

顺铂对S180-V系小鼠肿瘤细胞DNA的交联作用及其生物学意义

贺福初、夏寿萱 (军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

提要 本文观察了顺铂对 S180-V 系小鼠肿瘤细胞 DNA 的两种交联(DNA-蛋白质交联和 DNA 链间交联)作用, 并初步探讨了这两种交联作用与顺铂引起的 DNA 复制抑制、细胞分裂抑制和细胞存活率降低等生物学后果之间的关系。证明 DNA 交联与 TdR 参入抑制、肿瘤细胞分裂抑制密切相关。

关键词 顺铂; 抗肿瘤药; 脱氧核糖核酸复制; 细胞分裂; 细胞存活; 交联试剂; 肉瘤 180

顺铂(cisplatin)在临床上对多种癌、瘤具有疗效, 其中包括一些对大部分抗癌药呈现抗性的肿瘤⁽¹⁾。其作用机制的研究已深入到细胞存活⁽²⁾, 增殖⁽³⁾, DNA 复制⁽⁴⁾和 DNA 结构⁽⁵⁾等层次。但由于观察条件不同, 所用生物材料遗传背景差别较大, 从噬菌体⁽⁴⁾, 疟原虫⁽³⁾, 中国仓鼠⁽⁵⁾到人⁽²⁾, 因而较难将各文献中不同层次的研究结果综合起来进行分析, 得到一个较为清晰的概念。本文通过定量检测顺铂在 S180-V 小鼠肿瘤细胞中引起的 DNA-蛋白质交联(DNA-protein crosslink, 简称 DPC)和 DNA 链间交联(DNA interstrand crosslink, 简称 ISC), 初步探讨了顺铂在同一细胞中所致 DNA 交联与 DNA 复制抑制、肿瘤细胞增殖抑制及细胞杀伤之间的关系。

方法与结果

DNA 交联 S180-V 系小鼠腹水瘤细胞⁽⁶⁾在含 10% 小牛血清的 Eagle 氏培养液中单层贴壁培养, 将处于对数生长期的细胞(约 1.5×10^6)用 [³H]TdR 11.1 MBq/L(中国科学院原子能所)标记 23-24 h, 加入顺铂(冶金部贵金属研究所及昆明医学院制注射剂), 37°C 保温 12 h, 倾去作用液, 用不含 [³H]TdR 的新鲜培养液继

续培养 12 h, 以细胞悬液进行背景照射(Background irradiation)。然后, 用我们改进的微孔滤膜 DNA 碱洗脱法⁽⁷⁾检测 DNA 交联。膜上 [³H]TdR 存留率反映 DNA 洗脱程度, DNA 交联会使 DNA 在膜上的存留率增加。增加的幅度反映交联的程度, 称之为 DNA 总交联度。蛋白质消化能除去 DPC 中的蛋白质而使原来不被洗脱的 DNA 片段被洗脱, 从而使 DNA 存留率下降。下降的幅度反映 DPC 的程度(即 DPC 度)。总交联度减去 DPC 度为 ISC 度。背景照射的作用是使不含交联的大部分 DNA 能被洗脱。详细操作见另文⁽⁷⁾。

检测表明, 顺铂在 S180-V 系细胞中引起两种交联: DPC 和 ISC (表 1)。

Tab 1. DNA cross-links in mouse S180-V cells induced by cisplatin. Cells exposed for 1 h at 37°C, then incubated for 12 h in the absence of drug. In all the tables n=6, $\bar{x} \pm SD$, **p<0.05, ***p<0.01 vs control.

Cisplatin ($\mu\text{mol/L}$)	Total cross-link	DNA-protein cross-link	DNA interstrand cross-link
10	$4.5 \pm 0.6^{***}$	$2.3 \pm 0.6^{***}$	$2.2 \pm 1.0^{**}$
20	$10.7 \pm 1.7^{***}$	$5.9 \pm 1.7^{***}$	$4.8 \pm 1.7^{***}$
40	$19.3 \pm 1.4^{***}$	$11.9 \pm 1.6^{***}$	$7.4 \pm 1.7^{***}$
60	$26.7 \pm 1.7^{***}$	$18.2 \pm 1.1^{***}$	$8.5 \pm 1.7^{***}$

细胞 DNA 合成的抑制 细胞(约 1.5×10^6)与不同浓度顺铂保温 1 h 后, 在含 [¹⁴C]TdR 1.11 MBq/L(中国医学科学院放射医学研究所)的新鲜培养液中培养 12 h, 然后检测细胞 DNA 中 [¹⁴C]TdR 参入。结果以 TdR 参入抑制%表示。观察到顺铂在引起两种 DNA 交联的同时, 抑制 [¹⁴C]TdR 参入细胞 DNA, 抑制 DNA 复制(表 2)。

细胞分裂的抑制 接种等量 S180-V 细胞

Tab 2. Inhibition of [^{14}C] TdR incorporation and cell division in mouse S180-V cells by cisplatin

Cisplatin ($\mu\text{mol/L}$)	cpm/ 10^4 cells	Cell number ($\times 10^{-4}$)
0	416 \pm 8	45 \pm 2
20	292 \pm 8***	30 \pm 1***
40	230 \pm 3***	24 \pm 1***
60	203 \pm 2***	20 \pm 1***

于几组培养瓶中, 培养 12 h, 然后用不同浓度的顺铂处理 1 h, 继续培养 12 h, 分别进行细胞计数。结果以细胞分裂抑制表示。实验表明, 顺铂抑制细胞增殖, 浓度愈大抑制愈强(见表 2)。

细胞存活率的降低 约 1.0×10^6 细胞与 60 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂保温 18 h, 之后继续培养 12 h, 加药组细胞基本都从培养瓶壁上脱落, 悬浮于培养液中。台盼兰细胞染色结果表明, 加药组细胞死亡率为 $29.9 \pm \text{SD } 2.7\%$, 对照组仅为 $2.8 \pm 0.5\%$, $p < 0.01$, n (实验次数) = 8。

DNA 交联度与 TdR 参入抑制密切相关(表 3)。TdR 参入抑制与细胞增殖抑制又密切相关, $r = 0.9993$ 。

Tab 3. Relationship between DNA cross-links and inhibition% of TdR incorporation. $x = \text{inhibition\% of TdR incorporation}$, $y = \text{degree of indicated DNA cross-links}$

	Equation of linear regression	coefficient of correlation
Total cross-links	$y = 2.4 + 1.9 x$	0.9871
DNA-protein cross-link	$y = 4.8 + 2.8 x$	0.9676
DNA interstrand cross-link	$y = -1.0 + 6.1 x$	0.9973

讨 论

本文用细胞增殖抑制和 TdR 参入抑制定量表示细胞增殖、DNA 复制抑制的程度。以两抑制率的相关性可以看出, 顺铂引起的 S 180-V 系细胞增殖抑制与它所造成的 DNA 复制抑制有关。从 TdR 参入抑制率与 DNA 交联度的密切相关又可得出顺铂引起的 DNA 复制抑制与它所造成的 DNA 交联有关。这两种相关提示了

DNA 复制抑制和细胞增殖抑制很可能是 DNA 交联的结果。此外, 顺铂与低抗癌活性的同分异构体反铂的对比研究表明, 近 10 倍浓度的反铂才能达到顺铂的同等细胞杀伤力⁽⁸⁾。与此相对应, 引起同等程度 DNA 交联的反铂浓度要比顺铂浓度约高 10 倍⁽⁹⁾。根据上述结果, 我们推测, 顺铂抗癌的生化机理很可能是首先使肿瘤细胞产生 DNA 交联, 从而抑制 DNA 复制和细胞增殖, 最终导致细胞死亡。是 DPC, 还是 ISC, 还是这两种交联都产生这些生物学效应, 尚待研究。

参 考 文 献

- Gottlieb JA, Drewinko B. Review of the current clinical status of platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. *Cancer chemother Rep (Part I)* 1975; 59 : 621
- Erickson IC, Zwelling L, Kohn KW. Differential cytotoxicity and DNA crosslinking in normal and transformed human fibroblasts treated with cisplatin *in vitro*. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1980; 21 : 267
- Wright M, Lacorre-Arescaldino I, Macquet JP, Daff'e M. Induction of polyploid nuclei in the plasmodium of *Physarum polycephalum* by platinum antitumor compounds. *Cancer Res* 1984; 44 : 777
- Harder HC, Graham R, Leroy AF. Template primer inactivation by cis- and trans-dichlorodiamine platinum for human DNA polymerase α , β and Rauscher murine leukemia virus reverse transcriptase, as a mechanism of cytotoxicity. *Ibid* 1976; 36 : 3821
- Zwelling LA, Bradley MO, Sharkey NA, Anderson T, Kohn KW. Mutagenicity, cytotoxicity and DNA crosslinking in V 79 Chinese hamster cells treated with cis- and trans-pt (II) diaminedichloride. *Mutat Res* 1979; 67 : 271
- 旷健、柳惠图、王永潮、雷思普. S180-V 系细胞的增殖周期及其同步化研究. *中华肿瘤杂志* 1983; 5 : 161
- 贺福初、夏寿萱. 用碱洗脱法检测 DNA-蛋白质交联和 DNA 链间交联. *生物化学杂志* 1986; 2(6) : 71
- Zwelling LA, Filipinski J, Kohn KW. Effect of thiourea on survival and DNA crosslink formation in cells treated with platinum (II)

complexes, L-phenylalanine mustard, and bis (2-chlorethyl) methylamine. *Cancer Res* 1979, 39 : 4989

9 Zwelling LA, Anderson T, Kohn KW. DNA-

protein and DNA interstrand crosslinking by cis- and trans-platinum (II) diaminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity. *Ibid* 1979, 39 : 365

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Sep, 8 (5) : 468-470

DNA cross-links and their biological significance in S180-V mouse tumor cells treated with cisplatin

HE Fu-Chu, XIA Shou-Xuan

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*)

ABSTRACT DNA-protein cross-link and DNA interstrand cross-link in S180-V mouse tumor cells treated with cisplatin were explored. Correlations of these cross-links with the biological events, such as the inhibition of DNA replication, the retardation of cell division and the reduction of cell survival were set up. The biochemical processes for cisplatin in killing S180-V tumor cells were tentatively interpreted as:

first, the formation of DNA crosslinks; then the inhibition of DNA replication, the retardation of cell division; and the final death of cells.

KEY WORDS cisplatin; antineoplastic agents; DNA replication; cell division; cell survival; cross-linking reagents; Sarcoma 180