

博落回抗肿瘤作用及诱导人体端粒 DNA 形成 G-四链体分子机制研究

杨舒^{1,2}, 刘岩¹, 杨千帆^{1,2}, 向俊锋¹, 唐亚林^{1*}, 徐广智¹

1. 中国科学院化学研究所 分子动态与稳态国家重点实验室, 北京 100190

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: **目的** 从博落回的2个主要活性成分血根碱(San)和白屈菜红碱(Che)入手研究博落回的抗肿瘤作用分子机制。**方法** 采用MTT法测定San与Che对3种肿瘤细胞(肺癌细胞A-549、结肠癌细胞HCT-8、肝癌细胞Bel-7402)的IC₅₀值,从而确定这两种成分是否为博落回的抗肿瘤活性成分;采用UV-vis、FL、CD法研究San和Che与人体端粒DNA(HT4)的相互作用。**结果** San与Che对肿瘤细胞有不同能力的杀伤作用,说明该2种成分是博落回的抗肿瘤活性成分;San和Che能够与HT4相互作用,可以得出San与HT4的结合常数为 5×10^8 ,并能诱导单链HT4完全形成反平行结构,而Che与HT4的结合常数为930,并能诱导单链HT4部分形成反平行结构。**结论** 博落回含有的2种活性成分San和Che具有诱导人体端粒DNA形成G-四链体结构的能力,从而抑制端粒酶活性,达到抑制肿瘤细胞增殖的目的,这可能是博落回抗肿瘤的分子机制之一。

关键词: 博落回; 血根碱; 白屈菜红碱; 抗肿瘤; 端粒; G-四链体

中图分类号: R286.91 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0738-05

Antitumor effect of *Macleaya cordata* and its molecular mechanism on inducement of human telomeric DNA to form G-quadruplex

YANG Shu^{1,2}, LIU Yan¹, YANG Qian-fan^{1,2}, XIANG Jun-feng¹, TANG Ya-lin¹, XU Guang-zhi¹

1. Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, Centre for Molecular Sciences, State Key Laboratory for Structural Chemistry for Unstable and Stable Species, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: **Objective** To study the antitumor molecular mechanism started on sanguinarine (San) and chelerythrine (Che) from *Macleaya cordata*. **Methods** Determining the IC₅₀ values of San and Che against A-549, HCT-8, and Bel-7402 cell lines by using MTT to clarify whether these two alkaloids are the active components in *M. cordata*; studying the interaction between human telomeric DNA and two alkaloids respectively by using UV-Vis, FL, and CD methods. **Results** San and Che are the active antitumor components of *M. cordata*; San could induce HT4 to form antiparallel G-quadruplex completely with Ka of 5×10^8 and Che could induce HT4 to form antiparallel G-quadruplex partially with Ka of 930. **Conclusion** One of the antitumor molecular mechanisms of *M. cordata* is that the two active components could induce human telomeric DNA to form G-quadruplex.

Key words: *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.; sanguinarine (San); chelerythrine (Che); antitumor; telomere; G-quadruplex

恶性肿瘤是危害人类健康和生命的重大疾病。端粒DNA、G-四链体结构的发现以及现代分子生物学技术对其生理功能的揭示,一方面为快速、高效地寻找抗肿瘤药物提供了一个新的特定靶点,另一方面为揭示抗肿瘤药的分子机制提供了新的契机^[1]。博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. 为罂粟科博落回属植物,多年生高大草本,主要生长于丘陵或低山林的灌丛或草丛中,分布在我国贵州、广东、

广西、福建等省份。博落回始载于《本草拾遗》,其中记录了博落回的分布、形态特征、毒性及药用价值等。现代研究表明,博落回提取物具有强抗癌作用,对人肝癌、膀胱癌等多种癌细胞生长有抑制作用。博落回的活性成分主要为血根碱(sanguinarine, San)、白屈菜红碱(chelerythrine, Che)、原阿片碱、 α -别隐品碱等多种异喹啉生物碱^[2-4],其中以San和Che的量最高。

收稿日期: 2010-06-24

作者简介: 杨舒(1983—),女,锡伯族,辽宁省大连市人,博士,主要从事抗肿瘤药物分子机制研究。Tel: (010)82617304 E-mail: yshuer@iccas.ac.cn

*通讯作者 唐亚林 Tel: (010)62522090 E-mail: tangyl@iccas.ac.cn

从中草药中寻找活性成分并揭示其分子机制一直是国内外研究的热点和难点。本研究基于博落回的抗肿瘤作用,对其含量最高的两种生物碱进行研究。通过 San/Che 对人体端粒的诱导作用的系统研究,从结构化学生物学角度阐明了一种新的博落回抗肿瘤作用的机制,为博落回的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 肿瘤细胞株

肿瘤细胞株 A-549、HCT-8、Bel-7402 由协和医科大学惠赠。将 A-549、HCT-8、Bel-7402 细胞分别接种于培养瓶中,加入含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养液中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。当细胞覆盖率达 80%左右时,用 0.25%胰蛋白酶消化、传代。

1.2 DNA

人体端粒 DNA d (TTAGGG)₄ 序列 (HT4) 由上海生工生物工程有限公司提供。

1.3 药品

San 和 Che (质量分数 $\geq 98\%$) 由成都思科华公司提供,溶解于二甲亚砜 (DMSO) 中。

2 方法

2.1 细胞培养

将细胞接种于细胞培养瓶中,培养基为 RPMI 1640 (含 10%胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱,相对饱和湿度的条件下培养。在细胞长满后,在培养瓶内加 0.25%胰酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 3~5 min,1:3 传代,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱,相对饱和湿度的条件下继续培养;隔日换液,3~5 d 长满。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长的 A-549、HCT-8、Bel-7402 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化,配成 $2.0 \times 10^4/\text{mL}$ 细胞悬液,再将其接种至 96 孔培养板中,每孔 200 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养 24 h;待细胞完全贴壁后,实验组每孔加入含不同质量浓度 (5、0.5、0.05、0.005 $\mu\text{g/mL}$) 药物的 RPMI 1640 培养液 200 μL ,对照组加入含等体积溶剂的 RPMI 1640 培养液 200 μL ;各设 3 个平行孔,培养 72 h 后各孔分别加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL ,再培养 4 h 后,倾去各孔培养液,各孔加入 200 μL DMSO,15 min 后用酶标仪在 490 nm 下测定各孔吸光度 (A) 值。计算药物对细胞的抑制率。

抑制率 = $1 - \text{实验组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}$

2.3 药物与人体端粒 DNA 相互作用

将 HT4 用 Tris-HCl 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA, pH 7.4) 配成 100 $\mu\text{mol/L}$ 储备液。将 San 和 Che 用同样方法配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 储备液。取 HT4 储备液用 Tris-HCl 缓冲液稀释,并分别加入 San 和 Che 对照品,配成 2 mL 样品,使样品溶液中 HT4 与 San/Che 对照品成特定的浓度比。采用紫外光谱仪 (UV-1601PC) 和圆二色谱仪 (JASCO J-815) 测定样品的紫外光谱和圆二色谱。另配制 2 mL 样品,使样品溶液中 HT4 与 San 或 Che 成特定的浓度比。采用荧光光谱仪 (F-4500) 测定荧光光谱。

3 结果

3.1 体外抗肿瘤作用

细胞毒性实验结果 (表 1) 表明, San 对 3 种肿瘤细胞的 IC_{50} 值均小于阳性对照药 5-FU, Che 对 3 种肿瘤细胞的 IC_{50} 值各有不同,其中对结肠癌细胞 HCT-8 的 IC_{50} 值与 5-FU 相当。说明博落回的主要成分 San 与 Che 对肿瘤细胞有不同的杀伤作用。

表 1 San 与 Che 对肿瘤细胞的 IC_{50} 值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 IC_{50} values of San and Che to tumor cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药 物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		
	A-549	HCT-8	Bel-7402
San	0.530 ± 0.071	0.520 ± 0.008	0.340 ± 0.030
Che	1.940 ± 0.244	0.830 ± 0.054	0.740 ± 0.031
5-FU	1.220 ± 0.187	0.890 ± 0.024	0.330 ± 0.029

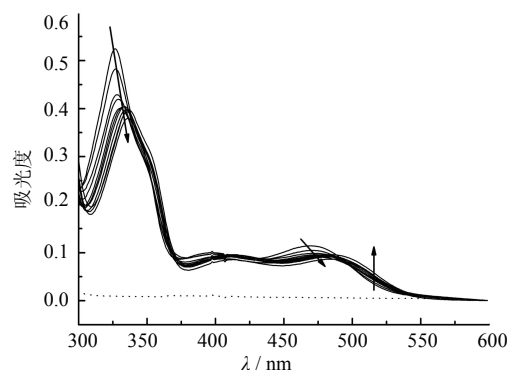
3.2 对人体端粒 DNA 的诱导作用

3.2.1 紫外-可见光谱 (Ultraviolet-visible absorption spectra, UV-vis) 人体端粒 DNA (HT4) 对 San 与 Che 滴定实验的吸收光谱表明,在 HT4 没有吸收信号的 300~600 nm 光区,HT4 的加入使 San 在 325 nm 与 470 nm 附近的吸收值减弱并红移,525 nm 附近的吸收值增强 (图 1);使 Che 在 320 nm 附近的吸收值减弱并红移,340 nm 附近的吸收值减弱并蓝移,360 nm 附近的吸收增强 (图 2),说明 San 和 Che 均与 HT4 有相互作用。

3.2.2 荧光光谱 (Fluorescence spectra, FL) HT4 对 San 与 Che 滴定实验的荧光光谱 (图 3、4) 表明,HT4 可以淬灭 San 与 Che 的荧光,证实了 San 和 Che 均与 HT4 有相互作用。通过 Logarithmic 曲线, $\lg(F_0 - F)/F = \lg K_a + n \lg [Q]$, 分别计算 San 和 Che 与 HT4 的结合常数 (K_a),可以得出 San 与 HT4 的 K_a

为 5×10^8 , 而 Che 与 HT4 的 K_a 为 930。

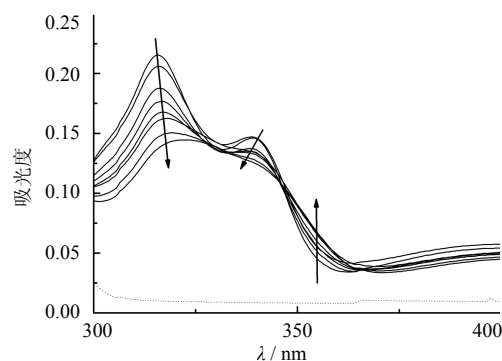
3.2.3 圆二色谱 (Circular dichroism, CD) San 与 Che 对 HT4 滴定实验的圆二色谱 (图 5、6) 表



→ HT4 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 1 系列浓度 HT4 对 San (20 $\mu\text{mol/L}$) UV-vis 光谱的影响

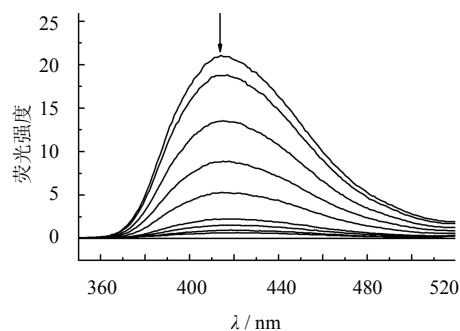
Fig. 1 Effect of HT4 at different concentrations on UV-vis spectrum of San (20 $\mu\text{mol/L}$)



→ HT4 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 2 系列浓度 HT4 对 Che (20 $\mu\text{mol/L}$) UV-vis 光谱的影响

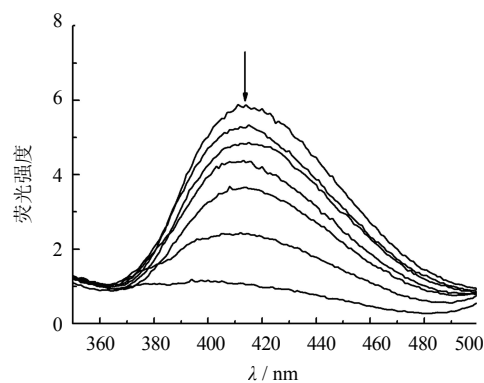
Fig. 2 Effect of HT4 at different concentrations on UV-vis spectrum of Che (20 $\mu\text{mol/L}$)



→ HT4 10、30、50、70、100、120、150、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 3 系列浓度 HT4 对 San (16 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光淬灭

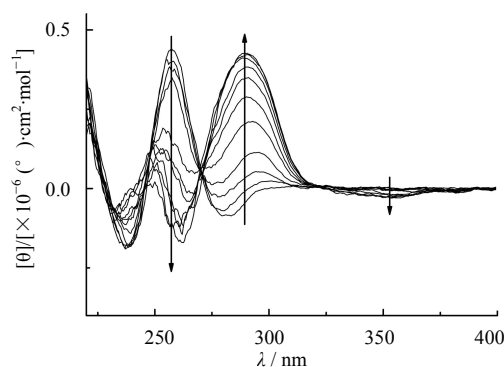
Fig. 3 Fluorescence quenching spectrum of HT4 at different concentrations on San (16 $\mu\text{mol/L}$)



→ HT4 0.1、0.3、0.4、0.6、0.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 4 系列浓度 HT4 对 Che (140 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光淬灭

Fig. 4 Fluorescence quenching spectrum of HT4 at different concentrations on Che (140 $\mu\text{mol/L}$)



→ San 2、4、8、12、16、24、32、40、48、56 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 5 系列浓度 San 诱导 HT4 (4 $\mu\text{mol/L}$) 的圆二色谱图

Fig. 5 CD spectrum of HT4 (4 $\mu\text{mol/L}$) induced by San at different concentrations

明, San 的加入使单链 HT4 的 CD 信号 (256 nm) 减弱, 使反平行 G4 的信号 (290 nm) 增强, 滴定结果使单链 HT4 的 CD 信号完全消失而转变为反平行 G4 的信号, 说明 San 能够诱导单链 DNA 形成完全的反平行 G4 结构; Che 的加入同样使单链 HT4 的 CD 信号减弱, 使反平行 G4 的信号增强, 但 Che 不能如 San 一样使单链 DNA 完全形成反平行结构, 只能诱导部分单链 DNA 形成反平行结构。根据 San 与 Che 对 HT4 滴定实验结果, 通过作图, 分析比较 San 与 Che 单链 HT4 的 CD 信号与反平行 G4 的 CD 信号的变化 (图 7), 可以得出 San 对单链 HT4 的诱导能力远大于 Che 的诱导能力。

4 讨论

1962 年, G-四链体结构首次被发现^[5], 直到 20 世纪 90 年代, 伴随着端粒 DNA 结构的研究及端粒

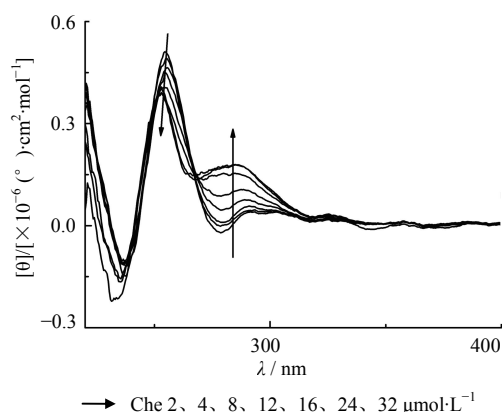


图 6 系列浓度 Che 诱导 HT4 (4 μmol/L) 的圆二色谱图
Fig. 6 CD spectrum of HT4 (4 μmol/L) induced by Che at different concentrations

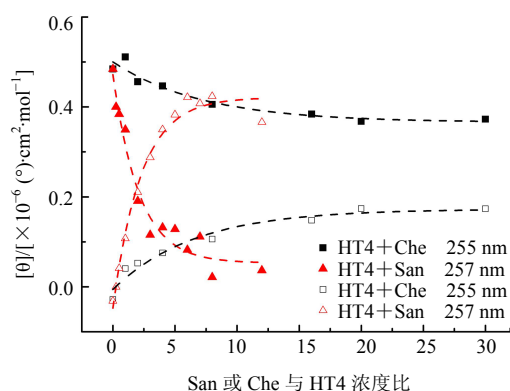


图 7 不同浓度 San 与 Che 诱导 HT4 (4 μmol/L) 能力比较
Fig. 7 Comparison of ability of San and Che at different concentrations to induce HT4 (4 μmol/L)

酶活性与癌症关系的发现^[6],对 DNA G-四链体结构与功能的研究引起了人们极大的兴趣^[7]。所谓 G-四链体结构,是指富含鸟嘌呤(G)的 DNA 单链在一价阳离子(如 K⁺和 Na⁺)的诱导下通过 G 碱基间 Hoogsteen 氢键形成 G-四集体(如图 8 所示),并进一步堆积形成四链体结构^[8]。大量研究表明,DNA G-四链体的出现与许多重要的生理过程密切相关。在人体内大约有 37 万可以形成 DNA G-四链体的基因序列^[9],它们位于双链 DNA 的延伸区域^[10],特别是在人体端粒末端和癌基因启动区域,在一定条件下就可以折叠形成 G-四链体^[11]。而 G-四链体的形成与其相关基因表达水平密切相关,而且具有不同功能的蛋白(例如核酸酶、解旋酶、溶解酶)与 G-四链体也存在着特殊的相互作用^[12]。尤为重要的是,G-四链体的形成选择性地引发了与整个癌细胞密切相关的很多生理功能的紊乱。特别是端粒末端 DNA G-四链体的形成,不仅阻止了端粒酶对端粒

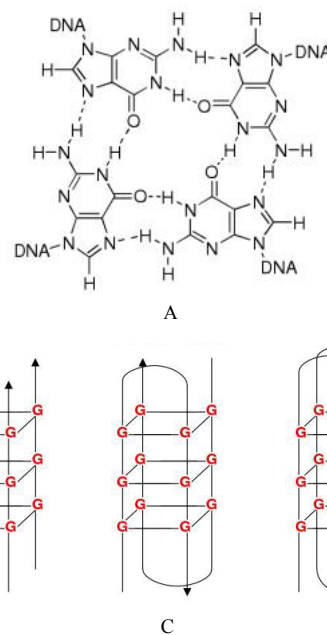


图 8 G 碱基间 Hoogsteen 氢键形成 G-四集体 (A)、4 条 G 丰富 DNA 单链形成的分子间 G-四链体 (B)、双分子型 G-四链体 (C) 和分子内 G-四链体 (D)

Fig. 8 G-tetrad structure (A), tetrameric-type intermolecular G-quadruplex (B), hairpin dimer intermolecular G-quadruplex (C), and basket-type intramolecular G-quadruplex (D) of hydrogen bond among bases

DNA 的识别而抑制了端粒酶活性的表达,从而达到促进肿瘤细胞死亡的作用;而且也阻碍了与端粒相关的蛋白质对其靶分子的正常识别,从而大大地增加了基因组的不稳定性^[13]。端粒 DNA 以及 G-四链体结构这个新的特定靶点的发现,为揭示抗肿瘤药的分子机制,尤其是中药抗肿瘤机制提供了新的契机。光谱分析是研究药物小分子与 DNA 相互作用的重要手段^[14]。本研究采用 3 种光谱手段研究了博落回的 2 种主要生物碱 San 和 Che 与单链人体端粒 DNA (HT4) 的相互作用。根据 San 和 Che 特定的紫外吸收光谱,利用 HT4 没有吸收的 300~600 nm 波段,可以初步确定小分子与 HT4 能够发生相互作用。根据 San 和 Che 的荧光光谱,以及 HT4 没有荧光却能够淬灭 San 和 Che 荧光的性质,可以进一步确证 San 和 Che 能够与 HT4 相互作用,并且能够计算出其相互作用的结合常数。圆二色谱是研究分子结构不对称性的方法,可以简便快捷获得生物大分子在溶液状态下的二级结构,是非常成熟的测定溶液中生物大分子构象的方法。本实验根据 DNA 不同构型独特的 CD 信号变化(单链 DNA 的

CD 信号为 256 nm, 平行结构 G-四链体的 CD 信号为 270 nm, 而反平行结构 G-四链体的 CD 信号为 290 nm), 从而研究 HT4 的构型变化, 实验结果表明, San 能诱导单链 HT4 完全形成反平行结构, 而 Che 能诱导单链 HT4 部分形成反平行结构。因此基本可以得出博落回抗肿瘤的分子机制之一为博落回的两种活性成分具有诱导人体端粒 DNA 形成 G-四链体结构的能力, 从而抑制端粒酶活性, 起到抑制肿瘤细胞增殖的作用。

参考文献

- [1] Jenkins T C. Targeting multi-stranded DNA structures [J]. *Curr Med Chem*, 2000, 7(1): 99-115.
- [2] 宗永立, 刘艳平. 白屈菜红碱对人胃癌 BGC823 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用 [J]. *中草药*, 2006, 37(7): 1054-1056.
- [3] 苟 兰. 民间草药博落回的药用与化学成分 [J]. *黔西南民族师范高等专科学校学报*, 2006 (4): 92-94.
- [4] 罗忠勇, 曾建国, 黄 敬, 等. RP-HPLC 法测定小果博落回中 7 种异喹啉类生物碱 [J]. *中草药*, 2010, 41(7): 1188-1190.
- [5] Mata J E, Joshi S S, Palen B, *et al.* A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrests growth of burkitt's lymphoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 1997, 144(1): 189-197.
- [6] Bednarek A K, Sahin A, Brenner A J, *et al.* Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: Positive detection at the in situ breast carcinoma stage [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(1): 11-16.
- [7] Zahler A M, Williamson J R, Cech T R, *et al.* Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures [J]. *Nature*, 1991, 350(6320): 718-720.
- [8] Todd A K, Johnston M, Neidle S. Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA [J]. *Nucl Acids Res*, 2005, 33(9): 2901-2907.
- [9] Shirude P S, Okumus B, Ying L, *et al.* Single-molecule conformational analysis of G-quadruplex formation in the promoter DNA duplex of the proto-oncogene C-kit [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(24): 7484-7485.
- [10] Huppert J L, Balasubramanian S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome [J]. *Nucl Acids Res*, 2007, 35(2): 406-413.
- [11] Eddy J, Maizels N. Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome [J]. *Nucl Acids Res*, 2006, 34(14): 3887-3896.
- [12] Oganessian L, Bryan T M. Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target [J]. *Bio Essays*, 2007, 29(2): 155-165.
- [13] Kelland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(17): 4960-4963.
- [14] Ou T M, Lu Y J, Tan J H, *et al.* G-quadruplexes: Targets in anticancer drug design [J]. *Chem Med Chem*, 2008, 3(5): 690-713.