

氧代赖氨酸抑制 CHL 细胞有丝分裂作用和遗传毒性研究

屠曾宏 倪汉宁 吴虹燕 王美瑛

中国科学院上海药物研究所 上海 200031

摘要 氧代赖氨酸是一种有抗癌作用的抗菌素,结构类似于赖氨酸。对 CHL 细胞有明显的抑制有丝分裂作用,但并不诱发染色体畸变。用闪烁计数法定量测定肝细胞核的程序外 DNA 的合成,未见氧代赖氨酸对其有明显影响。氧代赖氨酸与小牛胸腺 DNA 分子相互作用的体外试验亦未见 DNA 的 CD 谱明显改变。但氧代赖氨酸却明显地抑制肝细胞蛋白质合成。可以假设,氧代赖氨酸抑制了蛋白质合成,特别是组氨酸,因而抑制细胞分裂,并非对 DNA 直接作用之故。未检测出氧代赖氨酸的遗传毒性。

关键词 氧代赖氨酸;致突变试验;染色体畸变;DNA 修复;圆二色谱

INFLUENCE OF OXALYSINE ON THE MITOSIS OF CHL CELLS AND ITS GENOTOXIC STUDY

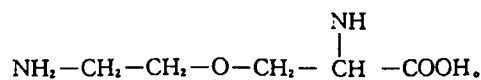
Tu Zenghong, Ni Hanning, Wu Hongyi, Wang Meiyang

Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031

Abstract Oxalysine was found to be an antitumor antibiotic with a simple chemical structure very similar to lysine. In CHL cells it showed potent inhibition of mitosis, but had no effect on chromosome aberration. The influence of oxalysine on DNA-repair was detected after incubation of cultured rat hepatocytes with oxalysine and [³H]-TdR in the presence of hydroxyurea, using nuclear isolation-liquid scintillation counting. Oxalysine did not induce UDS in hepatocytes. Further studies on effect of oxalysine on DNA conformation indicate the circular dichroism spectra of calf thymus DNA were not altered by oxalysine at 50 μg/ml. It is thought that inhibition of mitosis caused by oxalysine results not from effect on DNA, but more likely, from inhibition of protein biosynthesis, in particular the synthesis of histone. Oxalysine did not show any genotoxicity.

Key words oxalysine; mutagenicity tests; chromosome aberrations; DNA repair; circular dichroism

氧代赖氨酸(oxalysine, o-lys)是我所发现的一种有治疗肿瘤作用的抗菌素,结构类似于赖氨酸,其结构式为:



在实验动物上证明对多种小鼠实体瘤有

效⁽¹⁾。因具有抗肿瘤作用,自然很关心其遗传毒性。我们在试验 o-lys 对 CHL 细胞染色体畸变时,发现它对 CHL 细胞的 IC₅₀与出现满意的中期分裂相所用的 o-lys 剂量相差甚大。因此它对 DNA 的损伤作用是一个值得探索的问题。

材料和方法

1 对 CHL 细胞有丝分裂的抑制作用和染色体畸变试验

方法如前文所述⁽²⁾,求得 IC₅₀剂量。依此对半递减,直至观察到满意的中期分裂相为止。作为分析染色体畸变的最高剂量,按 Ishidate 标准判断实验结果⁽³⁾。

2 大鼠原代培养肝细胞试验

2.1 原代肝细胞的分离 按文献⁽⁴⁾略有改进。即在第二步灌注时则用循环的胶原酶溶液。分得细胞用锥兰检测成活率,大于 90%才用于实验⁽⁵⁾。细胞先用 Williams Medium E 培养液加 10%小牛血清培养,3h 贴壁后,改为无血清培养。加药液和 [³H]TdR。为分析程度外 DNA 合成(UDS)则再加 10mM 羟基脲(HU)。

2.2 肝细胞核的分离和 UDS 的闪烁计数

肝细胞与不同浓度 o-lys 和 [³H]TdR。HU 孵育不同时间,收获细胞按文献^(6,7)进行细胞核的分离。再用 27-11 型微量多头细胞收集器将之吸附到滤纸上,用 Beckman Ls-6000 液闪自动计数器计数,自动淬灭校正。

2.3 肝细胞蛋白合成的测定 如上所述细胞贴壁 3h 后,加入不同浓度的 o-lys 和 [³H]继续培养,于不同时间收获细胞,同上处理,作全细胞的闪烁计数。

3 DNA 圆二色谱测定 方法如前文所述⁽⁹⁾,所测得数据以左、右圆偏振光吸收系数表示($\Delta\Sigma = \Sigma_{左} - \Sigma_{右}$)。

结果

1 o-lys 对 CHL 细胞生长半数抑制剂量和有丝分裂抑制剂量 实验测得 IC₅₀为 18.2mM,但此时未见细胞分裂相。只有当浓度降到 3.8mM 以下时才可观察到满意的中期分裂相。

2 诱发 CHL 细胞染色体畸变试验 以呈现满意的有丝分裂相的 o-lys 浓度 4mM 为最高浓度,测 4, 2, 1mM 三个浓度的诱发 CHL 细胞染色体畸变作用,结果均为阴性。列于表 1。

Tab 1. Chromosome aberration test of Chinese hamster lung(CHL) cell line for oxalysine(O-lys), mitomycin C(mmc). b: break; e: exchange; o: other; p: polyploid; r: ring; t: translocation.

Drug	Conce mM	Time h	Chromosome aberrations		
			Type	%	Scale #
Normal saline	0.1ml	24	b	1	-
		48	bp	4	-
MMC	0.2μg/ml	24	berpt	29	++
		48	beropt	58	+++
O-lys	4	24	b	3	-
		48	b	1	-
		24	/	0	-
		48	b	2	-
		48	b	2	-

Criterion: -, negative(<4.9%); ± suspicions(5.0-9.9%); +, positive(10.0-19.9%); ++, (20.0-49.9%); +++, (>50%)

3 培养原代肝细胞的实验

3.1 对分离的肝细胞核的 UDS 效应 肝细胞与 o-lys 的最终浓度为 4, 2, 1mM 及 $[^3\text{H}]$ -TdR, HU 共孵, 在 4, 24h 时间点上所测得 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入的放射性强度与对照组相比, 均无明显差别。而加 HU 与不加 HU 的对照组特异性的活性相差约一半。与文献⁽⁸⁾报道相符。由图 1 可见, 氧代赖氨酸与对照组 (HU) 结果相似。

3.2 对肝细胞蛋白质合成的影响 O-lys 对肝细胞蛋白质合成的影响, 结果列于表 2, 由表可见氧代赖氨酸浓度为 1mM 时, 8h 即可见对蛋白质合成的抑制作用。当浓度为 2. 4mM 时从 4h 起就显示抑制作用, 而且分别可持续 8—20h, 可见对蛋白质的合成抑制作

用较为敏感。

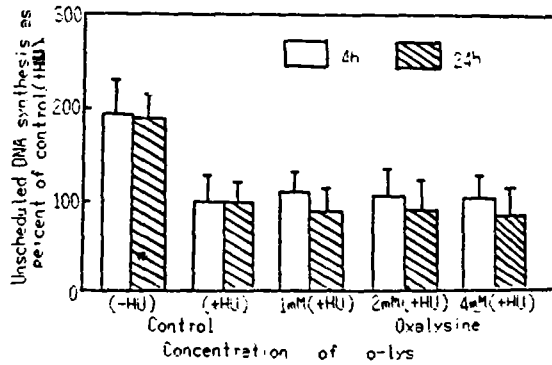


Fig 1. Effect of oxalysine on quantitation of UDS in isolated nuclei of cultured rat hepatocytes. The data are expressed as % control with 10mM HU. $n=6; \bar{x} \pm s; P > 0.05$ vs control (+HU)

Tab 2. Influence of O-lys on Incorporation of $[^3\text{H}]$ -lysine with protein in primary cultured rat hepatocytes. $n=6; \bar{x} \pm s; * P < 0.01$ vs control

Concen O-lys	1h	4h	8h	20h
control	2451 ± 643	3527 ± 314	4286 ± 264	4580 ± 343
1mM	2275 ± 641	3137 ± 641	2557 ± 211**	3287 ± 440
2mM	2100 ± 301	1820 ± 161**	2562 ± 725**	4001 ± 908
4mM	1950 ± 320	1972 ± 114**	2281 ± 571**	2812 ± 521**

4 对小牛胸腺 DNA 的 CH 谱影响 图 2 实线图谱为正常小牛胸腺 DNA 的 CD 谱。特征是在 246nm 和 276nm 处有一对称分布的正负峰。在 217nm 处有一小负峰。50μg/ml o-

lys 加入 50μg/ml 浓度的 DNA 溶液后, 经微机处理所呈现 DNA-lys 复合 CK 谱(图 2 虚线表示)几乎完全重叠。可以认为 o-lysg 与 DNA 无相互作用。

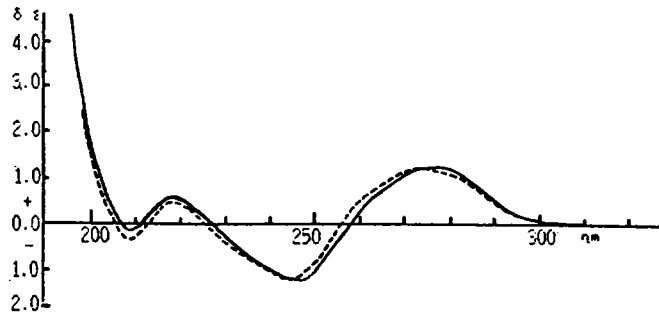


Fig 2. Effect of oxalysine on the circular dichroism spectra of calf thymus DNA. A: CD spectra of DNA B: CD spectra of DNA-oxalysin complex.

讨论

用闪烁计数法在培养的原代肝细胞上分析了氧代赖氨酸对 UDS 的作用。为排除核外物质吸附 $[^3\text{H}]-\text{TdR}$ 的影响,我们分离出细胞核进行测量。结果未见任何影响。闪烁计数法测 UDS 可能会受到处于 S 期少数细胞的干扰,加入 HU 可抑制 DNA 的复制合成,而不抑制 UDS。我们实验中加 HU 后放射性强度约减少一半,与文献⁽⁸⁾报道一致。Olson 平行比较了加 HU 的闪烁计数法和放射自显影法测 UDS 获得了较好的相关性。此外我们又进一步考察了氧代赖氨酸是否可对 DNA 的构形有所影响。用体外实验测试了氧代赖氨酸对小牛胸腺 DNA 分子 CD 谱的影响。结果也未见任何作用。考虑到组蛋白是细胞染色体的主要成分,与细胞分裂关系密切,且富含赖氨酸。氧代赖氨酸结构相似于赖氨酸,从 $[^3\text{H}]-\text{LYS}$ 对培养原代细胞掺入蛋白质的实验来看,1mM 氧代赖氨酸内可抑制蛋白质的合成。由此可从设想氧代赖氨酸对细胞分裂的抑制作用,不是直接对 DNA 的作用。很可能与抑制蛋白质特别是组蛋白的合成有关。而并不表现它的遗传毒性。

参考文献

1. 乐秀芳,吴富根,青衫. 氧代赖氨酸的抗癌和药理实验研究. 药学报,1980;15:391.
2. 屠曾宏,王美瑛,肖伟琪,等. 羟基喜树碱诱发中国仓鼠卵巢细胞染色体畸变和在小鼠骨髓、胎肝血中形成微核的作用. 中国药理学报. 1990;11:378.
3. Ishidate M Jr and Odashima S. Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro — a screening for chemical carcinogens *Mutat Res*,1977;48:337.
4. McQueen CA and Williams GM. The use of rat, mouse, hamster and rabbit in the hepatocyte primaryy culture/ DNA repair test *Ann N. Y. Aca Sci*,1983;4707:119.
5. 倪汉宁,屠曾宏. 用原代肝细胞研究氧代赖氨酸肝脂变机制. 中国药理通讯. 1993;10:9.
6. Olson MJ, Casciano DA and Pounds JG. A method for rapid sensitive quantitation of short—patch DNA in cultured rat hepatocytes. *Mutat Res*,1983;119:381.
7. Althaus FR, Lawrence SD, Sattler GL. Chemical quantitation of unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes as an assay for the rapid screening of potential chemical carcinogens *Cancer Res*,1982;42:3010.
8. Michalopoulos G, Sattler GL, O'Connor L, et al. Un-scheduled DNA sysnthesis induced by procarcinogens in suspensions and primary cultures of hepatocytes on collagen membranes. *Cancer Res*,1978;38:1866.
9. 屠曾宏,沈春镗,王美瑛,等. 药物诱变效应与其和 DNA 圆二色谱变化的关系探讨. 癌变·畸变·突变,1993;5:15.

=====

江苏省环境诱变剂学会成立

经过多年的筹备,江苏省环境诱变剂学会近期正式成立。来自江苏省高校、科研、防疫、卫生等单位的 50 余位代表于 1994 年 11 月 16 日在南京铁道医学院召开了学会成立大会。薛寿征副理事长代表中国环境诱变剂

学会到会祝贺。会上还进行了学术交流,并选举产生江苏省环境诱变剂学会第一届理事会。理事长:薛开先;副理事长:高翼之、杨永年、冯静仪、郑斯英;秘书长:王亚平。
(王亚平 宗卉)