

- [7] Sato, B. K. et al.: *J. Clin. Invest.*, **61**, 251, 1978.
 [8] Wilkerson, L. S et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)*, **75**, 838, 1978.
 [9] Scarlato, G. et al.: *Acta Neur. Scand.*, **59**, 262, 1979.
 [10] Kalofoutis, A. G. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **74**, 85,

1977.

- [11] Hirata, J. et al.: *Nature*, **275**, 219, 1978.
 [12] Jones, G. E.: *J. Neur. Sci.*, **58**, 159, 1983.
 [13] Butterfield, D. A.: *J. Neur. Sci.*, **52**, 61, 1981.

[本文于1983年12月5日收到]

三类不同连接方式的双吲哚化合物对 核酸和蛋白质合成的影响

吴冠芸 刘敬忠 张 镭

(中国医学科学院, 基础医学研究所, 北京)

靛玉红是我国首先发现的治疗慢性粒细胞白血病的有效药物。它是两个吲哚环通过2位和3'位碳原子之间的双键相连而成。中国医学科学院药物研究所合成室合成了三类不同连接方式的双吲哚化合物十个, 其两个吲哚环分别以2,3', 2,2'或3,3'相连(图1)。本文比较研究了这些化合物对癌细胞核酸和蛋白质合成的影响, 对无细胞体系DNA合成的影响, 以及与小牛胸腺DNA(CT-DNA)体外结合情况, 并讨论了它们的作用与结构的关系。

一、材料与方 法

1. 可移植性动物瘤瓦尔克256(W256, 腹水型), 接种自中国医学科学院药物研究所药理室, 小鼠艾氏腹水癌接种自基础医学研究所病理室。取常规接种5—6天后的腹水细胞为实验材料。

2. 试剂和放射性核素标记前体: 培养基用日本进口RPMI 1640粉剂配制。CT-DNA购自中国科学院生物物理研究所。 ^3H -TTP(25Ci/m mole), ^3H -亮氨酸(119.5 mCi/m mole)分别购自中国医学科学院放射医学研究所及中国科学院原子能研究所。

3. 体外掺入实验在过去方法基础上^[1], 稍加改变。掺入放射性计数采用非均相液闪测定法。药物对 ^3H -标记前体掺入癌细胞酸不溶性

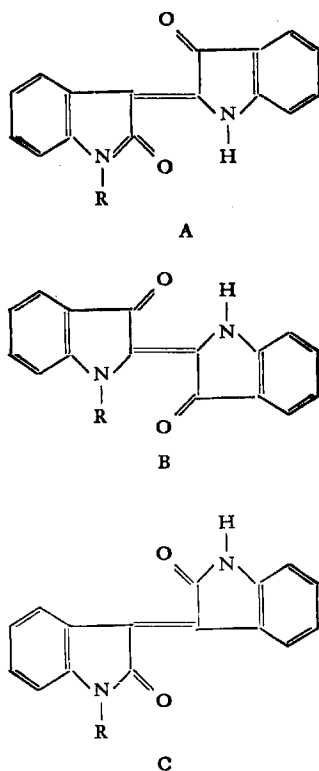


图1 三类不同连接方式的吲哚化合物

- A. 2,3'-系列化合物
 —R: —H, 靛玉红; —C₂H₅, 1[#]; —CH₂COOH, 2[#]; —C₁₀H₂₁, 4[#]; —C₁₈H₃₇, 5[#]; —CHO, 9[#].
 B. 2,2'-系列化合物
 —R: —CH₃, 6[#]; —C₂H₅, 7[#].
 C. 3,3'-系列化合物
 —R: —CH₃, 3[#]; —C₂H₅, 8[#].

部分的抑制率按下式计算:

掺入抑制率(%)

$$= \frac{\text{cpm}(\text{丙酮对照组}) - \text{cpm}(\text{药物组})}{\text{cpm}(\text{丙酮对照组})}$$

4. DNA 聚合酶 α 的提取以 W₂₅₆ 腹水细胞为材料。提取方法及无细胞体系 DNA 合成的测定方法同文献 [2]。

5. 药物的可见-紫外吸收光谱及 CT-DNA 对它的影响: 测定方法详见文献 [3]、[4]。药物溶液中加入一定浓度 CT-DNA 后,以结合态存在的药物分子百分数 α 按下式计算:

$$\alpha = \frac{\text{OD}_{210}^F - \text{OD}_{210}^*}{\text{OD}_{210}^F - \text{OD}_{210}^B}$$

*: 测定不同药物的 OD 并非都恰在 210 nm 波长下,详见表 1。

式中 OD₂₁₀^F和 OD₂₁₀^B分别代表药物全部以游离态和结合态形式存在时的溶液,在 210nm 下的光密度。OD_{210nm} 代表游离态和结合态两种形式并存时溶液,在 210nm 时的光密度。

二、结 果

1. 双吡啶化合物的可见-紫外吸收光谱及 CT-DNA 对光谱的影响:

(1) 可见-紫外吸收光谱: 图 2 是靛玉红, 5[#], 3[#]的吸收光谱扫描图(其他化合物均略去)。结果显示, 2, 3' 系列及 2, 2' 系列八种化合物的吸收光谱均有五个吸收峰(紫外区三个)。各对应吸收峰的位置基本相同,仅个别稍有差别。但 3, 3' 系列化合物(8[#]与图 2 中 3[#]几乎完全相同)在紫外区只有两个峰,其中除 210nm 吸收

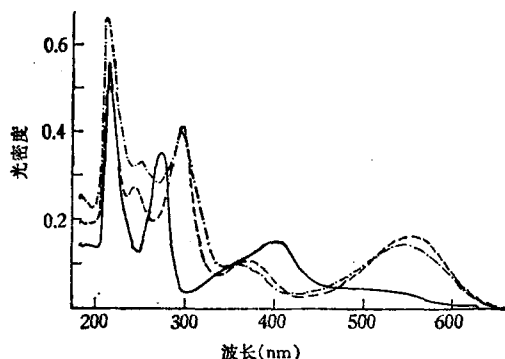


图 2 不同连接方式的双吡啶化合物可见-紫外吸收光谱
----靛玉红; ————3[#]; - · - · - 5[#]

峰外,与前两系列化合物光谱差别很大。

(2) CT-DNA 对药物紫外吸收光谱的影响:

靛玉红与 CT-DNA 在体外有结合作用,用吸收光谱分析法可以观察到 CT-DNA 使靛玉红在 207nm 吸收峰长移,吸收强度下降^[4]。本文用相同的方法,也观察到 2, 3' 系列其它化合物及 3[#] 化合物在 210 nm 左右的吸收峰均因 CT-DNA 的加入而长移、吸收强度下降,并且这些变化随 DNA 浓度的增加而加强;但不同化合物光谱的变化程度不同,说明 2, 3' 系列及 3[#] 化合物与 CT-DNA 在本实验条件下结合作用不同。表 1 列出了当 DNA 浓度分别为 0.1528 mM 和 0.2548 mM 时,以结合态存在的药物百分数 α 。 α 值越大,药物与 DNA 结合能力越强。

表 1 部分 2, 3'-系列及 3, 3'-系列化合物与 CT-DNA 体外结合能力的比较

药 物		$C_D =$ 0.1528mM	$C_D =$ 0.2548 mM	OD* _{210nm}
		以结合态存在的药物百分数(%)		
2,3' 系列化合物	靛玉红	0.278	0.581	OD _{207nm}
	1*	0.345	0.668	OD _{215nm}
	2*	0.323	0.692	OD _{215nm}
	4*	0.263	0.685	OD _{217nm}
	5*	0.270	0.592	OD _{218nm}
3, 3'-系列	3*	0.657	0.822	OD _{210nm}

2. 双吡啶化合物对 W₂₅₆ 及艾氏腹水癌细胞核酸和蛋白质生物合成的影响:

在相同克分子浓度时,十种药物对³H-TdR, ³H-UR 及³H-亮氨酸掺入 W₂₅₆ 腹水癌细胞酸不溶性部分的抑制率列于表 2。

从表 2 可见, 3[#], 8[#] 对 W₂₅₆ 腹水癌细胞 DNA RNA 及蛋白质生物合成有很强的抑制作用。靛玉红及 1[#], 2[#] 的抑制作用也较强,但 4[#], 5[#], 9[#] 及 2, 2' 系列化合物的作用很弱或没有测出。由于 7[#], 9[#] 浓度仅为其他药物的五分之一,因此测定结果无法与其他药物比较。对于 3[#], 8[#] 以及效力较强的靛玉红、1[#] 来说, 0.026 mM 的浓度显然太高。并且药物与细胞作用时

表 2 三类不同连结方式的双吡啶化合物对 W₂₅₆ 腹水癌细胞核酸和蛋白质合成的影响*

药 物		对 ³ H-标记前体物掺入细胞酸不溶部分抑制率(%)		
		³ H-TdR	³ H-UR	³ H-亮氨酸
2,3'系列化合物	靛玉红	49.1±5.4	47.0±3.6	32.4±7.6
	1 [#]	32.7±4.6	29.6±3.6	42.2±11.4
	2 [#]	40.1±1.3	15.4±2.2	20.9±6.4
	4 [#]	-28.4±13.1	2.3±1.4	9.5±5.3
	5 [#]	-6.0±12.4	-4.4±6.2	-3.0±2.1
	9 [#]	16.5±3.5	-4.5±8.2	9.7±7.9
2,2'系列	6 [#]	16.8±10.2	5.2±3.7	28.8±5.8
	7 [#]	-24.1±12.6	-18.4±6.1	6.3±8.4
3,3'系列	3 [#]	94.5±1.9	92.4±2.9	84.0±7.2
	8 [#]	96.9±1.0	96.2±0.2	93.8±0.5

* 实验用药物浓度,除 1[#],9[#]为 0.0052mM 外,其余均为 0.026mM。药物与细胞在 37℃ 下作用 1 小时,³H-前体物掺入 30 分钟。

间也较长。致使三种生物大分子均受到明显的抑制,无法区别哪一个是药物首先作用的靶子。在降低药物浓度,缩短作用时间后,就可观察到 3[#] 和靛玉红首先抑制 DNA 合成^[5]。它们对小鼠艾氏腹水癌细胞核酸和蛋白质生物合成的影响与 W₂₅₆ 相似。

3. 对无细胞体系 DNA 合成的影响: 前文曾报道靛玉红对无细胞体系 DNA 合成有明显抑制作用,而且可能是通过形成酶-模板-药物三元复合物而得到最大的发挥^[6]。本文比较了

表 3 不同连接方式的双吡啶化合物对无细胞体系 DNA 合成的影响

药 物		对无细胞体系 DNA 合成的抑制率(%) (平均值±标准差)
3,3'-系列	3 [#]	47.0±7.8
	8 [#]	47.5±7.6
2,3'-系列	靛玉红	20.3±7.6
	2 [#]	12.4±8.6

这三类不同连接方式的双吡啶化合物对无细胞体系 DNA 合成的影响,结果是 3[#],8[#] 的抑制作用最强,靛玉红次之,2[#] 最弱(表 3),其余化合物无明显影响。

三、讨 论

本文结果表明靛玉红及许多双吡啶化合物对 W₂₅₆ 艾氏腹水癌细胞及无细胞体系的 DNA 合成具有明显的抑制作用。除 2,2' 系列的两个化合物外,其余的相对抑制程度均与整体动物实验结果一致。这种体外实验方法简便,周期短,是观察药物构效关系的有效方法。

从本文结果还能观察到一些药物构效关系的规律性。

首先,不论靛玉红还是其它有效的衍生物都具有双吡啶环的共同结构,所以保持双吡啶环的完整性是药物具有特定作用的首要条件。

此外,影响双吡啶化合物效力还有两个重要因素:(1) 双吡啶环之间的连接方式: 属于 3,3' 系列的 3[#],8[#] 对癌细胞及无细胞体系 DNA 合成抑制作用最强,与 CT-DNA 结合能力也最强。2,3' 系列化合物次之,2,2'-系列的靛蓝衍生物最弱,甚至无作用。这可能是因为 3[#],3^{''} 相连时,其所有的 >C=O , >N-H 或

$\text{O}=\overset{|}{\text{C}}-\overset{|}{\text{N}}-\text{H}$ 都充分地暴露着,很容易与 DNA 及酶分子形成氢键而发挥其抑制作用。而 2,2' 相连的化合物,上述基团在自身两个吡啶环之间即形成氢键,使结构处于最稳定状态。因此与 DNA 或酶分子形成氢键的机会极少,甚至没有,故不显示或仅显示很弱的作用。以 2,3' 相连的化合物,其中一个吡啶环的 >C=O 与另一吡啶环的 >N-H 形成氢键,但另一个 >C=O 和 >N-H , 则与 DNA 及酶分子结合。因此这一类构型的化合物药效较 3,3' 系列弱,而较 2,2' 系列强。

第二,亚胺基上的 -R 的结构: -R 增大,药效减弱。这可能由于空间位阻增大,不利于药物与 DNA 或酶结合。2,3' 系列中,4[#],5[#] 的效力弱于靛玉红及 1[#],2[#],便是一例。至于 2[#],其 -R (-CH₂COOH) 虽与 1[#] 的 -C₂H₅ 大小近似,但乙酸基使 2[#] 溶解于水,并可与蛋白质分

子形成盐键,因此效力稍强于1[#]。

总之,当改变两个吡啶环的连接方式时,由于影响了 >C=O 形成氢键的能力和改变-R的结构,药效就会改变,说明 >C=O 和 >N-R 很可能是此类药物与 DNA 及酶的结合位点。

黄亮教授提供了十种双吡啶化合物,并对本文提出宝贵意见,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 吴冠芸等:《中国医学科学院学报》, 2, 83, 1980.
- [2] 吴冠芸等:《生物化学与生物物理学报》, 14 (6), 553, 1982.
- [3] Black, A., et al.: *Biopolymers*, 6, 1225, 1968.
- [4] 刘敬忠等:《中国医学科学院学报》, (付印中)
- [5] Wu Gy, et al.: *Abstracts of Papers Presented at the 12th International Congress of Biochemistry*, Perth, Western Australia, 15, August, 1982.

[本文于1983年12月29日收到]

技术与方法

谱 带 程 序 分 析

——显微光度术生物医学应用程序研究之一

李 素 文 薛 绍 白

(北京师范大学生物系)

显微光度术是光学显微镜技术和光度测量技术巧妙的结合,它能对显微镜分辨范围内的样品微区进行光吸收、荧光、反射光和光的干涉等测量,从而可以进行物质的定量分析,同时还可以结合对样品的形态学观察达到定位目的,因此它在生物医学中获得了广泛的应用。

它的应用还有两个重要的方面^[1]: 一个是波长扫描(wavelength scanning); 一个是面积扫描(area scanning)。不论做波长扫描还是做面积扫描,都必须有相应的部件以及一些记录和显示设备,此外还应配备一些应用程序。但是由于生物学和医学中所研究问题的复杂性、由于所配备部件和应用程序的不完善性,因此根据波长扫描和面积扫描的原理,再灵活地设计一些应用程序是有必要的。本文就是介绍和讨论这方面的一些应用程序。

一、光谱程序设计

吸收光谱和荧光发射光谱在生物学、医学

领域中应用十分广泛。吸收光谱的表达式为:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_o(\lambda)}{I_s(\lambda)}$$

式中 A 为光吸收; I_o 为透过背景的光强度; I_s 为透过样品的光强度; λ 为波长。

表观荧光发射光谱的表达式为:

$$E(\lambda) = E_s(\lambda) - E_o(\lambda)$$

式中 E 为表观荧光强度; E_s 为样品的荧光强度; E_o 为背景荧光强度; λ 为波长。由于光电倍增管对不同波长光的灵敏度不同; 由于各种光学部件(例如单色器, 双光束分离器等)对不同波长光的作用不同, 所以必须对上述有畸变的表观荧光发射光谱进行校正, 校正的荧光发射光谱表达式为:

$$E'(\lambda) = \frac{E_s(\lambda) - E_o(\lambda)}{E_k(\lambda)} \times P_k(\lambda)^{[1]}$$

式中 E' 为校正后的荧光强度; E_s 为样品的荧光强度; E_o 为背景的荧光强度; E_k 是色温为 k 的一只碘钨灯在测量条件下的辐射强度; P_k 是