

冬凌草甲素对体外无细胞 DNA 合成的影响¹

李 瑛、张 霖沐 (河南省医学科学研究所, 郑州 450052)

提要 冬凌草甲素(Orid)对部分纯化的 DNA 聚合酶 α 催化的体外无细胞系 DNA 合成有明显抑制作用。Orid 与酶液预保温, Orid 抑制作用增强, 而 Orid 与 DNA 或脱氧核苷三磷酸预保温, 抑制作用未增强, 提示冬凌草甲素可能对 DNA 聚合酶 α 有抑制作用。

关键词 冬凌草甲素; 脱氧核糖核酸聚合酶 II 类; 脱氧核糖核酸复制; Ehrlich 瘤癌

冬凌草甲素(oridonin, Orid)是由植物冬凌草(*Rabdosia rubescens* Hemsl)中提取的一种抗肿瘤有效成份。其化学结构为四环二萜类化合物, 生物活性中心为环外亚甲基环戊酮结构⁽¹⁾。体内外实验结果表明: 冬凌草甲素对多种移植性小鼠肿瘤株和体外培养的人癌细胞均有明显的抑制作用⁽²⁾。冬凌草甲素对胸腺嘧啶核苷参入肿瘤细胞 DNA 有明显抑制作用, 同时肿瘤细胞中 DNA 合成前体物胸苷酸堆积; 提示药物可能影响核苷酸底物聚合形成 DNA 的过程⁽³⁾。为阐明药物的作用机理, 为临床化疗合理用药提供理论依据, 我们观察了药物对体外无细胞系 DNA 合成的影响。

材料与 方法

Orid 为郑州化学制药厂产品; 小牛胸腺 DNA, 纯度 $>95\%$, 中国科学院生物物理所生化厂产品; 脱氧核苷三磷酸(dATP, dTTP 和 dGTP)均为 Sigma 产品; [³H]dCTP(比活性 555 GBq/mmol)为中国科学院原子能研究所产品; DEAE-纤维素(DE-52)为 Whatman 产品。

实验采用小鼠艾氏腹水瘤株, 用昆明种小鼠传代。小鼠由本院动物场提供。

DNA 聚合酶的提取及部分纯化 参照文献(4)方法, 所有操作在 0—4℃进行。取接种后 d 6-7 腹水瘤细胞, 用生理盐水洗涤两次, 加入少量缓冲液 A(含 Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.5, MgCl₂ 5 mmol/L, EDTA 0.5 mmol/L, β -巯基乙醇 2 mmol/L); 放入液氮中冷冻 10—20 min 后取出, 加入 2—3 倍容量的缓冲液 A, 使细胞冻融。冻融细胞用聚四氟乙烯匀浆器匀浆, 镜检罕见完整细胞。匀浆经 60 min 超速离心(105 000 $\times g$), 取上清液行 DEAE-纤维素柱层析。柱容量约 50 ml(1.8 \times 20 cm)。纤维素经酸、碱处理后装柱, 层析柱先用大量缓冲液 B 平衡(含 Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.5, EDTA 0.1 mmol/L, β -巯基乙醇 1 mmol/L, 10%甘油)。上样后用含有 KCl 50 mmol/L 的缓冲液 B 洗脱至几乎无蛋白质存在, 用含 KCl 300 mmol/L 的缓冲液 B 洗脱酶组分, 分步收集, 将收集的酶蛋白组分对含有 KCl 50 mmol/L 和 30%甘油的缓冲液 B 500 ml 透析 8 h, 用干燥蔗糖浓缩 6-8 h, 得部分纯化酶制剂, 含蛋白质 8 mg/ml。

DNA 的热变性 参照文献(5)方法, 将小牛胸腺 DNA 溶于测定酶活性的缓冲液中, 浓度为 2 mg/ml。100℃水浴中加热 7 min 后立即投入冰浴, 冰浴时间不少于 30 min。

无细胞系统 DNA 合成的测定 反应总容量为 100 μ l, 其中含 Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.5, MgCl₂ 8 mmol/L, β -巯基乙醇 1 mmol/L, 脱氧核苷三磷酸底物各 80 μ mol/L, 19 kBq [³H]dCTP, 20 μ g 热变性小牛胸腺 DNA 和 6 μ l 酶液, 根据需要加入适量药物或丙二醇置于 37℃保温 60 min, 立即加入 1 ml 预冷的 10%的三氯乙酸(含 4%焦磷酸钠)终止反应。

1986年1月21日收稿 1988年3月12日接受

¹ 本文是中国科学院科学基金资助的课题 No. 生字 85-267

冰浴 30 min 后将酸不溶部分抽滤至 0.45 μm 的微孔滤膜上, 用 10 ml 5% 三氯乙酸和 5 ml 95% 乙醇洗涤, 空气干燥, 测定放射性计数。

DNA 聚合酶的测定 本实验反应体系中, 乙基马来酰亚胺浓度为 1 mmol/L 时, 酶活性可被抑制 95% 以上, 与文献(6)结果相同, 说明酶液中存在的 DNA 聚合酶主要是聚合酶 α 。酶活性单位: 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 催化 1 nmol dCTP 参入到酸不溶物质的酶活性为 1 个酶单位。

药物抑制实验 实验分为药物组和丙二醇对照组。反应除加入适量药物或丙二醇外, 其它同正常反应体系。

预保温实验 药物与酶, 模板 DNA 和底物的预保温实验各分为 3 组, 即对照组(A), 不加药预保温组(B), 加药预保温组(C)。每一预保温成份在加入缓冲液后, 分别与丙二醇(A 和 B)组成 Orid (C) 组在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预保温 30 min, 加入预保温时略去成份, (A)和(C)组加入丙二醇, (B)组加入 Orid, 继续保温 30 min, 抑制率计算: 不加药预保温组抑制率 = (A 组 cpm - B 组 cpm) / A 组 cpm \times 100%; 加药物后预保温组抑制率 = (A 组 cpm - C 组 cpm) / A 组 cpm \times 100%。

蛋白质含量测定 按照文献(7)方法, 以牛血清白蛋白作为标准。

结 果

抑制作用与药物浓度和药物作用时间的关系 Orid 对无细胞系 DNA 合成有明显的抑制

作用。在一定的药物浓度范围内, 此抑制作用随药物浓度增加而升高; 在药物浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 即出现明显抑制作用, 抑制率为 28%。Orid 对 DNA 合成的抑制率随反应时间延长而升高, 在开始的 20 min 内抑制率升高较快; 在 Orid 浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 药物作用 20 min 抑制率达 40% (见图 1)。

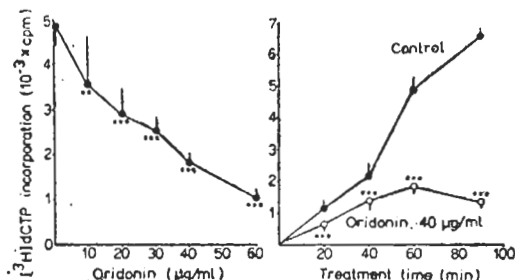


Fig 1. Effects of oridonin on the cell-free DNA synthesis catalyzed by partially purified DNA-dependent DNA polymerase II of Ehrlich ascites tumor cells. n = 5 expts, **p < 0.05, ***p < 0.01

药物与酶、模板和底物核苷酸的预保温实验 预保温实验是为了解药物作用的靶子而设计的。核苷酸底物和模板 DNA 与 Orid 预保温后, DNA 合成抑制率无明显改变; 酶液与 Orid 预保温后, 抑制率明显升高。在未加 Orid 的酶预保温组, DNA 合成抑制率为 47%, 而加入 Orid 的酶预保温的抑制率为 72% (见表 1)。

抑制作用与模板的关系 固定酶液和 Orid 的量, 改变模板 DNA 量, 增加 DNA 量未见药物抑制作用逆转。

Tab 1. Effect of preincubation of oridonin (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) with DNA, enzyme extract and deoxynucleosides (dNTPs) on DNA synthesis *in vitro*, the preincubation lasting 30 min before starting DNA synthesis. $\bar{x} \pm \text{SD}$. **p < 0.05, ***p < 0.01 vs control. $^{\dagger}p > 0.05$, $^{\ddagger}p < 0.05$ vs the group B

Group	DNA		Enzyme extract		dNTPs	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
A	5294 \pm 863	100	12477 \pm 1659	100	3779 \pm 554	100
B	1959 \pm 75***	37	7211 \pm 723**	53	1348 \pm 477***	36
C	2205 \pm 398*** [†]	42	3407 \pm 704*** ^{††}	28	1499 \pm 409*** ^{††}	38

A, control; B, drug added at the end of preincubation; C, drug added at the start of preincubation. Enzyme extract concentration was twice that of DNA or dNTP preincubating experiment.

讨 论

Orid 对无细胞系 DNA 合成有明显抑制作用, 抑制作用的程度在一定范围内随药物作用时间和药物浓度的增加而增强。Orid 对无细胞系 DNA 合成的抑制程度与它对细胞 DNA 合成的抑制程度相近似, 提示 Orid 抑制肿瘤细胞 DNA 合成的作用环节是抑制核苷酸底物聚合形成 DNA 的过程。

Orid 对无细胞系统 DNA 合成有明显抑制作用, 但药物作用的靶子是什么? 从预保温实验结果分析, 药物与 DNA 和底物核苷酸预保温后抑制率无明显改变, 说明药物对两者直接损伤的可能性很小; 酶与药物预保温后, 抑制率明显增加, 说明药物作用的靶子是酶。本实验体系中, 乙基马来酰亚胺 1 mmol/L 存在时, 酶活性几乎完全被抑制, 说明体系中酶活性主要是 α 聚合酶; 推论 Orid 可能抑制 DNA 聚合酶 α 的活性。

从 Orid 结构上分析⁽¹⁾, 该药的活性中心是 α -亚甲基环戊酮结构, 6 位碳原子上的羟基与 15 位碳原子上的羰基之间形成氢键, 使得 17 位碳原子极化带电荷, 可与酶蛋白中的 SH 和 NH 基团发生作用, 而 SH 基团是维持 DNA

聚合酶 α 活性所必需的; 推测 Orid 可能是通过对 DNA 聚合酶 SH 基团的作用抑制该酶活性。

由于增加模板 DNA 的量, 未见药物作用逆转, 提示 Orid 不是作用于 DNA 聚合酶的模板作用位点。

参 考 文 献

- 1 Fujita E, Nagao Y, Node M, Kaneko K, Nakazawa S, Kuroda H. Antitumor activity of the isodon diterpenoids: structure requirements for the activity. *Experientia* 1976; 32 : 203
- 2 张覃沐. 冬凌草抗肿瘤作用的研究近况. *中华肿瘤杂志* 1982; 4 : 322
- 3 李 瑛、张覃沐. 冬凌草甲素对小鼠肿瘤细胞核苷酸代谢的影响. *中国药理学报* 1987; 3 : 271
- 4 Lewis BJ, Abrell JW, Smith RG, Gallo RC. DNA polymerases in human lymphoblastoid cells infected with simian sarcoma virus. *Biochim Biophys Acta* 1974; 349 : 148
- 5 Aposhian HV, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. IX. The polymerase formed after T2 bacteriophage infection of escherichia coli : A new enzyme. *J Biol Chem* 1962; 237 : 519
- 6 Tsuruo T, Ukita T. Purification and further characterization of three DNA polymerases of rat ascites hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1974; 353 : 146
- 7 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265

Acta Pharmacologica Sinica Sinica 1988 Sep; 9 (3) : 465-467

Effect of oridonin on cell-free DNA synthesis *in vitro*

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

ABSTRACT Oridonin is an antitumor agent isolated from *Rabdosia rubescens* Hemsl. The DNA synthesis system was sensitive to oridonin in a concentration-dependent manner. When the system was exposed to oridonin 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 60 min, the DNA synthesis was inhibited by 62.5%. This inhibition was not reversed by increasing the DNA concentration. The preincubation of oridonin with partially purified DNA polymerase II of Ehrlich ascites tumor cells produced a stronger inhibition, but that

of oridonin with DNA or deoxynucleoside triphosphates did not. The inhibitory rates of oridonin 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were 47 and 78% in the groups preincubated without and with oridonin, respectively. These results suggest that oridonin exerts an inhibitory action on DNA polymerase II.

KEY WORDS oridonin; DNA polymerase II; DNA replication; Ehrlich tumor carcinoma

¹ Project supported by the Science Fund of the Chinese Academy Sciences No bio-85-267