

## 生物还原化合物作用的分子生物学机理

O'Neil P

近年来的研究表明,生物还原化合物,如RSU-1069的乏氧毒性作用与其在生物体内的还原过程有关。其作用的靶分子是DNA。在有氧和乏氧时毒性的差异也与其和DNA的作用方式有关。以下简单介绍生物还原化合物与DNA的相互作用,及其细胞毒性和辐射增敏作用产生的分子生物学机理。

### 一、生物还原化合物与核苷酸或DNA的相互作用

RSU-1069可与核苷酸的磷酸基以及碱基相互作用产生加合产物。RSU-1069在磷酸盐缓冲液中于310nm波长时,光吸收强度随着时间的增加而迅速减少,而在醋酸钠缓冲液中减少缓慢,这是由于RSU-1069与磷酸基团相结合的缘故。

当RSU-1069与核苷酸或核苷共同保温后,用HPLC(高效液相色谱)方法可以测得RSU-1069与核苷酸结合产生加合产物。RSU-1069与嘌呤核苷酸作用可产生2~3种加合物;而与嘧啶核苷酸作用主要产生一种类型加合物。RSU-1069与核苷酸相互作用的部位,包括鸟嘌呤的6位羰基和7位氮,以及腺嘌呤的7位氮。此外,对于四种脱氧核苷酸而言,RSU-1069均可与其磷酸基团相结合产生加合物,这也是其与嘧啶核苷酸的主要结合方式。

生物还原化合物与核苷酸的结合与其烷化作用有关。随着氮丙啶环上甲基取代的增加,其与核苷酸的结合减少。

RSU-1069与DNA的结合也得到实验证实。原型或辐射产生的还原型化合物均可与小牛胸腺DNA相结合,但结合速率有着显著差异(图1)。还原型RSU-1069与DNA

的结合速率远远高于其原型化合物。这种还原态的快速结合和原型的慢速结合反映了该双功能化合物与DNA作用的不同特点。原型RSU-1069主要是由于氮丙啶的烷化作用而与DNA结合,这种结合速度较慢;而还原型产物除烷化作用外,还可与DNA相结合,且结合速率较快。

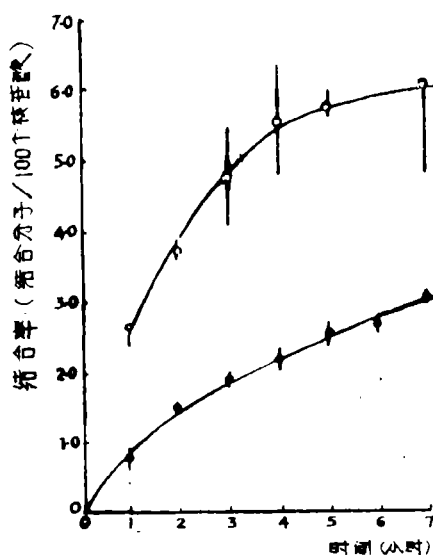


图1 RSU-1069 (●) 及其还原型 (○) 与小牛胸腺DNA的结合速率

### 二、生物还原化合物产生的DNA损伤

用质粒DNA系统可测定DNA上产生的单链断裂(ssb)和双链断裂(dsb)对碱不稳定损伤以及DNA-DNA交联损伤。当环状质粒(I型)一条链上产生断裂(ssb)时,即成为开环状DNA(II型),而当两条链相邻部位同时产生断裂(dsb)时,则转变为线状DNA(III型)。因此由I型DNA的减少或II型和III型DNA的增加,可

了解DNA单链断裂和双链断裂的产生。

RSU-1069 或其还原型与质粒 DNA 保温后均可产生ssb和dsb, 而且随保温时间的增加, ssb或dsb也增加, 使 I 型质粒减少。如果在电泳前预先用 pH12 碱性溶液处理 DNA, 则 I 型质粒减少更为明显, 这是由于 RSU-1069 与质粒DNA相互作用产生碱基加合物, 这些加合物在碱性条件下不稳定转变为ssb或dsb所致。

还原型化合物与其原型比较, 产生更多的ssb和碱基加合物, 这是由于它与DNA结合作用较强, 因此对 DNA 损伤增加与这种结合作用的增强有关。

生物还原化合物对 DNA 的损伤作用也与其氮丙啶环的甲基化程度有关。当甲基取代增加时, 对DNA的损伤减少, 从而使 I 型 DNA 减少所需的时间增加。表 1 列举了 RSU-1069 及其类似物与DNA保温后, I 型

表1 原型及还原型生物还原化合物使 I 型质粒DNA减少20%所需时间(h)

药物	甲基化结构	原型	还原型
RSU-1069	$-N<$	3.5	1.1
RSU-1131	$-N<\begin{array}{l} \text{CH}_3 \end{array}$	12	2.5
RSU-1150	$-N<\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	24	5.5
RSU-1164	$-N<\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	27	15
RSU-1165	$-N<\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	23	22.5
RB-7040	$-N<\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	50	40

质粒减少20%所需的时间。表 1 可看出氮丙啶结构对这类化合物与 DNA 的相互作用极其重要。此外, 还可看出所有化合物的还原型对 DNA 的损伤作用均比原型化合物强。

用质粒系统还可测得DNA的链间交联。其方法是在药物与DNA作用后使质粒DNA在碱性条件下 (pH>12) 变性, 然后进行

中和。如果DNA产生链间交联, 则在中和后很容易部分复性, 在凝胶电泳时可出现部分复性的 II 型DNA, 从它的数量可了解交联产生的情况。而ssb则在变性后部分复性的几率极低。

用上述方法观察到还原型 RSU-1069 可使DNA产生链间交联, 但原型RSU-1069无此作用。推测这是由于在还原状态, 不仅氮丙啶基团可以与DNA结合, 而且还原型产物也可与DNA结合, 当其分别与DNA的两条链相结合时, 就可产生链间交联。这也是在乏氧条件下, 生物还原化合物具有双功能作用的一个显著特点。此外, 由于DNA交联损伤致死性强, 这也是生物还原化合物对乏氧细胞毒性强的原因。

### 三、生物还原化合物的细胞毒性作用与DNA损伤及修复的关系

生物还原化合物对乏氧细胞DNA的单、双链断裂损伤作用均比对有氧细胞强。而且有氧和乏氧时产生的细胞dsb的差异更为明显, 产生相同效应所需药物浓度约相差一个数量级, 而产生ssb所需药物浓度在有氧和乏氧时仅相差约1/3个数量级。这表明在乏氧状态dsb的增加尤为明显。由表 2 可以看出在有氧和乏氧条件下各种类型 DNA 损伤与细胞毒性之间的关系。

表2 RSU-1069与RSU-1131的增效比较

作用	RSU-1069 : RSU-1131*	
	空气中	氮气中
细胞毒性	2.3	~20
细胞 DNA		
ssb	3.2	2.4
dsb	1.6	5.0
质粒 DNA		
ssb	3.4	2.3
链交联	无	~15~20
磷酸盐活性	~2.0	未测定

\*RSU-1131的值为1

由表 2 可见, RSU-1069 在乏氧时的细胞毒性较有氧时增加的同时, dsb 在乏氧时的产量也较有氧时明显增加, 而 ssb 则未有增加。可以推测 RSU-1069 对乏氧细胞的毒性作用主要是由于 dsb 的增加。一般认为 dsb 和 DNA 交联不易被细胞修复, 是细胞死亡的主要原因。此外, 从 RSU-1069 的药物浓度与细胞存活率变化的关系中也表明, 在有氧条件下, 随着药物浓度增加细胞存活率下降的同时, ssb 则随之增加。同样在乏氧时细胞存活率减少与 dsb 的增加有关 (图 2)。

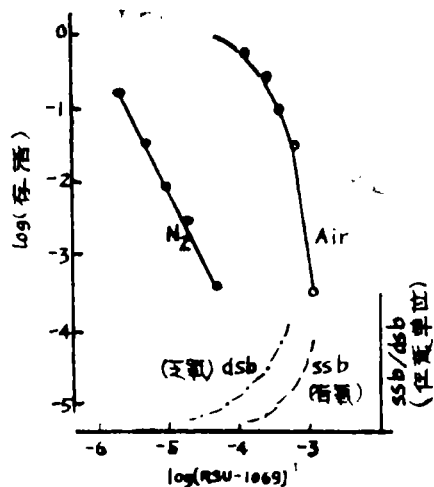


图 2 RSU-1069 细胞毒性与 DNA 链断裂的关系

因此可以认为, 生物还原药物对乏氧细胞产生较强毒性作用的主要原因之一是产生了较多的 dsb。

与辐射引起的 DNA 损伤修复不同的是, 生物还原化合物产生的 ssb 或 dsb 在修复保温过程中几乎完全不能被修复。当 RSU-1069 与  $V_{70}$  细胞保温 2 h 后洗去药物, 然后在 37℃ 保温 2~3 小时, 无论在有氧或乏氧下产生的 ssb 或 dsb 都不能被修复。

#### 四、生物还原化合物作用的温度依赖性

生物还原化合物的辐射增敏作用有着明显的温度依赖性。在 4℃ 时, RSU-1069 体内作用的 SER (增敏比) 值明显低于 20℃

时。4℃ 时, RSU-1069 的 SER 值与药物浓度的关系曲线与 MISO 在 20℃ 作用曲线相平行, 这表明在 4℃ 时, 主要是硝基咪唑环的亲电子作用产生增敏作用, 此时 RSU-1069 并没有显示其双功能作用; 而在 20℃ 时, RSU-1069 表现出对细胞的双重杀伤作用, 因此使 SER 值显著增加。这进一步说明生物还原化合物的还原代谢过程是依赖于温度的酶促反应过程。

在乏氧条件下, RSU-1069 合并放射产生的 DNA ssb 量也同样具有这种温度依赖性。在  $N_2$  下, 20℃ 时产生的 ssb 较 4℃ 时明显增加, 而且在 0 Gy 时的原初 ssb 损伤也增加, 这反映在 20℃ 时, RSU-1069 的毒性使 DNA 产生 ssb。

#### 五、生物还原化合物合并照射引起的 DNA 损伤的修复

电离辐射产生的 DNA 损伤在照后保温过程中可以部分或全部被修复, 辐射引起的 ssb 在保温 1 h 后几乎可以完全被重接。但是当细胞与 RSU-1069 保温后再行照射, 产生的 ssb 在保温 2 h 仍不能被完全重接。这部分残余 ssb 量高于药物毒性产生的 ssb 量, 说明除了药物毒性产生的 ssb 不能被修复外, RSU-1069 与辐射共同作用还产生了难以修复的 ssb, 或者是破坏了细胞内酶系统。dsb 的产生也具有类似情况。在照射后保温 3 h 后, 残余 dsb 量仍显著高于药物毒性引起的 dsb 量。在有氧情况下辐射引起的残余 dsb 约为 20%, 这与乏氧时 MISO 合并 120 Gy 辐照后的残余 dsb 量相近, 而乏氧条件下 RSU-1069 合并 120 Gy 引起的残余 dsb 则多达 59%。

不能被细胞修复的 DNA 链断裂, 即残余断裂是细胞死亡的主要原因之一。生物还原化合物在照射后产生较多的残余断裂, 尤其是残余 dsb, 是其辐射增敏作用较强的分子基础。