

羟基喜树碱对小鼠肝癌细胞核内 RNA 聚合酶活力的影响

凌义和 俞伟娟 胥彬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 2000031)

提要 用修改的文献⁽²⁾法分离小鼠肝癌细胞核, 10-100 μM 羟基喜树碱与核在体外作用 0.5 h 后, 能程度不等地抑制核内 RNA 聚合酶 I(III)和 II 的活力, 其 50% 抑制浓度约为 50 μM , 给小鼠 ip 羟基喜树碱 10 mg/kg \times 3 d, 对肝癌细胞核内 RNA 聚合酶 I(III)和 II 活力也有明显的抑制。

关键词 10-羟基喜树碱; 肝癌; 细胞核; RNA 聚合酶

10-羟基喜树碱(羟基喜)是从我国南方特有植物喜树中分得的抗癌有效成份, 我们实验室曾发现它能明显抑制肿瘤细胞的 RNA 和 DNA 合成⁽¹⁾, 为了进一步探讨其作用机理, 本文研究了它对小鼠肝癌细胞核内 RNA 聚合酶活力的影响。

材料和方法

试剂和药品 [³H]UTP (15 Ci/mmol); 中国科学院上海原子核所提供; 腺苷三磷酸(ATP), 鸟苷三磷酸(GTP), 胞苷三磷酸(CTP)及尿苷三磷酸(UTP)钠盐均由中国科学院上海生化所东风试剂厂出品; α -鹅膏蕈(α -amanitin); 西德 Boehringer 药厂出品; 羟基喜: 湖北黄石制药厂提供, 药物先用几滴 0.1 N NaOH 溶解, 然后用生理盐水或缓冲液配成所需浓度, 低温避光贮存; 放线菌素 D: 由本所抗生

素室提供。

瘤株和细胞核的制备 取 18-22 g 小鼠, 腹腔接种约 5×10^6 腹水肝癌细胞, 接种后 7-9 d, 解剖吸取肿瘤细胞, 于 $400 \times g$ 离心, 弃去上清液, 所得肝癌细胞按文献⁽²⁾方法, 略加修改, 分离细胞核。实验过程为: 肝癌细胞用磷酸一生理盐水缓冲液(PBS)洗 2 次, 然后用 20 倍容积含 0.01 M Tris-HCl, 0.01 M NaCl, 1.5 mM MgCl_2 (pH 7.4) 的网状细胞标准缓冲液(RSB)做成细胞悬液, 并于冰浴内放置 10 min, $600 \times g$ 离心 5 min, 细胞沉淀再用内含 0.1% Triton X-100 的 RSB 液做成悬液, 置于玻璃匀浆器内, 手动上下匀浆 10-15 次, $1200 \times g$ 离心 2 min 弃去细胞质得粗核沉淀, 用 10 倍容积 0.25 M 蔗糖, 2 mM MgCl_2 溶液做成核悬液, 叠加于等容积的 0.88 M 蔗糖液上, $1200 \times g$ 离心 15 min, 得较纯的核后, 再用 0.25 M 蔗糖, 2 mM MgCl_2 溶液做成一定浓度的核悬液, 以 Giemsa 染色观察核的完整性。

RNA 聚合酶活力的测定 按文献⁽³⁾方法, 稍作修改。取 100 μl 核悬液及 100 μl 内含 50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 2 mM MnCl_2 , 2.5 mM MgCl_2 , 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM 巯基乙醇, 0.4 mM ATP, GTP, CTP 及 25 μM [³H]UTP pH 8.0 的反应液, 于 37 $^\circ\text{C}$ 温育 15 min 后, 加入等容积 10% 冷 TCA 终止反应。用孔径 0.25 μ 的醋酸纤维滤膜收集酸不溶物质, 滤膜用 5% TCA 洗 2 次, 无水乙醇洗 1 次,

1983年2月24日收稿 1983年4月8日修回
1982年9月在哈尔滨市举行的中国药学会药理学学会学术会议上宣读。

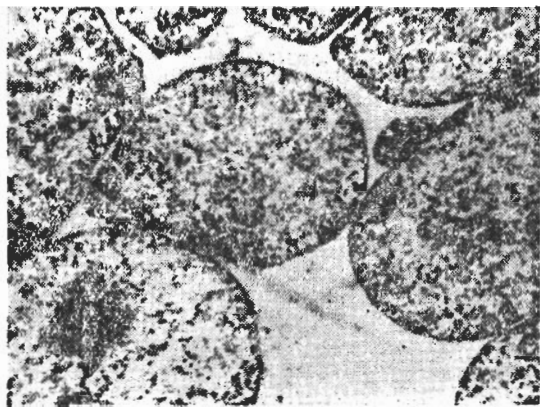


Fig 1. Electron micrograph of isolated nuclei of mouse hepatoma cells. $\times 5000$

90°C干燥后,置于液闪计数杯内,加入5 ml 内含0.4%PPO,0.01%POPOP的二甲苯闪烁液,用国产YSJ-78型自动液体闪烁计数器测定 $[^3\text{H}]$ UMP参入RNA的放射性。

核酸及蛋白质含量测定 按文献^(4,5)方法,用二苯胺测定DNA,苔黑酚测定RNA,Folin试剂测定蛋白质。

结 果

小鼠肝癌细胞核分离的纯度和完整性观察 参考文献⁽²⁾方法,改用0.1%非离子去垢剂Triton X-100分离小鼠肝癌细胞核,经光镜和电镜观察证明所得的细胞核结构比较完整,核周围粘附的细胞质很少。(见图1)

体外试验中羟喜对核内RNA聚合酶活力的影响 10-100 μM 羟喜与肝癌细胞核在37°C下温育0.5 h,能程度不等地抑制 $[^3\text{H}]$ UMP参

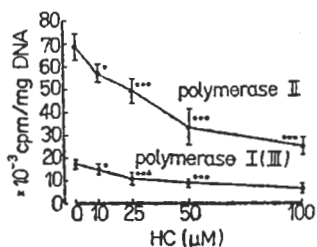


Fig 2 Effects of hydroxycamptothecin on RNA polymerase activities in hepatoma nuclei. ($\bar{x} \pm \text{SD}$) * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

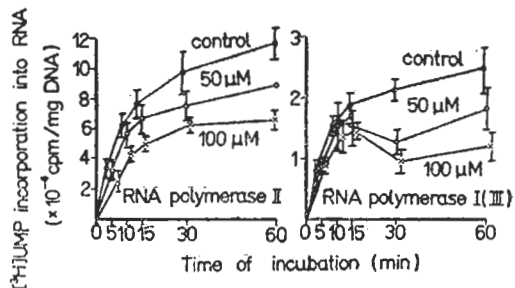


Fig 3. Reduction of RNA polymerases II and I (III) activities by HC 50 and 100 μM *in vitro*.

入到核内RNA,其50%的抑制浓度约为50 μM .若核先与 α -鹅膏蕈1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 在0°C作用5 min,在此浓度下的 α -鹅膏蕈能特异性抑制RNA聚合酶II的活力,而不影响聚合酶I(III)的活力.再将经 α -鹅膏蕈处理过的细胞核与上述浓度羟喜于37°C温育0.5 h,结果证明羟喜也能明显抑制RNA聚合酶I(III)的活力,其抑制程度和它对RNA聚合酶II的影响相似。(见图2)

用50或100 μM 羟喜与经或未经 α -鹅膏蕈处理过的肝癌细胞核作用不同时间后,观察药物对核内RNA聚合酶I(III)和II活力影响的时间动力学过程,结果见图3.羟喜在作用10-15 min时即对RNA聚合酶II呈现抑制,至30-60 min对RNA聚合酶I(III)也显抑制作用。(见图3)

小鼠ip羟喜后,核内RNA聚合酶活力的变化 取腹水肝癌小鼠12只,分成3组,分别ip羟喜10 mg/kg和放线菌素D 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,对照组注射等容量的生理盐水,连续3 d,于末次给药后4 h,测定各组肝癌细胞核内RNA聚合酶I(III)和II的活力.实验证明体内注射羟喜和放线菌素D均能明显抑制RNA聚合酶I(III)的活力,其抑制率分别为43%和59%.对RNA聚合酶II的抑制率分别为47%和45%。

讨 论

关于细胞核的分离方法,文献报道很多,

其中文献 2 介绍的方法操作较为简便, 效果也较满意. 作者用非离子去垢剂 Nonidet p 40 分离 HeLa, L 细胞及 ECA 等多种细胞株的细胞核, 并认为在分离核时应加入一定量的离子去垢剂如脱氧胆碱等以提高分离效果. 我们曾试用过不同去垢剂分离小鼠肝癌细胞核, 其中以 Triton X-100 较为满意, 本实验曾观察不同浓度 Triton X-100 对细胞核分离的影响, 当 Triton X-100 浓度大于 0.1% 时, 则易使核膜破碎, 染色质流出, 核产生丝状凝集. 当 Triton X-100 浓度低于 0.1% 时, 则核和细胞质分离不清, 影响分离效果.

有关 RNA 聚合酶活力及转录功能的研究, 文献上多采用完整细胞核、染色质或外源性 DNA 模板等体外系统, 由于完整细胞核内具有 DNA, 组蛋白, 非组蛋白, 各种 RNA 聚合酶及其他调节因子, 能较客观地反映细胞核的转录过程, 测得的活力也较高, 因此该系统日益受到人们重视⁽⁷⁾. 但该系统因结构和参与因素较为复杂, 下结论时要从多方面进行考虑. 本实验用小鼠肝癌细胞核系统证明羟喜能抑制

RNA 聚合酶 I(III) 和 II 的活力, 但究竟是影响核内可溶部分 RNA 聚合酶还是影响与染色质结合的酶, 以及是否通过影响染色质结构及功能等, 尚待研究.

致谢 舒荣生同志协助电镜制样和观察

参 考 文 献

- 1 中国科学院上海药物研究所. 中华医学杂志 1978; 58:598
- 2 Muramatsu M, Onishi T. Rapid isolation of nucleoli from detergent-purified nuclei of tumor and tissue culture cells. In: Prescott OM, ed. *Methods in cell biology*; vol 15. 1st ed. NY: Academic Press, 1977: 221
- 3 Daskal I, Ramirer SA, Ballal RN, Spohn WH, Wu B, Busch H. *Cancer Res* 1976; 36:1626
- 4 Valkin E, Cohn WE. Estimation of nucleic acids. In: Giick D, ed. *Methods of biochemical analysis*; vol 1. 1st ed. NY: Interscience Publ, 1954: 287
- 5 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951; 193: 265
- 6 黄道培、戴慧敏、李宝珪、仲金良. 生物化学和生物物理学报 1982; 14: 45

Acta Pharmacologica Sinica 1984 Sep; 5 (3) : 211-213

EFFECT OF 10-HYDROXYCAMPTOTHECIN ON NUCLEAR RNA POLYMERASE ACTIVITY IN HEPATOMA CELLS IN MICE

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

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

ABSTRACT 10-Hydroxycamptothecin (HC) is an effective antitumor alkaloid isolated from *Camptotheca acuminata*.

The nuclei from mouse hepatoma cells were isolated and purified. Under light and electron microscopes, the nuclei were intact and clean without cytoplasmic contaminants.

In vitro experiment: 30 min after incubation of the nuclei with HC 10-100 μM at 37°C, the activities of RNA polymerase II and I(III) were suppressed gradually. The dose for 50% of inhibition \approx 50 μM . The suppressive effect

of HC 50 and 100 μM on RNA polymerase II appeared generally at 10-15 min after incubation, whilst a similar effect on polymerase I(III) was seen at 30 min.

In vivo experiment: 4 h after the last ip injection of HC 10 mg/kg qd \times 3 to tumor-bearing mice, the activities of RNA polymerase II and I(III) in hepatoma nuclei were inhibited by 47% and 43%, respectively.

KEY WORDS 10-hydroxycamptothecin; hepatoma; cell nucleus; RNA polymerases