

研究论文

非嵌合性抗癌药物对小牛胸腺DNA拓扑异构酶I活力的影响

张卫升 林卓坤 黄熙泰

(南开大学生物系, 天津 300071)

提要 本文介绍从小牛胸腺中分离纯化DNA拓扑异构酶I(简称拓扑酶I)的方法,并用于检测了几种非嵌合性抗癌药物对该酶活力的影响。实验结果表明,一些已知的抗癌药物确有抑制DNA拓扑酶I的作用。以抑制DNA拓扑酶I为检测指标的方法可为筛选抗癌药物提供新的手段,并为药物抗癌机制的研究开辟了新的途径。

关键词 拓扑异构酶I; 抗癌药物; 药物筛选

DNA拓扑异构酶(DNA topoisomerases)是控制DNA拓扑结构状态的酶类,在DNA复制、转录、重组和修复等生物学过程中起着重要的作用^(1,2)。近年,已报道了多种嵌合性和非嵌合性抗癌药以DNA拓扑异构酶II(简称拓扑酶II)为靶蛋白而达到抗癌效果⁽³⁻⁵⁾。前者代表性药物为吡啶衍生物(acridine derivative, mAMSA);后者为鬼臼乙叉甙(epipodophyllotoxin, VP16),它们均可以同DNA拓扑酶II形成稳定的药物-酶-DNA复合物,导致处于S或G₂期的DNA断裂,达到杀死细胞的目的。本文介绍了纯化小牛胸腺DNA拓扑酶I的方法,并探讨了几种非嵌合性抗癌药物对小牛胸腺DNA拓扑酶I活力的作用。

实验部分

一. 材料和试剂

小牛胸腺取自天津生化制品厂,现场屠宰后取出完整胸腺,速冻保藏备用。

磷酸纤维素P11(Whatman); Bio-Rex 70(Bio-Rad); 聚乙二醇6000(PEG, Sigma); 氯化磺酰苯甲烷(PMSF, Sigma); 琼脂糖(上海东海制药厂); 喜树碱、羟基喜树碱(上海药物所); 新生霉素(Boehringer Mannheim); 长春新碱、环磷酰胺及甲氨喋呤(上海第十二制药厂); 丝裂霉素(协和发酵工业株式会社); 阿糖胞苷(北京医科大学实验药厂)

大肠杆菌HB101(本实验室提供), P₄噬菌体及P₂溶源性大肠杆菌C179(由我系蒋如璋先生赠送)。

pBR322质粒由本实验室按Maniatis的方法制备⁽⁷⁾。P₄噬菌体打结DNA由本室制备,获得拓扑打结P₄DNA,凝胶电泳检测为迁移率极为不同的涂布带状。有EcoRI切点,酶解后出现三条带(分别为7.7 Kb, 2.8 Kb, 500 bp),可作为DNA拓扑酶II的底物而

不被拓扑酶 I 作用。

二. 实验方法

(一) 拓扑酶 I 的制备^(5, 8, 9) 参考文献并简化方法。首先纯化胸腺细胞的细胞核, 将细胞核悬浮于核匀浆液 (KPi 5 mmol/L, pH 7.5, NaCl 100 mmol/L, PMSF 0.5 mmol/L, 巯基乙醇 10 mmol/L, EDTA 0.5 mmol/L) 高速匀浆后, 调 NaCl 浓度至 1 mmol/L, PEG 沉淀, 上清液用 100 mmol/L BC 缓冲液 (KPi 100 mmol/L, pH 7.0, 10% 甘油, EDTA 0.5 mmol/L, NaHSO₃ 10 mmol/L, PMSF 0.5 mmol/L, 巯基乙醇 10 mmol/L) 透析, 离心后上清液上 P11 柱, 用 200 mmol/L BC 缓冲液淋洗后再用 200 ~ 800 mmol/L BC 缓冲液线性梯度洗脱, 分部收集, 测 280, 260 nm 的吸收度及 DNA 松弛反应活力。收集活力部分, 用 100 mmol/L BC 缓冲液透析后过 Bio-Rex 70 柱, 200 mmol/L BC 缓冲液淋洗, 200 ~ 800 mmol/L BC 缓冲液线性梯度洗脱, 分部收集, 测 280, 260 nm 的吸收度及松弛反应活力, 收集活力部分, 低温保存。

(二) 蛋白质浓度测定 按 Bradford 法测定⁽¹⁰⁾。

(三) 拓扑酶 I 活力测定^(11, 12) 酶的活力测定是以超螺旋 pBR322 DNA 为底物测定酶催化的松弛反应。反应总体积 20 μ l, 含 Tris-HCl 40 mmol/L, pH 7.8, KCl 60 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, EDTA 0.5 mmol/L, BSA 3 mg/ml, pBR322 DNA 0.4 μ g, 1 单位拓扑酶 I, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min。加 5 μ l 反应终止液 (5% SDS, EDTA 50 mmol/L, 20% 甘油, 0.25 mg/ml 溴酚兰) 终止反应。反应液移入 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳缓冲液含 Tris-H₃PO₄ 80 mmol/L, EDTA 8 mmol/L, pH 8.0。电泳毕, 用溴化乙锭染色 30 min, 紫外灯下观察、照像。

酶活力单位 (U) 定义 在上述反应条件下, 使 0.4 μ g 超螺旋 pBR322 DNA 完全松弛所需的酶量为 1 个酶活力单位。

(四) 抗癌药物对拓扑酶 I 活力的影响 分别配制不同浓度的喜树碱、羟基喜树碱、丝裂霉素、甲氨喋呤、环磷酰胺、长春新碱、阿糖胞苷及新生霉素 (非抗癌药) 等 8 种药物, 按上述方法进行拓扑酶 I 松弛反应及电泳检测, 并设有不加药物的对照实验。

结果和讨论

一. DNA 拓扑酶 I 的制备与鉴定

利用拓扑酶 I 在 pH 7.0 时带正电荷, 选用阴离子交换树脂达到分离及部分纯化的目的。先经磷酸纤维素 P11 柱, 再经 Bio-Rex 70 柱层析, 使拓扑酶 I 纯化 140 倍, 洗脱曲线如图 1-1, 1-2 所示。经检测酶液具有松弛活性如图 1-3 所示。酶制品比活力为 5.6×10^3 u/mg 蛋白。

为证实酶制品中是否存在 DNase 及拓扑酶 II 内源性干扰松弛活力, 我们进行了不同保温时间的实验, 分别保温 0.5, 1, 2, 16 h (见图 1-4)。保温时间长至 16 h 仍未有 DNA 降解。另一实验中, 电泳系统中加入氯喹 3 mg/ml (见图 1-5), 结果表明, 经拓扑酶 I 松弛的 DNA 能形成正超螺旋, 图中可见到由于氯喹的插入使 pBR322 DNA 形成梯状带。提示该酶制品中没有 DNase 的干扰。已知 ATP 的存在不影响拓扑酶 I 的松弛活力, 但能增强拓扑酶 II 的活力, 图 1-6 表明 ATP 浓度达 10 mmol/L 时对该酶制剂的松弛活力仍无影响。在对 Mg²⁺ 的需要上, 真核细胞拓扑酶 I 的松弛反应不受 Mg²⁺ 的影响,

而拓扑酶 II 及 DMase 均需要 Mg^{2+} (如图 1-7 所示)。此外, 拓扑酶 I 不能作用于打结的 P_4 DNA, 而拓扑酶 II 则能进行解结反应 (见图 1-8)。综合上述实验, 表明该酶制品中不存在

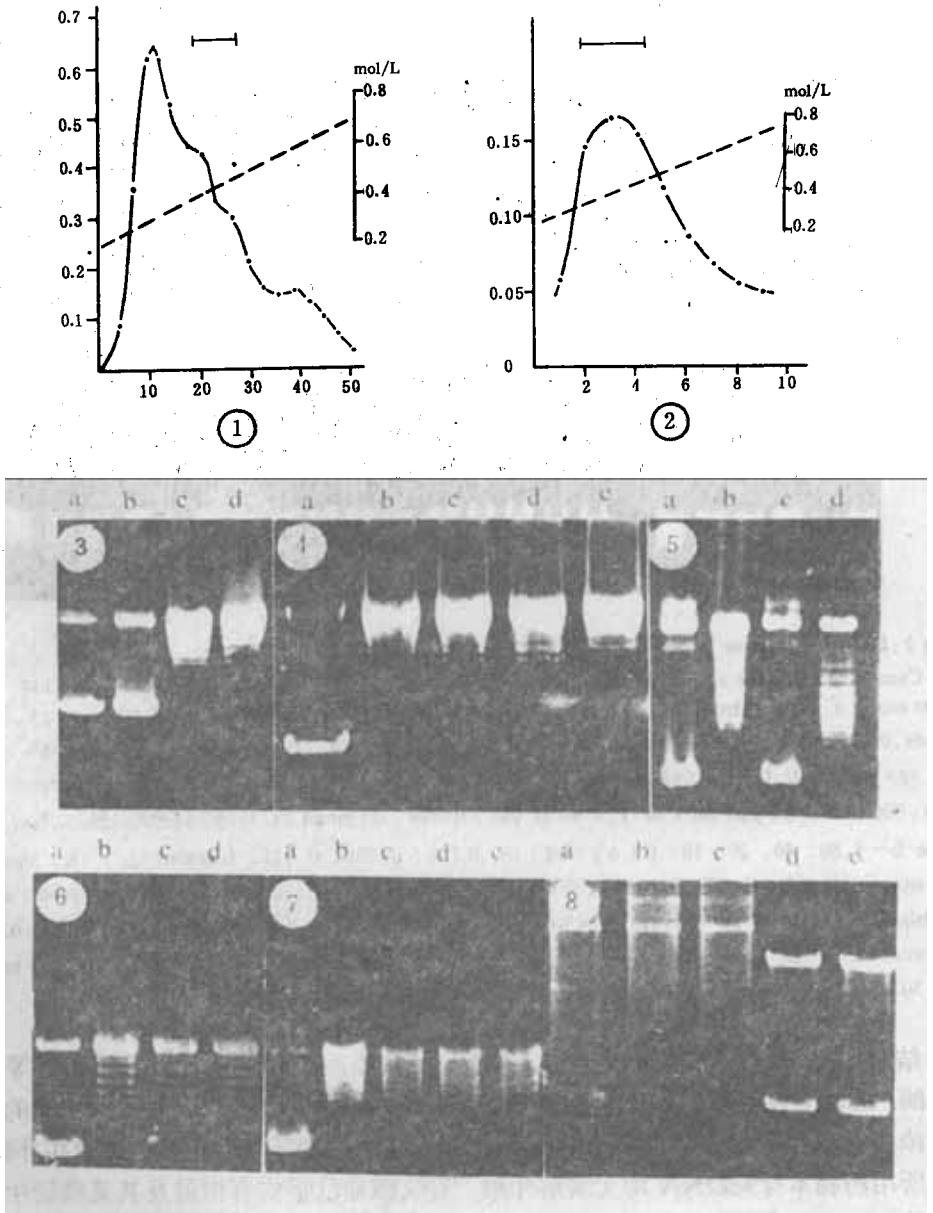


Fig 1. Purification and identification of DNA topoisomerase I.

1. Elution pattern of Topo I on P11, (---)Abs .280 nm, (- - -)KPi (mol/L), (|—|)fraction of Topo I.
2. Elution pattern of Topo I on Bio-Rex 70.
3. Relaxation reaction of Topo I, lane a, no enzyme; lane b, Topo I with protease K; lane c, protease K treatment after the reaction; lane d, the reaction of Topo I.
4. Incubation time, lane a, no enzyme; lane b~e, 0.5 ~ 16 h.
5. 3 μ g/ml chloroquine in electrophoresis buffer, lane a and c, reaction of Topo I; lane b and d, no enzyme.
6. ATP, lane a, no enzyme; lane b~d, 10, 1, 0 (mmol/L).
7. Mg^{2+} : lane a: no enzyme; lane b~e: 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, (mmol/L).
8. P_4 DNA: lane a: no enzyme; lane b~c: 5, 10 (μ l) enzyme; lane d~e: 1, 2 (μ l) EcoRI.

在内源性拓扑酶 II 及 DNase 的干扰, 适用于药物实验。

二. 药物对拓扑酶 I 活力的影响

我们检测了 8 种非嵌合性药物对拓扑酶 I 活力的作用, 除新生霉素外均为常用抗癌药物

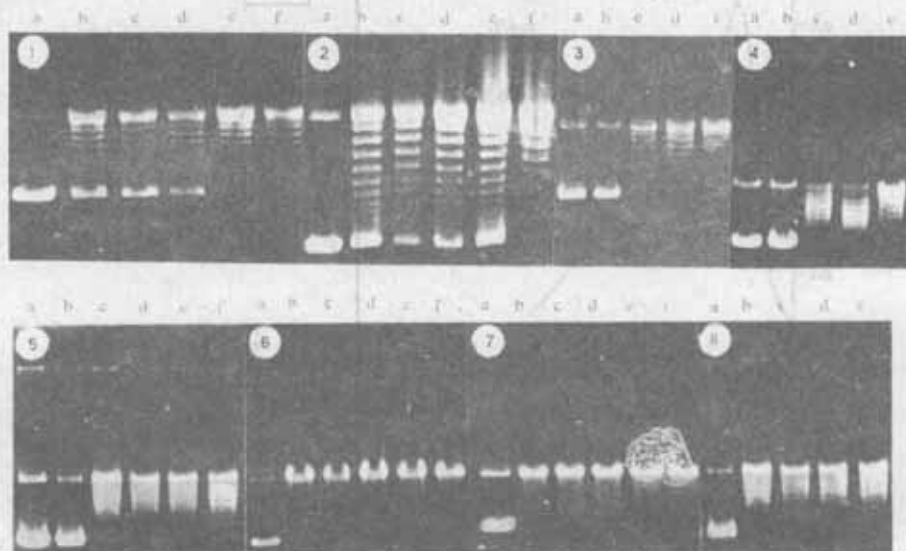


Fig 2. Effect of drugs on Topo I.

1. Camptothecine, lane a, no enzyme; lane b~f, 200, 50, 10, 2.5, 0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) or 0.575, 0.144, 0.028, 0.007, 0 (mmol/L). 2. Hydroxycamptothecine, lane a, no enzyme; lane b~f, 200, 100, 50, 25, 0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) or 0.549, 0.275, 0.137, 0.069, 0 (mmol/L). 3. Cyclophosphamide, lane a, no enzyme; lane b~e, 50, 25, 12.5, 0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) or 0.179, 0.089, 0.047, 0 (mmol/L). 4. Mitomycin C, lane a, no enzyme; lane b~e, 500, 300, 100, 0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) or 1.479, 0.898, 0.299, 0 (mmol/L). 5. Methotrexate, lane a, no enzyme; lane b~f, 80, 40, 20, 10, 0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) or 0.176, 0.088, 0.044, 0 (mmol/L). 6. Vincristine, lane a, no enzyme; lane b~f, 500, 300, 100, 50, 0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) or 0.617, 0.370, 0.123, 0.062, 0 (mmol/L). 7. Cytosine arabinoside, lane a, no enzyme; lane b~f, 500, 300, 100, 50, 0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) or 3.067, 1.841, 0.614, 0.306, 0 (mmol/L). 8. Novobiocin, lane a, no enzyme; lane b~e, 500, 300, 100, 0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) or 0.836, 0.503, 0.167, 0 (mmol/L).

实验结果(图2)表明, 喜树碱、羟基喜树碱、环磷酰胺、丝裂霉素及甲氨喋呤等 5 种药物对拓扑酶 I 松弛活性有不同程度的抑制作用。凝胶电泳图可以看到超螺旋 DNA 的松弛程度随药物浓度的变化有定量增加。新生霉素、长春新碱及阿糖胞苷等 3 种药物对拓扑酶 I 无抑制作用。所用药物本身对 DNA 均无裂解作用。有文献业已证实喜树碱及其某些衍生物是哺乳动物细胞 DNA 合成很强的抑制剂, 可使染色体 DNA 产生单链裂口。Hsiang 等⁽⁶⁾证实了喜树碱可终止哺乳动物拓扑酶 I 对 DNA 裂—合反应中的连接步骤, 由此导致 DNA 裂口复合物的积累, 这种复合物类似真核生物拓扑酶 I 暂短的中间产物。因此, 药物对核酸合成的抑制及 DNA 裂口的产生与此酶有关, 并且提出了喜树碱介导的 DNA 损伤作用模型。

上述结果表明环磷酰胺、甲氨喋呤、丝裂霉素等在体外对拓扑酶 I 也具有抑制作用, 其作用机制有待进一步研究。长春新碱和阿糖胞苷等药物对拓扑酶 I 无抑制作用, 说明它们的抗癌作用与拓扑酶 I 无关。以拓扑酶 I 为靶蛋白的非嵌合性药物可能都具有抗癌作用。但是对拓扑酶 I 无抑制作用的非嵌合性药物不能认为它们没有抗癌作用, 它们可以通过其它途径对癌细胞产生抑制。这种体外实验方法将为抗癌药物筛选及研究其作用机制提供了新途径。

参 考 文 献

1. Wang, JC. DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem* 1985; **54**: 665.
2. 曾桂超, 等. DNA 拓扑异构酶的研究进展. *生物化学杂志* 1986; **2**: 1.
3. Minocha A. Inhibition of the DNA catenation activity of type II topoisomerase by VP-23 and VM-26. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **122**: 165.
4. Nelson EM, et al. Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 1361.
5. Tewey KM. Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage reunion reaction on mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*. 1985; **259**: 9182.
6. Hsiang YH, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *Ibid* 1985; **260**: 14873.
7. Maniatis T, et al. *Molecular cloning*. New York: Cold spring Harbor, 1982.
8. Zumstein I, et al. Mutation in the gene coding for Escherichia coli DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 2474.
9. Edwards KA, et al. Purification and characterization of type II DNA topoisomerase from bovine calf thymus. *J Biol Chem* 1985; **260**: 2742.
10. Bradford MM, et al. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 1976; **72**: 248.
11. Hsieh TS, et al. Purification and properties of type II DNA topoisomerase from embryos of *Drosophila melanogaster*. *Methods Enzymol* 1983; **100**: 167.
12. Schrevel J, et al. Purification and characterization of *Plasmodium berghei* DNA topoisomerase I and II: drug action, inhibition of decatenation and relaxation and stimulation of DNA cleavage. *Biochemistry* 1986; **25**: 1471.

EFFECT OF SOME NONINTERCALATIVE ANTITUMOR DRUGS ON THE ACTIVITY OF CALF THYMUS DNA TOPOISOMERASE I

WS Zhang, ZK Lin and XT Huang

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

ABSTRACT DNA topoisomerase I has been isolated from the nuclei of calf thymus by PEG fractionation and chromatography on P11 and on Bio-Rex 70. Either a positive or negative supercoiled pBR322 DNA can be relaxed by the enzyme. The activity of Topo I is Mg^{2+} and ATP independent. Some of nonintercalative antitumor drugs such as camptothecine, hydroxycamptothecine, cyclophosphamide, methotrexate and mitomycin C were found to inhibit the activity of Topo I. The results suggest that DNA Topo I can be used to screen new nonintercalative antitumor drugs as a target protein.

key words Topoisomerase I; Antitumor drugs; Drugs screening