

# 羟基喜树碱对小鼠肝癌细胞染色质蛋白合成的影响

凌义和、赵朝省<sup>1</sup>、胥 彬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 体外 50-200  $\mu\text{M}$  或体内 ip 羟基喜 0.5-10 mg/kg 能程度不等地抑制肝癌细胞核内组蛋白和非组蛋白的合成, 但不影响细胞质和核浆蛋白的合成。羟基喜对 DNA, 组蛋白和非组蛋白合成抑制的时间动力学曲线是相似的。此外, 发现博莱霉素 A 5 的作用和羟基喜相类似, 而高三尖杉酯碱, Act D, 消瘤芥对细胞内各种蛋白均有抑制作用。

**关键词** 10-羟基喜树碱; 博莱霉素 A 5; 高三尖杉酯碱; 放线菌素 D; 消瘤芥; 肝癌细胞; 组蛋白; 非组蛋白

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生物碱, 能明显抑制肿瘤细胞 DNA 合成, 引起姐妹染色单体交换频率增加, 表明对染色体的结构和功能有一定的影响<sup>(1,2)</sup> 本文观察它对小鼠肝癌细胞核内染色质蛋白合成的影响。

## 材 料 和 方 法

**试剂和药品** 羟基喜由湖北黄石制药厂供给, 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。博莱霉素系华北制药厂出品。放线菌素 D、高三尖杉酯碱及消瘤芥分别由我所抗菌素、植化和合成研究室提供。

[<sup>3</sup>H]Leu (2.0 TBq/mmol) 及 [<sup>3</sup>H]TdR (740 GBq/mmol) 是中国科学院上海原子核所出品。

**瘤株和细胞培养** 取接种后 7-9 d 的小鼠腹水肝癌细胞 400 × g 离心去腹水后用冷生理盐水洗 2 次, 用 10 倍容量内含 5% 小牛血清

及 0.03 M HEPES 的 Hanks(pH 7.4) 培养液配成 2 × 10<sup>6</sup> 细胞/ml 悬液。取细胞悬液 0.5 ml 加入等容量不同浓度羟基喜及 185 GBq [<sup>3</sup>H]Leu 或 74 GBq [<sup>3</sup>H]TdR 于 37℃ 水浴内轻摇温育 1 h 后分离细胞核质并观察 [<sup>3</sup>H]Leu 参入各部分蛋白或 [<sup>3</sup>H]TdR 参入 DNA 的影响。

**细胞核的分离及核内蛋白提取** 按文献(3)法分离小鼠肝癌细胞核, 所得的细胞质置于冰浴内, 加 2 倍容量 10% TCA 使蛋白质沉淀, 然后用 5% TCA 洗 2 次, 无水乙醇洗 1 次, 所得的细胞质蛋白用 85% 甲酸溶解, 细胞核用 1 ml 0.15 M NaCl, 10 M Tri-HCl 于冰浴内提取核浆蛋白, 共 2 次, 所得丝状染色质沉淀与 0.4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 于 0-4℃ 下作用 1 h, 10 000 × g 离心 20 min 以提取组蛋白, 将 2 次提取的蛋白液合并, 加入 10 倍容量无水乙醇 0-4℃ 放置过夜, 400 × g 离心得组蛋白沉淀, 用无水乙醇洗 1 次, 丙酮洗 2 次, 无水乙醚洗 1 次, 低温干燥后, 用适量蒸馏水溶解, 经上述提取余下的非组蛋白部分用 85% 甲酸溶解。

**蛋白质和 DNA 测定** 用 Folin 试剂<sup>(4)</sup> 测定蛋白质浓度, 用二苯胺<sup>(5)</sup> 测定 DNA 含量。

**放射性测定** 取 0.2 ml 上述各部分蛋白质溶液, 置于液闪计数杯内, 放入 6 ml 内含 0.4% PPO, 0.01% POPOP 乙二醇乙醚及二甲苯的闪烁液, 用国产 YSJ-78 型自动液体闪烁仪测定样本的放射性。

## 结 果

**羟基喜对 [<sup>3</sup>H]Leu 参入肝癌细胞各部分蛋白的影响** 不同浓度(50-200  $\mu\text{M}$ )羟基喜在体外与肝癌细胞作用 1 h 后, 对 [<sup>3</sup>H]Leu 参入细胞质蛋白和核浆蛋白无影响, 而能抑制组蛋白和非组蛋白的合成, 其中对组蛋白的抑制较非组蛋

1985年3月12日收稿 1985年5月29日修回  
1984年12月在全国首届生化药理学术会议(苏州)上宣读

<sup>1</sup> 广西中医药研究所

白强(图1)。

给带瘤小鼠 ip 羟喜 0.5-10 mg/kg 后 4 h 观察对肝癌细胞不同蛋白质合成的影响结果见图2。随着羟喜剂量的增加,对 $[^3\text{H}]$ Leu 参入细胞质蛋白和核浆蛋白非但无抑制,且有升高的趋势,而对组蛋白和非组蛋白参入抑制随羟喜剂量增加而增加。

ip 羟喜 10 mg/kg/d  $\times$  3 d 对肝癌细胞质蛋白和核浆蛋白的合成呈抑制作用。从抑制率来看,组蛋白为 75%,非组蛋白为 50%,核浆蛋白为 33%,细胞质蛋白为 30%。以上结果说明,羟喜对核内构成染色质的蛋白作用较为明显,特别对组蛋白的作用尤为显著。

**羟喜对染色质蛋白和 DNA 合成抑制的关系** 用 100  $\mu\text{M}$  羟喜与肝癌细胞在体外作用不同时间,观察药物对 DNA,组蛋白和非组蛋白合成影响的时间动力学过程。结果(图3)表明,在羟喜作用 10 min 后,出现对 DNA,组蛋白及非组蛋白合成的抑制,其抑制的时间动力学曲线颇相类似。

体内 ip 羟喜 10 mg/kg, 观察给药后不同时间间隔对 DNA 及组蛋白和非组蛋白合成的影响,结果(图4)表明,给药后 0.5 h 对 DNA,组蛋白和非组蛋白已产生抑制作用,至 2-4 h 抑制作用最强,8-12 h 对 DNA 合成的抑制逐步消失,组蛋白和非组蛋白的合成也趋恢复。这些结果提示在羟喜作用下 DNA 合成和染色质蛋白合成呈一定的关联。

**其它抗癌药对肝癌细胞蛋白合成的影响** DNA 单链断裂剂博来霉素 A 5 和羟喜的结果相类似,即只影响组蛋白和非组蛋白的合成。蛋白质合成抑制剂高三尖杉酯碱对肝癌细胞多种蛋白合成均有很强的抑制作用。氮芥类药物消瘤芥及影响转录水平的药物放线菌素 D 对肝癌细胞不同蛋白的合成也有一定的抑制作用(表1)。

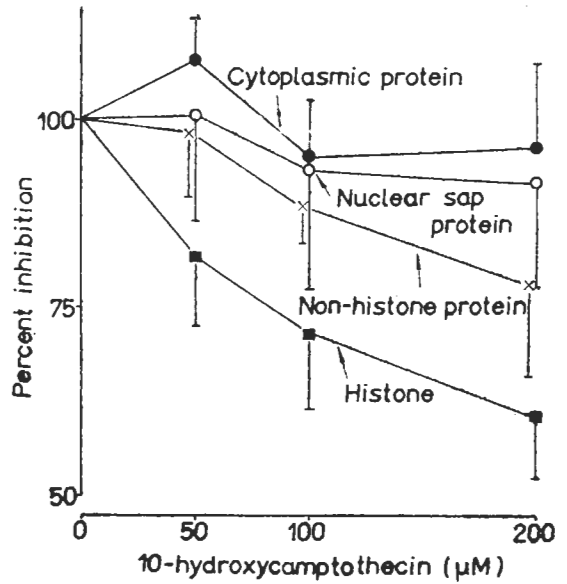


Fig 1. Effects of 10-hydroxycamptothecin on synthesis of proteins in murine hepatoma cells *in vitro*. ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

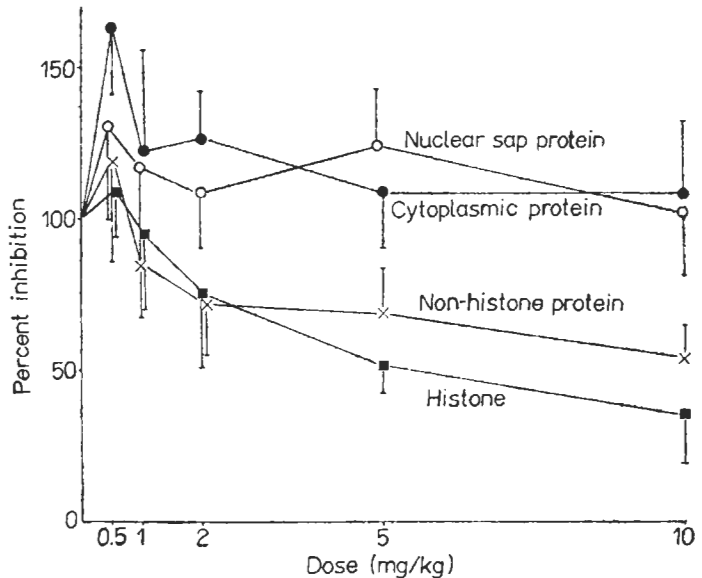


Fig 2. Effects of ip 10-hydroxycamptothecin on syntheses of proteins in mice bearing hepatoma cells. ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

## 讨 论

不少抗癌药物能选择性地作用于染色质蛋白,特别是抑制组蛋白的合成,从而影响肿瘤

细胞的生长<sup>(6-8)</sup>。从本文的结果看,羟喜也能选择性地抑制组蛋白和非组蛋白的合成,对DNA又有较强的作用,因此我们认为它的主要

作用点可能在于构成染色质纤维的DNA,及有关蛋白质分子上。

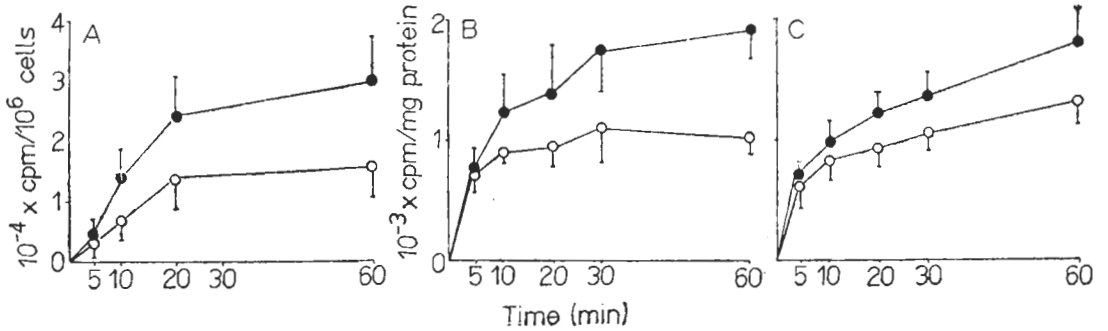


Fig 3. Time course for syntheses of DNA (A), histone (B) and non-histone (C) protein inhibited by 10-hydroxycamptothecin in murine hepatoma cells *in vitro*. ● control; ○ 100  $\mu$ M 10-hydroxycamptothecin. ( $\bar{x} \pm SD$ )

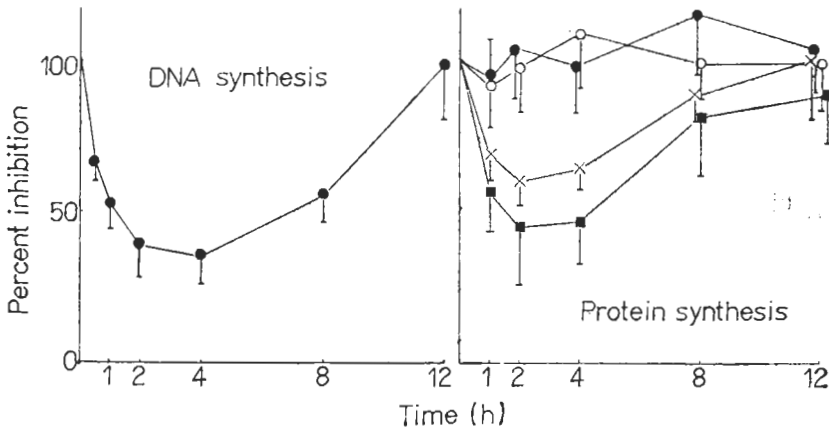


Fig 4. Effects of ip 10-hydroxycamptothecin 10 mg/kg on syntheses of DNA and proteins in murine hepatoma cells after different intervals. ● nuclear sap protein; ○ cytoplasmic protein; × non-histone protein; ■ histone ( $\bar{x} \pm SD$ )

Tab 1. Effects of 10-hydroxycamptothecin (HC), bleomycin A 5 (BLM), homoharringtonine (HHT), actinomycin D, and nitrocapane (AT-1258) on [<sup>3</sup>H]Leu incorporation into 4 proteins in murine hepatoma cells. (cpm/mg,  $\bar{x} \pm SD$ ) \*  $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

Group	Cytoplasmic protein	Nuclear sap protein	Histone	Non-histone protein
Control	1165 $\pm$ 355	1216 $\pm$ 136	1122 $\pm$ 264	1132 $\pm$ 270
HC 10 mg/kg	1152 $\pm$ 291*	1326 $\pm$ 252*	674 $\pm$ 189**	628 $\pm$ 246**
BLM 30 mg/kg	1216 $\pm$ 234*	1213 $\pm$ 86*	757 $\pm$ 119**	779 $\pm$ 160**
HHT 1 mg/kg	251 $\pm$ 77***	343 $\pm$ 91***	262 $\pm$ 148***	198 $\pm$ 49***
Act D 50 $\mu$ g/kg	933 $\pm$ 280*	1095 $\pm$ 348*	854 $\pm$ 249*	941 $\pm$ 356*
AT-1258 4 mg/kg	633 $\pm$ 205*	647 $\pm$ 22**	464 $\pm$ 126***	525 $\pm$ 22**

## 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 王心伟, 乐秀芳, 胥 彬, 等. 科学通报 1984; 8: 505
- 3 凌义和, 俞伟娟, 胥 彬. 中国药理学报 1984; 5: 505

- 4 Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951; 193: 265
- 5 Burton K. *Biochem J* 1956; 62: 351
- 6 Reches GP, Hurrup KR. *Cancer Res* 1973; 33: 389
- 7 Wolf H, Gaydt G, Puschendorf B, Grunicke H. *FEBS Lett* 1973; 35: 336
- 8 Jenery A, Dzurillay E, Dapis K, Volko E. *Chem Biol Interact* 1979; 26: 349

*Acta Pharmacologica Sinica* 1986 May, 7 (3): 285-288

## Effects of 10-hydroxycamptothecin on chromatin protein synthesis in murine hepatoma cells

LING Yi-he, ZHAO Chao-shen, XU Bin

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

**ABSTRACT** 10-Hydroxycamptothecin (HC) is a new antitumor alkaloid isolated from *Camptotheca acuminata* indigenous to China. After 60-min incubation of hepatoma cells with 50-200  $\mu$ M HC *in vitro*, the syntheses of histone and non-histone protein (NHP) in nuclei were inhibited gradually while the syntheses of cytoplasmic and nuclear sap proteins (0.15 M NaCl soluble part) were much less altered.

In mice bearing ascites hepatoma, 4 h after ip HC 0.5-10 mg/kg an obvious dose-dependent inhibitions of histone and NHP synthesis were observed, but the reductions in syntheses of cytoplasmic and nuclear sap proteins did not appear until ip HC 10 mg/kg/d  $\times$  3 d. It suggested that HC was more active on chromatin protein synthesis than others.

The time course of its effects on

syntheses of DNA, histone and NHP both *in vitro* and *in vivo* indicated that the initial, peak, and recovery of suppressive effect caused by HC occurred essentially at the same time. Such findings were coincident with the concept of tight coupling of synthesis of DNA and chromatin protein, particularly histone.

Bleomycin A 5, a DNA single-strand scissor, inhibited the syntheses of histone and NHP only, while homoharringtonine, actinomycin D, and nitrocapane produced the depressive influences on syntheses of all kinds of proteins.

**KEY WORDS** 10-hydroxycamptothecin; bleomycin A 5; homoharringtonine; actinomycin D; nitrocapane; hepatoma cells; histones; non-histone proteins