

四种抗肿瘤药物对 DNA 圆二色谱的影响

凌义和、沈春锰、施庆洛¹、胥彬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 放线菌素D明显改变DNA的圆二色谱(CD), 使其246 nm负峰显著增强, 276 nm正峰也有增加。高三尖杉酯碱和三尖杉碱使DNA的CD谱在276 nm和246 nm的正, 负峰值下降, 其中对246 nm负峰减少尤为明显, 低浓度的10-羟基喜树碱对DNA的CD谱无明显影响, 高浓度时则DNA的CD谱中各峰强度明显下降。

关键词 圆二色谱; 脱氧核糖核酸; 放线菌素D; 高三尖杉酯碱; 三尖杉碱; 10-羟基喜树碱; 抗肿瘤药

圆二色谱(circular dichroism spectra, CD)法是研究生物大分子在溶液中构象变化的重要方法, 文献报道以此技术研究一些物质对DNA构象的影响, 获得有意义的资料⁽¹⁾。本文报道放线菌素D, 10-羟基喜树碱及高三尖杉酯碱等抗肿瘤药物对小牛胸腺DNA的CD谱的影响, 为抗癌药物对DNA的结构和抑止肿瘤生长的影响等的相关性, 探索新的简便测试方法。

1986年3月3日收稿 1986年9月6日修回

¹ 中国科学院上海生物化学研究所

材料和方法

药品 放线菌素D(Act D), 10-羟基喜树碱(HCT), 高三尖杉酯碱(HHT)和三尖杉碱(CT), 分别由我所抗菌素室和植化室提供, 其中放线菌素D先用几滴丙酮溶解, 然后用去离子的重蒸馏水配成所需浓度; HCT先用几滴0.1 mol/l的NaOH溶解后用上述蒸馏水稀释至所需浓度; 高三尖杉酯碱和三尖杉碱先用几滴稀HCl溶解, 再用去离子重蒸馏水配至所需浓度。

小牛胸腺DNA, 购自美国Sigma公司。用去离子重蒸馏水配成100 μg/ml。实验时, 取1.5 ml DNA溶液加入等容积不同浓度的药液, 于37℃避光温育24 h, 然后进行CD谱的测定。

圆二色谱的测定 用日本JASCO产的带有DP-500微处理机的J-500 A型圆二色仪, 在20℃下测定CD谱, 样品测量池为圆形石英池, 其光径为10 mm测得的数值以 $[\psi]$ 比椭圆度(deg·cm²/g)表示, 由于所试的药物分子也

有圆二色性, 本实验用微机自动减去药物分子的 CD 谱的 $[\psi]$ 值, 直接得到药物作用后的 DNA 的 CD 谱。

结 果

图 1 为小牛胸腺 DNA 在水溶液内的 CD 谱, 即在 276 nm 和 246 nm 各有一个呈对称分布的正, 负峰, 在 217 nm 有一较强的正峰, 在 206 nm 有一小负峰, 这些和文献报道的 DNA 在水溶液中呈 B 构象的 CD 谱相一致⁽²⁾。

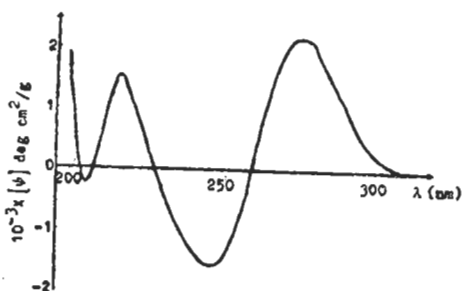


Fig 1. Circular dichroism (CD) spectra of calf thymus DNA.

当放线菌素 D ($C = 10, 20 \mu\text{g/ml}$) 与小牛胸腺 DNA 溶液作用 24 h 后, 使 DNA 正峰移至 280 nm, 并使该峰增大, 而 246 nm 的负峰明显变大, 且幅度亦增宽, 使 217 nm 峰值亦有

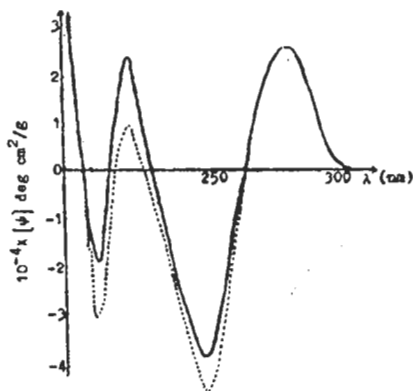


Fig 2. Difference in CD spectra of DNA-actinomycin D (Act D) complex and Act D. DNA: $50 \mu\text{g/ml}$, Act D: (—) $10 \mu\text{g/ml}$, (···) $20 \mu\text{g/ml}$.

一定改变, 原 206 nm 负小峰向远紫外位移及变大, 这些变化都可能和本品嵌入 DNA 碱基对后, 严重改变 DNA 构象有关。

实验证明, HCT 在 200 nm 处有一很强的负峰, 在 225 nm, 263 nm 各有一个很强的正峰, 当 HCT ($C = 10, 20 \mu\text{g/ml}$) 与小牛胸腺 DNA 相作用 24 h, 并不明显改变 DNA 的 CD 谱, 而当 HCT 浓度增至 $44 \mu\text{g/ml}$ 时, 则 DNA 的 CD 谱中各峰的强度大大降低, 这提示 HCT 对 DNA 的构象影响有一浓度极限, 有关工作将另文报道。

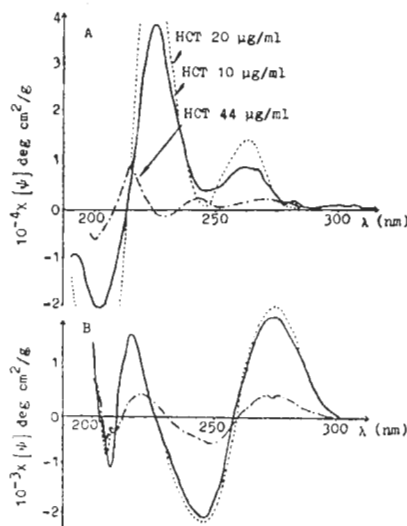
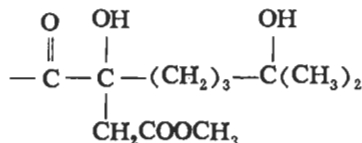


Fig 3. (A). CD spectra of 10-hydroxycamptothecin (HCT). (B). Difference in CD spectra of DNA-HCT complex and HCT.

高三尖杉酯碱和三尖杉碱都有相同的含 N 多环母核结构, 只是在 3 位 OR 取代基不同, 前者 R 为



后者 R 为 $\text{H}^{(3)}$ 。从 CD 谱看, 两者基本相似, 即在 205 nm 有一较强的负峰, 而在 240 nm, 285 nm 有二个负小峰, 这些结果表明高三尖杉酯碱的 CD 谱主要由其分子母核环的贡献, 而侧链部分的影响不明显, 当高三尖杉酯碱

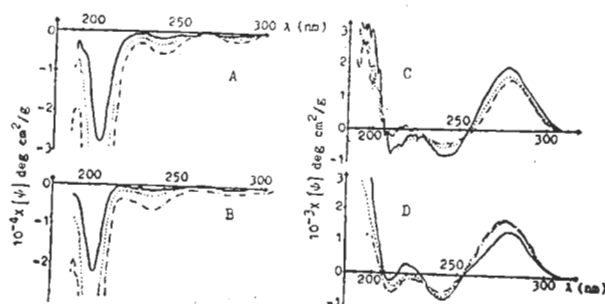


Fig 4. (a). CD spectra of (A) homoharringtonine (HHT) and (B) cephalotaxine (CT). (b). Difference in CD spectra of (C) DNA-HHT complex and HHT. (c). Difference in CD spectra of (D) DNA-CT complex and CT. DNA, 50 $\mu\text{g/ml}$, HHT or CT, (—) 5 $\mu\text{g/ml}$, (-----) 10 $\mu\text{g/ml}$, (- - -) 20 $\mu\text{g/ml}$.

($C = 5-20 \mu\text{g/ml}$)与小牛胸腺 DNA 相互作用后, 明显改变 DNA 的 CD 谱, 使 217 nm 正峰消失, 246 nm 负峰明显变小, 276 nm 的正峰也减弱, 这些变化又和高三尖杉酯碱浓度相关, 若用同样浓度的三尖杉碱与 DNA 作用, 也能引起 DNA 的 CD 谱类似的改变。

将高三尖杉酯碱与 DNA 相互作用后的复合物对蒸馏水透析 24 h, 然后再测定 DNA 的 CD 谱。由于药物小分子可以透析掉, DNA 又恢复了原来的 B 构象的 CD 谱, 这提示高三尖杉酯碱可能以非共价键形式与 DNA 相作用。

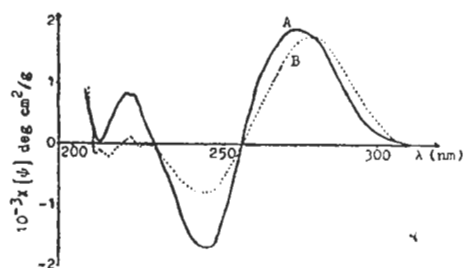


Fig 5. (A). DNA CD spectrum after dialysis of DNA-HHT complex against water for 24 h. (B). Difference in CD spectra of DNA-HHT complex and HHT.

讨 论

放线菌素 D 是临床常用抗癌抗生素, 其分

子中的酚噻唑环以 1:2 的比例嵌入于 DNA 的 CG 碱基对中, 二个环状多肽以 Van der Waals 力结合于 DNA 双螺旋小沟内。由于药物分子嵌入 CG 双键后, 从而抑制了 DNA 依赖的 RNA 聚合酶的活力⁽⁴⁾。本实验表明, 放线菌素 D 能明显改变 DNA 的 CD 谱, 特别是使 246 nm 负峰增大, 这些是否是药物嵌入 CG 碱基对后所引起 DNA 构象变化的特征 CD 谱, 尚需研究。

药理实验表明, 高三尖杉酯碱有很强的抑止肿瘤生长的生物活性, 而三尖杉碱却作用不明显⁽⁵⁾。但从对 DNA 构象影响看, 两者作用相似。因此改变 DNA 的构象和高三尖杉酯碱影响 DNA 的结构和功能及抑止肿瘤生长的相关性和贡献是值得探讨的问题。此外, 在观察药物引起 DNA 的 CD 谱改变的同时, 也应考虑由于药物和 DNA 相互作用后, 导致药物分子的 CD 谱变化。

Dalgleish 等研究了柔红霉素 (rubidomycin), 诺加霉素 (nogalamycin), 色霉素 (chromomycin) 和光神霉素 (methramycin) 等对小牛胸腺 DNA CD 谱的影响, 指出仅以 CD 谱的改变判断某一药物或试剂是否属 DNA 嵌合剂证据尚嫌不足, 还需用其它生化或生物物理方法加以证明⁽⁶⁾。本实验虽证明 HCT 对 DNA 的 CD 谱影响有一浓度极限, 但它对 DNA 代谢的作用已在前文中有所报告⁽⁷⁾, 其对 DNA 生物大分子的作用机理仍需研究。

参 考 文 献

- 1 Maria T, Jacqueline KB, Catherine CM, et al. Lack of Z-DNA conformation in mitomycin-modified polynucleotides having inverted circular dichroism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80 : 2874
- 2 Sato Y, Ckano T. Conformation change of DNA induced by 6-oxybenzo [a] pyrene radical. *Gann* 1982; 73 : 308
- 3 Xu B. Pharmacology of some natural products of China. *Trends Pharmacol Sci* 1981; 2 : 271
- 4 Sobell HM, Jain SC, Sakore TD, et al. Crystallographic studies of drug-nucleic acid crystal-

- line complex and their biological implications. In: Srivivasan R, Subramanian E, Yathindra N, eds. *Biomolecular structure, conformation, function, and evolution*; vol 1. 1st ed. Oxford: Pergamon Press, 1981 : 441-64
- 5 陈瑞婷、花泽、胥彬. 三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱的药理研究. 科学通报 1980; 18 : 859
- 6 Dalgleish DG, Fey G, Kersten W. Circular

- dichroism studies of complexes of the antibiotics daunomycin, nogalamycin, chromomycin and mithramycin with DNA. *Biopolymers* 1974; 13 : 1757
- 7 Xu B, Ling YH. Effect of hydroxycamptothecin on the activity of RNA and DNA polymerases prepared from murine hepatoma cells. *Am J Chin Med* 1985; 13 : 23

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Jul, 8 (4) : 374-377

Effects of four antitumor agents on DNA circular dichroism

LING Yi-He, SHEN Chun-Yi, SHI Qing-Luo, XU Bin

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

ABSTRACT Actinomycin D (Act D) is an effective anticancer antibiotic. Homoharringtonine (HHT) and 10-hydroxycamptothecin (HCT) are the potent antitumor alkaloids isolated from *Cephalotaxus fortunei* Hook. f. and *Camptotheca acuminata*, respectively.

In the present work, the circular dichroism (CD) spectra of calf thymus DNA were altered by Act D 10 or 20 $\mu\text{g/ml}$, i. e. the negative peak at 246 nm of DNA spectra was distinctly increased and the positive peak at 276 nm enhanced.

HHT and cephalotaxine (CT), possessing the common ring structure, showed similar CD spectra, and induced the same

alteration of DNA spectra. Moreover, the change of DNA CD spectra caused by HHT was found to be reversible.

The CD spectra of DNA with or without HCT did not show any difference. The intensities of CD spectra of DNA decreased seriously only when the concentration of HCT reached 44 $\mu\text{g/ml}$, indicating that there is a limit of concentration for the effect of HCT on the conformation of DNA.

KEY WORDS circular dichroism, DNA, actinomycin, homoharringtonine, harringtonine, 10-hydroxycamptothecin, antineoplastic agents