

冬凌草甲素对小鼠肿瘤细胞核苷酸代谢的影响¹

李 瑛、张章沐 (河南医学科学研究所, 郑州 450052)

提要 本文观察了冬凌草甲素对小鼠肿瘤细胞核苷酸代谢的影响。给药后胸腺嘧啶核苷参入肿瘤细胞的酸不溶部分(DNA)减少。而酸溶部分游离的胸腺嘧啶核苷酸增多, 其中以胸腺嘧啶核苷三磷酸增加最明显。提示冬凌草甲素可能阻断了脱氧核苷酸底物聚合形成DNA的过程, 而不影响胸腺嘧啶核苷的磷酸化。

关键词 冬凌草甲素; [³H]胸腺嘧啶核苷; 胸腺嘧啶核苷酸类; Ehrlich 癌; 肿瘤 DNA

1985年10月31日收稿 1986年6月30日修回

¹ 中国科学院科学基金资助的课题, No 267

冬凌草甲素(oridonin, Orid)系由植物冬凌草(*Rabdosia rubescens* Hemsl.)中提取出来的抗肿瘤有效成分之一。体内外实验证明: 该药对多种人癌细胞株和移植性动物肿瘤有效^(1,2)。近来发现, 冬凌草甲素对博莱霉素 A₅ 的抗肿瘤作用有明显增效作用。因此研究冬凌草甲素的抗肿瘤作用机理有一定实际意义。冬凌草甲素对 [³H]TdR 参入肿瘤细胞有明显抑制作用⁽¹⁾。为进一步研究其药理作用机理, 我

们观察了冬凌草甲素对小鼠艾氏腹水癌细胞胸腺嘧啶核苷酸代谢的影响。

材料和 方法

Orid 为郑州化学制药厂产品。[³H]TdR (比活性 999 GBq/mmol)为中国科学院原子能研究所产品。TdR、TMP、TTP 和小牛胸腺 DNA 均为 Sigma 产品。PEI-纤维素为 Serva 产品。

小鼠艾氏腹水癌瘤株用昆明种小鼠传代。动物由河南医科大学动物饲养场提供。

[³H]TdR 参入肿瘤细胞 取接种后 6-7 d 的艾氏腹水癌细胞,离心后弃上清。沉淀部分用生理盐水洗两次,1640 培养液悬浮、计数。对照组和实验组每组 3-5 个平行管,每管细胞浓度为 $1-2 \times 10^6$ 个/ml, Orid 适量或相应量的丙二醇,反应总容量 2 ml。37°C 保温 1 h,加入 [³H]TdR 20 μ l (37 kBq),继续保温 30 min,立即加入预冷的 30% 的三氯乙酸(含 4% 的焦磷酸钠)1 ml,4°C 放置 30 min 以上。沉淀物抽滤至玻璃纤维滤纸上,用三氯乙酸和乙醇洗涤,空气干燥,按固相法测定放射活性。闪烁液采用二甲苯溶液,含 0.3% PPO 和 0.03% POPOP。

药物对肿瘤细胞酸溶和酸不溶部分作用比较 [³H]TdR 参入同上,并参照文献(3)方法,细胞终浓度为 1×10^7 个/ml,反应总容量 2 ml,每管加入 [³H]TdR 74 kBq。反应终止时加入预冷的生理盐水,立即离心,加入 40% 甘油水溶液。分层提取上清,沉淀用生理盐水洗两次。沉淀用 0.5 mol/L 过氧酸 100 μ l 冰浴提取 1 h,离心取上清 70 μ l,用适量 NaOH 中和,即为酸溶部分。采用均相法测定放射活性;闪烁液为 0.7% PPO-0.4% POPOP-45% 乙二醇乙醚-二甲苯溶液。沉淀部分抽滤至玻璃纤维滤纸上,洗涤、空气干燥后按固相法测定放射活性,即为酸不溶部分。

游离胸腺嘧啶核苷酸的 PEI-纤维素薄层析 按照文献(3)方法,利用 PEI-纤维素薄

层层析分离肿瘤细胞酸溶部分的 TdR、TMP、TDP 和 TTP。层析条件为 LiCl 75 mmol/L (5 cm) LiCl 0.4 mol/L (15 cm) 连续分步层析,采用相应标准品及根据其 R_F 值在紫外灯下 (254 nm) 显迹定位。层析点用 20 μ l 蒸馏水浸湿刮入试管中,用 100-300 μ l LiCl 1.6 mol/L 浸泡 2 h,离心后定量取上清,按均相法测定放射性计数。

光谱移位实验 反应介质为 Na_2HPO_4 , 0.75 mmol/L- NaH_2PO_4 , 0.25 mmol/L。小牛胸腺 DNA 与药物按不同比例混合,室温放置 1-3 h,用 Sp 8-500 型光谱分析仪扫描测定吸收光谱。在药物与 DNA 的复合吸收峰中扣除药物峰。然后与正常的 DNA 吸收峰比较,观察药物对 DNA 吸收峰的影响;反之亦然。

实验 结果

Orid 抑制 [³H]TdR 参入的浓度依赖关系

Orid 对胸腺嘧啶核苷参入肿瘤细胞 DNA 有很强的抑制作用;12 μ g/ml 时, [³H]TdR 参入率为对照组的 52%。当药物浓度低于 16 μ g/ml,药物对 [³H] TdR 参入的抑制作用随药物浓度增加而升高(图 1)。

Orid 对 [³H]TdR 参入肿瘤细胞酸溶部分和酸不溶部分的影响 Orid 对 [³H]TdR 参入肿瘤细胞酸不溶部分有很强的抑制作用,但用药后 [³H]TdR 参入酸溶部分量较对照组明显增加。随药物浓度增加, [³H]TdR 参入酸不溶部分减少,而参入酸溶部分量随之增加(表 1)。

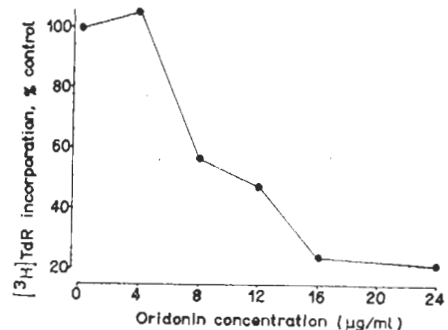


Fig 1. Effect of oridonin on [³H]TdR incorporation into DNA of Ehrlich ascites tumor cells.

Tab 1. Effect of oridonin on [^3H]TdR incorporation into Ehrlich ascites tumor cells. * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Acid-insoluble fraction cpm ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	%	Acid-soluble fraction cpm ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	%
0	7226 \pm 1182	100	5118 \pm 396	100
4	7002 \pm 1198*	97	7137 \pm 565***	139
8	4971 \pm 561***	68	8298 \pm 568***	162
12	4244 \pm 1440***	58	8646 \pm 1582***	168
20	3288 \pm 1000***	46	10941 \pm 686***	213

Tab 2. Effect of oridonin (20 $\mu\text{g/ml}$) on [^3H]TdR incorporation into thymine nucleotides in Ehrlich ascites tumor cells. $\bar{x} \pm \text{SD}$

		[^3H]TdR	[^3H]TMP	[^3H]TDP	[^3H]TTP
Incorporation(cpm)	Oridonin	261 \pm 39	1034 \pm 150	1192 \pm 133	2421 \pm 147
	Control	251 \pm 22	404 \pm 85	390 \pm 52	528 \pm 57
Ratio		106	255	306	458
	p value	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01
% total(cpm)	Oridonin	5.4	21	24.3	49.3
	Control	16	25.7	24.7	33.6

Orid 对肿瘤细胞胸腺嘧啶核苷酸代谢的影响

利用 PEI-纤维素薄层层析分离肿瘤细胞酸溶提取物中的 TdR, TMP, TDP 和 TTP. Orid 使 TMP, TDP, TTP 的参入比均明显升高; 而 TdR 部分参入比无明显改变. 观察各部分占酸溶部分总放射性的%, TdR 的%减少, TTP 的%增加, 而 TMP 和 TDP%无明显改变(表 2).

光谱移位实验 DNA 与药物混合后, DNA 光谱中 205 nm 吸收峰红移, 并伴有吸收强度减弱, 光谱改变随药物浓度增加而增强; 同时药物吸收峰发生蓝移(图 2).

讨 论

Orid 抑制胸腺嘧啶核苷参入肿瘤细胞 DNA 的作用环节有四种可能: 1. 药物抑制肿瘤细胞膜对胸腺嘧啶核苷酸的转运过程; 2. 抑制细胞中胸腺嘧啶核苷或核苷酸的磷酸化过程; 3. 抑制 DNA 聚合酶或其辅助因子的作用; 抑制核苷酸底物参入 DNA; 4. 直接损伤模板 DNA 引起 DNA 合成障碍.

胸腺嘧啶核苷是 DNA 合成的特异性前体. 研究其参入瘤细胞酸溶部分和酸不溶部分(参

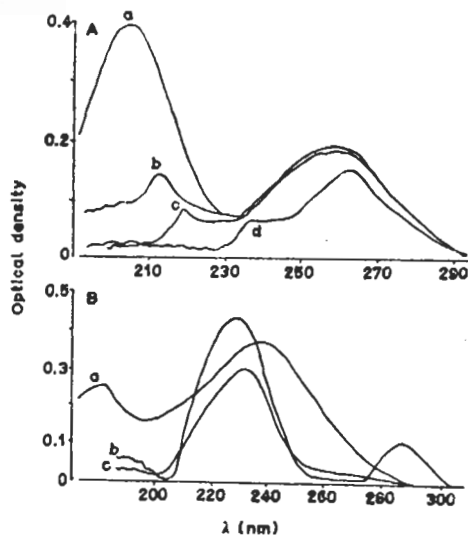


Fig 2. Effect of oridonin (DNA) on the uv-absorption spectrum of DNA (oridonin). A) DNA uv-absorption spectrum, weight ratio of oridonin: DNA a 0:1, b 4:1, c 8:1, d 16:1. B) Oridonin uv-absorption spectrum, weight ratio of DNA: oridonin a 0:1, b 20:1, c 27:1.

入 DNA)的变化, 是观察 TdR 参入 DNA 过程受抑环节的简捷途径. Orid 使 [^3H]TdR 参入 DNA 量减少, 参入游离核苷酸部分增加, 其中以 [^3H]TTP 增加最为明显, [^3H]TMP 和

[³H]TDP 量也明显增加; 该部分放射性计数的构成比的变化反映 DNA 合成受抑制而减少, 而前体物增多。提示由核苷酸底物聚合形成 DNA 的过程受阻, 而胸腺嘧啶核苷酸的磷酸化过程不受影响。

动物细胞和肿瘤细胞中的 TTP 合成是可以自动调节的。调节机理主要是 TTP 水平升高后反馈性抑制胸腺嘧啶核苷激酶, 使 TdR 向 TMP 转化减少^(4,5)。DNA 合成受抑同时, 其前体物合成代谢应减慢, 至少酸溶部分的总参入量不应增加; 但本实验结果相反, 其原因何在? 有几种可能的解释: 1. 酸溶部分总参入的增加是 Orid 抑制 DNA 合成后引起的暂时性结果; 2. 由于 Orid 的影响使 TTP 反馈作用失调; 3. Orid 抑制胸腺嘧啶核苷的分解代谢。我们对 Orid 影响肿瘤细胞的摄取胸腺嘧啶核苷过程进行了初步研究, 并未发现 Orid 对肿

瘤细胞摄取胸腺嘧啶核苷有促进作用。

光谱移位现象表明, 体外条件下 Orid 可以与 DNA 形成复合物, 分别影响它们的最大吸收峰。该结果的详细分析有待研究。

参 考 文 献

- 1 张覃沐. 冬凌草抗肿瘤作用的研究概况. 中华肿瘤杂志 1982; 4: 322
- 2 李学汤、林 晨、李佩茵、张覃沐. 七种人癌细胞对冬凌草甲素的敏感性比较. 药学报 1985; 20: 243
- 3 杨善蓉、方福德、吴冠芸. 三尖杉酯硷对肿瘤细胞核苷酸代谢的影响. 同上 1982; 17: 721
- 4 Plageman PGW, Erbe J. Thymidine transport by cultured Novikoff hepatoma cells and uptake by simple diffusion and relationship to incorporation into deoxyribonucleic acid. *J Cell Biol* 1972; 55: 161
- 5 Ives DH, Morse PA Jr, Potter VR. Feedback inhibition of thymidine kinase by thymidine triphosphates. *J Biol Chem* 1963; 238: 1467

Acta Pharmacologica Sinica 1987 May, 8 (3): 271-274

Effect of oridonin on metabolism of thymine nucleotides in tumor cells in mice¹

LI Ying, ZHANG Tan-Mu (Henan Institute of Medical Sciences, Zhengzhou 450052)

ABSTRACT Oridonin is an effective antitumor component isolated from *Rabdosia rubescens* Hemsl. The incorporation of [³H]TdR into the acid-insoluble fraction (DNA) of Ehrlich ascites tumor cells was distinctly inhibited by oridonin in a concentration-dependent manner, while the concentration of the [³H]thymine nucleotides in the acid-soluble fraction was evidently elevated, especially [³H]TTP. When the concentration of oridonin was 20 µg/ml, the incorporation of [³H]TdR was 46% of control in the acid-insoluble fraction and 213% of control in the acid-soluble fraction; the incorporation ratios of [³H]TMP,

[³H]TDP and [³H]TTP were 255, 306 and 458, respectively, but the concentration of [³H]TdR in the acid-soluble fraction was the same with that in control. These results suggest that oridonin blocks the polymerization of deoxynucleotides to form DNA, but does not influence the phosphorylation of thymidine or thymine nucleotides.

KEY WORDS oridonin; [³H]thymidine; thymine nucleotides; Ehrlich tumor carcinoma; neoplasm DNA

¹ Project supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences, № 267