

腺嘌呤 3', 5'-环状核苷酸磷酸酯和磷酰胺的合成及其对肿瘤细胞的作用

北京医学院

药学系科研组 基础部生物物理教研组

腺嘌呤 3', 5'-环状核苷酸 (以下简称 cAMP) 作为第二信使, 在一系列生理生化过程中起着重要作用。cAMP 对于肿瘤细胞的作用最近也已经得到广泛的注意。Ryan⁽¹⁾ 比较了 5 株癌细胞和 2 株非癌细胞在培养过程中细胞内的 cAMP 水平, 发现 2 株非癌细胞内 cAMP 水平显著高于癌变细胞。当癌变细胞在培养中加入 cAMP 后则癌变细胞的分裂受到抑制。其它不少工作者也都指出 cAMP 是影响细胞分化的重要因素。Presad⁽²⁾ 发现, cAMP 可以使肿瘤细胞形态完全逆转成正常细胞, 在动物移植性肿瘤的作用方面 cAMP 也显示有一定的抑制作用⁽³⁾。由于 cAMP 是控制、调节细胞分化、分裂、的重要因素, 所以 cAMP 对肿瘤细胞的抑制作用有可能区别于一般杀伤性的抗癌药, 有可能从分子水平的控制、调节来达到治疗肿瘤的目的。因此研究 cAMP 类型化合物对肿瘤细胞的作用, 对于发展新类型的抗癌药物是有意义的。

近几年来, 已经报导合成了大量 cAMP 的 N⁶-取代, O^{2'}-取代, C^{2'}-或 C⁸ 取代, 核糖的环氧部分和环状磷酸部分取代的衍生物⁽⁴⁾。研究了它们对不同组织来源的蛋白激酶和磷酸二酯酶的作用。企图找到有特异性作用或生理活性更强的 cAMP 衍生物。实验证明, 这些衍生物都有类似 cAMP 的作用, 有些如 C⁸ 取代的衍生物作用较 cAMP 更强。但是这类取代的 cAMP 衍生物由于结构的特点也很有可能成为正常核苷酸代谢的拮抗物, 从而产生目前一些抗癌药的缺点。

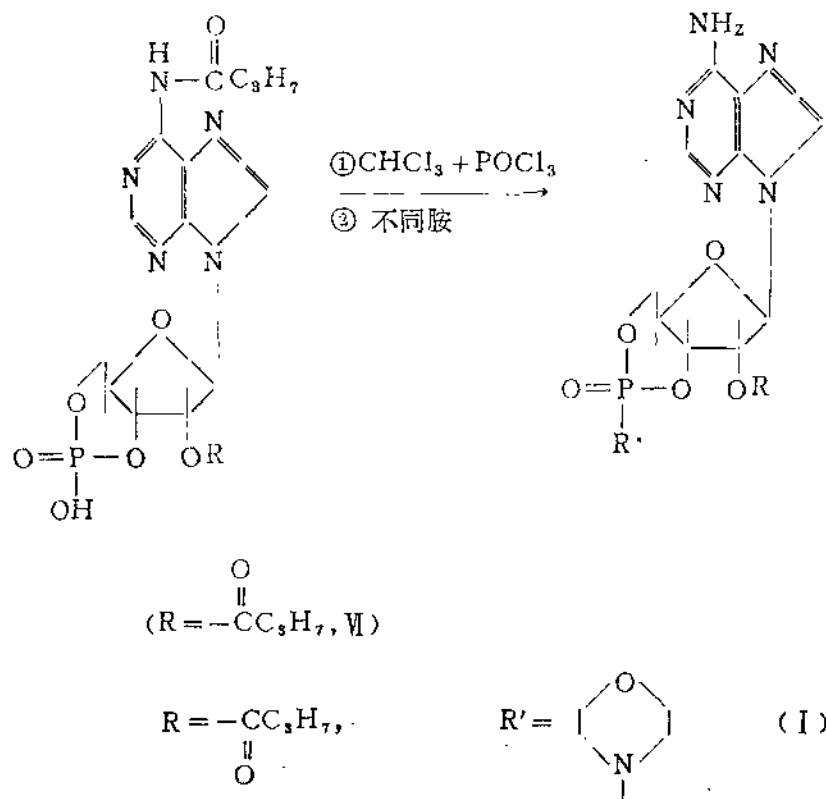
表 9 子宫颈癌患者在扶正培本治疗前后皮泡液免疫球蛋白的含量

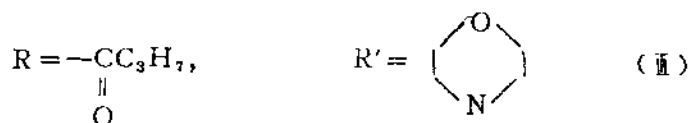
测定项目	例数	均值 (国际单位/毫升)		P 值
		治 疗 前	治 疗 后	
Ig A	9	52.1	100.8	<0.01
Ig G	10	60.0	89.8	<0.01

机体抵抗微生物侵袭的重要手段。我们建立了血清, 皮泡液 IgG 和 IgA 的定量测定方法, 并对一些子宫颈癌患者进行了测定。如表 9 所示, 子宫颈癌患者经扶正培本治疗后, 皮泡液 IgG 和 IgA 的含量均有明显增加。说明扶正培本治疗可以提高机体的体液免疫能力。

cAMP 的多种多样生理生化功能是通过激活各种特定的蛋白激酶，而使一些蛋白磷酸化，从而使一些非活性的酶变成活性的酶而起作用的。因此外源性 cAMP 的衍生物如果能够特异性地作用于某些肿瘤细胞必然首先有选择性地激活某些蛋白激酶。但是在第二信使学说中为什么同样的 cAMP 却能激活不同的蛋白激酶，产生如此多种多样的生理生化反应？这个问题虽然有一些假设，但没有最终解决。我们认为有可能 cAMP 在与一些不同的蛋白激酶作用以前，就存在着适应各种受体的各种不同结构形式。由于这些结构形式很不稳定，因此不容易分离获得。如果这种假设存在，则最有可能的是 cAMP 磷酸部分的衍生物。我们企图合成一系列 cAMP 的磷酸酯，磷酸胺，研究它们对肿瘤细胞的作用，从而希望能找到对肿瘤细胞有特异作用的药物，同时能说明 cAMP 起特异性作用时结构上的要求。这些磷酸酯和磷酸胺衍生物在体内代谢过程预计不会产生拮抗正常核酸代谢的作用，有可能避免常用抗癌药的一些缺点。

核苷酸的磷酸酯、磷酸胺的合成方法，已有不少报导，但环状核苷酸的磷酸酯、磷酸胺的合成方法没有很好的解决。Stevens⁽⁵⁾用甲基磺酰氯使 N⁶, O^{2'}-二乙酰-cAMP 的磷酸成磷酰氯，再用乙醇进行酯化，得到的磷酸酯收率仅15%。后来又用对甲苯磺酰氯和三异丙基苯磺酰氯代替甲基磺酰氯合成了一些酯，但方法仍然麻烦，收率不高⁽⁶⁾。Robins⁽⁷⁾用三氯氧磷使环状核苷酸的磷酸成磷酰氯，再用不同胺反应合成了磷酸胺，收率很低而且内容没有详细报导，我们用 N⁶, O^{2'}-二丁酰-cAMP 的三正丁胺盐，在无水氯仿中与三氯氧磷回流反应，反应物蒸除溶剂和试剂后在无水氯仿中与不同胺反应，通过层离方法，得到较纯的磷酸胺（表1.）。





cAMP的银盐在二氧六酮中与碘代烷反应得到cAMP的酯 (II—V)



表 1

化合物	U. V. λ_{max}	电泳比 移 值	薄板层析 R_f	纸 层 析		化合物	U. V. λ_{max}	电泳比 移 值	薄板层 析 R_f	纸 层 析	
				R_{fA}	R_{fB}					R_{fA}	R_{fB}
I	259.5	0.3	0.46	0.93	0.67	IV	260	0.3	—	0.76	—
II	261	0.3	—	0.52	—	V	266	0.3	—	0.74	—
III	261	0.3	—	0.64	—	VI	270	1.0	0.56	0.75	0.85

表 1 说明:

1. 纸层析溶剂系统: (Whatman NO. 1 滤纸)

A, 异丙醇: 浓氨水: 水 = 7:1:2

B, 95%乙醇: 0.5N NH_4Ac = 5:2

2. 薄板层析条件:

黄岩分析材料厂出品硅胶板 GF254

溶剂系统: 甲醇: 氯仿 = 1:1

3. 电泳条件:

新华中速滤纸 400V, 2 小时, 0.1N 三乙胺碳酸盐溶液, pH 7.8

4. 紫外吸收光谱用岛津 UV-200 紫外分析光光度计描绘

从得到的所有产物的性质来看, 它们在 0.1N 三乙胺碳酸盐溶液中的电泳速度约为磷酸基一元酸的 N^6 , $\text{O}^{2'}$ -二丁酰 cAMP 的 $\frac{1}{2}$, 因此证明 N^6 , $\text{O}^{2'}$ -二丁酰 cAMP 的游离磷酸基已经被取代。核磁共振谱中都出现嘌呤环 C^3 和 C^8 上的 H 的微弱吸收峰, 红外吸收光谱在 $1,240\text{--}1,270\text{ cm}^{-1}$ 处显示有磷酸基的 $\text{P}=\text{O}$ 键吸收和 1720 cm^{-1} 处显示有酯基的吸收。但是紫外吸收光谱的最大吸收在 260 nm 左右。根据嘌呤环 N^6 -酰基取代后的紫外吸收光谱规律, 最大吸收应在 270 nm 附近, 因此认为在反应过程中, N^6 -酰基被水解产物为 $\text{O}^{2'}$ -丁酰 cAMP 磷酰胺。这种情况和上海生化所在制备 N^6 , $\text{O}^{2'}$ -二丁酰 cAMP 时遇到的情况相似, 所有以上产物用 1N HCl 或 1N NaOH 水解, 水解产物用纸上电泳检查都出现 cAMP 和 5'-AMP 的色点。但由于合成的磷酸和磷酰胺均为高熔点物, 燃烧后均有不能烧尽的残渣, 因此均没有得到满意的元素分析数据。

细胞学实验

胸腺嘧啶核苷是细胞中合成 DNA 的前体,因此在肿瘤细胞中加入 H^3 胸腺嘧啶核苷培养一段时间后测量进入细胞 DNA 中的 H^3 的放射性,可以反映出细胞中 DNA 合成速率。如果同时加入不同药物再测量 H^3 的放射性则可以反映出细胞中 DNA 的合成是受到抑制还是促进。我们分别用 HeLa's 细胞和肝癌 7402 做标本研究了不同浓度 cAMP 对这二株细胞 DNA 的合成影响,结果如下:

表 2 不同浓度 cAMP 对两株细胞 DNA 的合成影响

cAMP 浓 度	HeLa's 细胞生长情况(%)	肝癌 7402 细胞生长情况(%)
0.01 微克	-19.0	-24.2
0.05 //	-10.8	-8.4
0.01 //	+7.0	+13.4
1 //	+39.0	+13.2
10 //	+95.0	+10.5
100 //	+82.8	+42.7

负为抑制,正为促进

我们用结晶紫细胞数数的方法研究了 cAMP 的磷酸胺对 HeLa's 细胞和肝癌 7402 细胞的作用。结果如下:

表 3 cAMP 的磷酸胺对两株细胞的作用

化 合 物	微克/毫升	HeLa's 细胞生长情况(%)	肝癌 7402 细胞生长情况(%)
$O^{2'}$ -丁酰 cAMP 噻唑酰胺	1	+4.0	-51.38
$O^{2'}$ -丁酰 cAMP 六氢吡啶酰胺	1	+14.13	-69.12

负为抑制,正为促进

cAMP 的酯类对 HeLa's 细胞没有产生明显作用,特别是 cAMP 丁酯由于水溶度较低所以没有得到满意结果。

讨 论

从不同浓度 cAMP 对 HeLa's 细胞和肝癌 7402 细胞的作用来看,说明 (一) cAMP 本身对不同肿瘤细胞株并没有选择性。(二) 不同浓度的 cAMP 作用完全不同在低浓度时 cAMP 抑制肿瘤细胞生长而高浓度时是促进细胞生长,因此维持一个合适的 cAMP 水平对细胞的正常生长是必要的。这和 Goldberg⁽⁹⁾ 提出的双相控制的观点是符合的。

Stevens 等⁽⁵⁾合成的 N^6O^2' -二乙酰-cAMP 磷酸甲酯和乙酯在体外实验和体内实验中都发现对艾氏腹水癌细胞比 cAMP 有更强的抑制作用。Cotton 等⁽⁸⁾合成的 cAMP 磷酸乙酯在体外、体内实验中,对 S_{180} 也呈现比 cAMP 更强的抑制作用。他们都认为这些酸酯的衍生物由于没有带负电荷的游离酸基,因此在外源性给药时能够比 cAMP 或 cAMP 的其他衍生物更容易透过细胞膜。在细胞内,这些酯作为 cAMP 的一种贮存形式慢慢释放出 cAMP,从而可以在细胞内产生一定 cAMP 的浓度。Stevens 等还认为这些磷酸酯到细胞内产生的抑制作用,除了由于细胞内 cAMP 水平升高外,还由于产生了烷基化作用。从我们比较的这些磷酸酯和磷酸酰胺的衍生物,对 HeLa's 细胞和肝癌细胞的作用来看,它们的作用情况是很不相同的。所有这些衍生物的磷酸部分都不带有负电荷,从透过细胞膜这一点来说应该比 N^6O^2' -二丁酰 cAMP 更容易,但是对这两个细胞株的抑制情况只有 O^2' -丁酰 cAMP 磷酸酰胺对肝癌细胞有较强作用,其他只有轻微的或类似于 N^6O^2' -二丁酰 cAMP 的作用。因此我们认为有可能除了衍生物本身透过细胞膜的能力外,对于这两个细胞株的抑制作用,还与这些衍生物在这些细胞内存在的结构有关,如果按照以前作者的假设,这些衍生物是 cAMP 的贮存形式,其作用是由于在细胞内水解释放出 cAMP 而起作用的,那么不管什么样的磷酸酯或磷酸酰胺其作用都不可能超过 cAMP 本身。显然这种说法不能很好的解释我们得到的结果。我们认为有以下几种可能性:(一)肝癌 7402 细胞中依赖于 cAMP 的蛋白激酶的调节亚基部分对 cAMP 磷酸酰胺的立体结构要比对 cAMP 本身更适应,从而表现为 cAMP 磷酸酰胺对肝 7402 癌细胞有比 cAMP 更强的抑制作用。(二)HeLa 细胞内具有水解 cAMP 磷酸酰胺的某种酶,使进入 HeLa 细胞内的药物水解,从而只表现为一般的抑制作用,而肝癌 7402 细胞这种酶的作用弱或没有,从而表现为对肝癌 7402 细胞有较强作用。(三)并不排除 cAMP 磷酸酰胺对细胞有细胞毒或其他作用的可能性。

参 考 文 献

1. Ryan et al: Cancer Research, 30, 376 (1970).
2. Presad et al: Biochem. Biophys. Research. Commun. 66, 131 (1975).
3. Gericke et al: E. Physiol. Chem. 350 (11), 1489 (1969).
4. Sutherland et al: Biochem. Biophys. Research Commun 148, 106 (1967);
Robino et al: Biochem. 10(12). 2390(1971). Ibid. 14 (19). 4238 (1975);
Nelbaeck et al: Pure and Applied chemistry 35 (4), 411 (1973).
5. Stevens et al: Biochem. Biophys. Research Commun. 55 (4) 1072 (1973)
6. Naguany et al: Nucleic Acid Research 1 (12), 1691 (1974)
7. Robries et al: Tetrahedron Letters 4, 269 (1973)
8. Cotton et al: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72 (4) 1335 (1975).
9. GoldbergvJ: Advances in Cyclic nucleotide Research vol.5,p.307