

## 3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环锕二柠檬酸配合物对 L7712 细胞 DNA、RNA、蛋白质、核蛋白和 ATP 代谢的影响<sup>1</sup>

刘力生<sup>2</sup>、王萍、王时征、郑荣梁、张龙弟、陈淑英<sup>3</sup>、王初华<sup>3</sup>、侯自杰<sup>3</sup>

(兰州大学生物物理学研究室, <sup>3</sup>化学系, 兰州 730001)

*Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Mar; 10 (2) : 188-191

### Effects of complex of 3,6-di-(dimethylamino)-dibenzopyridonium with praseodymium dicitrate on the syntheses of DNA, RNA, protein, nucleoprotein and ATP of leukemia L 7712 cells in mice<sup>1</sup>

LIU Li-Sheng<sup>2</sup>, WANG Ping, WANG Shi-Zheng, ZHENG Rong-Liang, ZHANG Long-Di, CHEN Shu-Ying<sup>3</sup>, WANG Chu-Hua<sup>3</sup>, HOU Zi-Jie<sup>3</sup>

(Section of Biophysics, <sup>3</sup>Department of Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730001)

**Abstract** The incorporations of [<sup>3</sup>H]thymidine, [<sup>3</sup>H]uridine and [<sup>3</sup>H]leucine into DNA, RNA and protein synthesis in leukemia 7712 cells were inhibited by the complex of 3,6-di-(dimethylamino)-dibenzopyridonium with praseodymium (Pr, rare earth element) dicitrate 34 µg/ml for 3-24 h. The degree of inhibition increased in proportion to the incubation time. After being treated with [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>I]<sub>3</sub>[Pr(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>] 34 µg/ml for 3, 6, 12 and 24 h, the incorporation of [<sup>32</sup>P]Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> into the nucleoprotein of leukemia 7712 cells was inhibited by 49, 57, 65 and 85%, while those into ATP were inhibited by 43, 59, 65 and 83%, respectively. The ID<sub>50</sub> of [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>I]<sub>3</sub>[Pr(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>] on DNA synthesis in leukemia 7712 cells at 24 h was 22 µg/ml. After the complex was removed from the medium entirely, the rate of DNA synthesis decreased with time over 3-12 h.

This result indicated that the inhibition mechanism was likely due to damage to the DNA template.

**Key words** dimethylamino-dibenzopyridonium praseodymium dicitrate; leukemia L 7712; [<sup>3</sup>H]thymidine; [<sup>3</sup>H]uridine; [<sup>3</sup>H]leucine; nucleoproteins; adenosine triphosphate

<sup>1</sup>Project supported by National Natural Science Foundation of China, № 2860369

<sup>2</sup>Now in Section of Bioengineering, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225

**提要** 3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环锕二柠檬酸配合物对 L 7712 细胞 DNA, RNA, 蛋白质, 核蛋白和 ATP 代谢的抑制作用, 在 3-24 h 内均随时间延长而提高。它对 L 7712 细胞 DNA 合成的 ID<sub>50</sub> 为 22 µg/ml。它对癌细胞 DNA 合成的抑制作用, 似属模板损伤型。

**关键词** 3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环锕二柠檬酸配合物; 白血病 L 7712; [<sup>3</sup>H]胸腺嘧啶核苷; [<sup>3</sup>H]尿苷; [<sup>3</sup>H]亮氨酸; 核蛋白类; 腺苷三磷酸

1987年10月3日收稿 1988年7月22日接受

<sup>1</sup> 国家自然科学基金资助项目 № 2860369

<sup>2</sup> 现在: 仲恺农业技术学院生物工程研究室, 广州 510225

碘杂环化合物具有辐射防护<sup>(1)</sup>、降血压<sup>(2)</sup>和抗心律失常<sup>(3)</sup>的作用。稀土元素对肿瘤组织有较大亲和力,可成为癌细胞的组分,从而抑制肿瘤的发展<sup>(4)</sup>。所以我们设想,这两类化合物化合在一起,可能有较好的抗癌作用。同时合成了一批纯化合物。本文研究 3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环镧二柠檬酸配合物对 L 7712 癌细胞 DNA、RNA、蛋白质、核蛋白和 ATP 代谢的影响。

## Materials

**癌细胞** 无菌取接种 d 5 的 L 7712 白血病细胞<sup>(5)</sup>,生理盐水洗涤一次,计数配成所需浓度。

**药物** 用无菌水将 3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环镧(稀土)二柠檬酸配合物等 15 种及其前体(即 3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环甲酸盐和二柠檬酸镧钠)分别在 80-90°C 制成所需浓度。

**标记物** [<sup>3</sup>H]脱氧胸苷([<sup>3</sup>H]TdR, 999 GBq/mmol), [<sup>3</sup>H]尿苷([<sup>3</sup>H]UR, 724 GBq/mmol), [<sup>3</sup>H]亮氨酸([<sup>3</sup>H]Leu, 2.96 TBq/mmol)均为上海原子核研究所产品。 [<sup>32</sup>P]磷酸氢二钠,中国科学院原子能研究所产品。

**消化剂** 过氧酸和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 容量比 1:1。

**闪烁液** 0.5% PPO 和 0.01% POPOP 的二甲苯溶液与乙二醇甲醚, 6:4(vol:vol)。

**标准 ATP** 西德 Boehringer 产品。

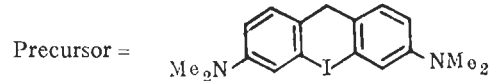
## Methods and results

**15 种 3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环稀土二柠檬酸配合物及其前体对 L 7712 细胞 DNA 合成的影响** 用体外培养细胞 [<sup>3</sup>H]TdR 参入法<sup>(6)</sup>,将 2 × 10<sup>5</sup>/ml 的 L 7712 细胞悬液分装成每瓶 5 ml,置 37°C 温育 14 h 后随机分组,按组分别加入 15 种碘杂环稀土配合物([C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>I]<sub>3</sub>[RE(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>], RE 为各种稀土元素)及其前体,使终浓度均为 20 μmol/L,对照组则加入相应的水溶液。同时加入 0.05 ml [<sup>3</sup>H]

TdR,使放射性比度为 37 kBq/ml,继续培育 24 h 后,离心、洗涤、消化。置 FJ-2100 型自动液体闪烁计数器测放射性,比较对照组与各实验组的平均 cpm,结果如 Tab 1。

**Tab 1. Inhibition of [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>I]<sub>3</sub>[RE(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>] 0.02 mmol/L on incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine into DNA of leukemia 7712 cells in mice *in vitro*. n = 3,  $\bar{x} \pm SD$ . P < 0.01 vs control.**

Group	[ <sup>3</sup> H]TdR in DNA 10 <sup>-4</sup> × cpm	Inhibiting rate %
Control	83.7 ± 3.3	
Na <sub>3</sub> Pr(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	88.5 ± 3.6	- 5.8
Precursor	44.1 ± 2.1	47.3
RE = La	19.2 ± 0.8	77.0
RE = Ce	20.8 ± 1.0	75.1
RE = Pr	17.9 ± 0.7	78.6
RE = Nd	17.5 ± 0.8	79.1
RN = Sm	20.4 ± 0.9	75.6
RE = Eu	22.1 ± 1.7	73.6
RE = Gd	20.8 ± 1.1	75.2
RE = Tb	24.0 ± 1.0	71.3
RE = Dy	25.0 ± 1.1	70.0
RE = Ho	25.4 ± 1.2	69.7
RE = Er	20.0 ± 1.0	76.1
RE = Tm	19.0 ± 1.0	77.3
RE = Yb	23.3 ± 1.1	72.2
RE = Lu	23.6 ± 1.2	71.8
RE = Y	22.8 ± 1.2	72.7



[C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>I]<sub>3</sub>[RE(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>], RE = La, Ce, Pr, Nd, ...

从 Tab 1 看, 15 种稀土配合物对 [<sup>3</sup>H]TdR 参入 L 7712 细胞 DNA 的抑制率大体相似。由于镧的来源较多,且镧配合物的相对水溶性较好,故选 3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环镧二柠檬酸配合物做了以下进一步的研究。

**3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环镧二柠檬酸配合物对 L 7712 细胞 DNA 合成的半抑制量(ID<sub>50</sub>)** 方法同上,结果如 Tab 2。计算其 ID<sub>50</sub> 和 95% 置信限为 21.8 (13.4-35.5) μg/ml。

**3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环镧二柠檬酸配合物对 L 7712 细胞 DNA 合成的后作用** 细胞悬液的分装与预培养同上,加入 [C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>

Tab 2. Inhibition of  $[C_{17}H_{20}N_2I]_3[Pr(C_6H_5O_7)_2]$  on incorporation of  $[^3H]$ thymidine into DNA of leukemia 7712 cells in mice *in vitro*.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm SD$ .

Group	$[^3H]$ TdR in DNA $10^{-4}\times cpm$	Inhibiting rate %	ID <sub>50</sub> ( $\mu g/ml$ )
Control	92.1 $\pm$ 4.4		
4 $\mu g/ml$	61.3 $\pm$ 3.0	30.2	
8 $\mu g/ml$	57.8 $\pm$ 3.0	37.2	21.8
16 $\mu g/ml$	54.9 $\pm$ 2.3	40.4 (13.4-35.5)	
32 $\mu g/ml$	38.2 $\pm$ 1.7	58.6	

$N_2I]_3[Pr(C_6H_5O_7)_2]$ 的终浓度为 32  $\mu g/ml$ , 在 37 $^{\circ}C$  温育 9 h 后, 生理盐水洗 2 次, 除去药物, 再加入 5 ml 新鲜 199 培养液, 37 $^{\circ}C$  分别培育 3, 6, 9 和 12 h 后, 加入  $[^3H]$ TdR, 37 kBq/ml, 均再培育 2 h. 按上法测其放射性, 比较各时相实验组与对照组平均 cpm 的相对参入率<sup>(7-9)</sup>, 结果如 Tab 3. 实验组的参入率分别相当对照组的 29%, 12%, 6% 和 4%.

**3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环 错二柠檬酸配合物对 L 7712 细胞 DNA, RNA 和蛋白质合成的抑制** 将 L 7712 细胞  $2\times 10^5/ml$  的悬液每瓶分装 5 ml, 37 $^{\circ}C$  预培养 14 h 后, 加入  $[C_{17}H_{20}N_2I]_3[Pr(C_6H_5O_7)_2]$  使终浓度为 34  $\mu g/ml$ , 同时按组分别加入  $[^3H]$ TdR,  $[^3H]$ UR 和  $[^3H]$ Leu, 均使放射性比度为 37 kBq/ml, 继续在 37 $^{\circ}C$  培养 3, 6, 12 和 24 h 后, 如上法测量放射性. 按各时相比较对照组与实

Tab 3. Rate of DNA synthesis measured as percentage of control incorporation of  $[^3H]$ thymidine into DNA in leukemia 7712 cells at various time after treatment with  $[C_{17}H_{20}N_2I]_3[Pr(C_6H_5O_7)_2]$  32  $\mu g/ml$ .  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm SD$ .

Time	Group	$10^{-4}\times [^3H]$ TdR in DNA (cpm)	Incorporation rate (%)
3 h	Control	9.24 $\pm$ 0.32	100
	Treated	2.52 $\pm$ 0.12	29.3
6 h	Control	18.37 $\pm$ 0.36	100
	Treated	2.18 $\pm$ 0.14	12.0
9 h	Control	26.79 $\pm$ 1.20	100
	Treated	1.52 $\pm$ 0.06	5.7
12 h	Control	28.07 $\pm$ 1.20	100
	Treated	1.20 $\pm$ 0.04	4.3

验组的平均 cpm, 结果如 Fig 1. 由 Fig 1 可见, 该配合物对 L 7712 癌细胞 DNA, RNA 和蛋白质合成均有显著的抑制作用, 其抑制率均随时间延长而增高.

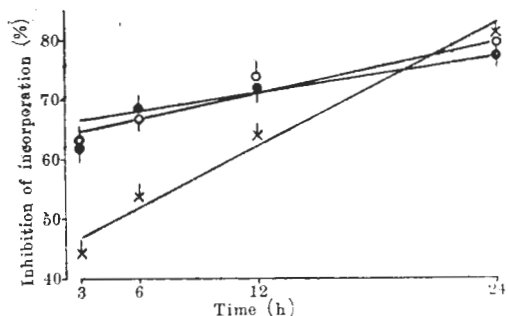


Fig 1. Inhibition of  $[C_{17}H_{20}N_2I]_3[Pr(C_6H_5O_7)_2]$  34  $\mu g/ml$  on  $[^3H]$ TdR ( $\circ$ ),  $[^3H]$ UR ( $\bullet$ ) and  $[^3H]$ Leu ( $\times$ ) incorporations into leukemia L 7712 cells *in vitro*.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm SD$ .

**3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环 错二柠檬酸配合物对核蛋白代谢的影响** 方法同上, 唯标记物改用  $[^{32}P]Na_2HPO_4$ , L 7712 细胞悬液为  $2\times 10^5/ml$ , 每瓶分装 20 ml, 同时加入  $[C_{17}H_{20}N_2I]_3[Pr(C_6H_5O_7)_2]$  (终浓度 34  $\mu g/ml$ ) 和标记物 ( $[^{32}P]$  37 kBq/ml), 37 $^{\circ}C$  培育 3, 6, 12 和 24 h, 取出癌细胞在 0-4 $^{\circ}C$  下用生理盐水洗涤 4 次, 加 5% 三氯乙酸 5 ml, 在 0-4 $^{\circ}C$  用 JC-2 型超声处理机破碎细胞 5 min, 用钡盐提取法分离核蛋白和 ATP.

按核素法<sup>(6)</sup>将上述细胞匀浆经重复萃取的酸不溶部分, 制成 2.0 ml 悬液, 取 0.20 ml 铺

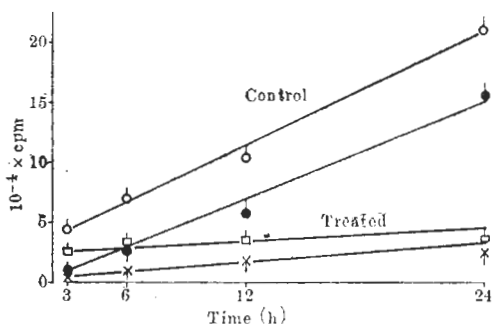


Fig 2. Incorporation of  $[^{32}P]$  into ATP ( $\circ$ ,  $\square$ ) and nucleoprotein ( $\bullet$ ,  $\times$ ) of leukemia L 7712 cells in mice treated with  $[C_{17}H_{20}N_2I]_3[Pr(C_6H_5O_7)_2]$  34  $\mu g/ml$ .  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm SD$ .

样在铝碟上,干燥后用 FJ-367 型闪烁探头测  $\beta$  射线,重复 3 个样品。结果如 Fig 2。对照组  $^{32}\text{P}$  参入核蛋白的量,随时间延长而迅速增加,实验组则增加缓慢。在相应时间,实验组比对照组  $^{32}\text{P}$  参入的抑制率依次为 49%, 57%, 65% 和 85%。

**3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环 锗二柠檬酸配合物对 ATP 代谢的影响** 从上法分得 L 7712 细胞的 ATP 等腺苷类物质的酸溶 钡 不溶部分,用标准 ATP 作对照,电泳分离样品中的 ATP。测  $\beta$  射线的 cpm, 结果如 Fig 2。对照组  $^{32}\text{P}$  的参入率对时间呈线性上升,给药组却上升甚微。各对应时间(3, 6, 12 和 24 h) 实验组的  $^{32}\text{P}$  参入率均比对照组的低,其抑制率依次为 43%, 59%, 65% 和 83%。

## Discussion

一般说对癌细胞的  $\text{ID}_{50}$  在 1-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  内的物质,可以认为是对癌细胞有细胞毒作用的药物<sup>(9,10)</sup>。3,6-二-[二甲氨基]二苯并碘六环 锗二柠檬酸配合物对 L 7712 细胞的  $\text{ID}_{50}$  为 22  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 因此它对癌细胞的细胞毒作用是显著的。先用该配合物与 L 7712 细胞温育 9 h 后,再除去该配合物。实验组  $[^3\text{H}]\text{TdR}$  参入 DNA 的相对参入率随时间延长而下降,表明其对 DNA 合成的抑制作用是不可逆的,故它对 DNA 合成的作用方式,可能属模板损伤型<sup>(11)</sup>。

该配合物对 L 7712 细胞上述代谢动态过程的作用,早期对 DNA 和 RNA 的抑制率较高,对蛋白质的抑制率较低,后期至 24 h 三者的抑制率都在 80% 左右,同时它对核蛋白和 ATP 代谢抑制的动态过程具有很好的相关性,从而显示该配合物对癌细胞的抑制作用。

似乎与其对 DNA $\rightarrow$ RNA $\rightarrow$ 蛋白质这样一个分子转录与翻译过程的干扰有关,同时也可能与其能量代谢 ATP 的合成受抑制有密切的联系。

## 参 考 文 献

- 1 刘力生、董金廷、郑荣梁。从能量转移观点来研究碘杂环化合物对电离辐射的防护作用。科学通报 1974; 6 : 274
- 2 王继光、梁重栋、张培楼。碘杂环化合物对心血管作用的研究的初步总结。同上 1963; 10 : 57
- 3 Cao W, Zhao DH, Sheng BH, Chen SY. Antiarrhythmic effects of iodiumheterocycle compounds. *Acta Pharm Sin* 1986; 21 : 161
- 4 Верхова ОА, Сорока ВР. Биологическая роль лантанидов. *Успехи современной биологии* 1980; 90 : 365
- 5 郑升、孟德鸣、张永基,等。可移植性小鼠白血病模型(L 7712)的初步研究。肿瘤 1982; 2 : 6
- 6 Liu LS, Xiao XH, Wang XX, Zheng RL, Zhou XF. Effect of  $\gamma$ -schisandrin on metabolism of DNA, ATP and nucleoprotein of cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 1984; 5 : 130
- 7 Liu LS, Xiao XH, Zhang LD, Zheng RL, Wu FE, Zhu ZQ. Effects of anemodeanin a on DNA, RNA and protein of tumor cells *in vitro* and plasma cAMP in mice. *Acta Pharmacol Sin* 1985; 6 : 192
- 8 刘力生、肖显华、张龙弟、郑荣梁、谢晶曦。联苯双酯对癌细胞 DNA, RNA, 蛋白质体内血浆中 cAMP 代谢和细胞免疫功能的影响。兰州大学学报(生物学辑刊) 1985; 21 : 42
- 9 Liu LS, Xiao XH, Zhang LD, et al. Effects of synthetic isoharringtonine on DNA, RNA, ATP, protein and nucleoprotein of transplanted tumour cells in mice. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7 : 279
- 10 Smith CG, Lummis WL, Grady JE. An improved tissue culture assay I. Methodology and cytotoxicity of anti-tumor agents. *Cancer Res* 1959; 19 : 843
- 11 Painter RB. Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature* 1977; 265 : 650