

药物诱变效应与其和 DNA 圆二色谱变化的关系探讨

屠曾宏 沈春镒 王美瑛 唐卫东 祁晓东

中国科学院上海药物研究所新药实验室 上海 200031

摘要 DNA 是药物所致突变效应的分子学基础。圆二色谱 (CD 谱) 是研究大分子物质在溶液中构象的 1 种可靠方法。具有诱变作用的药物如顺铂、碳铂、丝裂霉素 C、放线菌素 D、高三尖杉酯碱等均影响小牛胸腺 DNA 的 CD 谱。而环磷酰胺对 DNA 的 CD 谱影响不大, 它本身不作用于 DNA, 需经代谢活化后才具效应。无诱变作用的药物: 双酚胺酸、氧化赖氨酸, 前者具有强致畸作用, 后者能抑制有丝分裂, 均不影响 CD 谱。其它所测试无诱变作用的药物均不影响 DNA CD 谱。结果表明药物诱变作用及对 DNA CD 谱的影响具有一定依存关系。

关键词 诱变效应; DNA; 圆二色谱

THE MUTAGENICITY OF DRUGS AND THEIR EFFECT ON DNA CIRCULAR DICHROISM SPECTRA

Tu Zeng hong, Shen Chun yi, Wang Mei ying, Qi Xiao dong

Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai, 200031

Abstract Circular dichroism (CD) is a reliable, sensitive and convenient method for analysing the effect of drugs on DNA, which inserted into the DNA molecule or formed DNA complex and could change the conformation of DNA, and therefore alter the CD spectra. Mutagenicity of 19 drugs were tested, while their effects on CD spectra of DNA were measured. These drugs are cisplatin, carboplatin, 10-hydrocamptothecin, actinomycin C homoharringtonine, harringtonine, bleomycin, adriamycine, cyclophosphamide, catecholamic acid, oxalysine, aniracetam et al. The calf thymus DNA possesses characterization of CD spectra, which can show a symmetrically positive and negative peak at 276 and 246 nm respectively as well as a positive peak at 217nm, a small negative peak at 206nm. All of mutagenic drugs effected on CD spectra of DNA, except cyclophosphamide which need metabolic activation. Effects of various concentration of cisplatin on CD spectra was conducted and rendered a dose-dependant relationship. The change of CD spectra by carboplatin could not be reversed by dialysis for 24 h. Effects of non-mutagenic drugs were not observed, even though some of them show teratogenic action (catecholamic acid), inhibition of mitosis in CHL cells (oxalysine). Previous experiment indicated

oxalysine might affect RNA, but not DNA. Results suggest that mutagenesis might be related to the change of CD spectra of DNA, but it need further validating in more chemicals.

Key words effect of mutagenicity; circular dichroism; DNA

药物致癌作用与诱变效应密切相关, 诱发突变的分子学基础是 DNA。在许多研究药物与大分子物质关系的方法中, 圆二色谱(Circular Dichroism Spectra, CD 谱)是 1 种可靠研究 DNA 在溶液中构象变化的方法。其特点: 灵敏、快速、样品用量少(0.01-0.02mg)。DNA 在水溶液中具特有的 CD 谱。已知任何化合物分子嵌入 DNA 或与 DNA 分子形成加合物都会引起 DNA 构象改变导致 CD 谱变化。文献报道以此法研究某些化合物与 DNA 构象改变的关系, 所获资料具有一定价值⁽¹⁾。Dalglish 等⁽²⁾研究了一些抗癌药物对小牛胸腺 DNA 的 CD 谱的影响。药物诱变性与 DNA 的 CD 谱变化间的内在依存关系是 1 个颇有价值的课题。为此我们近来测试了 19 种药物诱变作用及对 DNA CD 谱的影响, 试图探索药物诱变作用与 DNA CD 谱依存关系。

材料和方法

1. 药品 丝裂霉素 C, 放线菌素 D, 阿霉素, 博来霉素和环磷酰胺均为商业产品。羟基喜树碱由湖北黄石制药厂中心实验室提供。余测试药物均由本所提供。药物用去离子重蒸馏水配制, 而羟基喜树碱用 0.1M NaOH 先溶解, 调节 pH 再用重蒸水稀释至所需浓度。若用光谱纯 DMSO 溶解的药物则先做溶剂对照试验。

2. 圆二色谱测定

用日本 JASCO 产的带有 DP-500 微机的 J-500A 型圆二色仪, 在 20℃ 下测定 CD 谱。样品池为圆筒形石英池, 其光径为 10mm 测得数值以左、右圆偏振光吸收系数差 ($\Delta \Sigma = \Sigma_{左} - \Sigma_{右}$) 表示。受试物本身有光学活性, 本实验所用微机可自动减

去药物本身的 CD 谱而直接描出药物作用后 DNA 的 CD 谱。

3. 药物诱变作用的测试

沙门菌/微粒体系统实验, 小鼠骨髓微核和 CHL 细胞染色体畸变实验如以前所述方法^(3,4)。微核实验用 KB 表评价⁽⁵⁾。CHL 细胞染色体畸变按 Ishidate⁽⁶⁾标准判断实验结果。

结果

小牛胸腺 DNA CD 谱 图 1 为小牛胸腺 DNA 在水溶液中的 CD 谱。DNA 浓度为 50 μ g/ml, pH7.4, 20.5℃ 在图谱上可见在 276nm 和 246nm 处各有 1 呈对称分布的正、负峰。在 217nm 处有 1 较强的正峰, 在 206nm 处有 1 小负峰, 与文献报道 DNA 在水溶液中呈 B 构象的 CD 谱相一致⁽⁷⁾。

pH 对 DNA CD 谱的影响 pH 对 DNA CD 谱的影响如图 2 所示。当 pH 酸度增加时, 图形逐渐发生变化: 峰值降低, 且峰的位置亦有所改变。增至 pH 4.5 时变化较大, pH 2.0 时则变化十分显著。pH 6-9 CD 谱图形无明显变化。我们实验常用的 pH 值为 6-9。

具诱变作用的药物对 DNA CD 谱影响 我们测试了顺铂、碳铂、丝裂霉素 C、阿霉素、博来霉素、放线菌素 D、高三尖杉酯碱、三尖杉酯碱、环磷酰胺等 11 种在不同致突变测试系统中试验呈阳性反应的药物对 DNA CD 谱的影响。除了环磷酰胺外所有药物均能改变 DNA CD 谱: 峰的位置移动; 峰值大小的改变。DNA CD 谱和加环磷酰胺作用后 CD 谱的叠谱基本重复, 提示: 无明显相关作用。

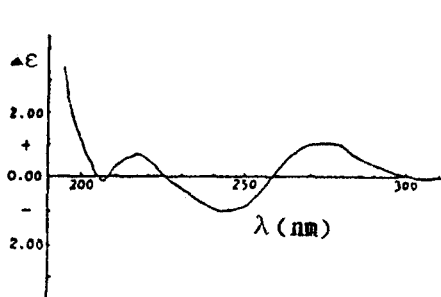


图1 小牛胸腺DNA圆二色谱
DNA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH7.4, 20.5 $^{\circ}\text{C}$

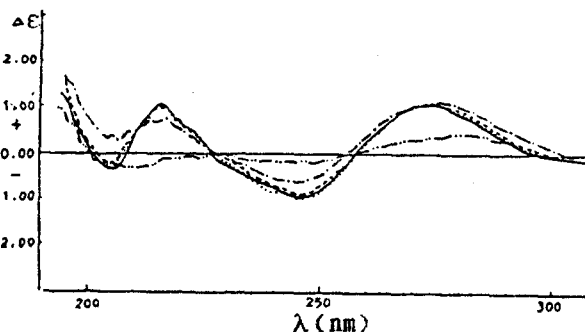


图2 不同pH对小牛胸腺DNA的CD谱的影响
DNA 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$
—— pH 7.4 ····· pH 2.0
----- pH 6.0 ····· pH 9.0
- · - · pH 4.5

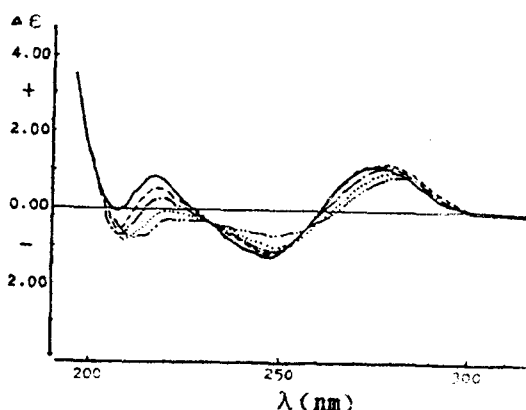


图3 不同浓度的顺铂与DNA作用后的CD谱
—— DNA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
··· DNA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 顺铂2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
----- DNA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 顺铂4 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- · - · DNA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 顺铂8 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- - - - DNA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 顺铂16 $\mu\text{g}/\text{ml}$

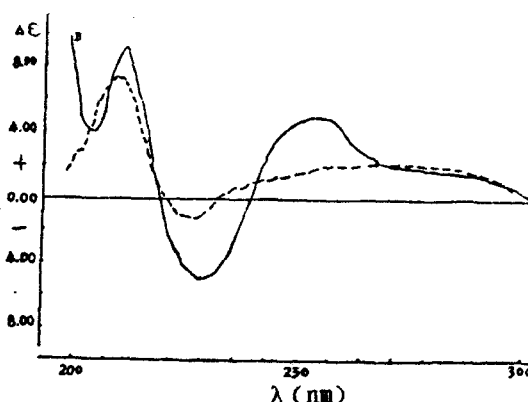


图4 DNA对丝裂霉素C的CD谱的影响
A. 丝裂霉素C 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
B. 丝裂霉素C 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + DNA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
(图形经微机处理此复合CD谱已除去丝裂霉素C本身的图谱)

为探索药物对DNA CD谱作用性质,我们作了3方面分析: i, 剂量—效应关系; ii, 药物与DNA作用后引起CD谱的变化,是否可由透析而得以恢复; iii, 以丝裂霉素C为基准,观察加入DNA后丝裂霉素C的CD谱变化。图3所示不同浓度顺铂与DNA作用后的CD谱,由图可见顺铂在浓度为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时即可测出对DNA CD谱的影响217nm正峰;246nm负峰减少;且峰的位置有所移动。随浓度的增加,变化更为明显。呈剂量—效应相关。碳铂能明显改变DNA

CD谱即:峰值的幅度或位置均有变化。该变化经24h透析,其波形除在200-230nm处有变化,余依然维持原状。提示:碳铂与DNA残基相结合。丝裂霉素C是在致突变实验中常用的阳性对照药。它本身为光活性化合物,图4为DNA对丝裂霉素C作用的CD谱。实验操作照常规,但丝裂霉素C和DNA相互作用后的CD谱在微机处理时减去DNA CD谱,而不减去丝裂霉素C的CD谱,以观察DNA对丝裂霉素C的CD谱影响。丝裂霉素C 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用已表明

显, 240nm 呈高耸宽的负峰, 275nm 出现宽而高的新正峰。故不同处理, 不同表达同样说明丝裂霉素 C 和 DNA 的相互作用关系。

无诱变作用药物对 DNA CD 谱的影响 主要测试我所研制的药物, 其中有羟甲芬太尼(强效镇痛药)、千金藤立定(多巴胺阻断剂)、石杉碱甲、茴拉西坦和吡乙酰胺是促智药、牛膝多糖有免疫调节作用、氧代赖氨酸有一定的抗癌作用⁽⁸⁾。双酚胺酸是一种整合剂, 有良好的治疗铀中毒和促排作用。以上药物在 Ames 实验、小鼠骨髓微核试验和 CHL 细胞染色体畸变试验中均为阴性。它们对 DNA CD 谱均无明显影响。有些药物如羟甲芬太尼本身并无光学活性, 有些药物如氧代赖氨酸、双酚胺酸有光学活性, 但经微机处理减除有光学活性药物 CD 谱后均得复盖较好的叠波。氧代赖氨酸作用后 DNA CD 谱与 DNA CD 谱相比, 在 270nm 246nm 处的 CD 谱几乎重叠, 而在 217nm 和 208nm 峰的波长位置基本相同仅 $\Delta\Sigma$ 值稍有差异。据此分析叠波, 可认为氧代赖氨酸与 DNA 无作用。其它药物作用后 DNA CD 谱都基本与 DNA CD 谱相叠, 故这些药物并不引起 DNA CD 谱明显变化, 可考虑这些药物基本上不作用于 DNA。

讨论

药物若作用于 DNA, 则往往具诱变效应, 因此分析探究药物与 DNA 间的关系是研究阻止诱变的前提。故有必要从不同角度以不同方法分析检测。

CD 谱则是 1 种简便、可靠、灵敏、经济、省时的方法。CD 谱上 1 个平面偏振光可看作是周期和振幅都相同而旋转方向相反 (1 左、1 右) 的 2 个圆偏振光合

成。因光学活性物质是不均匀电场, 故对左、右偏振光吸收率不同。所以光透射过各种光学活性化合物时就形成自己独有的 CD 谱。若药物与 DNA 分子相互作用, 或嵌入形成加成物都会导致 DNA CD 谱变化。

有些人为可控制的因素 pH、温度均影响 CD 谱图谱形状。实验证实 pH 在 6-9, 温度在 15-25℃, 测 DNA CD 谱较稳定。我们以顺铂实验分析药物剂量和诱变效应关系, 其结果为: 随着顺铂浓度的增加, CD 谱变化加大。用透析方法分析药物对 DNA 作用可初步得知: 小分子碳铂是否与 DNA 分子某个基团形成化学结合, 经透析, DNA 分子构形并不恢复原状。提示: 碳铂可能与 DNA 残基结合。药物与 DNA 为相互作用。我们以丝裂霉素 C 的 CD 谱为基准, DNA 对其的影响, 同样也观察到 CD 谱变化。

在所测试的具诱变效应的药物仅有环磷酰胺对 DNA CD 谱无明显影响, 这可能是因为环磷酰胺需经酶代谢后转化为活化的烷化剂所致。其综合结果列于表 1。

所测无诱变性化合物中, 对 DNA CD 谱都没有明显的影响。其中双酚胺酸有明显的致畸作用, 结合诱变实验阴性结果和对 DNA CD 谱作用的分析, 提示其致畸实质尚可能未涉及 DNA。尽管氧代赖氨酸动物实验表明此化合物有抗癌作用⁽⁸⁾, 对 CHL 细胞有丝分裂有明显抑制作用, 但结合诱变实验和 CD 谱的分析, 均未干扰 DNA。有未发表的资料曾表明其影响 DNA, 主要是在转译水平上。

如上所述, 药物致突变作用强弱及与影响 DNA CD 谱变化具有一定的依存关系。可作为三致实验中对结果分析的辅助资料和研究补充。

表 1 药物的诱变作用和对 DNA 的 CD 谱影响的关系小结

药物(化合物)	致突变试验*	对 CNA 的 CD 谱影响	说明
顺铂	+	+	
10-羟基喜树碱	+	+	
碳铂	+	+	
放线菌素 D	+	+	
高三尖杉酯碱	+	+	
三尖杉酯碱	+	+	
博来霉素	+	+	
阿霉素	+	+	
长春碱	+	+	
阿糖胞苷	+	+	
环磷酰胺	+	-	需代谢活化
羟甲芬太尼	-	-	
石杉碱甲	-	-	
苗拉西坦	-	-	
吡乙酰胺	-	-	
牛膝多糖	-	-	
双酚氨酸	-	-	致畸作用
羧代赖氨酸	-	-	抑制 CHL 细胞有丝分裂
千金藤立定	-	-	

* 致突变试验包括微核试验, 染色体试验和细菌回交试验

参 考 文 献

1. Maria T, et al. Lack of Z-DNA conformation in mitomycin-modified polynucleotides having inverted circular dichroism. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80(10): 2874.
2. Daigleish DG, et al. Circular dichroism studies of complexes of the antibiotics daunomycin, nogalamycin, chromomycin and mithramycin with DNA. Biopolymers 1974; 13(9):1757.
3. 屠曾宏, 王美瑛. 3种促智药, 石杉碱甲、苗拉西坦和吡乙酰胺的诱变作用和诱变协同作用. 新药与临床 1990;9(2):65.
4. 屠曾宏, 王美瑛, 肖伟琪等. 羟基喜树碱诱变中国仓

- 鼠卵巢细胞染色体畸变在小鼠骨髓、胎肝血中形成微核的作用. 中国药理学报 1990;11(4):378.
5. Kastenbaum MA, et al. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res. 1990;9(5):527.
6. Ishidate MJR, et al. Chromosome test with 134 compounds on chinese hamster cells *in vitro*—a screening for Chemical carcinogens. Mutat Res 1977;48 (3/4):337.
7. Sato Y, et al. Conformation change of DNA induced by 6-oxybenzo [x]pyrene radical. Gann 1982; 73(2):308.
8. 乐秀芳, 吴富根, 符彬. 羧代赖氨酸的抗癌及药理实验研究. 药理学报 1980; 15(7):391.

(上接第 22 页)

用乙醇, 在胎鼠中观察到的肝细胞超微结构的变化与人体酒精中毒见到的肝细胞损害相似。

图 1~4. 均为乙醇组。1. 肝细胞中见线粒体膜已破, 嵴溶解, 紊乱。20000× 2. 肝细胞中见大脂肪泡, 部分线粒体嵴溶解。8000× 3. 肝细胞质大片溶解坏死, 核内见空泡。8000× 4. 毛细胆管扩张, 微绒毛稀疏短小。12000×

参 考 文 献

1. Clarren SK, et al. The fetal alcohol syndrome. N Engl

- J Med 1978; 298(5): 1063.
2. Cynthia Uphoff, et al. Cardiac muscle development in mice exposed to ethanol in utero. Teratology 1984; 30(1):119
3. Petersen P, et al. Abnormal mitochondria in hepatocytes in human fatty liver. Acta Pathol Microbiol Scand. Sect A 1977;85(3):413.
4. Weibel ER, et al. Practical stereological methods for morphometric cytology. J Cell Biol 1966; 30(1):23.
5. 杨光等. 豚鼠肾上腺髓质嗜铬细胞超微结构的立体学研究. 解剖学报 1986; 17(2):216.
6. 余耀南等. 酒精和乙醛对小鼠的胚胎毒性和致畸效应. 解剖学杂志 1987; 10(3):200.
7. 引自 Rømer P, et al. Alcohol-induced injury of mitochondria in hepatocytes of mini-pig fetuses. Virchows Arch [Pathol Anat] 1983; 399(2):299.
8. Rubin E, et al. Effects of ethanol on the biogenesis of mitochondrial membranes and associated mitochondrial functions. Lab Invest 1970; 23(4):620.