

抑制 DNA 合成药物作用方式的简易测定法

方福德 吴冠芸

(中国医学科学院基础医学研究所,北京)

很多药物(特别是抗癌药物)是通过抑制靶细胞内 DNA^{*}的生物合成而发挥疗效的。为了阐明这一类型药物作用的分子机制,首先应区分作用方式是属于损伤 DNA 模板型还是干扰代谢型。一般说来, DNA 的损伤作用近乎不可逆;干扰代谢的作用绝大多数具有可逆性,一旦药物作用被解除,细胞内 DNA 合成即可逐渐复原。根据这一原理,可利用肿瘤细胞体外解除药物作用后 ³H-TdR 掺入(代表 DNA 合成)的图谱(以下称掺入曲线)来测定药物的作用方式。

实 验 部 分

本文使用下列受试药物:氮芥(盐酸盐,海普药厂产品),红卫霉素(上海第四制药厂产品,相当于 Daunorubicin),争光霉素 A₅(上海第三制药厂产品,相当于 Bleomycin A₅),阿糖胞苷(Arac)和氟尿嘧啶(Fu)为本院抗菌素研究所提供,氨甲喋呤(MTX,上海药物研究所供给)。所有药物均在使用时经适当溶解并调至 pH 7.4。

在非纯种小鼠常规接种后第七天的艾氏腹水癌,消毒条件下吸出腹水,将细胞离心沉淀,用生理盐水洗涤一次,悬浮于 RPMI 1640 培养液(含 2.5% 小牛血清)以供实验用。实验分为用药组和对照组,每组均设三个平行管。具体操作如下:用药组每管加入 1 ml 含药的 RPMI 1640 培养液,0.1 ml 细胞悬液(含 1~2 × 10⁶ 个细胞),于 37°C 水浴保温 1 小时后,加入约 5 ml SSG 溶液(0.15 M NaCl, 0.015 M 柠檬酸钠),离心(1000 转/min, 1~2 分钟),去上清,细胞重复洗涤一次。然后每管加入 1 ml 新鲜的 RPMI 1640 培养液(不含药),依次于 0 时、半小时、1 小时和 2 小时每管加入 1 μci ³H-TdR(比活 13.3 ci/mM),保温 10 分钟后立即置入冰水浴中停止其作用,随即用抽滤法将细胞转移至玻璃纤维纸片上,依次用 1~2 ml 蒸馏水、冷 5% 三氯醋酸洗涤,再依次浸泡于 5% 三氯醋酸 15 分钟、70% 乙醇 15 分钟和无水乙醇半小时。纤维纸片凉干或烘干后进行放射性测量,闪烁液的组成是:PPO 0.3%, POPOP 0.03%, 以甲苯为溶剂。对照组除不含药物外,操作同上。实验结果以用药组的掺入计数(三管平均的 cpm)相当于对照组掺入计数的百分比(掺入率)表示。

结果表明,氮芥、红卫霉素和争光霉素 A₅ 对瘤细胞作用后的掺入曲线均呈递降型(图 1),掺入率在 100~40% 范围内,提示其 DNA 合成的受抑为不可逆。与此相反, AraC、MTX 和 Fu 作用后的掺入曲线均呈递增型(图 2),但三种药物的表现有所不同:① 受阿糖胞苷作用过的细胞,停药后 0 时至 2 小时内 ³H-TdR 掺入仍受抑制,掺入率在 10~60% 范围内递增,似乎表示药物作用比较持久② MTX 作用过的细胞停药后掺入率逐步恢复,在第 2 小时呈现掺入的促进作用③ Fu 则从停药 0 时开始至 2 小时掺入率均高于对照,完全为促

本文于 1980 年 4 月 7 日收到。

* 本文简写如下: DNA, 脱氧核糖核酸; TdR, 胸腺嘧啶核苷; PPO, 2,5 二苯基噁唑; POPOP, 2,2' 对苯撑双(5-苯基噁唑)。

进作用。另外，在两种不同的药物浓度下，掺入曲线的图谱基本相似。

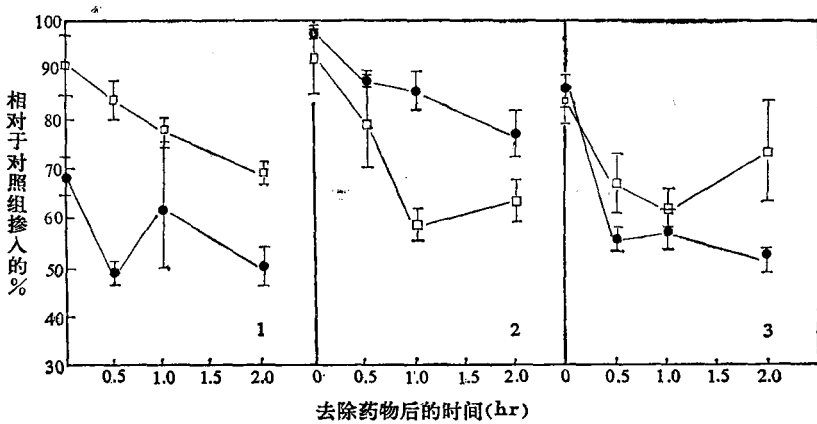


图 1 氮芥、红卫霉素和争光霉素作用后艾氏腹水癌细胞的 DNA 合成
 1. 氮芥·—·0.9 $\mu\text{g/ml}$, □—□0.4 $\mu\text{g/ml}$
 2. 红卫霉素·—·6.4 $\mu\text{g/ml}$, □—□17.2 $\mu\text{g/ml}$
 3. 争光霉素 A₃·—·43.5 $\mu\text{g/ml}$, □—□89.5 $\mu\text{g/ml}$

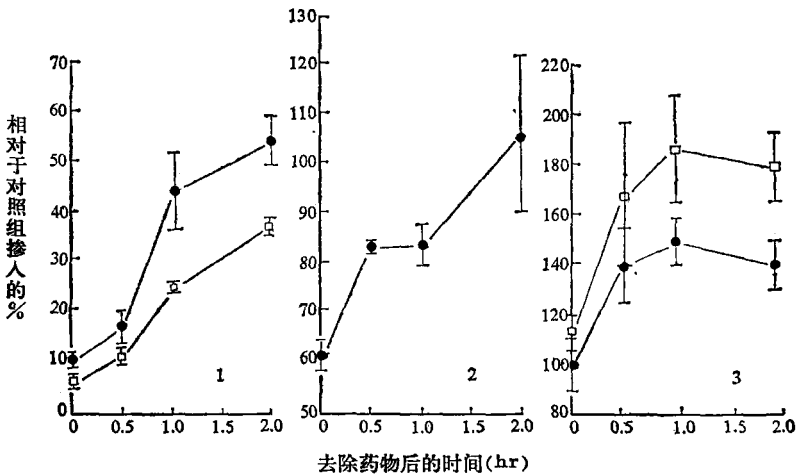


图 2 阿糖胞苷、氨甲喋呤和氟尿嘧啶作用后艾氏腹水癌细胞的 DNA 合成
 1. 阿糖胞苷·—·196.5 $\mu\text{g/ml}$
 □—□909 $\mu\text{g/ml}$
 2. 氨甲喋呤 413 $\mu\text{g/ml}$
 3. 氟尿嘧啶·—·430 $\mu\text{g/ml}$
 □—□577 $\mu\text{g/ml}$

讨 论

Painter⁽¹⁾ 曾以长期培养的人癌细胞为材料，用双标记的 TdR 掺入法测定某些致癌物、诱变物、紫外线及化学药物的作用方式，能精确地区分它们属损伤 DNA 型或干扰代谢型。我们采用动物腹水癌细胞的体外单标记的 TdR 掺入法测定药物的作用方式，也取得了满意的结果。本文结果表明，氮芥、红卫霉素和争光霉素所呈现的掺入曲线为递降型，属于损伤 DNA 模板型药物，这与其它的研究结果相一致^(2~4)；AraG、Fu 和 MTX 所呈现的掺入曲线为递增型，属于干扰代谢型药物，也与文献报道结果相吻合^(5~8)。在本实验条件下，干扰代谢型药物所呈现的掺入曲线不象损伤 DNA 型者单一，主要表现在停止药物接触后 0 时掺入率

的起点不同,这可能与其作用的位置及性质有关,如 AraG 因可直接抑制 DNA 聚合酶,停药后尚待酶活性恢复,故其上升的起点较低。综合以上结果,我们认为本法可以比较简便而准确地测定抑制 DNA 合成的药物的作用方式,对于进一步设计分子及生化药理学实验方案甚至对于临床选择应用药物或组成联合化疗方案都很有帮助。

值得指出,有些药物需经微粒体混合功能氧化酶活化后才发挥作用,对此应采取相应的活化步骤。本文使用的损伤 DNA 型药物均属直接起作用者,而 AraG 和 Fu 虽需经磷酸化作用,亦非受混合功能氧化酶活化者,故本文未用上述活化步骤。此外,在有关的研究中,若将本法与其它方法结合起来,从不同角度相互佐证,则更为理想。

致谢 本文曾得到李士谔教授帮助,特此致谢。

参 考 文 献

1. Painter RB: Rapid test to detect agents that damage human DNA. *Nature* 265:650, 1977
2. Biesele JJ, et al: Chromosome alternation and tumour inhibition by nitrogen mustards: the hypothesis of cross-linking alkylation. *Nature* 166:1112, 1950
3. Calendi E, et al: On physico-chemical interactions between daunomycin and nucleic acids. *Biochem Biophys Acta* 103:25, 1965
4. Hideo Suzuki, et al: On the mechanism of action of Bleomycin: Scission of DNA strands in vitro and in vivo. *J Antibio* 22:446, 1969
5. Bertino JR: The Mechanism of action of the folate antagonists in man. *Cancer Res* 23:1286, 1963
6. Heidelberger C: Biochemical mechanism of action of fluorinated pyrimidines. *Exp Cell Res Suppl* 9:462, 1963
7. Chu MY, et al: A proposed mechanism of action of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine as an inhibitor of the growth of leukemic cells. *Biochem Pharmacol* 11:423, 1962
8. Skoog L, et al: Effects of hydroxyurea and 1- β -D-arabinofuranosyl-cytosine on deoxyribonucleotide pools in mouse embryo cells. *Eur J Biochem* 19:81, 1971

A SIMPLE METHOD TO DETERMINE THE MODE OF ACTION OF DRUGS THAT INHIBIT DNA SYNTHESIS

Fang Fude and Wu Guanyun

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT

The mode of action of drugs that inhibit DNA synthesis can be classified into two categories; one is to damage the DNA template, the other is to interfere with DNA biosynthesis. Following up the changes of the rate of DNA synthesis in Ehrlich ascites cells after exposing to the drugs that inhibit DNA synthesis of these tumor cells, one can easily determine the mode of action of the types of inhibition. Thus a decreasing curve of ^3H -thymidine incorporation into DNA would suggest a type of mode of action through damage of DNA template, while an ascending curve would suggest one through interference of DNA metabolism. With this method, it was shown that antitumor drugs such as nitrogen mustard, bleomycin and daunorubicin exerted their inhibitory action on DNA synthesis of tumor cells through damage of DNA template. On the other hand, the inhibitory action of 5-fluorouracil, cytosine arabinose and methotrexate on DNA synthesis was through interference of DNA metabolism. These results were in agreement with those determined by other methods.