

研究工作

超氧化物歧化酶在癌细胞毒性中的作用

郑荣梁 莱斯科 S. A. 曹安邦

(兰州大学 生物物理教研组) (美国约翰·霍普金斯大学卫生学院生物物理系, 巴尔的摩)

超氧化物歧化酶 (SOD) 的抑制剂二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DDC) 既能加强抗癌药的药效^[1], 又能提高细胞的辐射敏感性^[2], 因此是一种有希望的肿瘤化疗及放疗综合疗法的试剂。我们曾发现它能使癌细胞的 SOD 活性下降, 癌细胞的存活率下降^[3], 对癌细胞集落形成率、DNA 合成和细胞形态都呈双时相毒性^[4]。它也能抑制癌细胞的增殖率, 延长细胞倍增时间^[5]。由于 SOD 活性与 DNA 合成的变化密切相关, 因而 SOD 活性的大小对癌细胞受 DDC 中毒时能否存活起重要作用。本文着重研究 DDC 对癌细胞 SOD 活性的影响以及 SOD 在细胞中毒中的作用。

一、材料及方法

1. 材料 DDC 及 SOD 均为 Sigma 公司产品。

2. 细胞 采用近交系叙利亚地鼠的胚胎细胞 LSH/SS LAK (Lakeview-Hamster Colony), 使成纤维细胞变成高度癌变的细胞株 BP6T^[6]。

3. 培养条件 用改进后的 Dulbecco-Eagle 培养液 IBR (Biobabs, Northbrook, Ill.), 每 100ml 中加入 0.22 克 NaHCO₃ 及 10% Rehatuin 胎牛血清 (Reheis Chemical Co., Kankakee, Ill.)。细胞放在含 5% CO₂ 的 37℃ 潮湿空气中温育。

4. 细胞集落形成率 将细胞放在 1×10^{-5} 到 $3 \times 10^{-3} M$ DDC 中处理 1 小时; 洗去 DDC, 在每一培养皿中接种 200 个细胞。对照组不经 DDC 处理。培养 8 天, 计数。

5. 生化指标 用超声击碎细胞, 经 10,000g

离心 20 分钟, 取上清液进行以下分析。

(1) SOD 用 Marklund^[7] 分光光度法测定。总 SOD 中主要由 Cu-Zn-SOD 及 Mn-SOD 组成。氰化物能抑制 Cu-Zn-SOD, 而对 Mn-SOD 无影响, 因此用 2mM KCN 处理后, 可单独测出 Mn-SOD 的活性。

(2) CAT (过氧化氢酶) 用 Beers 和 Sizer^[8] 分光光度法测定。

(3) 蛋白质 根据 Hartree 法改良的酚试剂法^[9]。

4. DNA 合成 细胞经 DDC 处理和清洗后, 向每一培养皿中接种约 1×10^5 个细胞, 加入 0.2 μ Ci/ml 的 ³H-胸苷, 温育 48 小时, 用液闪计测放射性强度。

二、结果与讨论

1. DDC 对总 SOD 和 CAT 的影响

癌细胞用 DDC 处理 1 小时后, 再测定 SOD 和 CAT 的活性, 结果发现随着 DDC 浓度的增加, 总 SOD 活性迅速下降, 但 CAT 却不变 (表 1)。

表 1 DDC 对癌细胞总 SOD 和 CAT 的影响

	SOD*	CAT**
	(u/mg 蛋白质)	
对照	62.8±10.6	5.0±2.1
DDC×10 ⁻⁷ M	48.0±6.4	4.5±1.9
10 ⁻⁶	39.9±8.3	3.0±1.6
10 ⁻⁵	29.5±9.9	3.9±1.9
3×10 ⁻³	7.4±6.0	4.7±2.1

* 每一组浓度处理三次, 每个处理组又分别测定活性 7 次。

** 每一组浓度处理三次, 每个处理组又分别测定活性 6 次。

2. Mn-SOD 在 DDC 细胞毒性中的作用

癌细胞经 1×10^{-3} 或 $1 \times 10^{-4}M$, DDC 处理后 1 小时,比较 Mn-SOD、DNA 合成及细胞集落形成率(图 1)。

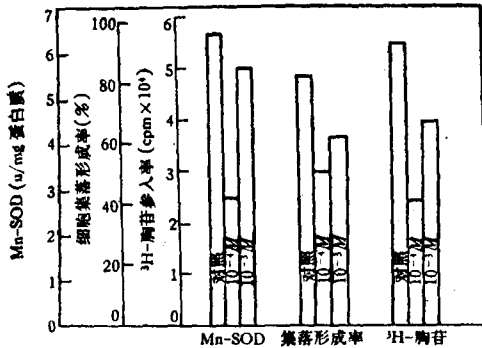


图 1 不同浓度 DDC 对癌细胞 Mn-SOD DNA 合成及细胞集落形成率的影响

低浓度 DDC 时 ($1 \times 10^{-4}M$) 对 Mn-SOD 的抑制作用,反而比高浓度 ($1 \times 10^{-3}M$) 强烈。这一现象与 DDC 对癌细胞的存活(集落形成率)和 DNA 合成 (3H -TdR 掺入率)的双时相毒性^[4]恰好吻合,因此设想 DDC 对癌细胞的毒性正是通过对 Mn-SOD 的影响而表现的,换句话说, Mn-SOD 在 DDC 的双时相毒性中起重要作用。我们以前曾推测 DDC 的双时相毒性可能一方面是由于超氧阴离子自由基的作用,另一方面由于 SOD,尤其是 Mn-SOD 被抑制的结果^[4]

3. 外源性 SOD 对癌细胞存活的影响

既然 SOD 对癌细胞的存活起着重要作用,但加外源性 SOD 是否能保护癌细胞,为此我们做了以下实验。为了防止其它酶的干扰,突出外加 SOD 的作用,先将培养液中胎牛血清用 $56^{\circ}C$ 水浴加热 30 分钟,使酶灭活,作为对照组;同时分别外加 1,500u/ml 的 Cu-Zn-SOD,或 500u/ml CAT 作试验组,除对照组是 12 个数据的平均值外,其余数值是 3 个数据的平均值(表 2)。

灭活后,癌细胞的集落形成率从正常的 82.9% 下降到 56.3%。无论外加 SOD 或者加 CAT 对细胞存活都无影响。我们曾发现,即使使用 $3 \times 10^{-3}M$ DDC 处理癌细胞,在 SOD 活

表 2 外源性酶对细胞存活的影响

	细胞集落形成率% (平均值 ± SE)
对照	82.9 ± 1.3
酶灭活	56.3 ± 4.0
外加 SOD	60.0 ± 5.6
外加 CAT	58.7 ± 5.1

性被抑制了 80% 的情况下,外加 SOD 仍然无效^[3]。

4. 癌细胞对外源性 SOD 的吸收

在已热灭活血清的培养液中,外加 Cu-Zn-SOD (3,311 或 6,622u/ml),温育 1 或 24 小时后,测细胞及上清液中 SOD 活性(表 3)。

表 3 外加 SOD 后细胞及培养液中 SOD 活性 (u/mg 蛋白质)

	细胞中		培养液中 1 小时
	1 小时	24 小时	
对照	48.7	72.2	17.7
外加 3,311u/ml SOD	57.6	60.3	955.3
外加 6,622u/ml SOD	66.2	80.9	1761.8

虽然 SOD 在体内经过短时间绝大部分即随尿排出,但在培养条件下仍可维持较长时间,即便如此,外加 SOD 浓度高或低,作用时间长或短,对细胞内 SOD 活性都无明显影响。在经过离心,去除细胞的上清液中, SOD 继续成比例地保留着很高的活性。这说明癌细胞不能吸收外源性 SOD,它基本滞留在培养液中,因 SOD 是具有 32,000 分子量的蛋白质,不能穿透细胞膜。G. Czapski^[10] 也发现 SOD 不能进入大肠杆菌。

我们正设法把 SOD 包在脂质体中,使之能进入细胞内部,以观察它对癌细胞的作用。

参 考 文 献

- [1] Gregory, E. M. et al.: *J. Bacteriol.*, 114, 193, 1973.
- [2] Lin, P. S. et al.: *The Lancet*, 7, 777, 1979.
- [3] Lesko, S. A. et al.: *Free Radicals Lipid Peroxidation and Cancer*, (McBrien, D. C. H. (ed.)), 401, 1982, Academic Press, London.
- [4] Lesko, S. A. et al.: *Proceedings of Its Pathophysiology*, Oak Ridge, Tennessee, 1983.

[5] 郑荣梁等: «生物化学与生物物理学报»(待发表)。
 [6] Leavitt, J. et al.: *Nature*, 269, 63, 1977.
 [7] Marklund, S.: *J. Biol. Chem.*, 251, 7504, 1976.
 [8] Jr, Beers, R. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, 195, 133, 1952.

[9] Hartree, E. F.: *Anal. Biochem.*, 48, 422, 1972.
 [10] Fridovich, I.: *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 147, 1975.

[本文于1983年9月19日收到]

Mo-S 结构在含钼酶中的作用

——含钼酶模型研究

钱露萍 陈冬兰 方大惟

(中国科学院上海植物生理研究所)

微量元素钼,在许多氧化还原酶的活性中,起很重要的作用。目前已知有固氮酶、NADH脱氢酶、硝酸还原酶、亚硫酸氧化酶、醛氧化酶、黄嘌呤脱氢酶、黄嘌呤氧化酶等七种含钼酶^[1],它们的共同特点是分子量大,底物专一性差,转换率低。除了酶蛋白以外,还含有其它辅基成分,每分子含1—2个钼原子,金属铁或细胞色素b和黄素。

Schrauzer^[2]的钼-半胱氨酸络合物(图1),能够模拟固氮酶的许多功能,我们曾利用它作为固氮酶模型,探讨固氮酶反应中ATP和Fe-S原子簇的作用^[3],初步认为Mo-SH结构参与固氮酶的活性中心,Fe-S原子簇与电子传递有关。

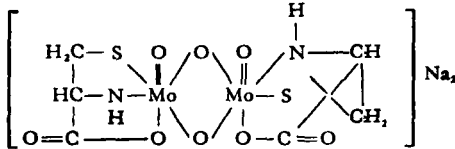


图1 Mo-S 络合物结构式

本文按同法,用Mo-SH络合物,模拟硝酸还原酶,亚硫酸氧化酶,黄嘌呤氧化酶催化性能,以观察Mo-SH结构在含钼酶中的作用。

一、材料和方法

1. Mo-SH 络合物合成 按Kay^[4]法,在水溶液中用连二亚硫酸钠(保险粉)还原钼酸钠至紫红色,加适量半胱氨酸盐酸盐,用乙醇抽

提,重结晶数次,成土黄色粉末,抽干备用,使用时新鲜配置。

2. 菠菜Fd提取 参阅文献[3]。

3. Mo-SH 络合物催化活性分析

a) 催化NO₃⁻还原成NO₂⁻ 参阅Filner^[5]硝酸还原酶测定法。每毫升反应液含Mo-SH络合物3μmoles, KNO₃ 20μmoles; NADH 1μmole或保险粉3μmoles,以0.1M磷酸盐缓冲液pH7.5稀至终体积,厌氧操作,以注入新制保险粉或NADH为反应开始,于30℃水浴中保温,不同时间取样,显色反应。即1毫升反应液加1毫升1%磺胺(溶于3N HCl)和1毫升0.02% N-1-萘乙烯二亚胺二盐酸盐,室温17℃,10分钟后在540nm读光密度,以NaNO₂为标准曲线。

另法,按Garrett^[6]法测定NADH的氧化。3.5毫升反应液内含Mo-SH络合物0.1μmole; NADH 1μmole, KNO₃ 20μmoles, 0.1M磷酸盐缓冲液pH7.5稀至终体积,15℃于340nm不同时间测光吸收的降低。

b) 催化黄嘌呤氧化 类似黄嘌呤氧化酶的分析^[7],用黄嘌呤为还原底物, O₂作受体,以华氏微量呼吸法测定O₂的摄入。因为黄嘌呤氧化不伴随CO₂释放,所以华氏瓶的主室中心杯可以不加碱。2毫升反应液内含Mo-SH络合物4μmoles,黄嘌呤20μmoles(溶于NaOH),