Raven Press, 1975:681-98
- 2 杨金龙、韩家娴、沈祖铭、胥 彬. 中国药理学报

*Acta Pharmacologica Sinica* 1982 Dec; 3 (4) : 264-266

## EFFECT OF 10-HYDROXYCAMPTOTHECIN ON ADENYLATE CYCLASE ACTIVITY IN MURINE HEPATOMA CELLS

LING Yi-he, YU Wei-juan, XU Bin

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

**ABSTRACT** 10-Hydroxycamptothecin is a new antitumor principle isolated from *Camptotheca acuminata* indigenous to China. It has been found in our laboratory that 10-hydroxycamptothecin raised cAMP levels in murine hepatoma cells. Whether such action is related to activation of adenylate cyclase system was investigated.

The activity of adenylate cyclase was not changed markedly *in vitro* by 10-hydroxycamptothecin 1  $\mu$ M-5 mM. *In vivo*, ip 10-hydroxycamptothecin 10 mg/kg qd  $\times$

1981年12月; 2(4):250

- 3 Clement-Cormier YC, Robison GA. *Biochem Pharmacol* 1977 Sep 15; 26(18):1719
- 4 Gilman AG. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970 Sep; 67(1):305
- 5 Lowry OH, Rosebough NJ, Farr AL, Rondall RJ. *J Biol Chem* 1951 May; 193(1):265
- 6 Rodbell M. Methods for the isolation of rat liver plasma membranes and fat cell "ghosts"; an assay methods for adenylate cyclase. In: Chasin M, ed. *Methods in molecular biology*, vol 3. 1st ed. NY: Marcel Dekker, 1972:101
- 7 Kelley RO, Palmer GC, Crissman HA, Nilson JH. *J Cell Sci* 1977 Dec; 28:237
- 8 Cassel D. *Biochem Soc Trans* 1981 Feb; 9(1):39

3 d elevated significantly the intracellular cAMP level and adenylate cyclase activity by 67% and 82%, respectively.

For control experiments the effect of dopamine on adenylate cyclase activity in hepatoma cells was observed. The results showed that dopamine strongly stimulated adenylate cyclase activity both *in vitro* and *in vivo*.

**KEY WORDS** 10-hydroxycamptothecin; murine ascites hepatoma cells; cAMP; adenylate cyclase; dopamine