

氧代赖氨酸(I-677)对赖氨酸参入的影响及其亚细胞分布

乐秀芳 吴淑云 吴富根 桂金珠 胥彬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 I-677为一结构简单的抗肿瘤抗菌素,本文以标记 Leu 及 Lys 为前体,观察此药对蛋白质合成,特别是对组蛋白合成的影响.实验证明 I-677 对 [^3H]Lys 参入组蛋白有一定抑制作用,抑制率为 59%,而对 [^3H]Leu 的参入无明显影响.采用微生物测定方法观察 I-677 的亚细胞分布,发现它主要分布在可溶性细胞质部份.

关键词 氧代赖氨酸; 赖氨酸; 亮氨酸; 组蛋白; 亚细胞分布

氧代赖氨酸(I-677)是一抗肿瘤抗菌素,结构与 Lys 相似,不同给药途径实验证明对多种小鼠实体型肿瘤有效⁽¹⁾.我们发现它能影响小鼠体内纤维蛋白原的合成⁽²⁾,而对其它蛋白组分的影响也是一个值得探讨的问题.肿瘤细胞是失去控制而迅速繁殖之异常细胞.组蛋白

1981年10月20日收稿 1982年7月10日修回

是一种碱性蛋白质, 富含 Lys, 是细胞染色体的主要成份, 与细胞分裂密切相关. I-677 之结构与 Lys 很相似, 因此考虑其抗肿瘤作用是否与影响肿瘤组蛋白的合成有关. 本文采用微生物测定方法观察药物的亚细胞分布以求深入了介此药的作用特点.

材料与方 法

本实验所用 [^3H]Leu (54 Ci/mmol) 和 [^3H]Lys (15 Ci/mmol) 由上海原子核研究所提供, [^{14}C]Lys (312 mCi/mmol) 由四川放射医学研究所提供. RPMI-1640 培养基未由日本制药株式会社出品, 用重蒸馏水配制, 0.5% NaHCO_3 调节 pH 至 7.0-7.2. I-677 由本所抗菌素室提供, 为白色粉末, 用生理盐水溶解.

瘤块体外培养法 按文献方法⁽³⁾, 在无菌条件下取出肉瘤-37(S-37), 切成 20 mg 左右扁平小块, 放入 0.9 ml 的 RPMI-1640 培养液中加入不同浓度 I-677 0.1 ml, 於 37°C 保温 2 h, 随后各管加入 0.2 μCi [^{14}C] Lys 或 1 μCi [^3H] Lue, 继续温育 4 h, 取出瘤块用生理盐水洗涤 3 次, 用滤纸吸去水份, 以甲酸, 过氧化氢消化后进行放射性测定.

组蛋白的分离及测定 取接种后 1 周 S37 小鼠各 1 只, 给药组 ip I-677 0.1 g/kg 或 0.4 g/kg qd \times 2 d, 于次日给药后 2 h ip [^3H]Lys 1 mCi/kg, 或 [^3H] Leu 0.5 mCi/kg 此时对照小鼠也 ip 同位素. 给同位素后 1, 4 h 解剖小鼠, 取出瘤组织, 参照文献方法⁽⁴⁾分离组蛋白.

瘤组织加入生理盐水, 匀浆后 800 \times g 离心, 弃去含有漂浮残渣的上清液. 沉淀用酸化生理盐水 (pH 3.5) 洗涤, 以上述速度离心去除上面一半沉淀, 重复数次至上清液澄清为止. 此最后沉淀为核蛋白部份, 用 2 倍体积 0.25 N HCl 提取, 提取液用微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 得澄清液体, 以 6 倍体积丙酮沉淀蛋白, 再用丙酮洗 2 次, 最后得组蛋白. 用蒸馏水溶解之, 取其一部份用 Folin 试剂测蛋白质含量, 另取

一部份测放射强度.

提纯之组蛋白仍按文献方法进行聚丙烯凝胶电泳, 胶浓度为 20%, 用 0.1 N 乙酸作电泳液, 电泳时间约为 8 h.

亚细胞各成份分离及 I-677 含量的微生物测定 按文献方法⁽⁵⁾分离细胞各成份. 以 2.2 M 蔗糖溶液配成 12% 的组织悬液, 40,000 \times g 离心 1 h, 所得沉淀加入 1.0 M 蔗糖溶液 2000 \times g 离心 15 min, 得细胞核部分. 去核后的上清液配成等渗蔗糖溶液, 12,000 \times g 离心得线粒体, 100,000 \times g 离心得微粒体及可溶性细胞质部份. 上述操作所用器皿均作无菌处理, 所得各亚细胞组份, 用生物检定法测定 I-677 的浓度, 实验菌用 *S. sake* 菌, 以杯碟扩散法进行测定, 测量抑菌圈大小, 根据标准曲线换算成 I-677 浓度. 取与上述实验同等量的肝组织 (0.8 g) 分离各组份用 Folin 试剂测定各组份的蛋白质总量.

实验结果

I-677 对标记氨基酸参入 S37 总蛋白的影响 本实验中 I-677 在各反应管中的最终浓度为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml. 所测得数据以不加 I-677 对照管之值即 cpm/mg 瘤组织为 100% 进行计算, 结果见图 1. 以 [^3H] leu 作为参入蛋白质合成前体时 I-677 对 S37 蛋白质合成的影响与对照组相比, 作用不明显. 而用 [^{14}C] Lys 进行实验时, 均低於对照值.

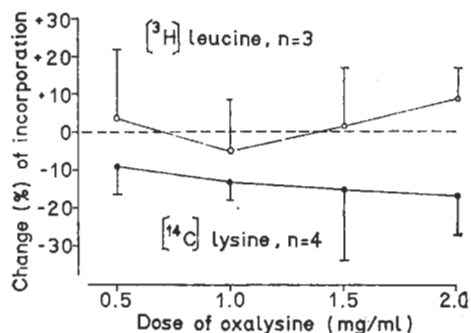


Fig 1. Influence of oxalysine on incorporation of [^3H]leucine and [^{14}C]lysine into protein in S37 *in vitro*

I-677 浓度为 2.0 mg/ml 时, 参入下降 17%
 $P > 0.05$.

I-677 对标记氨基酸参入 S37 组蛋白的影响 实验所得纯组蛋白进行聚丙烯凝胶电泳得 4 条带 5 个组分 (f 2a₁, f 2 a₂, f 2b, f 3, f 1) 与文献报道一致。

I-677 影响标记氨基酸参入组蛋白的结果列于表 I。当 I-677 的剂量为 0.4 g/kg 时, 对 [³H] Lys 参入组蛋白有一定抑制作用, 其抑制率为 59% $P < 0.05$, 而对 [³H] Leu 的参入无作用, 与体外试验结果一致。降低 I-677 的剂量为 0.1 g/kg 时, 观察 [³H] Lys 的参入作用, 对照组的 cpm 值为 5786 ± 1725 , I-677 组为 6623 ± 939 , 无抑制作用。

I-677 的亚细胞分布 取接种 1 周后的 S37 或 S180 小鼠, ip I-677 后不同时间, 取出瘤组织, 用微生物法进行含量测定, 发现给药后 1 h I-677 就已到达小鼠各组织, 因此本实验于给药后 1 h 进行。

取肉瘤小鼠 1 只, ip I-677 1 g/kg, 1h 后取出肝瘤组织, 按方法 3 分离各亚细胞成份, 肿瘤组织中所得分的各成份仅在可溶性细胞质部分能测到 I-677 的含量, 其他各组份均不显示 I-677 的抗菌活性。肝细胞中各组份的实验结果见表 2。从此表可见在肝细胞中 I-677 也大部份分布在可溶性细胞质内。

讨 论

I-677 是 Lys 的类似物, 结构简单, 有一

Table 1. Influence of oxalysine (0.4 g/kg) on incorporation of [³H]lysine and [³H]leucine into histone of sarcoma-37 (cpm/mg histone), $n = 5$ $\bar{x} \pm SD$.

	[³ H]lysine		[³ H]leucine
	1 h	4 h	4 h
Control	2793 ± 318	5092 ± 1721	693 ± 264
Oxalysine	2356 ± 813*	2096 ± 1671**	729 ± 158*
Inhibition	16%	59%	—

Compared with control * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$

Table 2. Subcellular distribution of oxalysine in liver of tumor-bearing mice, $n = 2$

	Oxalysine		Protein content	
	(μg/ml)		(mg)	
Nuclear	3.2	3.8	6.4	6.8
Mitochondrial	3.2	6.0	4.3	4.0
Microsomal	5.1	4.5		4.3
Soluble cytoplasmic fraction	80	85	16.7	15.4

定抗肿瘤活性, 根据其结构特点, I-677 的抗肿瘤作用可能是由于影响蛋白质的合成。实验结果发现, 用标记 Lys 作为蛋白质参入前体时, I-677 能影响蛋白质合成, 对总蛋白的抑制率为 17%, 对组蛋白的抑制率为 59%。当用标记 Leu 作为蛋白质参入前体时, 则 I-677 对总蛋白和组蛋白均无影响, 这说明 I-677 对组蛋白合成的影响是有一定选择性。由于组蛋白富含 Lys, 用标记 Lys 作为蛋白质参入前体, 则较易显示出药物的作用。采用不同的标记氨基酸得到不同的实验结果, 在研究 X 射线照射对大鼠增殖组织中核蛋白合成的影响时, 也得到相似结果, 即 X 射线可影响 [¹⁴C]Lys 参入核蛋白, 而对 [¹⁴C]Leu 的参入却无作用, 在某些增殖组织甚至有上升趋势⁽⁶⁾。

用微生物法测定 I-677 的亚细胞分布, 由于受方法灵敏度的限制, 瘤组织仅在可溶性细胞质部份显示出 I-677 的抗菌活性, 药物在肝中含量较高, 它的分布特点也显示主要存在于可溶性细胞质部份, 由此看来 I-677 对 Lys 参入组蛋白的影响不是由于直接影响核糖核蛋白体的蛋白质合成, 可能影响携带 Lys tRNA 所致, 由于组蛋白主要在细胞质内合成, 这也与 I-677 的分布特点相符合, 本实验所分得的微粒体部份由于没有用等渗蔗糖液洗涤因此可能有极少量可溶性细胞质存在, 使测得值略为偏高。

致谢 庞大伟和同位素组同志协助进行

参 考 文 献

1 乐秀芳、吴富根、胥 彬. 药学学报 1980 年 7

- 月, 15 (7):391
 2 乐秀芳、吴富根、胥 彬. 待发表
 3 Nicholson RI. *Eur J Cancer* 1977 Nov; 13 (11):1225
 4 Johns EW. *Biochem J* 1967 Jul; 104 (1):78
 5 Bresnick E, Liebelt RA, Stevenson JG, Madix

- JC. *Cancer Res* 1967 Mar; 27 (3):462
 6 Hidégi EJ, Holland J, Streffer C, van Beuningen D. Biochemical phenomena in ionizing irradiation of cells. In: Busch H, ed. *Methods in cancer research*, vol 15. NY: Academic Press, 1978:234-47

Acta Pharmacologica Sinica 1983 Mar; 4 (1) : 54—57

INFLUENCE OF OXALYSINE (I-677) ON THE INCORPORATION OF LYSINE AND ITS SUBCELLULAR DISTRIBUTION

YUE Xiu-fang, WU Shu-yun, WU Fu-geng, GUI Jin-zhu, XU Bin
 (Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT Oxalysine (I-677) was found to be an antitumor antibiotic with a simple chemical structure very similar to lysine. In this paper, we investigated the effect of I-677 on protein biosynthesis, in particular the synthesis of histone. When [^{14}C]lysine or [^3H]lysine was used as a precursor, a 17% inhibition of protein synthesis *in vitro* and a 59% inhibition on biosynthesis of histone *in vivo* were noted. But such an inhibitory effect of I-677 was

not seen in the experiments using [^3H]leucine as a precursor.

The subcellular distribution of I-677 in liver and tumor of mice bearing sarcoma was determined by a microbiological assay. The drug content was highest in the soluble cytoplasmic fraction.

KEY WORDS oxalysine; lysine; leucine; histone; subcellular distribution