

海南粗榧新碱衍生物 HH07A 对 DNA 聚合酶 I 活性的影响

叶玉梅 徐承熊

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要 用体外 DNA 聚合酶 I 作用下 DNA 合成的方法, 研究 HH07A 的作用机制。结果表明, HH07A 对 DNA 聚合酶 I 催化下的 DNA 合成有明显抑制作用, 且在一定浓度范围内存在浓度依赖性。将药物与 DNA 模板及 DNA 聚合酶 I 分别预保温后, 发现 DNA 模板活性无明显改变, 而酶的活性则受到显著抑制。提示 HH07A 对 DNA 聚合酶 I 催化下 DNA 合成的抑制是通过 HH07A 与 DNA 聚合酶 I 直接作用而实现的。

关键词 海南粗榧新碱衍生物; HH07A; DNA 聚合酶 I; 脱氧核糖核酸; 抗癌药物

海南粗榧新碱衍生物 HH07A 对体外培养的小鼠 L1210 细胞 DNA, RNA 及蛋白质合成都具有明显抑制作用, 但以抑制 DNA 合成作用最强, 其次为 RNA 与蛋白质^[1]。进一步研究表明, HH07A 可能不与 DNA 直接结合, 且 HH07A 抑制 DNA 合成作用可能是通过干扰其代谢过程所致。而 DNA 聚合酶, 是 DNA, RNA 合成的关键酶之一, 本文通过研究 HH07A 对 DNA 聚合酶 I 催化下 DNA 合成的影响, 进一步了解 HH07A 的作用机制。

材料与方 法

药品与试剂 HH07A 由本所合成室郭积玉教授提供, 分子量为 363.5, 溶于水, 以无菌生理盐水或三蒸水配制; 小牛胸腺 DNA 为瑞士产品, 按文献方法^[2]进行活化, -20℃ 保存; DNA 聚合酶 I, dATP, dTTP, dCTP, dGTP 均为华美公司产品; ³H-dCTP (77.7×10^{10} Bq·mmol⁻¹) 为上海原子能研究所产品。

细胞外 DNA 聚合酶 I 作用下 DNA 的合成^[2] 反应总体积为 30 μ l, 含 Na₃PO₄ 67 mmol·L⁻¹, MgCl₂ 6.7 mmol·L⁻¹, DTT 1.0 mmol·L⁻¹, 活化小牛胸腺 DNA 10 μ g, DNA 聚合酶 I 1 u,

dATP, dTTP, dGTP 26 μ mol·L⁻¹, ³H-dCTP 5×10^5 Bq(不足的化学量用非标记的 dCTP 补足), 37℃ 保温 2 h, 加 150 μ l 冷 10% TCA 终止反应, 将沉淀物质收集在玻璃纤维膜上, 以冷 5% 三氯醋酸及 95% 乙醇分别洗 3 次, 滤片烘干后, 加闪烁液, 进行放射性测量。

药物抑制实验 实验分 3 组, 每组设 3 个平行管。对照组按上法测定 DNA 聚合酶 I 作用下的 DNA 合成, 给药组除加入一定量药物外, 余同对照组。空白对照组其组分同对照组, 但酶在加三氯醋酸后加入。

HH07A 与 DNA 的预保温实验 加药预保温组取活化 DNA 与 HH07A 400 μ g·ml⁻¹ 在 37℃ 保温, 于 30, 60, 90 min 时取 2 μ l 按上法测 DNA 合成。预保温后加药组及对照组的模板 DNA 均加入等体积三蒸水经同样时间预保温, 但预保温后加药组在测定 DNA 合成时加入 HH07A(400 μ g·ml⁻¹), 对照组加等体积三蒸水。

HH07A 与 DNA 聚合酶 I 的预保温实验 加药预保温组, 取 DNA 聚合酶 I 与 HH07A 400 μ g·ml⁻¹ 在 37℃ 保温, 于 15, 30 及 60 min 时取 2 μ l 按上法测 DNA 合成。并于 37℃ 保温 60 min 后, 每次取 2 μ l 测定不同时间(15, 30, 60 min)酶活性。预保温后加药组及

对照组的酶均加入等体积三蒸水经同样时间预保温,但预保温后加药组在测定 DNA 合成时加入 HH07A 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,对照组加等体积三蒸水。

结 果

1 HH07A 对细胞外 DNA 聚合酶 I 作用下 DNA 合成的影响

DNA 聚合酶 I 在 DNA 模板及 Mg^{2+} 存在下,可催化 4 种脱氧核糖核苷酸逐步聚合,从而复制 DNA。在此 DNA 合成系统中,加入 HH07A 可明显抑制 DNA 的合成,并有浓度依赖性。在 HH07A 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 作用下,对 DNA 合成的抑制率为 43.7%(表 1)。

Tab 1 Effect of HH07A at different concentrations on the DNA synthesis catalyzed by DNA polymerase I in cell free system

Concentrations of HH07A ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$^3\text{H-dCTP}$ incorporation DPM($\times 10^4$)
Control	29.42 \pm 1.76
100	20.82 \pm 1.59*
200	20.63 \pm 1.08*
400	16.58 \pm 1.01**

$n=3, \bar{x} \pm s. * P < 0.05; ** P < 0.01$ vs control.

2 HH07A 与模板 DNA 的预保温实验

模板 DNA 与 HH07A 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 预保温不同时间(30, 60, 120 min),测定 DNA 聚合酶 I 催化下的 DNA 合成。结果表明,与对照组相比,DNA 预保温组的 DNA 合成无明显改变(说明随模板 DNA 进入反应系统中的微量 HH07A 不影响该条件下的 DNA 合成),而预保温后加药组(模板 DNA 经同样时间预保温,在测定 DNA 合成时加 HH07A 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)的 DNA 合成量则明显降低。提示 HH07A 与 DNA 预保温不同时间并不影响 DNA 模板的活性(表 2)。

3 HH07A 与 DNA 聚合酶 I 的预保温实验

DNA 聚合酶 I 与 HH07A 预保温不同时间(15, 30, 60 min)后,测定酶作用下 DNA 合成(表 3)。结果表明,HH07A 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 与酶预保温 15 min,即明显影响酶的活性,显著抑

制 DNA 合成,且加药预保温组对 DNA 合成的抑制率也高于预保温后加药组。DNA 聚合酶 I 与 HH07A 预保温 60 min 后,测定不同时间(15, 30, 60 min)酶的活性(表 4),结果表明,加药预保温组及预保温后加药组(在测定 DNA 合成时加入 HH07A 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)的 DNA 合成均受到抑制。且加药预保温组的 DNA 合成抑制率也略高于预保温后加药组。以上结果提示,HH07A 与酶预保温不同时间均可影响酶的活性,显著抑制 DNA 的合成。

Tab 2 Effect of preincubation of HH07A at a concentration of 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ with DNA on the DNA synthesis catalyzed by DNA polymerase I in cell free system

Group	$^3\text{H-dCTP}$ incorporation, DPM($\times 10^4$)		
	30 min	60 min	120 min
Control	29.9 \pm 3.7	20.2 \pm 4.3	18.5 \pm 1.0
1	29.2 \pm 0.4	23.2 \pm 3.6	15.3 \pm 1.8
2	14.4 \pm 2.7*	16.0 \pm 3.1	12.6 \pm 1.8*

$n=3, \bar{x} \pm s. * P < 0.05; ** P < 0.01$ vs control. 1: HH07A added at the start of preincubation; 2: HH07A added at the end of preincubation.

Tab 3 Effect of preincubation of HH07A at a concentration of 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ with DNA polymerase I on the DNA synthesis catalyzed by DNA polymerase I in cell free system

Group	$^3\text{H-dCTP}$ incorporation, DPM($\times 10^4$)		
	15 min	30 min	60 min
Control	7.9 \pm 3.7	8.0 \pm 2.4	5.0 \pm 1.9
1	3.9 \pm 1.4**	2.5 \pm 1.0*	1.1 \pm 0.4**
2	4.1 \pm 0.4*	3.8 \pm 1.2*	2.7 \pm 1.2*

$n=3, \bar{x} \pm s. * P < 0.05; ** P < 0.01$ vs control. 1: HH07A added at the start of preincubation; 2: HH07A added at the end of preincubation.

Tab 4 Effect of preincubation of HH07A at a concentration of 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ with DNA polymerase I on the DNA synthesis catalyzed by DNA polymerase I in cell free system at different reaction time

Group	$^3\text{H-dCTP}$ incorporation, DPM($\times 10^4$)		
	15 min	30 min	60 min
Control	12.6 \pm 1.1	50.5 \pm 11.8	72.0 \pm 20.1
1	10.3 \pm 2.4	25.8 \pm 7.3*	50.8 \pm 8.6
2	10.9 \pm 0.0	31.3 \pm 6.2	51.2 \pm 5.7

$n=3, \bar{x} \pm s. * P < 0.05; ** P < 0.01$ vs control. 1: HH07A added at the start of preincubation; 2: HH07A added at the end of preincubation.

讨 论

HH07A 为海南粗榧新碱衍生物, 体外明显抑制多种肿瘤细胞的生长, 在体内对某些实验性移植性肿瘤也有较好的疗效^[3], 且 HH07A 对肿瘤细胞 DNA, RNA 和蛋白质的生物合成均有显著的抑制作用, 其中又以抑制 DNA 合成的作用最强。众所周知, 抑制 DNA 合成可通过直接损伤 DNA 模板结构及干扰其代谢过程两种方式, 损伤 DNA 模板最主要形式是药物与 DNA 形成不可逆的结合或使 DNA 链交联、断裂等。干扰代谢过程主要包括对前体代谢, 大分子代谢以及与之有关的其它代谢过程的干扰破坏作用^[2]。以前的研究表明, 一旦解除 HH07A 的作用, 细胞 DNA 合成可逐渐恢复, 并且 HH07A 不与 DNA 直接结合, 无形成不可逆复合物的可能, 因此可认为 HH07A 可能属于干扰代谢过程型的药物。

本文研究表明, HH07A 对 DNA 聚合酶 I 催化下的 DNA 合成有明显抑制作用, 且有一定浓度依赖性。在本实验条件下, HH07A 直接作用靶一般有两种可能, 即 DNA 模板和 DNA 聚合酶 I。从 HH07A 与模板 DNA 预保温实验结果看, 加药预保温组的 DNA 合成与对照组

的相比, 无明显改变, 提示 HH07A 可能不作用于 DNA 模板。而从 HH07A 与 DNA 多聚酶 I 的预保温结果看, 药物与酶不同时间的保温, 均可明显抑制 DNA 的合成, 并对酶活性确有一定的抑制作用, 说明 HH07A 直接作用于 DNA 聚合酶 I 的可能性较大, 且加药预保温组的 DNA 合成抑制率又高于预保温后加药组, 因而 HH07A 对 DNA 聚合酶 I 催化下 DNA 合成的抑制作用可能主要是由于 HH07A 与酶直接作用所致。这一结果也进一步证实了 HH07A 属于干扰 DNA 合成代谢型药物的推论。但对 HH07A 与 DNA 聚合酶 I 作用方式还需作深入的研究。

参 考 文 献

- 1 YM Ye, CX Xu. The mechanism of inhibition of DNA synthesis by HH07A, a derivative of hainanensine. *Chin Med Sci J*, 1996, (accepted for publication)
- 2 吴冠芸, 方福德, 韩锐, 等. 三尖杉酯碱抑制脱氧核糖核酸生物合成机制的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1981, **13**:509
- 3 叶玉梅, 徐承熊, 郭积玉, 等. 海南粗榧新碱衍生物 HH07A 在体外对 L1210 细胞的杀伤作用. *药理学报*, 1995, **30**:491

EFFECT OF HH07A, A DERIVATIVE OF HAINANENSINE, ON DNA POLYMERASE I

YM Ye and CX Xu

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100050*)

ABSTRACT The effect of HH07A on DNA polymerase I in a cell free system was studied. The results showed that HH07A strongly inhibited the DNA synthesis catalyzed by DNA polymerase I in a dose dependent manner. Further results indicated that the DNA synthesis decreased significantly after DNA polymerase I was preincubated with HH07A. However, no change was found when DNA template was preincubated with HH07A. These results suggest that the inhibitory action of HH07A appeared to be on the enzyme molecules rather than on the DNA template.

KEY WORDS HH07A; DNA polymerase I; DNA; Antineoplastic agent