

二茂钛二甘氨酸盐酸盐的体外抗肿瘤活性 及其与 DNA 的作用研究

张志刚 杨 频

(山西大学分子科学研究所, 太原, 030006)

摘要 研究了二茂钛二甘氨酸盐酸盐的体外抗肿瘤活性, 发现该化合物对艾氏腹水癌肿瘤细胞具有很高的活性. 又通过琼脂糖凝胶电泳技术研究了该化合物与 PBR322 DNA 的作用, 发现它与 PBR322 DNA 之间不存在任何插入键合作用, 而且也不会引起 DNA 链的缺刻.

关键词 二茂钛二甘氨酸盐酸盐, 抗肿瘤, DNA, 琼脂糖凝胶电泳法

分类号 O614.4

二氯二茂钛具有很高的抗肿瘤活性, 人们曾一度推测其抗肿瘤机理与顺铂相同^[1,2], 我们利用核磁共振方法研究二氯二茂钛与单核苷酸的成键特点时发现^[3], 二氯二茂钛与核苷酸的成键方式不同于顺铂, 表明二氯二茂钛的抗肿瘤机理可能与顺铂有明显差别. 但由于二氯二茂钛在水中的溶解度不大, 这在一定程度上妨碍了它对与 DNA 的作用机理进行深入的研究. 由于二茂钛二甘氨酸盐酸盐极易溶于水, 且其酸性配体为具有生物学重要意义的氨基酸, 因此研究该化合物的抗肿瘤活性及其与 DNA 的作用特点, 对了解二茂钛类化合物的抗肿瘤机理具有很重要的意义.

1 实验部分

1.1 材料和仪器

氚标记的脱氧胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)购自中国科学院原子能研究所. 质粒 PBR322 DNA(北京华美生物工程公司), 溴化乙锭(EB, Fluka 公司), 琼脂糖(agarose, DNA 级, 美国 FMC 公司), 二茂钛二甘氨酸盐酸盐(TDG)根据文献[4]方法合成. 所用其它试剂均为生化试剂或分析纯试剂. TAE 缓冲液: 0.04 mol/L Tris, 0.02 mol/L 乙酸钠, 0.001 mol/L EDTA, pH 7.2. 接种艾氏腹水癌肿瘤的荷瘤小白鼠, 由山西省肿瘤研究所赠送.

PACKARD-TIR-CARB 2200CA 型液体闪烁仪, DYY-III 型电泳槽, DYY-III 型稳压稳流电泳仪, 法国 GILSON 公司微量可调进样器.

1.2 二茂钛二甘氨酸盐酸盐的体外抗肿瘤活性

在无菌条件下, 取接种肿瘤 7 d 后生长良好的小白鼠肿瘤腹水, 分别以生理盐水和 RPMI 1640 培养基洗涤后, 用 RPMI 1640 培养基配成细胞浓度为 1.2×10^6 cell/mL 的活细胞悬浮液. 将 TDG 用生理盐水配制成浓度分别为 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} 和 1×10^{-3} mol/L 的溶液. 然后, 向细胞培养板上各孔中分别加入 100 μ L TDG 和 100 μ L 活细胞悬浮液的混合物. 将上述细胞培养板在 5% CO₂ 气氛中, 于 37 °C 培养 3 h, 同时也将作为空白对照

的细胞在同样条件下同时培养. 然后, 向细胞培养板上的每个孔中再分别加入 $10 \mu\text{L}$ ($0.6 \mu\text{C}$) 的 $^3\text{H-TdR}$, 继续于 37°C 培养 1.5 h 后, 终止掺入反应. 在液体闪烁仪上测量各样品的放射性. 取 cpm 的均值计算掺入率. 以 $(T/C)\%$ (用药组放射性/对照组放射性) 表示存活率, $(1-T/C)\%$ 表示抑制率. 测定结果表明, 当二茂钛二甘氨酸盐酸盐的浓度分别为 5×10^{-7} , 5×10^{-6} , 5×10^{-5} 和 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时, 其抑制率分别为 20.11, 58.51, 68.74 和 80.09. 通过抑制率对药物浓度的曲线, 算得抑制率为 50% 时的药物浓度 (IC_{50} 值) 为 $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$.

1.3 二茂钛二甘氨酸盐酸盐与 DNA 的作用

将一定量的 PBR 322 DNA ($0.5 \mu\text{g}$) 与不同浓度的 TDG 溶液混合 (浓度依次为 0 , 4×10^{-5} , 6×10^{-5} , 8×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 2.0×10^{-4} 和 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), 室温下静置反应一定时间后, 在 TAE 缓冲液中, 于 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳实验. 电泳结束后, 将琼脂糖凝胶浸泡于 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的 EB 溶液中染色 12 h . 取出凝胶, 在紫外检测仪上用带有红光滤光镜的照相机照相 (图 1).

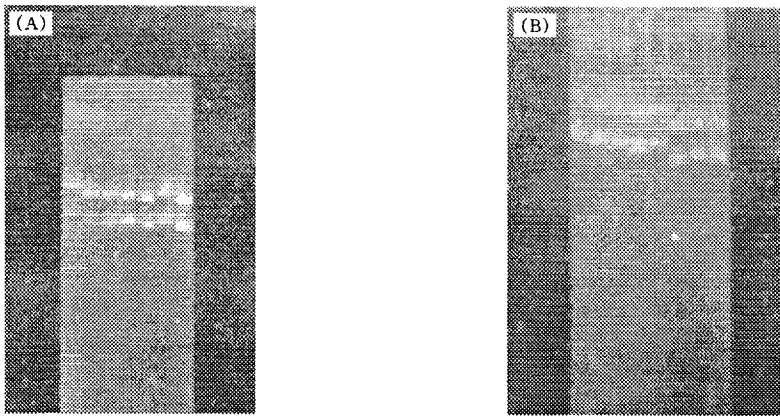


Fig. 1 Electrophoresis in 1% agarose gels of PBR 322 DNA in the presence of varying concentrations of titanocene glycine complex after a period of incubation at room temperature

(A) 48 h incubation; $c(\text{TDG})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$, from left to right: 0 , 4×10^{-5} , 6×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 2.0×10^{-4} and 2.5×10^{-4} , respectively. (B) 92 h incubation; $c(\text{TDG})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$, from left to right: 0 , 4×10^{-5} , 6×10^{-5} , 8×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1.5×10^{-4} , 2.0×10^{-4} and 2.5×10^{-4} , respectively.

2 结果与讨论

2.1 二茂钛二甘氨酸盐酸盐的体外抗肿瘤活性

以氚标记 DNA 合成特殊前体掺入法研究二茂钛二甘氨酸盐酸盐的体外抗肿瘤活性表明, 二茂钛二甘氨酸盐酸盐对艾氏腹水瘤的 IC_{50} 值为 $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ (二氯二茂钛的为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ [5]). 可见, 二茂钛二甘氨酸盐酸盐 also 具有很高的抗肿瘤活性.

2.2 琼脂糖凝胶电泳法研究二茂钛二甘氨酸盐酸盐与 DNA 的作用

图 1 反映了不同浓度的二茂钛二甘氨酸盐酸盐在与 PBR 322 DNA 分别反应了 48 h 和 92 h 后 DNA 电泳带的变化. 从图 1 可见: (1) TDG 与 DNA 作用后, DNA 的 CCC 带和 OC 带的量均无明显变化, 且 CCC 带和 OC 带的相对距离也未改变. (2) TDG 与 PBR 322 DNA 反应时间的延长, 未对 DNA 的 CCC 带和 OC 带产生显著的改变. 即使用较高浓度的药物与 DNA 作用很长的时间, 也未能使 DNA 的 CCC 带产生缺刻而转变为 OC 带.

当具有超螺旋结构的 DNA 与 EB 等平面插入剂作用时^[6], 随着药物浓度的增大, OC 带的迁移率基本不变, 而 CCC 带的迁移率却变得越来越小, 从而使得 CCC 带和 OC 带的距离变得越来越近, 直到 CCC 带几乎接近 OC 带时, CCC 带的迁移率又开始变大, 从而使 CCC 带和 OC 带的距离又逐渐加大。

我们的实验表明, TDG 浓度的增加并未使 PBR 322 DNA 的 CCC 带和 OC 带的相对距离有任何变化, 因而二茂钛氨基酸化合物与 PBR 322 DNA 之间不存在任何插入键合作用。

Lippard 等^[7]用凝胶电泳法对顺铂与 DNA 的作用的研究表明, 当顺铂与 DNA 反应 24 h 以后, 顺铂与 DNA 之间有明显的共价结合, 在电泳上表现为其 CCC 带和 OC 带的电泳迁移率明显变小, 而当顺铂与 DNA 反应 160 h 后, 药物造成了 DNA 的严重缺刻, 并使 DNA 的 CCC 带全部转变成了 OC 带。

在我们的实验中, 即使 TDG 在较高浓度时与 DNA 反应 92 h 后, 也未观察到 DNA 的 CCC 带和 OC 带的量有明显的变化, 因而可推测二茂钛二甘氨酸盐酸盐不会引起 DNA 链的缺刻。这一推测与文献[8]的结果一致。另外, 当 TDG 的浓度较大时, DNA 的 CCC 带和 OC 带的迁移率会逐渐变大, 这可能是由于 DNA 分子在较高浓度的药物存在下形成了一种结构更为紧密的分子结构。实验中未观察到 DNA 的 CCC 带和 OC 带的迁移率随药物的浓度增大而逐渐减小的情形, 可能正是由于二茂钛二甘氨酸盐酸盐的相对浓度较高的缘故。

参 考 文 献

- 1 Koepf H., Koepf-Maier P.. ACS Symp. Ser., 1983, (209): 315
- 2 Rosenberg B.. Cancer, 1985, **55**: 2 303
- 3 Zhang Zhigang, Yang Pin, Guo Maolin. Trans. Met. Chem., 1996, **21**(4): 322
- 4 Klapoekte T. M., Koepf H., Torniepoth-Oetting I. C.. Organometallics, 1994, **13**(9): 3 628
- 5 Koepf-Maier P.. Prog. Clin. Biochem. Med., 1989, **10**: 151
- 6 Islam S. A., Neidle S., Gandecha B. M. *et al.*. Biochem. Pharm., 1983, **32**: 2 801
- 7 Howe-Grant M., Wu K. C., Bauer W. R. *et al.*. Biochemistry, 1976, **15**(19): 4 339
- 8 ZHANG Zhi-Gang(张志刚), YANG Pin(杨 频). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 1997, **18**(8): 1 259

In Vitro Antitumor Activity of Titanocene Glycine Complex and Its Interaction with DNA

ZHANG Zhi-Gang, YANG Pin*

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Titanocene glycine complex, $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-)_2$, was found to have *in vitro* antitumor activity against Ehrlich ascites tumor cells. The interaction between $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-)_2$ and DNA was investigated by agarose gel electrophoresis. The results suggested that no intercalation bonding exists between the compound and DNA, and the compound does not induce nicking of DNA.

Keywords Titanocene glycine complex, Antitumor, DNA, Agarose gel electrophoresis

(Ed.: M, G)