

# 阿克拉霉素 B 对瘤细胞 DNA 聚合酶 II 的影响

李占荣 冯剑波 韩锐 (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

尹明标 夏丽娟 (中国预防医学中心病毒研究所, 北京 100052)

**提要** 用 DEAE 纤维素, 磷酸纤维素和 DNA 琼脂糖亲和层析分离纯化的 Lewis 肺癌及 L 1210 白血病细胞 DNA 聚合酶 II( $\alpha$ ), 在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱上只显示一条多肽带, 并对 *N*-乙基马来酰亚胺(*N*-ethylmaleimide)有很高的敏感性。阿克拉霉素 B 对 Lewis 肺癌及 L 1210 白血病细胞 DNA 聚合酶 II 均有明显的抑制作用, 其  $IC_{50}$  分别为  $3.6 \mu\text{g}$  和  $5.3 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 。

**关键词** Lewis 肺癌; 模板; DNA 聚合酶 II; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 白血病 L 1210; [ $^3\text{H}$ ]胸腺嘧啶脱氧核苷酸; 阿克拉霉素 B; 乙基马来酰亚胺

阿克拉霉素 B(ACM B) 对 Lewis 肺癌, S 180 和 L 1210 白血病等有抗肿瘤活性<sup>(1,2)</sup>。ACM B 在正常大鼠及狗体内代谢, 组织分布以及对 L 1210 白血病细胞 DNA, RNA 生物合成的抑制作用已有报道<sup>(3,4)</sup>。为了探讨 ACM B 对肿瘤细胞 DNA 生物合成抑制作用的机制, 我们研究了它对 Lewis 肺癌和 L 1210 白血病细胞 DNA 聚合酶活性的影响。

## 材 料

ACM B 纯度 92.5%, 由四川抗菌素工业研究所提供, 按报道方法<sup>(1)</sup>配制。脱氧核苷三磷酸, dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 为美国 P-L 生化试剂公司产品。 [ $^3\text{H}$ ]dTTP 购自 New England Nuclear, 比活性为 77.8 Ci/mmol。小牛胸腺 DNA, 二硫苏糖醇(dithiothritol, DTT), *N*-乙基马来酰亚胺(*N*-ethylmaleimide, NEM) 和小牛血清蛋白为 Sigma 公司产品。DEAE 纤维素(Cellex-D), 磷酸纤维素 P 11 分别购自 Bio-Rad 和 Whatman 公司。DNA-agarose 为 Bethesda Research Laboratories 产品。活化小牛

胸腺 DNA 按报道方法<sup>(5)</sup>制备。

**肿瘤组织及白血病细胞** 用动物移植性肿瘤 Lewis 肺癌和接种后 d 4 的白血病细胞。

## 方法与结果

**DNA 聚合酶 II 活性测定** 按文献<sup>(5,6)</sup>方法进行。反应混合液为 0.1 ml, 其中含 Tris-HCl 50 mM pH 7.6; dATP, dCTP, dGTP, dTTP 分别为  $100 \mu\text{M}$ , [ $^3\text{H}$ ]dTTP 比活性为 20-30 cpm/pmol;  $\text{MgCl}_2$  2 mM, DTT 1 mM, BSA 10  $\mu\text{g}$ , 活化小牛胸腺 DNA 18  $\mu\text{g}$  和一定量酶溶液。反应混合液在 37°C 保温 20-30 min 后于冰浴冷却并加 100  $\mu\text{l}$  预冷的 20% TCA 中止反应。加 2 ml 10 mM 焦磷酸钠的 5% TCA 溶液。放置 5 min, 在玻璃纤维滤膜上收集酸不溶部分, 烤干。于 Beckman 9800 型液体闪烁计数器计数。DNA 聚合酶活性: 以 1 h 内催化 1 nmol 的脱氧核苷酸参入酸不溶部分所需要的酶量为 1 U。

**DNA 聚合酶 II 的纯化** 在 0-4°C 进行。Lewis 肺癌 40 g, 用缓冲液 A (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 蔗糖 0.25 M,  $\text{MgCl}_2$  1.0 mM, KCl 6.0 mM 和 DTT 1.0 mM) 冲洗后制成 20% 匀浆, 105 000  $\times$  g 离心 2 h, 取上清液为“F 1”, 比活性为 3.9 U/mg 蛋白。

用 45% 饱和度的硫酸铵沉淀“F 1”, 11 000  $\times$  g 离心 10 min, 取沉淀部分重新溶于缓冲液 A 中, 对缓冲液 B (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, KCl 5.0 mM, DTT 1.0 mM, EDTA 0.1 mM 和 20% 甘油) 透析过夜后的酶制剂为“F 2”, 比活性为 4.6 U/mg 蛋白。

“F 2”酶液加到预先经缓冲液 B 平衡的 DEAE 纤维素柱上 (2.5  $\times$  12 cm), 以 200 ml

缓冲液 B 冲洗杂蛋白, 然后用 0-0.5 M KCl 线性梯度洗脱, 酶活性高峰出现在 0.25 M KCl 处。合并酶活性部分。经透析过夜后为“F 3”, 其比活性为 15 U/mg 蛋白。

“F 3”酶液加到磷酸纤维素柱(1.4 × 13 cm)后, 经缓冲液 C (含有 30% 甘油的缓冲液 B, pH 7.2) 冲洗, 然后以含有 0.05 M KCl 的缓冲液 C 冲洗, 随后以 0.05-0.5 M KCl 线性梯度洗脱, 总体积为 150 ml, 酶活性峰值出现在 0.3 M KCl 附近。将酶活性部分合并对缓冲液 D (含有 50% 甘油的缓冲液 B) 透析并浓缩过夜为“F 4”, 酶的比活性为 444 U/mg 蛋白。

“F 4”酶液内加 EDTA 至 2 mM, 上 DNA-agarose 柱(3 ml)。用缓冲液 D 以及含有 0.05 M KCl 的缓冲液 D 冲洗后, 再用 0.05-0.5 M KCl 线性梯度洗脱。DNA 聚合酶的活性峰值出现在 0.25 M KCl 附近。合并酶活性部分经透析浓缩后为“F 5”, 其比活性为 2231 U/mg 蛋白, 置 -60℃ 保存。

用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对 DNA 聚合酶纯度进行了测定, 分离胶为 7.5% 的聚丙烯酰胺, 预电泳 1 h 后, 加入大约 2-4 μg 酶制剂继续电泳 4 h, 用考马士兰染色, 经 DEAE 纤维素, 磷酸纤维素及 DNA-agarose 亲和层析后的 Lewis 肺癌 DNA 聚合酶制剂基本呈现一条区带(图 1)。

**DNA 聚合酶 II 的鉴定** 在酶反应混合液内加入不同浓度的 NEM 或 硫酸铵, 观察酶活性的变化。由表 1 可见, 三个不同纯化阶段的

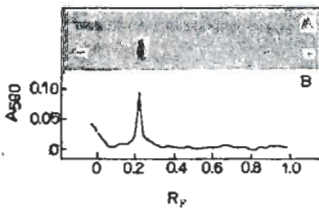


Fig 1. Nondenatured polyacrylamide gel electrophoresis of Lewis lung carcinoma DNA polymerase (fraction after DNA-agarose chromatography). The gel was stained with Coomassie blue (A) and scanned densitometrically (B).

Tab 1. Inhibition of Lewis lung carcinoma DNA polymerase activity (% ,  $\bar{x} \pm SD$ ) with *N*-ethylmaleimide 1-10 mM

|                  | 1 mM       | 5 mM       | 10 mM      |
|------------------|------------|------------|------------|
| DEAE-Cellulose   | 85.0 ± 5.0 | 91.1 ± 8.9 | 91.8 ± 1.6 |
| Phosphocellulose | 95.0 ± 7.2 | 100 ± 1.0  | 100 ± 0.5  |
| DNA-agarose      | 97.5 ± 0.4 | 100 ± 1.1  | 100 ± 0.3  |

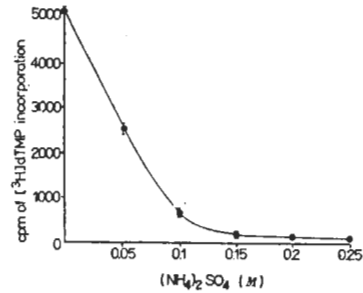


Fig 2. Sensitivity of Lewis lung carcinoma DNA polymerase from DNA-agarose column chromatography to salt concentration

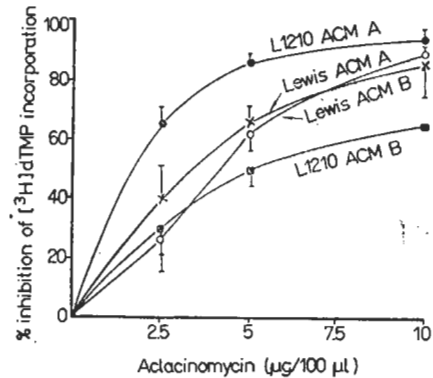


Fig 3. Effects of aclacinomycin A and B on DNA polymerases II from Lewis lung carcinoma and leukemia L 1210.

酶制剂对其特异抑制剂均有高度敏感性。图 2 表明, DNA-agarose 亲和层析后的 DNA 聚合酶活性在硫酸铵为 0.1 M 时, 可被抑制 85%。以上两实验结果证明该酶为 DNA 聚合酶 II<sup>(7)</sup>。L1210 细胞 DNA 聚合酶也以同样试验证明其为 DNA 聚合酶 II (NEM 0.5 mM 抑制该酶活性 88%)。

**ACM B 对 Lewis 肺癌和 L 1210 细胞 DNA 聚合酶活性的影响** 小鼠 Lewis 肺癌和 L 1210

细胞 DNA 聚合酶 II 对 ACM B 均较敏感。由图 3 可见,当 2.5, 5, 10  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  时, ACM B 对 Lewis 肺癌和 L 1210 细胞 DNA 聚合酶 II 活性分别抑制 39, 65, 85% 和 27, 50, 65%。ACM B 对 Lewis 肺癌 DNA 聚合酶 II 的  $\text{IC}_{50}$  为 3.6  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , 对 L 1210 细胞 DNA 聚合酶 II 的  $\text{IC}_{50}$  为 5.3  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 。

我们比较了 ACM A 对以上两个酶活性的抑制作用。ACM A 对 Lewis 肺癌 DNA 聚合酶 II 的作用与 ACM B 相似。其  $\text{IC}_{50}$  为 3.7  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 。但是 ACM A 对 L 1210 细胞的 DNA 聚合酶 II 的抑制作用较 ACM B 明显, 其  $\text{IC}_{50}$  为 1.6  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , 是 ACM B 对 L 1210 细胞 DNA 聚合酶的  $\text{IC}_{50}$  的 1/3。

## 讨 论

真核细胞内含有 4 种 DNA 聚合酶, 即 I( $\beta$ ), II( $\alpha$ ), III( $\gamma$ ) 和线粒体 DNA 聚合酶。其中 DNA 聚合酶 II 与 DNA 复制及细胞增殖有密切关系<sup>(8,9)</sup>。本工作用离子交换层析和亲和层析法制备了 L 1210 细胞和 Lewis 肺癌 DNA 聚合酶 II, 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示一条蛋白质区带, 说明该酶制剂是比较纯的。

我们尚未看到有关 Lewis 肺癌 DNA 聚合酶的报道。由于药物试验需要酶量较大, 我们不仅收集了酶活性的峰顶部分, 而且收集了高峰两侧活性较低部分, 故酶的比活性不很高。

ACM B 对这两种来源的 DNA 聚合酶 II 均有较强的抑制作用, 尤其对 Lewis 肺癌 DNA 聚合酶 II 的抑制作用更强。ACM A 对 Lewis 肺癌 DNA 聚合酶 II 的抑制与 ACM B 颇为相

似, 但对 L 1210 细胞 DNA 聚合酶 II 的抑制比 ACM B 强 3 倍。这与该两个药物对 L 1210 白血病和 Lewis 肺癌的肿瘤生长抑制实验结果<sup>(2)</sup>相符。

ACM B 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  对 L 1210 细胞 DNA 合成代谢的抑制为 57%<sup>(4)</sup>。而本实验中, ACM B 浓度在 5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  时, 对 L 1210 细胞 DNA 聚合酶 II 催化的试管内 DNA 合成抑制 50%。试管内 DNA 合成时的药物浓度较细胞内 DNA 合成时高许多倍。推测, 可能试管内 DNA 合成是无细胞开放体系之故。另外, ACM B 可能不仅抑制 DNA 聚合酶 II, 而且对 DNA 合成代谢的其他环节也有抑制作用。抑制 DNA 聚合酶 II 活性可能只是 ACM B 作用机制的一个方面。

## 参 考 文 献

- 1 庄镇华、陈荣秀。抗生素 1983; 8: 231
- 2 韩 锐、万家濂、董学良、陈荣秀、庄镇华。同上 1983; 8: 236
- 3 李占荣、王龙贵、冯剑波、庄镇华、韩 锐。同上 1984; 9: 110
- 4 李占荣、冯剑波、梁 菲、曾绍贤、韩 锐。中国医学科学院学报 1984; 6: 174
- 5 Li ZR (李占荣), Ho YK, Bardos TJ. *Cancer Biochem Biophys* 1983; 6: 221
- 6 Mechali M, Abadiebat J, Recondo AM. *J Biol Chem* 1980; 225: 2114
- 7 Weissbach A, Baltimore D, Bollum FJ, Gallo R, Korn D. *Science* 1975; 190: 401
- 8 Holmes AM, Hesslewood IP, Wickremasinghe RG, Johnston IR. *Biochem Soc Symp* 1977; 42: 17
- 9 Chen YC, Bohn EW, Planck SR, Wilson SH. *J Biol Chem* 1979; 254: 11678

## EFFECT OF ACLACINOMYCIN B ON DNA POLYMERASE II OF TUMOR CELLS

LI Zhan-rong, FENG Jian-bo, HAN Rui

(*Inst Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

YIN Ming-biao, XIA Li-juan

(*Inst Virology, China National Centre for Preventive Medicine, Beijing 100052*)

**ABSTRACT** DEAE-cellulose, phosphocellulose and DNA-agarose affinity chromatography were used to isolate and purify the DNA polymerase II from L 1210 cells and Lewis lung carcinoma. The enzyme showed a single polypeptide band on the profile of non-denaturing polyacrylamide electrophoresis and possessed high sensitivity to *N*-ethylmaleimide (NEM). Aclacinomycin B inhibited potently DNA polymerase II from

the 2 sources. The  $IC_{50}$  was 3.6  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  and 5.3  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  for Lewis lung carcinoma and the L 1210 enzymes, respectively.

**KEY WORDS** Lewis lung neoplasms; templates; DNA polymerase II; polyacrylamide gel electrophoresis; leukemia L 1210; [ $^3\text{H}$ ] thymine nucleotide; aclacinomycin B; ethylmaleimide