

# 合成的异三尖杉酯碱对小鼠移植瘤细胞 DNA, RNA, ATP, 蛋白质和核蛋白代谢的影响<sup>1</sup>

刘力生、肖显华、张龙弟、郑荣梁<sup>2</sup>、李绍白<sup>3</sup>、崔育新<sup>3</sup>、潘鑫复<sup>3</sup>、李裕林<sup>3</sup>  
(兰州大学生物物理教研室, 有机化学研究所<sup>3</sup>, 兰州 730001)

**提要** 异三尖杉酯碱 20 μg/ml 在体外能显著抑制 [<sup>3</sup>H]TdR, [<sup>3</sup>H]UR, [<sup>3</sup>H]Leu 参入 L 7712 白血病细胞的 DNA, RNA 和蛋白质。培养 12, 24, 36 和 48 h 后, 对 <sup>32</sup>P-磷酸盐参入核蛋白的抑制率依次为 75, 92, 96 和 98%, 参入电泳法分离其 ATP 抑制率为 70, 78, 88 和 92%。IH<sub>8</sub>, IH<sub>1</sub>, IH<sub>2</sub> 和 IH<sub>n</sub> 的 ID<sub>50</sub> 依次为 4, 62, 46 和 0.9 μg/ml。IH<sub>8</sub> 对 S180 和 AH 细胞 DNA 合成的抑制率分别为 70 和 83%。

**关键词** 合成的异三尖杉酯碱; 立体异构体; 白血病 L7712; 肉瘤 180; 腹水型肝癌; [<sup>3</sup>H]胸腺嘧啶脱氧核苷; [<sup>3</sup>H]尿嘧啶核苷; [<sup>3</sup>H]亮氨酸; 腺苷三磷酸; 核蛋白

异三尖杉酯碱 (isoharringtonine) 是从三尖杉属 (*Cephalotaxus*) 植物中分离出具有抗癌活性的 4 种酯碱之一<sup>(1-3)</sup>。三尖杉酯碱 harringtonine 对白血病细胞的 DNA 和蛋白质合成有抑制作用<sup>(4)</sup>。本文研究人工合成的异三尖杉酯碱<sup>(5,6)</sup> 对 615 小鼠 L 7712 白血病细胞 DNA, RNA, ATP, 蛋白质和核蛋白代谢的影响及其对 S 180 和腹水型肝癌细胞 DNA 合成的抑制作用。

## 实验材料

**癌细胞** 无菌取接种 d 5 的 L7712 白血病<sup>(7)</sup> 或 S 180 或腹水型肝癌 (AH) 的癌细胞, 生理盐水洗涤一次, 计数配成所需浓度。

**培养液** 199 培养液 (Difco 产品) 内含 20% 的小牛血清和青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μg/ml。

**药物** 合成的异三尖杉酯碱 (IH<sub>8</sub> 包含 4 种立体异构体)<sup>(5,6)</sup>, 异构体 1 (IH<sub>1</sub>), 异构体

2 (IH<sub>2</sub>), 天然立体异构体 (IH<sub>n</sub>), 用 pH 4 的无菌水稀释。

**标记物** [<sup>3</sup>H]脱氧胸苷 ([<sup>3</sup>H]TdR, 比强度 999 GBq/mmol), [<sup>3</sup>H]尿苷 ([<sup>3</sup>H]UR, 740 GBq/mmol), [<sup>3</sup>H]亮氨酸 ([<sup>3</sup>H]Leu, 2.96 TBq/mmol) 为上海原子核研究所产品, [<sup>32</sup>P]磷酸氢二钠, 中国科学院北京原子核研究所产品。

**消化剂** 过氯酸和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 容量比 1:1。

**闪烁液** 0.5% PPO 和 0.01% POPOP 的二甲苯溶液与乙二醇甲醚, 6:4 (v:v)。

**标准 ATP** 西德 Boehringer 产品。

## 方法与结果

**比较 S180, AH 和 L7712 癌细胞 DNA 合成的抑制作用** 用体外培养细胞 [<sup>3</sup>H]TdR 参入法<sup>(8)</sup> 将上述 S180, AH 或 L7712 癌细胞分别用 199 培养液配成 4 × 10<sup>5</sup>/ml 的细胞悬液, 每瓶分装 5 ml, 37°C 温育 14 h 后, 随机分组,

Tab 1. Inhibition of synthetic isoharringtonines (99 μg/ml) on incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine into DNA of sarcoma 180, ascitic hepatoma and leukemia 7712 cells in mice.  $\bar{x} \pm SD$ , \*\*\*p < 0.01

Group		[ <sup>3</sup> H]TdR in DNA (10 <sup>-2</sup> × cpm)
S180	Control	574 ± 22
	Treated	173 ± 5***
AH	Control	1854 ± 75
	Treated	323 ± 12***
L7712	Control	5406 ± 195
	Treated	30 ± 1***

1984年8月20日收稿 1985年5月27日修回

<sup>1</sup> 中国科学院科学基金资助的课题

<sup>2</sup> 通讯联系人

每组3瓶,向实验组加入0.05 ml 1% IH<sub>s</sub>(终浓度为99 μg/ml)、对照组加入相应 pH 4 水溶液,并加0.05 ml 的 [<sup>3</sup>H]TdR 使培养液成 37 KBq/ml. 37°C 温育 48 h,离心、洗涤、消化,并用 10 ml 闪烁液分 3 次将消化物全部移入测量杯,置 FJ-2100 型自动液体闪烁计数器测量,结果 L 7712 细胞对 IH<sub>s</sub> 最为敏感, AH 次之, S180 较差(表 1).

对 L7712 细胞 DNA 合成抑制的 ID<sub>50</sub> 用 199 培养液配制 L7712 癌细胞 4 × 10<sup>5</sup>/ml 悬液,每瓶分装 5 ml, 37°C 温育 14 h 后,随机分成 5 组,每组 15 瓶,每个剂量组重复 3 瓶, IH<sub>s</sub>, IH<sub>1</sub>, IH<sub>2</sub> 分别按 2, 10, 20, 40, 60, 80 和 100 μg/ml 的浓度加入, IH<sub>n</sub> 按 0.2, 0.4, 1 和 2 μg/ml 的浓度加入,对照组加入 pH 4 水溶液,同时如上法加 [<sup>3</sup>H]TdR, 37°C 培育 48 h 后,测量放射性,分别比较对照组与各不同剂量组的平均 cpm 值,得到 [<sup>3</sup>H]TdR 参入 L7712 细胞 DNA 的抑制曲线(图 1). 从图 1 看, IH<sub>s</sub>, IH<sub>1</sub>, IH<sub>2</sub> 和 IH<sub>n</sub> 的 ID<sub>50</sub> 依次为 4, 62, 46 和 0.9 μg/ml.

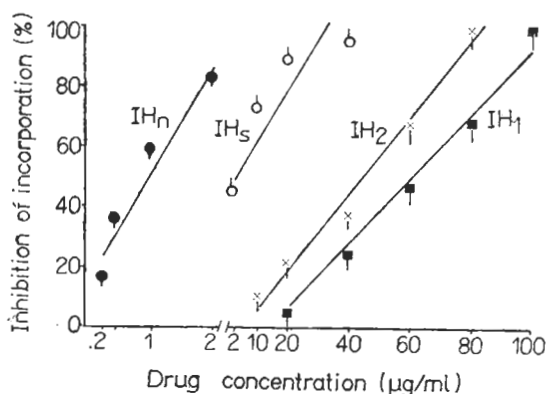


Fig 1. Inhibition of DNA synthesis of leukemia 7712 cells *in vitro* by stereoisomers of isoharringtonine.  $\bar{x} \pm SD$ .

对 DNA, RNA 和蛋白质合成的影响 将 L7712 细胞用 199 培养液配成 4 × 10<sup>5</sup>/ml 悬液,每瓶分装 5 ml, 37°C 温育 14 h 后,随机分组,每组 12 瓶,向实验组各瓶加入 0.02 ml 0.5% 的 IH<sub>s</sub> 溶液(终浓度 20 μg/ml), 对照组

加入 pH 4 水,并立即向每瓶分别加入 0.05 ml [<sup>3</sup>H]TdR 或 [<sup>3</sup>H]UR 或 [<sup>3</sup>H]Leu, 使成 37 KBq/ml. 37°C 继续培育 12, 24, 36 和 48 h, 分别取出离心、洗涤、消化,测量其放射性,得到它对 DNA, RNA 和蛋白质合成的动态抑制曲线(图 2). 图 2 指出, IH<sub>s</sub> 20 μg/ml 对 L7712 细胞蛋白质合成的抑制作用最强, DNA 次之, RNA 较低.

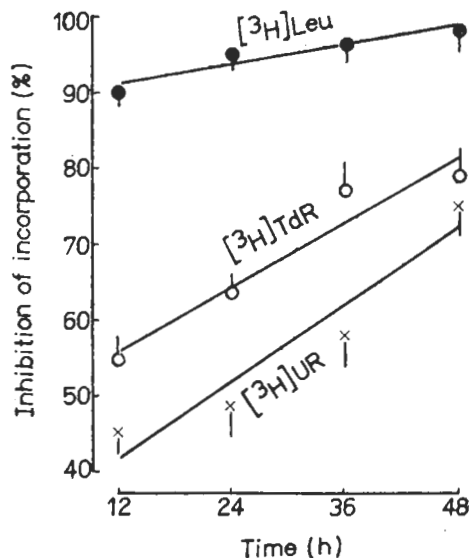


Fig 2. Inhibition of synthetic isoharringtonine 20 μg/ml on [<sup>3</sup>H]TdR, [<sup>3</sup>H]UR and [<sup>3</sup>H]Leu incorporations into leukemia 7712 cells *in vitro*.  $\bar{x} \pm SD$ .

对核蛋白代谢的影响 方法同上,唯标记物用 [<sup>32</sup>P]Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, L7712 细胞悬液为 2 × 10<sup>5</sup>/ml, 每瓶分装 20 ml, 同时加入药物和标记物后,培育 12, 24, 36 和 48 h, 取出癌细胞在 0-4°C 下用生理盐水洗涤 4 次,加 5% 三氯醋酸 5 ml, 在 0-4°C 用 JC-2 型超声处理机破碎细胞 5 min, 用钡盐提取法分离核蛋白和 ATP.

按文献<sup>(9)</sup>取样和测量 β 射线, 取重复 3 个样品 cpm 的平均值. 结果如图 3. 对照组 <sup>32</sup>P 参入核蛋白的量, 对时间呈线性上升, 而实验组则相反. 各时间给药组的 <sup>32</sup>P 参入率比对照组的越来越低, 其抑制率依次为 75, 92, 96 和 98%.

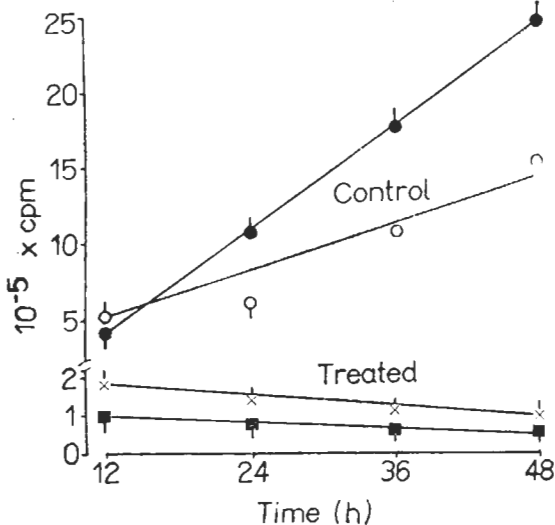


Fig 3. Incorporation of [ $^{32}\text{P}$ ] into ATP (●, ■) and nucleoprotein (○, ×) of leukemia 7712 cells in mice treated with synthetic isoharringtonine 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $\bar{x} \pm \text{SD}$ .

**对 ATP 含量的影响** 从上法分得 L7712 细胞的 ATP 等腺苷类物质的酸溶钡不溶组份, 用标准 ATP 作对照, 电泳分离样品中的 ATP, 如前法测量其放射性强度, 结果如图 3。对照组  $^{32}\text{P}$  的参入率随时间延长而增高, 给药组却随时间延长而下降。各对应时间实验组的抑制率依次为 70, 78, 88 和 92%。

## 讨 论

$\text{IH}_8$ ,  $\text{IH}_1$ ,  $\text{IH}_2$  和  $\text{IH}_n$  抑制 L7712 细胞 DNA 合成的  $\text{ID}_{50}$  依次为 4, 62, 46 和 0.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。这表明  $\text{IH}_n$  对癌细胞 DNA 合成的抑制作用比  $\text{IH}_1$ ,  $\text{IH}_2$  高 51-68 倍, 显示药物分子的立体异构体对癌细胞的抑制作用有较大影响, 即癌细胞对药物分子的不同立体异构体具有不

同的反应和选择性。 $\text{IH}_8$  中  $\text{IH}_n$  约占 1/4, 其  $\text{ID}_{50}$  也为  $\text{IH}_n$  的 4.4 倍, 表明  $\text{IH}_8$  的抑制效能主要是  $\text{IH}_n$  的作用。它们  $\text{ID}_{50}$  都在 1-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  内, 可认为都是有效抗癌药物<sup>(10)</sup>。

$\text{IH}_8$  对上述代谢动态影响的过程中, 对蛋白质的抑制始终比对 DNA 的高, 这与三尖杉酯碱的作用<sup>(4)</sup>相类似。本工作表明, 合成的异三尖杉酯碱对蛋白质和核蛋白合成前体参入的抑制率都在 90% 以上, 似乎显示核酸与核蛋白的合成并不按比例同时进行。该药对癌细胞蛋白质合成前体参入的抑制率较高, DNA 次之, RNA 较低, 而且它对核蛋白和 ATP 代谢抑制的动态过程具有平行关系(图 3), 因此, 该药对癌细胞的抑制作用, 可能与 DNA  $\rightarrow$  RNA  $\rightarrow$  蛋白质这样一个分子转录与翻译的过程受阻有关, 同时也与其 ATP 代谢受抑制有紧密的关系。

## 参 考 文 献

- 1 Powell RG. *J Pharm Sci* 1972; 61: 1227
- 2 全国三尖杉研究协组. 肿瘤防治研究 1976; 1: 12
- 3 中国医学科学院药物研究所, 中国人民解放军 187 医院. 化学学报 1976; 34: 283
- 4 吴冠芸, 方德福, 左瑾. 中国医学科学院学报 1982; 4: 78
- 5 潘鑫复, 李裕林, 李绍白, 等. 科学通报 1982; 27: 1048
- 6 李绍白, 崔育新, 李裕林, 等. 兰州大学学报(自然科学版) 1982; 18: 179
- 7 郑升, 孟德鸣, 张永基, 等. 肿瘤 1982; 2: 6
- 8 Lea MA, Morris HP, Weber G. *Cancer Res* 1966; 26: 465
- 9 刘力生, 肖显华, 王肖萱, 郑荣梁, 周秀芳. 中国药理学报 1984; 5: 130
- 10 Smith CG, Lummis WL, Grady JE. *Cancer Res* 1959; 19: 843

## Effects of synthetic isoharringtonine on DNA, RNA, ATP, protein and nucleoprotein of transplanted tumour cells in mice<sup>1</sup>

LIU Li-sheng, XIAO Xian-hua, ZHANG Long-di, ZHENG Rong-liang<sup>2</sup>, LI Shao-bai<sup>3</sup>, CUI Yu-xin<sup>3</sup>, PAN Xin-fu<sup>3</sup>, LI Yu-lin<sup>3</sup>

(Section of Biophysics, Inst Organic Chemistry<sup>3</sup>, Lanzhou University, Lanzhou 730001)

**ABSTRACT** Synthetic isoharringtonine (IH<sub>s</sub> 20 µg/ml) inhibited the incorporations of [<sup>3</sup>H]thymidine, [<sup>3</sup>H]uridine and [<sup>3</sup>H]leucine into DNA, RNA and protein syntheses of leukemia 7712 cells during the period of 12-48 h after exposure *in vitro*. The degree of inhibition increased with the incubation time. After the L7712 cells were treated with IH<sub>s</sub> 20 µg/ml for 12, 24, 36 and 48 h, the incorporations of [<sup>32</sup>P]Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> into nucleoprotein were inhibited by 75, 92, 96 and 98%, and those into ATP were inhibited by 70, 78, 88 and 92%, respectively. ID<sub>50</sub> of stereoisomers of synthetic isoharringtonine-IH<sub>s</sub>, IH<sub>1</sub>, IH<sub>2</sub> and IH<sub>n</sub> on DNA synthesis in L7712

cells incubated for 48 h were 4, 62, 46 and 0.9 µg/ml, respectively. After S180 and ascitic hepatoma cells were treated with IH<sub>s</sub> 99 µg/ml for 48 h, the incorporations of [<sup>3</sup>H]thymidine into DNA were inhibited by 70 and 83%, respectively.

**KEY WORDS** synthetic isoharringtonines; stereoisomers; leukemia 7712; sarcoma 180; ascitic hepatoma; [<sup>3</sup>H]thymidine; [<sup>3</sup>H]uridine; [<sup>3</sup>H]leucine; adenosine triphosphate; nucleoproteins

<sup>1</sup> Projects supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed.