

# 毛茛甙体外细胞毒活性及其机制

李润沼\* 籍秀娟

(中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 研究表明,毛茛甙对 KB 细胞、Bel<sub>7402</sub> 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.21 和 0.35 μmol/L; 对细胞大分子物质的生物合成以抑制 DNA 合成最强 (IC<sub>50</sub> = 0.35 μmol/L)。作用机制研究表明,至少有两种机制参与毛茛甙的体外细胞毒作用:抑制 DNA 聚合酶作用下的 DNA 合成;促进超氧阴离子自由基的生成。

**关键词** 毛茛甙; 抗肿瘤作用

毛茛甙 (ranunculin; RAN) 化学名 5-羟甲基-2,5 二氢呋喃酮(2)-β-吡喃葡萄糖甙, 广泛存在于多种毛茛科植物中, 化学结构如图 1。

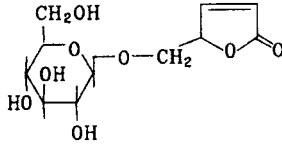


Fig 1 The chemical structure of ranunculin.

国外曾报道 RAN 类似物有抗肿瘤作用<sup>(1)</sup>; 徐州医学院用天然 RAN 治疗肿瘤认为有一定疗效<sup>(2)</sup>。本所全合成 RAN 成功, 合成的 RAN 为白色粉末状结晶, 易溶于水, 理化性质与天然毛茛甙相同<sup>(3)</sup>。本文观察了合成毛茛甙的体外细胞毒活性, 并从分子水平探讨其作用机制。

## 实验材料

毛茛甙由本所合成室合成; 小牛胸腺 DNA、四氮唑兰 (NBT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 为 Sigma 产品; 蛋白酶 K、二巯基苏糖醇 (DTT) 及过氧化氢酶 (CAT) 为 Merck 公司产品; DNA 聚合酶 I 为 Promega 产品; 三尖杉酯碱 (HAR) 为本所实验药厂生产; 柔红霉素 (DNR) 为西德产品; 阿霉素 (ADR) 由汕头鮑滨制药厂生产; K<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 由北京医科大学药学院制备。闪烁液为 PPO 及 POPOP 的甲苯溶液, PPO 和 POPOP 均为上海试剂一厂生产。dCTP, dTTP 及 dATP 为 Boehringer 公司生产; <sup>3</sup>H-dCTP 为 Amersham 产品, <sup>3</sup>H-TdR (6.6 × 10<sup>11</sup> Bq/mmol) 及 <sup>3</sup>H-UR 由中国科学院原子能研究所生产; <sup>3</sup>H-TyR (16 × 10<sup>11</sup> Bq/mmol) 由上海原子能所生产。

本文于 1992 年 6 月 22 日收到。

\* 现工作单位: 北京医科大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083

KB 细胞及 Bel<sub>7402</sub> 肝癌细胞生长于 RPMI 1640 完全培养基液 (Gibco 产品, 含 10% 小牛血清, 青霉素 10 IU/ml、链霉素 10 μg/ml) 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 常规培养。

## 方法与结果

### RAN 对 KB 及 Bel<sub>7402</sub> 细胞克隆形成的影响

取对数生长期细胞 (KB, Bel<sub>7402</sub>), 用 RPMI 1640 培养液分别按 30, 300 及 3000 个细胞/ml 制成细胞悬液, 每培养皿 5 ml 接种于 60 mm 平皿内, 每组 3 皿, 于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 6 h 后加入不同浓度的 RAN, 终浓度分别为 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 及 2.0 μmol/L。继续培养 10 天, 以 Germonys' 液固定, Giemsa 染色, 计克隆数 (50 个细胞以上者为克隆)。以给药组与对照组相比, 计算克隆存活率。结果表明 RAN 对 KB 及 Bel<sub>7402</sub> 细胞的生长抑制起效浓度均为 0.1 μmol/L, IC<sub>50</sub> 分别为 0.21 μmol/L (KB) 及 0.35 μmol/L (Bel<sub>7402</sub>), 在 2 μmol/L 浓度时两种细胞均无克隆形成 (图 2)。

### RAN 对 L<sub>1210</sub> 细胞大分子生物合成的影响

1 取对数生长期的 L<sub>1210</sub> 细胞, 以无血清 RPMI 1640 培养基液配成  $1.5 \times 10^6$  个细胞/ml 悬液备用。分装 1 ml/管, 各管加入不同浓度的 RAN 50 μl, 终浓度分别为 0.1, 0.5, 5.0, 15 及 30 μmol/L, 并设对照, 37°C 轻摇 2 h, 反应终止前 30 min 加入标记前体 (<sup>3</sup>H-TdR, <sup>3</sup>H-UR 或 <sup>3</sup>H-TyR)  $1.85 \times 10^4$  Bq/ml, 冰浴终止反应, 以纸片法测定各前体掺入之放射性强度。结果表明, RAN 在浓度为 0.1, 0.5 及 5 μmol/L 时, 分别对 L<sub>1210</sub> 细胞 DNA, RNA 及蛋白质产生轻微抑制作用, 但无显著性差异; RAN 在 15 μmol/L 时, 使 DNA, RNA 及蛋白质的合成抑制分别为 87.18 ( $P < 0.05$ ), 56.21 ( $P < 0.01$ ) 及 11.72% ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

Tab 1 Effect of ranunculin on the incorporation of <sup>3</sup>H-labeled nucleic acid precursors to macromolecules in L<sub>1210</sub> Cells

RAN concentration (μmol/L)	DPM ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)		
	<sup>3</sup> H-TdR	<sup>3</sup> H-UR	<sup>3</sup> H-TyR
0	5869 ± 227	3348 ± 353	2950 ± 525
0.1	3467 ± 118	4120 ± 614	3965 ± 541
0.5	2031 ± 734*	2462 ± 567	3873 ± 611
5.0	556 ± 693*	1874 ± 160**	2681 ± 233
15	752 ± 635*	1466 ± 239**	2604 ± 706
30	842 ± 186*	1560 ± 360**	1972 ± 583

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control

2 RAN 抑制 DNA 合成的作用方式: 参照方福德等人的方法<sup>(4)</sup>, 取 L<sub>1210</sub> 细胞悬液 ( $1.5 \times 10^6$ /ml), 每管 1 ml, 分组后分别加入 RAN (50 μmol/L), DNR (27 μmol/L) 及 HAR (56 μmol/L), 于 37°C 温孵 1 h。冰浴终止反应, 以冰 SSC 液 (0.1 mol/L NaCl, 0.5 mol/L 柠檬酸钠) 4 ml 洗去药物, 随即于 37°C 继续保温, 于 0 min (立即), 30, 60, 90 及 120 min 加入 <sup>3</sup>H-TdR  $1.85 \times 10^4$  Bq/ml, 掺入 30 min 后, 冰浴终止反应, 计数放射强度。结果显示, 在洗去药物后随时间延长, HAR 组的掺入呈递增型, 即洗去药物后 <sup>3</sup>H-TdR 的掺入可逐渐恢复到用药前水平。DNR 组的掺入呈递减型, 即洗去药物后 <sup>3</sup>H-TdR 掺入始终处于低水平。RAN 组的掺入亦呈递减型, 洗去药

物后 $^3\text{H-TdR}$  掺入由 40% 继续下降至近于零(图 3)。

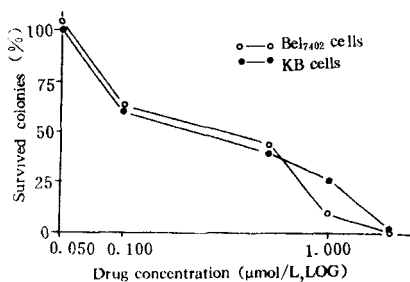


Fig 2 Cytotoxicities of ranunculin on  $\text{Bel}_{7402}$  and KB cells.

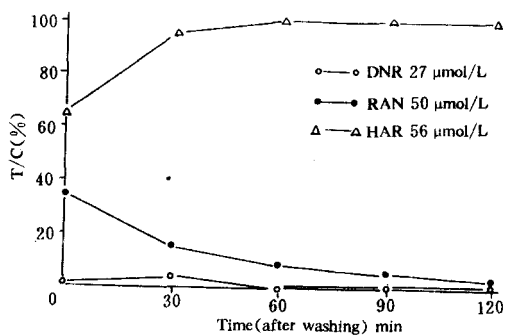


Fig 3 Analysis of the mode of action of ranunculin on DNA biosynthesis in  $L_{1210}$ .

### 波谱移动法观察 RAN 对 DNA 的直接作用

于 1 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.7) 中, 加入小牛胸腺 DNA (28 μg/ml) 及 RAN (36 μmol/L, 144 μmol/L) 或 ADR (17 μmol/L, 68 μmol/L), 每实验管均设参比管。在 200~300 nm 范围, 从零时起每小时进行一次紫外吸收光谱扫描, 观察 DNA 吸收峰的强度与位移。结果显示嵌入剂 ADR 作用使 DNA 峰出现红移和减色效应, 与文献<sup>(5)</sup>一致; 而 RAN 36 及 144 μmol/L 均未使 DNA 吸收峰发生变化(图 4)。

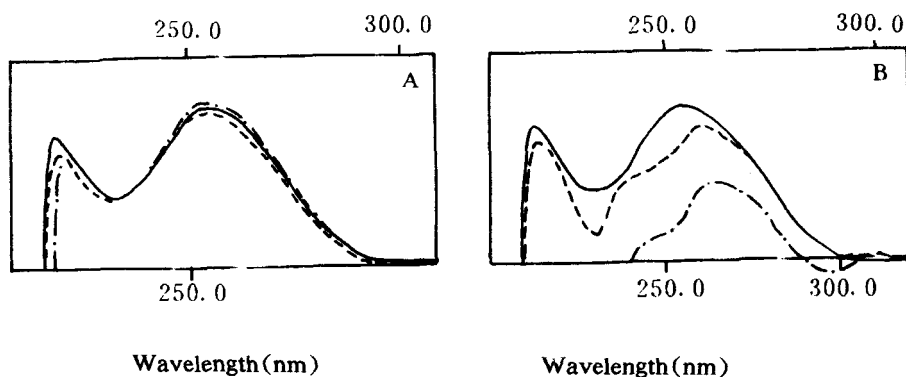


Fig 4 The UV spectra of DNA treated with ranunculin (A) and ADR (B). — DNA only (28 μg/ml); --- DNA + RAN (36 μmol/L) or ADR (17 μmol/L); - · - DNA + RAN (144 μmol/L) or ADR (68 μmol/L).

### RAN 对 DNA 聚合酶 I 作用下 DNA 合成的影响

取活化小牛胸腺 DNA 6  $\mu\text{g}$ , DNA 聚合酶 I 1  $\mu\text{l}$ , dNTP 25  $\mu\text{mol/L}$ , dCTP 1.5  $\mu\text{mol/L}$ ,  $^3\text{H-dCTP}$  3.7  $\times 10^4$  Bq, DTT 1 mmol/L,  $\text{MgSO}_4$  10 mmol/L 及 BSA 50  $\mu\text{g/ml}$  置于 50  $\mu\text{mol/L}$  Tris-HCl 中, 加入 RAN 的终浓度分别为 0(对照)、1, 5, 15 及 50  $\mu\text{mol/L}$ , 总反应体积为 30  $\mu\text{l}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 2 h, 冰浴终止反应。将反应液转移至玻璃纤维膜上测定其放射性。结果显示, RAN 对 DNA 聚合酶 I 作用下的 DNA 合成的抑制呈量效相关, RAN 50  $\mu\text{mol/L}$  对 DNA 聚合酶 I 的抑制达 61.02%(表 2)。

Tab 2 Effect of ranunculin on DNA polymerase I *in vitro* ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Treatment (RAN concentration $\mu\text{mol/L}$ )	0	0.5	5	15	50
DPM	17980 $\pm$ 4858	13930 $\pm$ 2638	10770 $\pm$ 1658	7744 $\pm$ 1760*	7077 $\pm$ 426*

\*  $P < 0.05$  vs control

### RAN 对 DMSO-KO<sub>2</sub> 系统 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 生成的影响

DMSO 3 ml 含 NBT(终浓度 19.2  $\mu\text{mol/L}$ ) 做指示剂, 以及不同浓度 RAN, 加入 KO<sub>2</sub>(终浓度 10 mmol/L) 启动反应, 于反应 30 min 以紫外分光光度计分别测定各管在 530 nm 处的吸收度, 以此计算 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 生成的促进率(T/C-1)%。结果显示, RAN 10  $\mu\text{mol/L}$ , 使 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 生成增加 22.42% ( $P < 0.05$ ); 100  $\mu\text{mol/L}$  时 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 生成显著增加, 促进率达 208.48%(表 3)。

Tab 3 Effect of ranunculin on generation of superoxide anion in DMSO-KO<sub>2</sub> system *in vitro*

Treatment ( $\mu\text{mol/L}$ )	0	0.1	10	100
Absorbance (530 nm)	0.165 $\pm$ 0.015	0.158 $\pm$ 0.025	0.202 $\pm$ 0.013*	0.509 $\pm$ 0.019**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control

### 过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)对 RAN 抑制 DNA 合成的影响

取 L<sub>1210</sub> 细胞悬液 (1.5  $\times 10^6$  /ml) 每管 1 ml, 除空白对照外均加入 RAN, 终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ , 然后分为 3 组, 即 RAN 组、RAN+CAT(3000 IU/ml) 组及 RAN+SOD(0.25 mg/ml) 组。于 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 1 h, 加入  $^3\text{H-TdR}$  (1.85  $\times 10^4$  Bq/ml), 30 min 后冰浴终止反应。结果显示, RAN+CAT 组和 RAN+SOD 组与 RAN 组相比, 对  $^3\text{H-TdR}$  的掺入抑制分别降低了 37.57 和 50.26% (表 4)。

Tab 4 Effects of CAT and SOD on DNA biosynthesis inhibition by RAN in L<sub>1210</sub> ( $n=3$   $\bar{x} \pm s$ )

Treatment	0	RAN (50 $\mu\text{mol/L}$ )	RAN+CAT	RAN+SOD
DPM	14920 $\pm$ 566	2949 $\pm$ 409	7448 $\pm$ 799 $\Delta$ **	10448 $\pm$ 626 $\Delta$ **

\*\*  $P < 0.01$  vs control,  $\Delta P < 0.01$  vs RAN

## 讨 论

实验显示 RAN 有较强的细胞毒作用,对 KB 及 Bel<sub>7402</sub> 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.21 及 0.35  $\mu\text{mol/L}$ 。RAN 对大分子生物合成的影响,显示出影响 DNA 合成的靶向性,对 RNA 影响轻微,我们不排除 RAN 对转录过程的直接影响,但也可能是 DNA 合成抑制的继发效应,而对蛋白质合成的影响与对照相比无显著差异。抑制 DNA 合成作用方式分析表明,RAN 作用机制不同于单纯抑制核酸代谢的 HAR,而与模板损伤型药物 DNR 相似;但实验同时表明,RAN 并不具有 DNA 嵌入剂所特有的嵌入效应,这些表明 RAN 的细胞毒作用机制可能有其独特之处。

Kupchan 等认为  $\alpha,\beta$  不饱和内酯的抗肿瘤作用活性可能与某些巯基酶发生反应有关<sup>(6)</sup>,RAN 的母核具有  $\alpha,\beta$  不饱和内酯结构,实验显示其对 DNA 聚合酶 I 作用的抑制支持这一论点。该靶点是 DNA 合成的重要环节,但仅此一点并不能解释其作用特征;RAN 对超氧自由基生成的促进作用可能起一定的作用,超氧自由基直接或间接对 DNA 模板的攻击可引起 DNA 损伤及细胞死亡<sup>(7)</sup>,CAT 及 SOD 使 RAN 抑制 DNA 合成作用部分解除。这也说明超氧阴离子也确实参与了 RAN 的细胞毒作用,即 RAN 促进超氧阴离子生成的作用也是其体外杀伤肿瘤细胞的机制之一。

## 参 考 文 献

- 1 Pattenden G. Natural-4-ylidenebutenolides and 4-ylideneteronic acids. (Rev) *Fortschr Chem Org Naturst* 1978;35:113.
- 2 张家华,等.毛茛甙临床治疗肿瘤研究. *江苏医学资料* 1981;9:76.
- 3 方政,等.毛茛甙全合成研究. *药学报* 1989;24:182.
- 4 方福德,等.抑制 DNA 合成的药物作用类型的简易测定法. 同上 1981;16:238.
- 5 Kohn KW, et al. Intercalative binding of ellipticine to DNA. *Cancer Res* 1975;35:71.
- 6 Kupchan SM, Advance in chemistry of tumor-inhibitory natural products; In: Runeckles VC, eds. *Recent Advances in Photochemistry*. Vol 9. New York: Plenum Press, 1975:167~87.
- 7 White JR, et al. Superoxide radical in the mechanism of action of streptonigrin. *Fed Proc* 1971;30:114.

## THE CYTOTOXICITY AND ACTION MECHANISM OF RANUNCULIN IN VITRO

RZ Li\* and XJ Ji

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

**ABSTRACT** This paper describes the cytotoxicity of ranunculin(RAN) and its mechanism of action. The IC<sub>50</sub> of RAN against the KB and Bel<sub>7402</sub> cells in colony test were found to be 0.21 and

0.35  $\mu\text{mol/L}$  respectively. RAN inhibited the incorporation of  $^3\text{H}$ -labeled precursors into DNA and RNA of  $L_{1210}$  cells. RAN (15  $\mu\text{mol/L}$ ) markedly decreased DNA synthesis catalyzed by DNA polymerase I and promoted the generation of superoxide anions in DMSO/ $\text{KO}_2$  system. In the meantime, SOD and CAT were shown to partly revoke the inhibitory effects of RAN upon the incorporation of  $^3\text{H}$ -TdR into DNA. No direct reaction between RAN and DNA template was observed and no effect of RAN on DNA TOPO II or RNA polymerase was found. Our results suggest that the cytotoxicity of RAN *in vitro* may be due to inhibition of DNA polymerase and increase of oxygen free radicals.

**Key words** Ranunculin; Antitumor activity

---

\* Now in Department of Cell Pharmacology, National Lab. of Natural and Biomimetic Drugs, Beijing Medical University, Beijing 100083