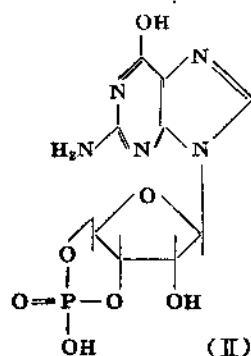
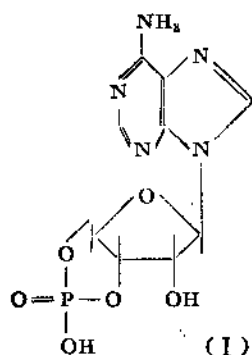


腺嘌呤 3',5'-环核苷酸(c-AMP)和鸟 便嘌呤 3',5'-环核苷酸(c-GMP) 合成方法的改进

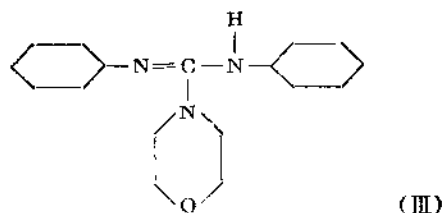
药理学系科研组*

腺嘌呤 3',5'-环核苷酸(c-AMP)(I)在一系列重要的生理生化过程中起着第二信使的作用⁽¹⁾。近年来,更发现了c-AMP对冠心病、牛皮癣等疾病有一定临床治疗价值⁽²⁾,鸟嘌呤 3',5'-环核苷酸(c-GMP)(II)的研究虽然比c-AMP少,但其在生理生化过程中的重要性,也越来越引起人们的重视,似乎是与c-AMP起着调节作用。c-AMP的临床试用和c-AMP、c-GMP结构改造以加强其选择性的工作正在进行,因此,一个方便的合成c-AMP和c-GMP的方法,是临床和基础研究的迫切需要。



c-AMP的合成已有不少研究报导,但都存在一定的問題,三磷酸腺苷(ATP)在一些金属离子催化下,可以生成c-AMP⁽³⁾,但由于ATP不是一个方便的原料,收率也不高,因此有一定的局限性,大多数的工作者考虑,以5'-腺嘌呤核苷酸为原料直接环合成c-AMP⁽⁴⁻⁶⁾。

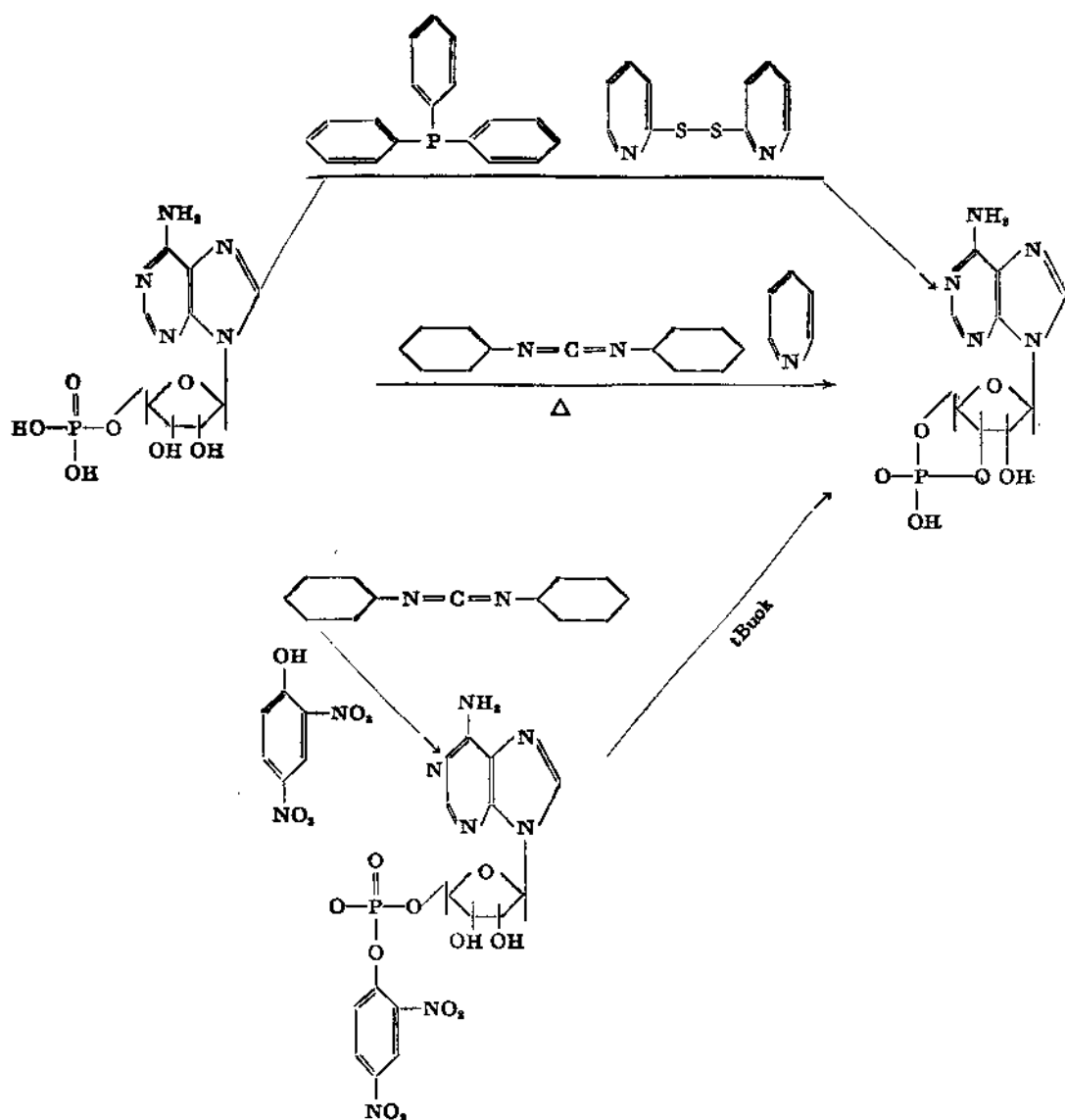
综合各种方法还是5'-腺嘌呤核苷酸用N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)在吡啶中直接环合比较简便,试剂也容易获得。在反应中,为了增加反应物溶解度,一般都是使5'-腺嘌呤核苷酸和N,N'-二环己基吗啉胍(III)生成复盐再进行反应。



但是用DCC为缩合剂,除了5'-腺嘌呤核苷酸分子内环合成c-AMP外,还可以产生分子间缩合,生成二核苷酸等副产物。因此为了使反应物比较单纯,都建议在稀溶液中反应,产物用DEAE纤维素或离子交换树脂进行分离⁽⁷⁾。

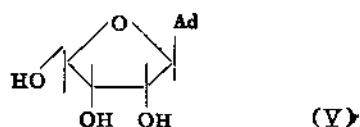
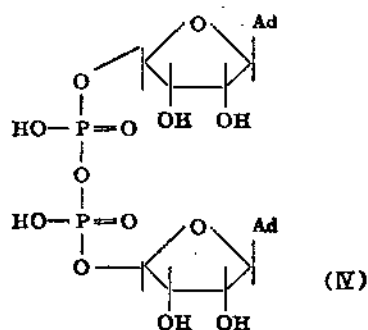
我们重复了文献方法,即用1毫克分子的5'-腺嘌呤核苷酸和1毫克分子N,N'-二环己基吗啉胍生成复盐,后者和2毫克分子N,N'-二环己基碳二亚胺在无水吡啶中反应4小时,

* 后字236部队进修同志曾参加本工作。



用纸上电泳检查反应物，发现有4个荧光点。我们按文献方法用DEAE纤维素柱用0.002 M~0.1 M 三乙胺碳酸氢盐溶液进行梯度洗脱

分离，获得四个产物，用纸谱证明这四个产物分别为5'-腺嘌呤核苷酸、P, P'二腺嘌呤核苷-5'-焦磷酸酯(IV)、c-AMP和腺嘌呤核苷



Ad = 腺嘌呤

(V)。这些产物由于性质很接近,用一般重结晶方法不易分离。显然5'-腺嘌呤核苷酸和P, P'二腺嘌呤核苷5'-焦磷酸酯的存在是由于反应不完全的缘故,而腺苷的存在是由于5'-腺嘌呤核苷酸水解,磷酸键断裂的结果。我们在做c-AMP衍生物时发现c-AMP的磷酸部分是比较不活泼的,较难反应,因此我们增加了反应液中DCC的克分子比,使由原来5'-腺嘌呤核苷酸:DCC=1:2变成了1:3,同时反应时间由4小时增加到8小时。再用纸上电泳检查反应液,发现原料和P, P'二腺嘌呤核苷5'-焦磷酸酯的点显著减少,反应中并没有产生其它高聚物,只是腺苷的点有所增加。但在采取了严格的无水措施后,5'-腺嘌呤核苷酸在反应中水解成腺苷也可以避免。考虑到反应物已经比较单纯,反应液中绝大部分的成分是c-AMP,因此有可能利用重结晶的方法使c-AMP得到精制。我们滤去反应中的N, N'-二环己基脲,减压蒸去吡啶,残渣用水提取,水液用乙醚洗去未反应的DCC,水液浓缩到小体积后,直接用2N HCl沉淀c-AMP,粗品再在pH 1时,用50%乙醇重结晶获得了比较纯的c-AMP,纸谱,电泳为一点,元素分析与已知结构一致。

为了扩大反应的量,使反应能在较小体积的溶剂中进行,我们研究了反应物浓度对产物的影响。一般是采用5'-腺嘌呤核苷酸复盐的吡啶液滴加到沸腾的DCC吡啶溶液中反应,考虑到除了采用稀溶液反应的方法外,放慢加料速度也是避免分子间缩合的一个方法。实验证明:在慢速滴加反应物的情况下,反应液体积可大大减少,反应产物仍比较单纯,而如果反应体积缩小了滴加速度并不减慢,则产物成分非常复杂,常常得到一些胶状物,不易分离c-AMP,目前采用我们的方法c-AMP的收率可达50%左右。

c-GMP的合成,文献介绍是经过先合成N-苯甲酰-5'-GMP再环合,脱酰基、产物的分离同样也要进行冗长的层析步骤。我们采用类似c-AMP的合成方法获得了成功,5'-GMP

吡啶盐先和N, N'-二环己基吗啉胍生成复盐。后者粉末直接分次加入沸腾的DCC吡啶液中反应,反应液经类似c-AMP的分离步骤获得了纸谱电泳一点的c-GMP,元素分析与已知结构一致。为了使加料方便我们曾用二甲基亚砷和吡啶溶解5'-GMP复盐,但最后从产物中除去二甲基亚砷比较困难,往往不容易直接获得c-GMP结晶。

实验部分

吡啶先经氢氧化钾干燥重蒸后再用5 Å分子筛处理,电泳用0.1 M三乙胺碳酸氢盐溶液,新华中速滤纸380 V 4小时,紫外吸收光谱用日本岛津生产的UV-200型紫外分光光度计,纸谱用Whatman No. 1滤纸溶剂系统(A)为异丙醇:浓氨:H₂O=7:1:2, (B) 1 M醋酸钠:乙醇=2:5, (C) 异丙醇:浓氨:0.1 M硼酸=7:1:2,操作过程中,浓缩过程都在40°C以下进行。

1. 腺嘌呤3',5'-环核苷酸的制备:

5'-AMP吡啶盐10 g (19.8毫克分子)、N, N'-二环己基吗啉胍6克(20.5毫克分子)、100毫升水、400毫升吡啶,使其全溶,溶液蒸干,残渣再加500毫升无水吡啶,蒸干,重复以上操作二次,最后得白色粉末状复盐,使悬浮于800 ml无水吡啶中。

在装有密封搅拌及回流冷凝器和无水氯化钙干燥管装置的三颈瓶内,加入14克DCC(68毫克分子)及1000 ml无水吡啶,于130°C油浴搅拌回流,同时在8小时内加完以上复盐的吡啶悬浮液,继续回流20小时,过滤除去N, N'-二环己基脲,滤液蒸干,用1000 ml水提取,水提液用1000 ml乙醚分三次洗涤,水溶液浓缩到约20毫升,用2N盐酸中和到pH 1~2,析出白色沉淀,冰箱放置一天。过滤沉淀用水洗干燥得4克c-AMP*,以上产物电泳一点泳动距离约为5'-AMP的 $\frac{1}{2}$,纸谱 $R_f=0.45$ (A), 0.40(B), 但原点有蓝色荧光。粗产品

* 母液中仍有c-AMP,但成分较复杂,用重结晶方法不能纯制。

肿瘤亚显微结构的基本变化

附属第一医院病理科

本世纪50年代以来,随着电子显微镜分辨能力的提高,以及超薄切片的使用,电子显微镜愈来愈多地被应用来观察正常细胞及病理细胞内微细结构的变化,在肿瘤病理学研究方面亦得到广泛开展。一系列研究工作使我们对肿瘤细胞形态学的知识从光学显微镜水平提高到亚显微结构水平。

在肿瘤病理学的研究范围内,很早就开始了对肿瘤病因学的研究,这方面的工作着重在努力发现肿瘤细胞内的病毒颗粒。很多动物的肿瘤细胞内,如鸡肉瘤、兔乳头状瘤、兔纤维瘤、小鼠乳汁因子族的乳癌、小鼠白血病及多发瘤等,已发现有病毒或病毒样颗粒。在人类肿瘤中,如急性淋巴性白血病、何杰金氏病等,亦发现有病毒样颗粒^(12,13,15,16)。中国医学科学院观察人类子宫颈癌的亚显微结构中,发现癌细胞核内有一种颗粒,较一般正常核仁颗粒(直径150Å)及染色质颗粒为大,直径为200~300Å,且有更高的电子密度,在核内似有排列倾向。作者对于这些颗粒是否与病毒有关,或由于某种其他因素作用后产生的核仁解离现象,即从核仁分离出来的颗粒(直径200~250Å),还不能肯定⁽⁴⁾。解放军某军医大学对人类肝癌的研究中,亦发现两例癌细胞核中有一种较为特殊的染色质间颗粒,其大小比较规则、球形、直径为150~220Å,在切面上呈空心或实心,他们对这类颗粒的性质亦留待深入研究⁽⁵⁾。总的说来,到目前为止,对人类肿瘤细胞尚未发现有确切的病毒颗粒,要确定电子显微镜下的病毒样颗粒与病因的关系,尚须作更多的鉴别工作。

另一方面的研究工作,是对某些特殊形态及发生来源不明的肿瘤进行电子显微镜观察,鉴别这些肿瘤细胞中微细结构的特征,探讨该肿瘤的组织发生来源,对进一步了解肿瘤的组

织发生及对肿瘤的病理诊断有一定的价值。例如,对肺良性透明细胞肿瘤的发生来源提出是平滑肌或周细胞来源⁽²²⁾。对所谓的“肺硬化性血管瘤”有人认为来自原始呼吸上皮⁽²¹⁾,另有人认为来自原始血管增生或内皮细胞⁽¹⁹⁾,对所谓的“腺泡状软组织肉瘤”的发生来源,有人认为该肿瘤不是神经源性而是肌源性的,更象一种异常类型的横纹肌肉瘤⁽¹⁸⁾,而另有人认为该肿瘤十分相似颈动脉体型的付神经节瘤⁽²⁹⁾。总之,有关这方面的工作很多,对肿瘤病理工作者说来,借助电子显微镜的高度分辨能力,对一些疑难肿瘤进行深入观察,企图解决诊断或组织发生等问题,已广为采用。比光学显微镜下的观察有很大进步。但由于电子显微镜的观察仍避免不了形态学的片面性,因此看来仍有不同的观察结果和见解。

关于肿瘤细胞的一般微细结构的研究,至今已有比较全面的观察,对肿瘤细胞与正常细胞之间的微细结构提出一些有一定意义的差异。总的说来,肿瘤细胞内一般微细结构均有不同程度的变化,尤以胞浆内微细结构的变化更为显著。下面将肿瘤细胞内微细结构的基本变化与正常细胞相对比,进行一些介绍,使对肿瘤亚显微结构的变化有初步的认识。

一、细胞膜及细胞间隙:电子显微镜下观察正常细胞的细胞膜分内、中、外三层膜。内、外二层电子密度较高,为蛋白质的分子层,中间层电子密度较低,为排列规则的类脂质分子。细胞膜的表面一般不是光滑的,多少有些凹凸不平。细胞膜在包围吞噬物质时形成内陷及吞饮小泡,并向胞浆内移动。细胞之间有联接物将细胞连在一起,上皮细胞之间连接更为紧密。很多人描述了上皮细胞之间的连接,如有些细胞是由相邻细胞膜的局部增厚及胞浆的致密部分相连接(如单层及假复层上

悬溶于 10 毫升水中, 加 10% Na_2CO_3 溶液使溶, 有部分不溶物滤去滤液加少量活性炭过滤, 滤液加 20 毫升乙醇, 用 2 N HCl 调到 pH 1~2, 析出白色结晶得 2.8 g 过滤产品, 电泳纸谱一点紫外吸收光谱 λ_{max} 258 $\text{m}\mu$ $\epsilon=14000$ 元素分析符合于 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}_1 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 收率 43%。

2. 鸟嘌呤 3', 5'-环核苷酸的制备:

5'-GMP 吡啶盐 0.5 克 (~1 毫克分子)、N, N'-二环己基吗啉胍 0.36 克 (~1.2 毫克分子), 并置于圆底瓶中, 分次加入 45 ml 吡啶、11 ml 水, 使其全溶。减压浓缩干, 再加入无水吡啶 30 ml, 进行带水重复以上操作三次, 得到白色粉末状复盐。

在装有密封搅拌、迴流冷凝管及氯化钙干燥管的三颈瓶中, 加入 1.12 g (5.4 毫克分子) DCC 100 ml 无水吡啶, 在 130°C 的油浴中搅拌迴流下在 4 小时内分次加完以上制备的复盐继续迴流 8 小时做电泳反应完全, 反应液过滤除去不溶物, 滤液减压蒸干, 加 100 ml 水提取,

水提液用 20 ml $\times$ 3 乙醚提取, 醚液用水提一次, 合并水液, 浓缩到约 5 ml, 用 2 N HCl 调 pH 到 2, 此时稍有些混浊, 放入冰箱中析出白色结晶, 过滤, 水洗到中性, 干燥得 72 mg, 电泳为一点, cGMP 为 5'-GMP 泳动距离的%, 纸层析 $R_f=0.31$ (B), 0.18(G)。紫外吸收光谱 λ_{max} 254 $\text{m}\mu$ $\epsilon=12600$ 用类似 c-AMP 的方法重结晶后元素分析符合 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}_1 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$, 收率约 20%。

参 考 文 献

1. Sertherland: Cyclic AMP and Cell function. 1970.
2. 中国科学院生化所东风试剂厂: 医药工业, 8:4, 1973.
3. Cook WH, et al: J Am Chem. Soc, 79:3607. (1957).
4. M. Smith et al: J Org Chem, 31:3247, 1966.
5. Ternaki Mukaiyama, et al J Am Chem Soc. 94 (24): 8528, 1972.
6. Khorana HG, et al: J Am Chem Soc, 83:698, 1961.
7. 中国科学院上海生化所: 生物化学与生物物理进展, 3: 44, 1974.