中国药理学报　1986年7月；7(4)：373-377

3-氨基苯甲酰胺对S180细胞DNA复制和修复合成的影响

陈　关、潘启超　（中山医科大学肿瘤研究所，广州 510026）

提要　用[^{3}H]TdR为前体物研究3 AB对S180细胞DNA复制和修复合成的影响。结果发现3 AB浓度为2 m*M*时能刺激$BLMA_5$损伤后的DNA修复合成，浓度增至5 m*M*，本身对DNA复制合成就有抑制作用，10 m*M*时，还能加强$BLMA_5$对DNA复制合成的抑制作用。抑制作用以5 h时最明显，对修复合成的刺激作用3 h最强。

关键词　3-氨基苯甲酰胺；　脱氧核糖核酸复制；脱氧核糖核酸修复；　肉瘤180；　博莱霉素A_5

聚(腺苷二磷酸—核糖)[聚(ADP-R)]是细胞内天然存在的大分子，已发现它和DNA复制、修复及细胞分化等多种生命现象有关，特别是参与DNA切除修复的作用较为肯定[1]。国外很多报道3-氨基苯甲酰胺(3AB)等ADP-R转移酶(ADPRT)抑制剂能刺激非时序DNA合成(UDS)[2-6,10]，我们证实了3AB能加强博莱霉素A_5($BLMA_5$)的抗瘤作用[7]，本文以[^{3}H]TdR作为DNA合成的前体物，用$BLMA_5$作为DNA损伤剂，分别观察了3AB对DNA复制和修复合成的影响，并对其作用机制进行了探讨。

1985年4月4日收稿　1985年11月28日修回

材料和方法

可移植性瘤株　S180细胞由本所抗癌药物研究室提供。以每周一次于小鼠皮下接种传代。

药物、标记前体和培养液　3AB，日本东京化成工业株式会社生产，溶于培养液。盐酸$BLMA_5$，华北制药厂生产，批号820101，

10 mg/支，溶于生理盐水。羟基脲(HU)，山东济南制药厂惠赠，用前用生理盐水配制。[^{3}H]TdR 中国科学院原子能研究所生产，比放射性 851 GBq/mol，放射性强度 37 MBq/ml。RPMI-1640 培养基粉剂由日水制药株式会社生产。49 型玻璃纤维滤纸由上海红光造纸厂生产，孔径<0.3 μm。

方法 参考文献[3,5]略加改动。

1. 实验步骤 取接种 7-8 d 小鼠 S 180 (腹水型)生长良好的腹水，离心 1500 rpm × 5 min，弃上清，用生理盐水旋洗沉淀一次，用预温的 RPMI-1640(含 2.5% 小牛血清，0.03% 谷氨酰胺，pH 7.2)培养液重悬，终浓度为 1×10^6/ml，计数台盼蓝拒染细胞。对照组和处理组各设 3 复管，每管加细胞悬液 1 ml，处理组加入 $BLMA_5$，终浓度 5 μg/ml，对照组加等量生理盐水。37℃ 转动培养 30 min 后，用 SSC (0.15 *M* NaCl，15 m*M* 柠檬酸钠)溶液和生理盐水 1500 rpm × 8 min 各洗一次，再用预温的新鲜培养液及含有不同浓度的 3 AB 溶液 1 ml 稀释，充分混匀后 37℃转动培养至不同时间，最后 1 h，观察 DNA 修复合成的各管加入 HU，终浓度 2 m*M*，观察 DNA 复制的各管加入生理盐水。实验各管均加入[^{3}H]TdR，(终浓度 37 kBq/ml)。培养结束时，各管加入等量预冷生理盐水，投入 4℃冰箱。

2. 测量样品的制备 将样品收集于 49 型玻璃纤维滤纸上，依次用 10 ml 生理盐水、50 ml 蒸馏水洗脱，5%三氯醋酸 5 ml 固定，5 ml 无水乙醇脱水，将纸片置于 65℃，烘烤 30 min。

3. 样品测量及结果处理 闪烁液含 ppo 3.5 g，popop 0.25 g。二甲苯 500 ml，LKB 1215 液闪仪测量，测量效率为 44%，结果取三管平均值，以 dpm 对照组的%表示，各组之间用配对 *t* 检验判断其显著性。

实验结果

3AB 对 DNA 复制和修复合成的影响 图 1 总结了不同剂量 3AB 对 S180 细胞 DNA 复制和修复合成的影响。无 HU 时，计数较高，加入 2 m*M* HU 后减少约 90%，这里剩余的约 10%参入量则代表残留的半保留复制[5]。

Tab 1. Effect of 3-aminobenzamide on DNA synthesis in undamaged and bleomycin A_5-treated S 180 cells. dpm [^{3}H] TdR/10^6 cells per hour

Expt	$BLMA_5$ (μg)	3 AB (m*M*)	In the absence of 2 m*M* hydroxyurea $\bar{x}\pm$SD	%	p	In the presence of 2 m*M* hydroxyurea $\bar{x}\pm$SD	%	p
	–	–	176 558±76 634	100		14 206±3 848	100	
	–	1	158 749±72 317	90	>0.05†	13 605±3 824	96	>0.05†
	–	2	154 375±81 114	87	>0.05†	13 462±3 499	95	>0.05†
I	5	–	101 765±32 272	58	>0.05†	11 758±3 353	83	>0.05†
	5	1	102 886±42 276	58	>0.05‡	12 469±3 014	88	>0.05‡
					>0.05 §			>0.05 §
	5	2	96 097±30 117	54	>0.05‡	13 307±3 470	94	>0.05‡
					>0.05 §			<0.005 §
	–	–	156 813±25 204	100		16 989±9 384	100	
	–	5	129 324±29 930	83	<0.05†	16 351±9 722	96	>0.05†
	–	10	111 282±28 083	71	<0.05†	14 800±9 117	87	<0.001†
II	5	–	89 808±27 659	57	<0.05†	12 459±8 959	74	<0.02†
	5	5	81 094±21 915	52	<0.05‡	15 438±8 367	91	>0.05‡
					>0.05 §			<0.05 §
	5	10	68 354±18 337	44	<0.05‡	16 685±8 230	98	>0.05‡
					<0.05 §			<0.05 §

* 3 determinations in Exp I and 4 determinations in Exp II with triplications of each.
† vs control, ‡ vs 3AB, § vs $BLMA_5$.

$BLMA_5$ 对 DNA 的复制合成有较恒定的抑制作用，两组实验的参入率分别为 58% 和 57%。这里 $BLMA_5$ 作用后的计数是 $BLMA_5$ 损伤 DNA 后的残留半保留复制和其诱导的修复合成的综合表现[10]。由于 HU 的主要作用是抑制 DNA 合成的复制部分，经 $BLMA_5$ 作用后的细胞在 HU 存在的条件下[^{3}H]TdR 的参入则表示 DNA 的修复合成。由表 1 可见，3 AB 2 m*M* 时能明显刺激 $BLMA_5$ 诱导的 DNA 修复合成，剂量增至 5 m*M* 时，本身就能抑制 DNA 的复制合成，再增加其剂量至 10 m*M*，3 AB 还能进一步加强 $BLMA_5$ 对 DNA 复制合成的抑制作用，呈现出典型的量效关系。

3 AB 作用的动力学观察 由图 1 A 可见，3 AB 对 DNA 复制的抑制作用随作用时间延长而增加，以 5 h 最明显。未加 3 AB 的 $BLMA_5$ 处理组表明，$BLMA_5$ 对 DNA 模板的损伤在药物去除 3 h 似达最大效应，5 h 则有恢复趋势，两者联合应用则变化介于两者之间，但 3 AB 加强 $BLMA_5$ 对 DNA 复制合成的抑制作用和 3 AB 单独作用相同，5 h 最强。

由图 1 B 可见，3 AB 发挥刺激 DNA 修复合成的作用较快，3 h 作用似最大，时间延至 5 h，这种刺激作用反而不明显，和其对 DNA 复制合成作用的最大效应时间点不同。

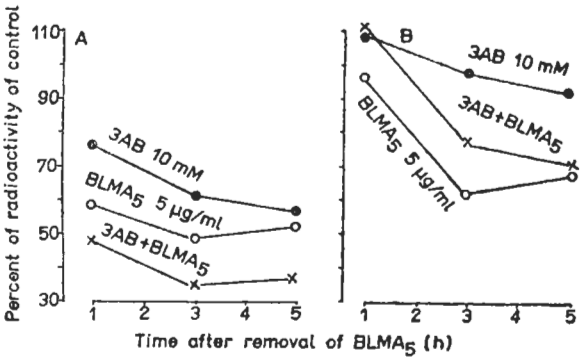

Fig 1. Effect of 3 AB and $BLMA_5$ on the DNA synthesis in the absence (A) and presence (B) of 2 m*M* hydroxyurea. All the values came from 2 determinations.

讨　　论

本实验发现在 5 m*M* 和 10 m*M*，对同一靶细胞，3 AB 对 DNA 半保留复制和修复合成分别表现出抑制和刺激两种截然相反的作用，其可能的机制是：

3 AB 对 DNA 复制的抑制作用 ADPRT 抑制剂对大鼠肝癌细胞及正常肝细胞的 DNA 复制合成具有明显的抑制作用，且能加强博莱霉素对 DNA 合成的抑制效应[8]。3 AB 长时间间作用于 CHO 细胞也能抑制 DNA 合成，造成 G_1/S 期延滞[9]，我们的结果与此相似。由于聚(ADP-R)在细胞内可和组蛋白及非组蛋白结合，参与多种功能的调节作用[1]，3 AB 可能通过抑制 ADPRT 作用于 DNA 复制合成的一个或多个环节，造成复制合成的抑制。还有很多作者报道 ADPRT 抑制剂对 DNA 复制合成没有抑制作用，这可能是因所用的细胞株或/和抑制剂不同而造成的反应性差异。

3 AB 对 DNA 修复合成的刺激作用 3AB 能显著刺激 DNA 的修复合成，这和很多作者报道 ADPRT 抑制剂能刺激 UDS[2-6,10]相同，显然这不是通过上述方式，而可能是：1. 切口转译(nick translation)[11]：业已证明博莱霉素能造成 DNA 断裂，使 ADPRT 活性增加[12]，后者又可激活 DNA 连接酶，促进断裂 DNA 链的修复连接；3 AB 由于抑制了 ADPRT，从而也抑制了 DNA 分子中的切口连接[13,14]，这样由于 DNA 分子中待修复的斑块增多或/和增大，使得 DNA 修复合成增加[11]。故这里的修复合成增加是继发于 DNA 分子中的断裂切口，是 DNA 修复连接受抑的表现。可能也是其加强 $BLMA_5$ 抗瘤作用的主要机理[7]。2. 代谢池影响[3,8,10]：可能 3 AB 对修复合成的作用不是刺激，而只是逆转；因为 NAD^+ 是聚(ADP-R)的前体物[1]，也是细胞合成 ATP 的重要辅酶，DNA 断裂激活了 ADPRT，使得细胞内 NAD^+ 下降，继而造成 ATP 生成减少，导致细胞内 DNA 修复合成等耗能过程的抑制。

3 AB 抑制了 ADPRT，阻止 NAD^+ 和 ATP 下降，从而使许多耗能过程得以进行。本实验发现大剂量 3 AB 不仅能使修复合成增加，还能抑制 DNA 的复制合成，后者也是耗能过程，故前一种机理的可能性较大。本文实验证明了 3 AB 在不同的剂量水平可作用 S180 细胞的 DNA 修复和复制两个过程，这可能和其加强 $BLMA_6$ 的抗瘤作用有关。

参 考 文 献

1 Mandel P, Okazaki H, Niedergang C. Poly (adenosine diphosphate ribose). In: Cohn WE, ed. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*; vol 27. NY: Academic Press, 1982 : 1-51

2 Miwa M, Kanai M, Kondo T, Hoshino K, Ishihara K, Sugimura T. Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase enhance unscheduled DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 100 : 463

3 Sims JL, Sikorski GW, Catino DM, Berger SJ, Berger NA. Poly (adenosinediphosphate-ribose) polymerase inhibitors stimulate unscheduled deoxyribonucleic acid synthesis in normal human lymphocytes. *Biochemistry* 1982; 21 : 1813

4 Sime JL, Berger SJ, Berger NA . Effects of nicotinamide on NAD and poly (ADP-R) metabolism in DNA-damaged human lymphocytes. *J Supramol Struct Cell Biochem* 1981; 16 : 281

5 Durrant LG, Margison GP, Boyle JM. Effects of 5-methynicotinamide on mouse L 1210 cells exposed to N-methyl-N-nitrosourea: mutation induction, formation and removal of methylation products in DNA and unscheduled DNA synthesis. *Carcinogenesis* 1981; 2 : 1013

6 Strauss BS. The interaction of UV-and methyl methanesulfonateinduced DNA repair synthesis: a role for poly (ADP-ribose)? *Ibid* 1984; 5 : 577

7 陈 关、潘启超。3-氨基苯甲酰胺增强平阳霉素抗瘤作用。药学学报 1985; 20 : 331

8 Barra R, Randolph V, Sumas M, Lanighan K, Lea MA. Effects of nicotinamide, isonicotinamide, and bleomycin on DNA synthesis and repair in rat hepatocytes and hepatoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69 : 1353

9 Schwartz JL, Morgan WF, Kapp LN, Wolff S. Effects of 3-aminobenzamide on DNA synthesis and cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells. *Exp Cell Res* 1983; 143 : 377

10 Sims JL, Berger SJ, Berger NA. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors preserve nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5-triphosphate pools in DNA-damaged cells: mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis. *Biochemistry* 1983; 22 : 5188

11 James MR, Lehmann AR. Role of poly (ADP-R) in deoxyribonucleic acid repair in human fibroblasts. *Ibid* 1982; 21 : 4007

12 Miller EG. Stimulation of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase activity by bleomycin. *Fed Proc* 1976; 36 : 906

13 Creissen D, Shall S. Regulation of DNA ligase activity by poly(ADP-ribose). *Nature* 1982; 296 : 271

14 Lehmann AR, Broughton BC. Poly (ADP-ribosylation) reduces the steady-state level of breaks in DNA following treatment of human cells with alkylating agents. *Carcinogenesis* 1984; 5 : 117

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Jul; 7 (4) : 373-377

Effect of 3-aminobenzamide on DNA replication and DNA repair synthesis in S180 cells

CHEN Guan, PAN Qi-chao

(Cancer Inst, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510026)

ABSTRACT To elucidate the mechanism by which 3-aminobenzamide (3 AB) enhanced the antitumor effect of bleomycin A_5 ($BLMA_5$) on S180, We studied the effects of 3 AB on the DNA-replication synthesis and DNA-repair synthesis both in untreated and $BLMA_5$-treated S 180 cells. 3 AB 2 m*M* stimulated DNA-repair synthesis after the cells were exposed to $BLMA_5$ for 30 min, but 5 and 10 m*M* inhibited DNA-replication synthesis and enhanced the inhibition of DNA-replication synthesis by $BLMA_5$ respectively.

3 AB affected DNA-repair synthesis more rapidly than DNA-replication. The results indicate that more than one mechanism are involved in the above-mentioned process.

KEY WORDS 3-aminobenzamide; DNA replication; DNA repair; sarcoma 180; bleomycin A_5

* * * * * *