

氮氧自由基对白血病细胞 DNA 合成的抑制*

郑荣梁 刘力生**

(兰州大学生物系, 兰州 730001)

H. M. Swartz

(美国伊里斯诺大学医学与生物物理系, 乌巴拿 61801)

张自义 魏陆林

(兰州大学化学系, 兰州 730001)

摘 要

4-异硫氰酸盐-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧自由基对白血病细胞 7712 的生长及 DNA 合成都有强烈抑制作用, 对 DNA 合成的半抑制浓度为 $2.2 \mu\text{g/ml}$, 在浓度为 $50 \mu\text{g/ml}$ 时抑制率高达 99.7%, 对小白鼠腹腔注射的半致死剂量为 277 mg/kg , 不损伤 DNA 复制模板。它对 DNA 合成的抑制作用强于异硫氰酸盐及氮氧自由基单独作用之和。其它氮氧自由基类化合物也有较弱的抑制作用。但氮氧自由基的还原物羟胺却没有抑制作用。对致癌和抗癌的自由基机理进行了讨论。

关键词: 氮氧自由基, 抗癌

普遍认为生物体内 DNA 的损伤可能导致突变或癌变。物理的或化学的因素常能诱发产生非常活泼的自由基^[1], 致癌物 (C) 也能经细胞活化而生成自由基 $\text{C}^{\bullet}$ ^[2], 这些自由基能使细胞中敏感的靶分子 DNA 转变成 $\text{DNA}^{\bullet}$, 随后与 $\text{C}^{\bullet}$ 形成 DNA-C 加合物^[3], 这种加合物可能是癌变诱发阶段的关键因子。如果非致癌物 N 与致癌物竞争而生成 DNA-N 加合物, 就可能阻止癌变。已有报道 $\text{DNA}^{\bullet}$ 可与氮氧自由基形成加合物^[4]。有人建议把这类自由基物质作为抗癌药^[5], 例如氮氧自由基的亚硝基脲衍生物能提高抗癌能力, 并降低药物的毒性^[6]。

对氮氧自由基类化合物进行系统研究将有助于阐明致癌作用的自由基机理, 其次也有助于寻找新类型抗癌药。本文企图把具有抗癌作用的异硫氰酸盐类^[7]与 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧自由基 (Tempo) 相结合, 以观察它们对癌细胞的影响, 并探讨致癌及抗癌的自由基机理。

本文 1989 年 10 月 12 日收到, 1989 年 12 月 1 日收到修改稿。

* 国家自然科学基金资助项目。

** 现在地址: 广州仲恺农业技术学院生物技术中心, 510225。

一、材料和方法

1. 细胞和培养条件 把白血病 7712 细胞注射到纯种小白鼠腹腔中生长 5 天, 收集细胞, 用生理盐水清洗。有些实验中细胞生长在 GIBCO (Life Technologies, Inc. New York) 199 培养基中, 加入 20% 小牛血清和 100 单位/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素。

2. 氮氧自由基和有关化合物 合成各种氮氧自由基^[6], 并用抗坏血酸还原法制备上述自由基的羟胺类化合物。用薄层色谱法分离提纯。用 10% 丙二醇制成悬液。配制 H_2O_2 与过氯酸 (V:V 为 1:1) 作为细胞消化液。闪烁液由 0.5% PPO 和 0.01% POPOP 的二甲苯溶液与乙二醇甲醚以 3:2 组成。 ^3H -胸腺嘧啶核苷 (^3H -TdR, 999 GBq/mmol) 购自中国科学院上海原子核研究所。

3. 细胞 DNA 合成 按照 Zittoun 等方法^[7]把 2.5×10^5 个/ml 的白血病 7712 细胞 5 ml 放入 25 ml 的培养瓶中, 37℃ 温育 14 h, 加入被试物使终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 重复 3 份。同时加入 ^3H -TdR 使终浓度为 37 KBq/ml, 37℃ 温育 24 或 48 h, 离心、清洗、消化, 放到含有 10 ml 闪烁液的测量瓶中, 在 FJ-2100 液闪计中测放射性。用显微镜测细胞数。

4. DNA 损伤的检测 一个能损伤 DNA 复制模板的化合物, 即使从培养基中清除后, 由于模板受到损伤, DNA 的合成速率不能恢复; 如果一个化合物不损伤模板, 仅通过代谢阻断了 DNA 合成, 那么一旦化合物清除, DNA 合成速率可以迅速恢复。利用这一原理可以区别一试剂是否能损伤 DNA^[10]。在含有 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 4-异硫氰酸盐-Tempo 的培养基中将细胞温育 9 h, 用生理盐水清洗 3 次, 随后更换成新鲜培养基, 分别生长 3, 6, 9 和 12 h 后, 加入 ^3H -TdR 37 KBq/ml, 标记 2 h, 弃去培养液, 清洗, 测放射性, 重复 3 份。

5. 急性毒性试验 杂种昆明小白鼠 20 ± 2 g, 雌雄各 25 只, 腹腔注射 4-异硫氰酸盐-Tempo 154, 221, 256, 315 和 450 mg/kg。用线性回归法计算半致死剂量 LD_{50} 。

二、结果与讨论

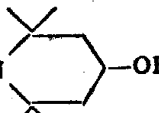
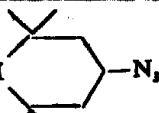
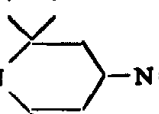
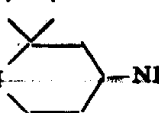
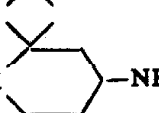
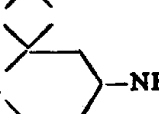
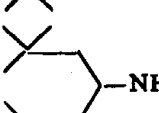
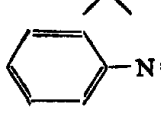
1. 对细胞 DNA 合成的抑制

从表 1 可见 4-异硫氰酸盐-Tempo (3) 强烈抑制 ^3H -TdR 参入 DNA, 抑制率高达 99.7%。其它氮氧自由基的抑制能力弱得多。氮氧自由基本身 TMHPO (1) 和 4-叠氮基-Tempo (2) 的抑制率仅有 18%。用苯基取代(3)的氮氧自由基后(8), 抑制率从 99.7% 下降到 27.1%。把氮氧自由基与异硫氰酸盐结合起来(3)的抑制作用(99.7%)远大于二者单独作用的和, 即 $17.9\% + 27.1\% = 45.0\%$ 。

为了进一步核实氮氧自由基本身对抑制作用的效应, 还做了第二个试验。比较了氮氧自由基类似物羟胺的抑制作用。羟胺类化合物不是自由基, 而是由氮氧自由基还原的分子(表 2 中 R_2)。氮氧自由基的抑制作用远强于羟胺类, 表现为(1) > (9), (3) > (10)(表 2)。氮氧自由基(1)和(3)都有抑制作用, 而不是自由基的羟胺(9)却没有抑制作用。羟胺(10)所以呈现出抑制作用可能是由于异硫氰酸盐的作用^[7]。

据此可以认为, 氮氧自由基对 DNA 合成具有明显抑制作用, 而它的还原物羟胺却无作用。这一见解与 Emanuel 等^[11]报告相同。

表 1 氮氧自由基对 DNA 合成的影响 ($\bar{x} \pm SD$, $n = 3$)

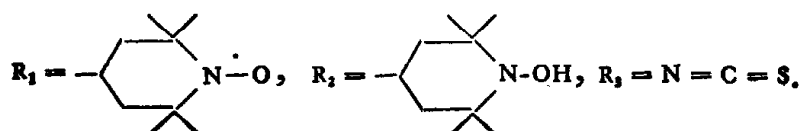
化 合 物	浓度* ($\mu\text{g/ml}$)	DNA 的放射性 ($\times 10^{-4}$ cpm)	抑制率(%)
对 照	—	24.4 ± 0.9	—
(1) 	50	20.1 ± 0.5	17.9
(2) 	50	20.0 ± 0.4	18.0
(3) 	50	0.06 ± 0.02	99.7
(4) 	50	21.7 ± 1.0	10.9
(5) 	50	12.7 ± 0.2	48.2
(6) 	50	17.4 ± 1.2	28.9
(7) 	50	21.0 ± 1.1	13.8
(8) 	50	17.8 ± 0.3	27.1

* 与细胞作用 48 h.

表 2 氮氧自由基及其羟胺类似物对 DNA 合成的影响 ($\bar{x} \pm SD$, $n = 3$)

化 合 物	浓度* ($\mu\text{g/ml}$)	DNA 的放射性 ($\times 10^{-4}$ cpm)	抑制率 (%)
对照	0	74.6 ± 3.10	—
(1) R_1 -OH	50	57.8 ± 2.62	22.5
(9) R_2 -OH	50	75.4 ± 3.44	-1.1
(3) R_1 - R_3	5	3.8 ± 0.16	94.9
(10) R_2 - R_3	5	27.2 ± 1.53	63.5

* 与细胞作用 24 h;



2. DNA 合成与细胞生长的关系

化合物(3)对 DNA 合成和对细胞生长的抑制都随浓度增加而作相应的增强(图 1), 这表明 DNA 合成的抑制反映了细胞生长的削弱。

3. 对 DNA 的损伤

当把(3)从培养基中清除后, DNA 合成速率从抑制状态中迅速恢复(图 2)。可见(3)仅代谢性地阻断了合成, 而没有损伤 DNA 复制模板。

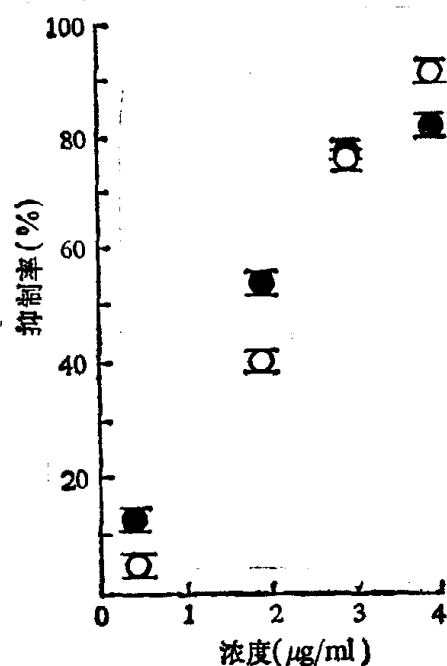


图 1 4-异硫氰酸盐-Tempo 对 L7712 DNA 合成(○)和生长(●)的相关性 ($n=3$)

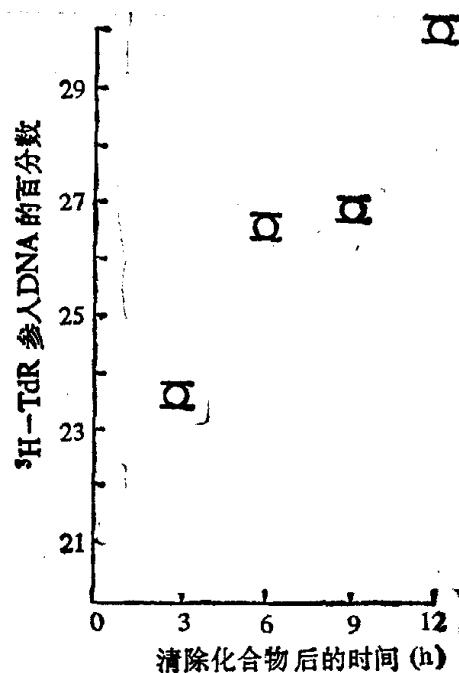


图 2 清除 4-异硫氰酸盐-Tempo 后, DNA 合成速率的恢复 ($n=3$)

4. 急性毒性

用线性回归法算出(3)的 LD_{50} 是 277 mg/kg (表 3)。

表 3 4-异硫氰酸盐-Tempo 对小白鼠存活的急性效应

剂量 (mg/kg)	小鼠只数	死亡数	死亡率(%)
450	10	9	90
315	10	9	90
256	10	4	40
221	10	1	10
154	10	0	0

稳定性氮氧自由基是极有效的抗氧化剂^[12], 它既能抑制内源性的及 CCl_4 引发的微粒体脂类过氧化, 又能降低耗氧量^[13]。许多具有抗氧化力的化合物既能抑制实验动物的诱发性肿瘤, 又能防止各种结构不同致癌物的有害作用^[14]。另一方面, 氮氧自由基常与极活泼的其它自由基生成加合物, 因此它起着清除剂作用^[15]。在涉及不饱和脂肪酸和氧的生物系统中, 自由基消除剂和抗氧化剂在某种程度上效应相同^[16]。因此氮氧自由基类化合物的抗癌作用也许是独

特的,它可能通过与 DNA[·] 或 C[·] 形成加合物以清除自由基这一机理来实现的。看来肿瘤的自由基机理是值得重视的。

4-异硫氰酸盐-Tempo 除了强抗癌作用 and 低毒性外,它不损伤 DNA 结构,因此在受试浓度范围内不会有突变作用。这个化合物可能具有临床应用前景。

参 考 文 献

- [1] 郑荣梁等,中国科学 B 辑, 1988, 2: 152.
- [2] 郑荣梁等,生物化学与生物物理学报,19(1987),4: 317.
- [3] Singer, B. & Grunberger, D., *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, Plenum Press, New York, 1983, 143.
- [4] Willson, R. L., *Free Radical, Lipid Peroxidation and Cancer*(Eds. McBrien, D. C. H. & Slater, T. F.), Academic Press, London, 1982, 275.
- [5] Konovalova, N. et al., *Dokl. Akad. Nauk. (SSSR)*, 157(1964), 3: 707.
- [6] Sosnovsky, G. & Li, S. W., *Life Sciences*, 36(1985), 1473.
- [7] Schroeder, D. C., *Chem. Rev.*, 55(1955), 181.
- [8] 张自义等,有机化学,1(1987),70.
- [9] Zittoun, R. et al., *Cancer*, 35(1975), 507.
- [10] Painter, R. B., *Nature*, 265(1977), 650.
- [11] Emanuel, N. M. et al., *PCT Int. Appl.*, WO 80 03, 510 (Cl. CO7D207/46); *C. A.*, 103(1985), 160524.
- [12] Weil, J. T. et al., *Nature*, 219(1968), 168.
- [13] Wolf, C. R. et al., *Mol. Pharmacol.*, 18(1980), 553.
- [14] Slaga, T. J. & Digiovanni, J., *Chemical Carcinogens* (Eds. Searle, C. E. et al.), 1984, Vol. 2, 2nd ed. 1279.
- [15] Mason, R. P., *Spin Labeling in Pharmacology*, Academic Press, New York, 1984, 87.
- [16] Slater, T. F., *Free Radical Mechanisms in Tissue Injury*, Pion Limited, London, 1972, 48.