

阿克拉霉素 B 对人胃癌细胞核仁超微结构及 RNA 合成功能的影响

李良宏、王浴生、李光蓉¹ (华西医科大学药理教研室, 实验中心电镜室¹, 成都 610044)

提要 用 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 和 $[^{14}\text{C}]\text{UR}$ 双标记参入和电镜观察研究 AcM-B 对人胃癌细胞大分子合成和核仁超微结构影响。结果 AcM-B 抑制细胞 DNA 和 RNA 合成,

$\text{IC}_{50\text{DNA}}$ 为 $2.38 \mu\text{g/ml}$, $\text{IC}_{50\text{RNA}}$ 为 $0.16 \mu\text{g/ml}$ 。Adr 的 $\text{IC}_{50\text{DNA}}$ 为 $3.10 \mu\text{g/ml}$, $\text{IC}_{50\text{RNA}}$ 为 $2.15 \mu\text{g/ml}$ 。AcM-B 所致核仁分离和微球体的超微结构改变与 Adr 不同, 与 Act 相似, 提示有明显抑制细胞核仁 rRNA 合成的作用,

1985年9月30日收稿 1986年8月4日修回

关键词 阿克拉霉素 B; 阿霉素; 放线菌素 D; 胃癌细胞; 核仁; 核酸; [³H]胸腺嘧啶核苷; [¹⁴C]尿嘧啶核苷; [³H]亮氨酸;

阿克拉霉素 B (aclacinomycin B, AcM-B) 可明显抑制小鼠 L 1210 白血病细胞 DNA 和 RNA 的合成, 抑制 RNA 合成特别明显, 但对蛋白质合成影响小⁽¹⁾。同类的 AcM-A 抑制 RNA 合成也明显强于对 DNA 的抑制⁽²⁾, 尤其明显抑制核仁 45 s RNA 的合成。因此认为 AcM-A 有细胞核仁 rRNA 合成的特异性抑制作用⁽³⁾。但 AcM-B 明显抑制 RNA 合成的机理研究尚少。为此, 本文用体外培养的人胃癌细胞观察 AcM-B 干扰细胞大分子合成和所致的细胞核仁超微结构改变, 与核仁 rRNA 特异性抑制剂放线菌素 D (dactinomycin, Act) 和非特异性抑制剂阿霉素 (doxorubicin, adriamycin, Adr) 比较, 结合探讨 AcM-B 抑制核仁 RNA 合成的机理。

材料和方 法

材料和试剂 AcM-B 由四川抗菌素工业研究所提供, Adr 为意大利 Farmitalia 进口, Act 是 Fluka 产品。同位素标记化合物: [甲基-³H]胸腺嘧啶核苷([³H]TdR), 放射比活性 925 MBq/mol; DL-[4,5-³H]亮氨酸([³H]Leu), 放射比活性 1.96 GBq/mol; [2-¹⁴C]尿嘧啶核苷([¹⁴C]UR), 放射比活性 1.96 GBq/mol, 均购于上海原子核研究所。玻璃纤维膜(0.3 μm) 购于上海红卫造纸厂。

细胞培养 人胃癌细胞株 (SGC-7901) 由中国科学院上海药物研究所赠给, 为单层生长细胞。用 Tc 199 (Difco) 培养液 (pH 7.2-7.4) 加小牛血清 20%, 链霉素 100 μg/ml, 青霉素 100 IU/ml 进行培养。

同位素双标记参入试验 设用药组和对照组。每组设三个平行管, 每管含细胞 $5-7 \times 10^5$ 个。

1. 测定 DNA 和 RNA 合成抑制的 IC₅₀ 不同浓度的 AcM-B 和 Adr 加入细胞悬液中,

37°C 孵育 15 min, 分别加入 [³H]TdR 74 kBq/ml 和 [¹⁴C]UR 7.4 kBq/ml, 孵育 2 h, 用 2 ml 预冷 NKM 溶液 (NaCl 140 mmol/L, KCl 5 mmol/L; MgCl₂ 8 mmol/L) 终止反应。细胞经抽滤收集在玻璃纤维滤膜上, 经 NKM 溶液, 50% 三氯醋酸和无水乙醇各 5 ml 处理后, 于 60-70°C 烘干 30 min, 加入闪烁液 (0.3% PPO, 0.03% POPOP, 溶剂为二甲苯) 中待测。

2. 测定抑制 DNA, RNA 和蛋白质合成的时间效应 方法同 1。同位素双标记参入组成为: [¹⁴C]UR 和 [³H]TdR, [¹⁴C]UR 和 [³H]Leu (74 MBq/ml)。

以上同位素参入样品均用 Beckman LS 9800 型液体闪烁计数器测定其 dpm。

电子显微镜标本制备 经细胞染色观察, 选择适当的药物浓度。AcM-B, Adr 和 Act 作用后的细胞, 经 500-800 × g 离心 10 min, 细胞团经 3.6% 戊二醛固定 24 h (4°C), 1% 锇酸固定 2 h (4°C), 丙酮梯度脱水, 国产环氧树脂 618 浸泡包埋。用 LKB-5 型超薄切片机作 0.05-0.06 μm 超薄切片。枸橼酸铅和醋酸铀双重电子染色。JEM-7 透射电子显微镜观察并摄像。

结 果

抑制细胞大分子合成作用

1. 抑制 DNA 和 RNA 合成的 IC₅₀ 测定 同位素双标记前体参入细胞酸不溶部分的 dpm, 计算参入率和 IC₅₀。图 1 显示 AcM-B 和 Adr 抑制细胞 DNA 和 RNA 合成的作用, 可见 AcM-B 和 Adr 的作用有不同。

表 1 中可见 AcM-B 抑制 DNA 和 RNA 合成的 IC₅₀ 有明显差别 (p < 0.01)。Adr 抑制 DNA 和 RNA 合成的 IC₅₀ 则相近 (p > 0.05)。Adr 的 IC_{50 RNA} 明显大于 AcM-B 的 (p < 0.01)。

2. 抑制细胞 DNA, RNA 和蛋白质合成的时间效应 图 2 示 AcM-B (2.0 μg/ml) 作用后 1/2-1 h, [³H]TdR 和 [¹⁴C]UR 的参入率快

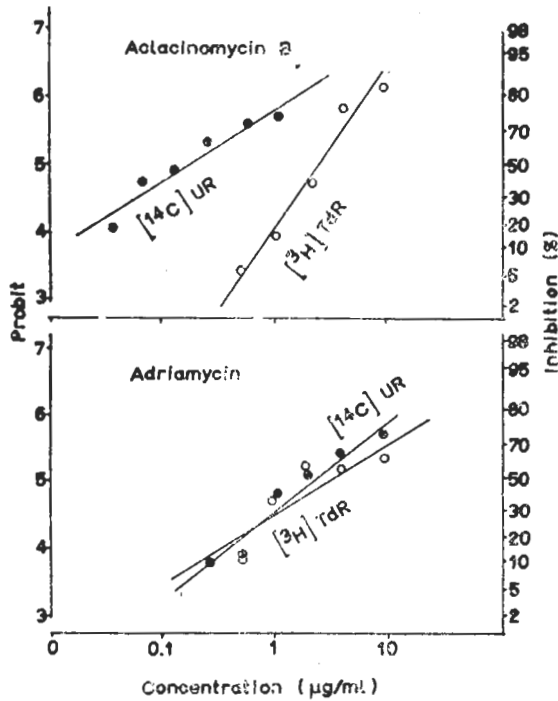


Fig 1. Inhibitory effects of aclacinomycin B and adriamycin on DNA and RNA synthesis of human gastric cancer cells.

Tab 1. 50% inhibition concentration (IC_{50}) of aclacinomycin B (AcM-B) and adriamycin (Adr) for DNA and RNA synthesis.

Drugs	IC_{50DNA} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50RNA} ($\mu\text{g/ml}$)	$\frac{IC_{50DNA}}{IC_{50RNA}}$
AcM-B	2.38	0.16***	14.88
Adr	3.10†	2.15*†††	1.44

* $p > 0.05$, *** $p < 0.01$ compared to IC_{50DNA}

† $p > 0.05$, ††† $p < 0.01$ compared to AcM-B

速而明显下降, 抑制率达70%以上。在12h内 $[^3\text{H}]\text{Leu}$ 参入受的影响小。

图2中Adr(2.0 $\mu\text{g/ml}$)作用后1-3h $[^3\text{H}]\text{Tdr}$ 参入率明显下降, 抑制达80%。 $[^{14}\text{C}]\text{UR}$ 参入的抑制在3h后才明显, 抑制率最大达55%。12h内对于 $[^3\text{H}]\text{Leu}$ 参入的影响小。

对细胞核仁超微结构的影响 对照组人胃癌细胞核仁超微结构(见图3A)为圆形或椭圆形。由三种结构成分组成: 核仁原纤维和颗粒成分, 以及核仁原纤维中心(nucleolar fibrillar center), 原纤维成分位于核仁中央区, 围绕核

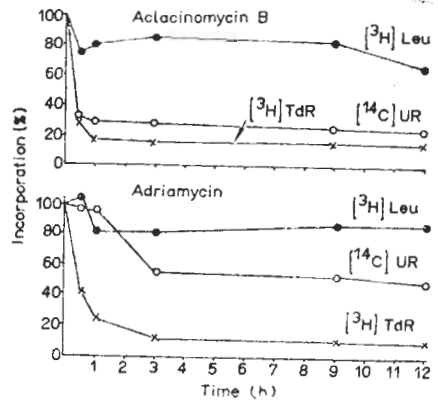


Fig 2. Effects of aclacinomycin B(2.0 $\mu\text{g/ml}$) and adriamycin (2.0 $\mu\text{g/ml}$) on the synthesis of protein, RNA and DNA of human gastric cancer cells.

仁原纤维中心分布。颗粒成分位于核仁周边区。核仁原纤维中心由电子密度较低的原纤维丝组成, 周围有一圈较致密的原纤维成分。

AcM-B 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 作用30min, 核仁结构出现早期改变。核仁原纤维中心不规则, 变小和空泡形成, 核仁内出现多个微球体。微球体(microsphere)是由较大颗粒和纤维成分组成。呈电子密度较高的团状结构(图3B)。多位于核仁原纤维中心周围。作用1h微球体变大, 向核仁边缘迁移, 伴随原纤维和颗粒成分分离(图3C)。作用3h和12h, 核仁分离更加明显, 多个微球体迁移至核仁边缘并突出, 核仁原纤维中心分布消失。在分离的核仁边缘出现核仁原纤维中心样纤维区(图3D)。作用到28h, 部分核仁有碎裂(fragmentation)。

Act 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 作用所致的核仁超微结构改变与AcM-B相似。作用30min有类似AcM-B作用所致的早期改变。3h后见明显的核仁颗粒和原纤维成分分离, 微球体出现, 突出核仁边缘, 核仁原纤维中心分布消失, 可见分布于已分离核仁边缘的核仁原纤维中心样纤维区(图3E)作用12h也见核仁碎裂。

Adr 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 作用30min无明显核仁结构改变。作用3h和12h后核仁原纤维和颗粒成分有分离, 核仁原纤维中心聚集变大, 位于

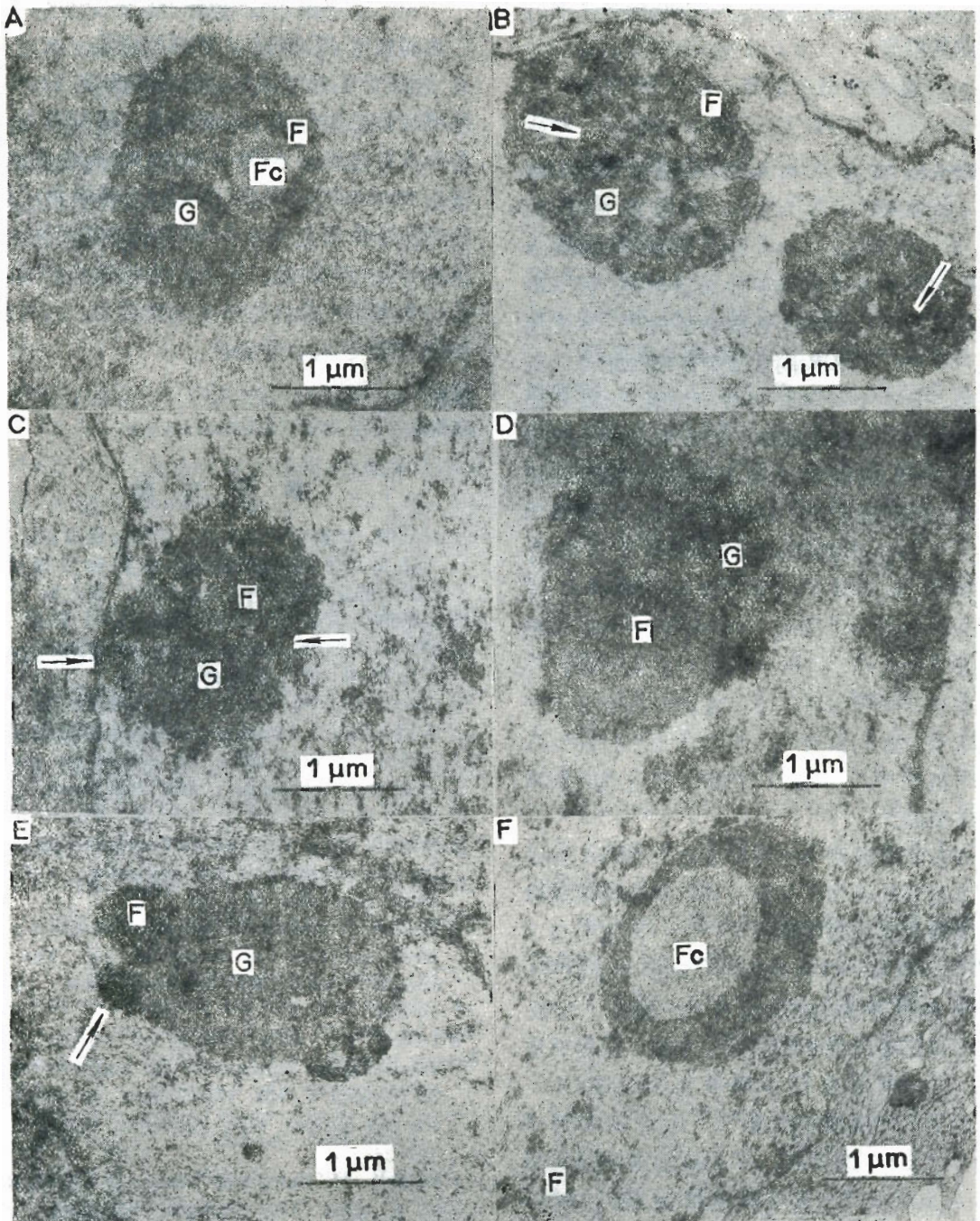


Fig 3. Electron micrographs of nucleoli in human gastric cancer cells. **A)** Nucleolus of the control cell, nucleolar granular component (G), fibrillar component (F), and fibrillar center (Fc), $\times 28\ 000$. **B)** Initial changes of microspheres (arrow) at the edge of nucleolar fibrillar center after aclacinomycin B $0.5\ \mu\text{g/ml}$, 30 min, $\times 27\ 000$. **C)** Nucleolar segregation and formation of microspheres (arrow) after aclacinomycin B $0.5\ \mu\text{g/ml}$, 1 h, $\times 27\ 000$. **D)** Migration of microspheres (arrow) to the edge of nucleolus with appearance of fibrillar center-like structure (Fo) after aclacinomycin B $0.5\ \mu\text{g/ml}$, 12 h, $\times 27\ 000$. **E)** Nucleolar segregation with formation of microspheres (arrow) after actinomycin D $1.0\ \mu\text{g/ml}$, 3 h, $\times 17\ 000$. **F)** Nucleolar segregation with gathering and enlargement of fibrillar center (Fc) after adriamycin $2.0\ \mu\text{g/ml}$, $\times 26\ 000$.

中央(图 3 F), 但未见类似 AcM-B 和 Act 所致的微球体改变。

讨 论

Crooke 等观察到 AcM-A 抑制 Novikoff 肝癌细胞 RNA 合成 IC_{50RNA} 明显小于抑制 DNA 合成的 IC_{50DNA} 6-7 倍, 并认为 AcM-A 有核仁 rRNA 合成的特异性抑制作用。而 Adr 是非特异的核仁 rRNA 合成抑制剂⁽³⁾。本文用 [3H]TdR 和 [^{14}C]UR 同位素前体双标记参入进行实验, 旨在更可靠地观察和比较 AcM-B 和 Adr 对大分子合成的影响。证明 AcM-B 与 Adr 在抑制 DNA 和 RNA 合成上作用有不同, 作用快而强, 尤其明显抑制 RNA 的合成, 与 AcM-A 相似。可能也具有抑制细胞 rRNA 合成的作用, 为探讨 AcM-B 对核仁结构和 RNA 合成功能的影响提供了依据。AcM-B 和 Adr 对蛋白质合成影响小, 只在 12 h 上有轻度抑制。可能在较长时间作用后, 或者在较大浓度时才对蛋白质合成起明显抑制。可以认为在抗肿瘤细胞作用机理中, AcM-B 对蛋白质合成的影响不是主要的。

许多研究表明 Act 有抑制核仁 rRNA 合成和加工过程的作用, 导致以核仁分离和微球体形成为特点的超微结构改变^(4,5)。本文比较了 AcM-B, Adr 和 Act 所致的核仁超微结构改变, 观察到 AcM-B 引起的改变与 Act 相似, 出现典型的核仁原纤维和颗粒成分分离, 伴微球体形成, 而 Adr 无类似 AcM-B 和 Act 的作用, 不引起类似的微球体改变⁽⁶⁾。考虑到 AcM-B 明显抑制 RNA 的合成。可以认为其明显抑制 RNA 合成的机理主要与抑制细胞核仁 rRNA 合成和加工过程有关。

核仁原纤维中心(也称核仁内染色质)是核仁合成前体 rRNA 的主要部位^(5,7)。本文观察到 AcM-B 引起的最早超微结构改变 (30 min) 主要在核仁原纤维中心和周围。同位素双标记参入实验也提示 AcM-B 抑制 RNA 合成的作用在 30 min 已很明显。因此, 早期的核仁原纤维中心结构改变提示 AcM-B 的作用可能选择性干扰该区功能, 反映出超微结构改变, 由此导致 rRNA 合成的快速明显抑制。这可能是 AcM-B 影响的主要部位。

致谢 本校电镜室彭晓东同志、药理教研室范爱兰同志和同位素室周谦同志协助部分技术工作。

参 考 文 献

- 1 沈炜明、严惠芳、潘成新。阿克拉霉素 B 体外对小鼠 L 1210 白血病细胞的生长影响及体内对 Lewis 肺癌抗瘤作用的实验研究。抗生素 1983; 8 : 290
- 2 Oki T. New anthracycline antibiotics. *Jpn J Antibiot* 1977; 30 (suppl) : 70
- 3 Crooke ST, Duvernay VH, Galavan L, Prestayko AW. Structure-activity relationship of anthracyclines relative to effects on macromolecular syntheses. *Mol Pharmacol* 1978; 14 : 290
- 4 Schoefl GI. The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus. *J Ultrastruct Res* 1964; 10 : 224
- 5 Puvion E, Moyne G. *In situ* localization of RNA structure. In: Busch H, ed. *The cell nucleus*; vol 8. NY: Academic Press, 1981 : 59-113
- 6 Daskal Y. Drug effects on nucleolar and extranucleolar chromatin. In: Busch H, Crooke ST, Daskal Y, eds. *The effects of drugs on the cell nucleus*. NY: Academic Press, 1979: 107-25
- 7 Boutelle M, Hernandez-Verdun D. Localization of a gene: The nucleolar organizer. *Bio-medicine* 1979; 30 : 282

Effects of aclacinomycin B on nucleolar ultrastructure and function of RNA synthesis of human gastric cancer cells

LI Liang-Hong, WANG Yu-Sheng, LI Guang-Rong¹

(Department of Pharmacology, Laboratory of Electron Microscope¹, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610044)

ABSTRACT The effects of aclacinomycin B (AcM-B) on macromolecule synthesis and nucleolar ultrastructure of human gastric cancer cells were studied by the methods of double-labelled radioactive precursor incorporation with [³H]TdR and [¹⁴C]UR as well as observation by electron microscope. AcM-B showed an inhibitory effect on synthesis of DNA and RNA. The inhibition on RNA synthesis was much stronger than that on DNA synthesis. IC_{50DNA} and IC_{50RNA} for AcM-B were 2.38 and 0.16 µg/ml, respectively. But IC_{50DNA} and ID_{50RNA} for adriamycin (Adr) were quite

close, 3.10 and 2.15 µg/ml, respectively. AcM-B induced changes of nucleolar segregation and formation of microspheres, similar to those induced by actinomycin D, but differed from those induced by Adr. These results suggest that AcM-B has a strongly inhibitory effect on synthesis of nucleolar rRNA.

KEY WORDS aclacinomycin B; doxorubicin; dactinomycin; stomach neoplasma cells; cell nucleolus; nucleic acids; [³H]thymidine; [¹⁴C]uridine; [³H]leucine