

一种钒配合物 LMC 抑制 DNA 拓扑异构酶 I 的抗肿瘤作用*

莫晓媚 李 静 李延团 耿美玉

(中国海洋大学医药学院分子药理室 山东 青岛 266003)

摘要 目的: 探讨钒配合物 LMC 对拓扑异构酶 I、II (Topo- I、Topo- II) 的影响及其抗肿瘤活性。方法: 采用 DNA 松弛实验观察 LMC 对 Topo- I、活性的影响并探讨其相关分子作用机制; 采用 MTT 法、流式细胞术在细胞水平观察了 LMC 的抗肿瘤作用。结果: LMC 可明显抑制 Topo- I 活性, 对 Topo- II 无明显抑制作用, 对多种肿瘤细胞株 A549、Hela、BEL- 7402 具有明显抑制生长的作用, 且可将细胞阻断在 G2/M 期, 而对正常细胞株 L- 02 生长无明显影响。结论: 钒配合物 LMC 具有抑制 Topo- I 活性而发挥抗肿瘤的作用。

关键词: 钒配合物; DNA 拓扑异构酶; 抗肿瘤

The antitumor activity of a vanadium compound LMC in inhibiting DNA topoisomerase

ME Xiao- mei, LI Jing, LI Yan- tuan, GENG Mei- yu

(Molecular Pharmacology Lab, School of medicine and pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT: In this paper, we studied the effects of vanadium compound LMC on DNA topoisomerase and its antitumor activity. DNA relaxation assay was used to detect the activity of LMC on topoisomerase I (Topo- I) and topoisomerase II (Topo- II) and its correlated molecular mechanism of action; MTT assay and Flow cytometry were used to detect LMC's antitumor activity from cytology angle. LMC can inhibit Topo- I activity obviously, but not, Topo- II LMC can also inhibit A549, Hela, BEL- 7402 cell lines growth evidently, and LMC can arrest the cells at G2/M stage. However, it makes no difference to normal cell line L- 02, from which we conclude that Vanadium compound LMC has obvious anticancer activity through inhibiting Topo- I activity.

Key words: Vanadium compound; DNA topoisomerase; Antitumor

六十年代末, 顺铂被发现具有抗癌活性, 在临床上对多种肿瘤均有良好的治疗效果, 从而开辟了金属配合物抗癌作用研究的新领域。经过近三十年的努力, 化学家虽然发现了一些不同程度的抗癌活性过渡金属配合物, 但这些药物因毒副作用大和持续时间短等缺点, 临床应用受限。DNA 拓扑异构酶 (DNA topoisomerase) 是多种抗肿瘤药物的有效靶标^[1]。DNA 拓扑异构酶在 DNA 复制、基因转录、DNA 重组、有丝分裂等细胞代谢过程中起着极重要的作用, 可分为 Topo- I 和 Topo- II 两个家族。抗癌药物喜树碱 (camptothecin) 及其衍生物羟基喜树碱 (hydroxycamptothecin, OPT) 的作用靶位是 Topo- I^[3], 吡啶类化合物 (m- AMSA) 和鬼臼毒素类化合物 (VP- 16、VM- 26) 等则作用于 Topo- II^[2]。这些药物可通过抑制 Topo- I 或 Topo- II 而导致肿瘤细胞的死亡。但由于这些药物易出现耐药性, 临床应用也不广泛。因此, 设计、筛选、合成新一代高效、广谱、低毒、持续时间长的抗癌药物, 仍为当前努力的方

向。

LMC 是我院化学合成室合成的一种由氧原子配位的四价金属钒配合物, 该配合物分子式为 $[VO(SO_4)(C_6H_6N_4S_2)(H_2O)_2] \cdot 4H_2O$ (四水·硫酸根·一联噻唑·二水合氯钒(III), diaqua(2, 2'-diamino-4, 4'-bi-1, 3-thiazole)oxosulfatovanadium(III) tetrahyolate), 为淡蓝色微晶, 易溶于水, 分子量为 469.36。我们在以 DNA 拓扑异构酶为靶点的抗肿瘤化合物筛选中发现, LMC 具有较强的 Topo- I 抑制作用。本文进一步对 LMC 的 Topo- I 抑制作用及抗肿瘤活性进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂: LMC, 中国海洋大学医药学院化学合成室提供。RPMI- 1640 培养基、DMEM 培养基、F- 12 培养基购于 Hyclone 公司, N- 月桂酰肌氨酸钠、四氮唑蓝 (MTT)、PMSF 为

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973 计划) 资助项目 (No. 2003CB716400)

作者简介: 莫晓媚, 女, 硕士, 研究方向: 分子药理学, Tel: 0532- 82031981, Email: silvia_mpl@163.com

通讯作者: 耿美玉 (1963-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子药理学

Tel: 0532- 82032066, Fax: 0532- 82033054, Email: gengmy@mail.ouc.edu.cn.

(收稿日期: 2006- 04- 10 接受日期: 2006- 04- 26)

Sigma 产品,其它常规试剂均购于上海生工。

1.1.2 动物与瘤株:小鼠白血病细胞株 L1210,小鼠白血病细胞株 P388,人肺癌细胞株 A549,人子宫颈癌细胞株 Hela,人肝癌细胞株 BEL- 7402,人正常肝细胞株 L- 02,均为本实验室冻存。DBA/2 小鼠(雄性,6~ 8 周龄,体重 18~ 22g)、C57BL/6 小鼠(雄性,6~ 8 周龄,体重 18~ 22g),北京大学医学部动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 pBR322 DNA 的提取:质粒 pBR322 转化到大肠杆菌 E. coli 中,摇床培养,按常规方法提取超螺旋 pBR322 DNA^[4]。

1.2.2 DNA 拓扑异构酶的提取:参照文献^[5]提取 DNA 拓扑异构酶,此酶提取液为粗酶,同时含有 Topo- I 和 Topo- II 的活性。

1.2.3 DNA 松弛实验:5μL 4× 缓冲液(200 mmol/L Tris- HCl pH7.5, 340mmol/L KCl, 40mmol/L MgCl₂, 20mmol/L DTT, 120μg/ml BSA, 5mmol/L EDTA) 中加入 0.5μg 超螺旋 pBR322DNA 及不同量的酶提取液,并加蒸馏水至 20μL,置 37℃ 水浴反应 30 分钟,加 1μL 终止液(10% SDS 10μL+ 1μL 蛋白酶 K 10mg/ml) 终止反应,继续温育半小时,加 2μL 上样 Buffer, 0.8% 琼脂糖电泳, TBE 缓冲液, 50~ 60V 电压,电泳 2h,溴化乙锭(EB) 染色,紫外灯观察。使 0.5μg pBR322 超螺旋 DNA 完全变成缺口环状或线性 DNA 的酶量为 1U。反应体系中加入 1mmol/L 三磷酸腺苷(ATP) 测的是 Topo- II 的酶活;反应体系不含 ATP,主要测 Topo- I 的酶活。

1.2.4 LMC 对 Topo 的抑制作用:5μL 4× 缓冲液中加入不同浓度的药物和 1U Topo, 作用 30 分钟;后续步骤同上。反应体系中加入 1mmol/L ATP 测药物对 Topo- II 的作用;反应体系不含 ATP,主要测药物对 Topo- I 的作用。

1.2.5 MTT 测定:取对数生长期的 P388、A549、Hela、BEL- 7402 和 L- 02 细胞,接种于 96 孔板。每孔含 5× 10³~ 10⁴ 个细胞、200μL 培养液及不同浓度的 LMC, 各组设 3 个平行孔。加药 48h 后每孔加入 20μL 5mg/ml MTT, 继续培养 4h,弃上清,各孔中加入 200μL DMSO,振荡后用酶标仪于 570nm 波长(参比波长为 630nm) 下比色测定。计算化合物对肿瘤细胞的抑制率,绘制生长抑制曲线并算出 IC₅₀。

1.2.6 细胞周期的测定:取对数生长期的 A549 人肺癌细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后吹打均匀并计数,以 25× 10⁴/孔接种于 6 孔板,细胞贴壁后加入各浓度药物,终体积为 2ml。48h 后收获细胞,PBS 洗两次,PI 染色 30 分钟后,上流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 LMC 对 DNA 拓扑异构酶的抑制作用

LMC 对 Topo- I 酶活性的影响见图 1。A 图为 OPT 对 Topo- I 的作用,B 图为 LMC 对 Topo- I 的影响。由图可知,随着药物浓度的提高,超螺旋 DNA (Form I) 逐渐增多,缺口和线性 DNA (Form II&III) 逐渐减少,且呈较好的量效关系,对 Topo- I 的抑制作用略强于 OPT。另外 LMC 对 Topo- II 酶活性无明显抑制作用,如图 2 所示。

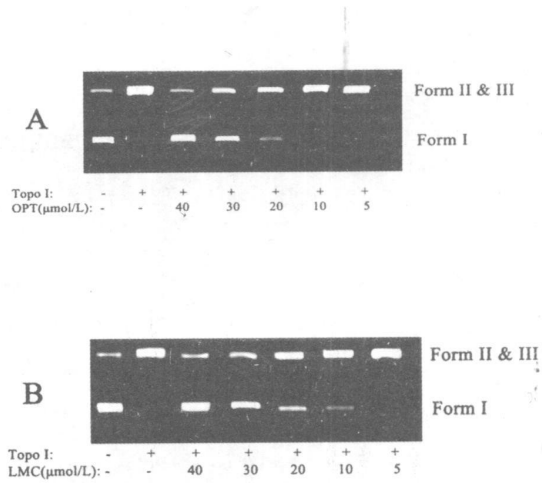


图 1: A: OPT 对 Topo I 介导的 pBR322 DNA 松弛实验的影响。
B: LMC 对 Topo I 介导的 pBR322 DNA 松弛实验的影响。
Fig.1: A: Effect of OPT on Topo I-mediated pBR322 DNA relaxation.
B: Effect of LMC on Topo I-mediated pBR322 DNA relaxation.

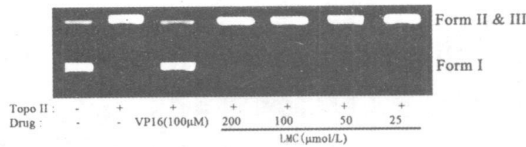


图 2: LMC 对 Topo II 介导的 pBR322 DNA 松弛实验的影响。
Fig. 2: Effect of LMC on Topo-II mediated pBR322 DNA relaxation.

2.2 LCM 对不同肿瘤细胞株生长的影响

LMC 对 BEL- 7402、A549 和 Hela 具有较强的抑制生长的作用,对 P388 作用较弱,对 L- 02 人正常肝细胞无明显抑制作用,结果见表 1。

Table 1 IC₅₀ of LMC on P388, BEL- 7402, A549, Hela and L- 02

Cell lines	P388	BEL- 7402	A549	Hela	L- 02
IC ₅₀ (μmol/L)	53.6±3.4	4.2±0.8	6.8±0.8	7.2±0.6	220.6±17.6

2.5 LMC 对 A549 肺癌细胞周期的影响

与空白组相比, $100\mu\text{mol/L}$ 的 LMC 可显著地将 A549 肺癌细胞阻断在 G2/M 期, 并呈一定的剂量依赖性。如图 3 所示。

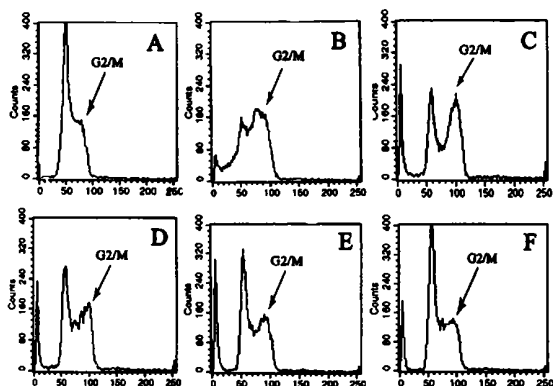


图 3 LMC 对 A549 肺癌细胞周期的影响。A: 空白; B: OPT, $40\mu\text{mol/L}$; C: C: LMC, $100\mu\text{mol/L}$; D: LMC, $50\mu\text{mol/L}$; E: LMC, $25\mu\text{mol/L}$; F: LMC, $12.5\mu\text{mol/L}$; G2/M 期占总周期的百分比: A: 8.94%, B: 36.43%, C: 48.16%, D: 21.15%, E: 20.31%, F: 15.72%。

Fig. 3. Effect of LMC on A549 human lung cancer cells. A: control; B: OPT, $40\mu\text{mol/L}$; C: LMC, $100\mu\text{mol/L}$; D: LMC, $50\mu\text{mol/L}$; E: LMC, $25\mu\text{mol/L}$; F: LMC, $12.5\mu\text{mol/L}$; The percentage of G2/M, A: 8.94%, B: 36.43%, C: 48.16%, D: 21.15%, E: 20.31%, F: 15.72%。

3 讨论

钒是许多生物有机体所必需的微量元素。近年来一些钒配合物证明具有抗癌活性^[6], 但确切机制仍不十分清楚, 因此也影响了高效低毒的钒配合物的研究开发。

我们的实验结果表明, 钒配合物 LMC 对不同来源的肿瘤

细胞株 BEL-740、A549 和 Hela 均具有较强的抑制生长能力, 而对正常肝细胞几乎无影响, 表明其发挥作用的选择性较强, 流式细胞仪检测还发现 $100\mu\text{mol/L}$ 的 LMC 能显著地将细胞周期阻断于 G2-M 期, 表明 LMC 对细胞生长还具有周期抑制性。

我们的研究还发现, LMC 对 Topo- I 有较强的抑制作用。Topo- I 是一种单链的核酸内切酶和连接酶, 喜树碱的衍生物 OPT 是典型的 Topo- I 抑制剂。实验中发现 LMC 对 Topo- I 具有明显的抑制作用, 且作用强于 OPT, 其深入的分子机制值得进一步研究。

综合我们的研究表明, 钒配合物 LMC 具有抑制肿瘤细胞的作用, 其机制与有较强的 Topo- I 抑制作用有关。该研究为 LMC 进一步开发成新的非铂类抗肿瘤药物奠定了基础, 其新的作用机制也为金属配合物的抗肿瘤研究提供了新视野。

参考文献

- [1] Krishnan P, Bastow KF. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives alaphachone and beta-lapachone [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 47(3): 187~98
- [2] POMMIER Y. Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors [J]. Biochimie, 1998, 80(3): 255~70
- [3] Beaches B, Bonner M, Brunon J. Sensitivity to topoisomerase of human malignant glioma cell lines [J]. Cancer Radiother, 1999, 3(1): 57~64
- [4] J. 萨姆布鲁克, D.W. 拉塞尔. 上册. 第三册. 北京. 分子克隆实验指南[M]. 科学出版社, 2003: 32~36
- [5] 蒋超, 卿晨, 蒙凌华, 等. 灵芝提取物对 DNA 拓扑异构酶的抑制作用及诱导 K562 细胞凋亡[J]. 癌症, 1999, 18(6): 661~67
- [6] Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 42(3): 249~65
- [7] the avian adrenal following immobilization or adrenocorticotropin [J]. Endocrinol, 1974, 23: 193
- [8] Bousquet WF, Miya TS. Modification of stress response in histamine-depleted rats [J]. Brain Res J. Pharmacol, 1996, 27: 177
- [9] Kwenqsky, Mikulazl. Adrenal and urinary catecholamine in rats during adaptation to repeated immobilization stress [J]. Endocrinol, 1970, 87: 738
- [10] 金光亮, 南睿, 郭霞珍. 慢性应激肝郁证大鼠模型的建立 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(2): 18
- [11] 路翠艳, 潘芳. 应激反应中 HPA 轴的中枢调控和免疫调节 [J]. 中国行为医学科学, 2003, 12(3): 353
- [12] 赵歆, 陈家旭, 杨建新, 等. 疏肝中药复方对慢性束缚应激大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(2): 6
- [13] Zachariassen RD. Phenylethanolamine-N-methyl transferase acting in

(上接第 12 页)

参考文献

- [1] 熊振芳, 朱清静. 柴胡疏肝散对慢性束缚应激性肝郁证大鼠的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2004, 12(4): 220
- [2] 朱清静, 罗欣拉, 熊振芳. 柴胡疏肝散对慢性束缚应激性肝郁证大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节作用 [J]. 湖北中医杂志, 2003, 25(11): 7
- [3] 周永生, 樊雅莉, 陈小野, 等. 观察脾气虚证动物模型规范化的初步研究 4/4 部分免疫功能方面 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(2): 1
- [4] 罗国钧, 罗海琳. 慢性肝病肝郁脾虚证的研究进展 [J]. 山西中医, 2001, 17(3): 57
- [5] 王子梅. ACTH 激素分泌调节新进展 [J]. 国外医学内分泌学分册, 1994, 14(4): 171
- [6] Zachariassen RD. Phenylethanolamine-N-methyl transferase acting in