

# 新型核苷类似物 $\beta$ -L-D4A对人DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的作用及其机制

李岩, 林菊生, 张颖慧, 王晓燕, 何星星, 汪鸿, 高玲玲

李岩, 林菊生, 张颖慧, 王晓燕, 何星星, 汪鸿, 高玲玲, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030

李岩, 湖北省武汉市同济医院消化内科博士, 主要从事肝脏病学研究。

国家自然科学基金重点资助项目, No. 30330680

作者贡献分布: 本课题由林菊生, 李岩, 张颖慧, 王晓燕, 何星星, 汪鸿, 高玲玲设计; 研究过程中酶的提纯由李岩, 张颖慧共同完成, 药物实验部分由李岩操作完成; 数据分析由李岩, 王晓燕完成; 本论文写作由李岩, 林菊生, 张颖慧完成。

通讯作者: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所。

fengshuwenliyan@yahoo.com.cn

电话: 027-83663661 传真: 027-83663661

收稿日期: 2007-12-11 修回日期: 2008-01-25

## Effect of $\beta$ -L-D4A on human DNA polymerases $\beta$ and $\delta$ and its mechanism

Yan Li, Ju-Sheng Lin, Ying-Hui Zhang, Xiao-Yan Wang, Xing-Xing He, Hong Wang, Ling-Ling Gao

Yan Li, Ju-Sheng Lin, Ying-Hui Zhang, Xiao-Yan Wang, Xing-Xing He, Hong Wang, Ling-Ling Gao, Institute of Liver Diseases, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30330680

Correspondence to: Professor Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji Medical College, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. fengshuwenliyan@yahoo.com.cn

Received: 2007-12-11 Revised: 2008-01-25

## Abstract

**AIM:** To purify and characterize the DNA polymerase  $\delta$  and investigate the side effects of  $\beta$ -L-D4A (a novel nucleoside analog) on human DNA polymerases  $\beta$  and  $\delta$ .

**METHODS:** Human DNA polymerase  $\delta$  was separated from crude extract of human Hela cells by ion exchange chromatography. Detailed kinetic parameters were determined for  $\beta$ -L-D4A against DNA polymerases  $\beta$  and  $\delta$ .

**RESULTS:** Human DNA polymerase  $\delta$  was

purified and characterized with a yield of 15% and a specific activity of 1911 ukat/mg. When  $\beta$ -L-D4A was used as an inhibitor, the kinetic parameters of human DNA polymerases  $\beta$  and  $\delta$  were  $K_m = 1.86 \mu\text{mol/L}$  and  $2.45 \mu\text{mol/L}$ ,  $IC_{50} = 25.21 \mu\text{mol/L}$  and  $150.1 \mu\text{mol/L}$ ,  $K_i = 24.03 \mu\text{mol/L}$  and  $132.7 \mu\text{mol/L}$ , respectively, suggesting that the inhibitory effect of  $\beta$ -L-D4A on human DNA polymerases  $\beta$  and  $\delta$  was less than that of lamivudine.

**CONCLUSION:**  $\beta$ -L-D4A is a competitive inhibitor of DNA polymerases  $\beta$  and  $\delta$ . Its toxic side effects on DNA polymerases  $\beta$  and  $\delta$  are less than lamivudine. It can be expected to become a high efficient and low toxic anti-HBV agent.

**Key Words:** Nucleoside;  $\beta$ -L-D4A; Human DNA polymerase  $\beta$  and  $\delta$ ; Enzyme kinetics; Side effect

Li Y, Lin JS, Zhang YH, Wang XY, He XX, Wang H, Gao LL. Effect of  $\beta$ -L-D4A on human DNA polymerases  $\beta$  and  $\delta$  and its mechanism. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(6): 621-628

## 摘要

**目的:** 对人DNA聚合酶 $\delta$ 进行纯化和鉴定, 通过检测 $\beta$ -L-D4A对人DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的作用, 观察 $\beta$ -L-D4A的毒副作用。

**方法:** 运用多次离子交换层析的方法提取、纯化人Hela细胞的DNA聚合酶 $\delta$ ; 检测 $\beta$ -L-D4A对人DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的酶动力学作用。

**结果:** 提纯并鉴定了DNA聚合酶 $\delta$ , 收得率是15%, 比活力是1911 Ukat/mg。  $\beta$ -L-D4A为抑制剂时, 对人DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的酶动力学参数分别是 $K_m = 1.86 \mu\text{mol/L}$ ,  $2.45 \mu\text{mol/L}$ ,  $IC_{50} = 25.21 \mu\text{mol/L}$ 和 $150.1 \mu\text{mol/L}$ ,  $K_i = 24.03 \mu\text{mol/L}$ 和 $132.7 \mu\text{mol/L}$ , 结果均提示 $\beta$ -L-D4A对DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的抑制作用远小于拉米夫定。

**结论:**  $\beta$ -L-D4A是人DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的竞争

## ■背景资料

现在对HBV病毒感染的治疗缺乏有效的高效低毒的药物。在我们的前期实验中新型核苷类化合物- $\beta$ -L-D4A具有强大的抑制病毒逆转录酶的作用。为对该化合物进行系统的全面的评估, 本文进行了酶的动力学研究, 观察药物对纯化的正常人DNA聚合酶的抑制作用, 以便于作出全面的评价。

## ■同行评价者

高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

## ■研发前沿

近年来对慢性HBV感染治疗的研究热点集中在2', 3'双脱氧核苷(DDNs)。据报道新型核苷类化合物- $\beta$ -L-D4A在体外实验中对2.2.15细胞具有高效的抑制病毒复制的作用, 但对于该药物毒副作用尚无相关报道。

性抑制剂, 他对这两种酶的毒副作用远小于拉米夫定, 可望成为更高效低毒的抗HBV类药物。

**关键词:** 核苷类;  $\beta$ -L-D4A; 人DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ ; 酶动力; 毒副作用

李岩, 林菊生, 张颖慧, 王晓燕, 何星星, 汪鸿, 高玲玲. 新型核苷类似物 $\beta$ -L-D4A对人DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的作用及其机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(6): 621-628

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/621.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种全球性广泛传播的传染病<sup>[1]</sup>, 我们在前一项国家自然科学基金课题“抗乙肝病毒药物筛选模型和新化合物的研究”的强力资助下<sup>[2]</sup>, 发现一种新型抗HBV化合物( $\beta$ -L-D4A)。我们对其体外抗HBV作用进行研究, 发现它具有比拉米夫定具有更强的抑制HBV DNA复制的作用<sup>[3-4]</sup>。因为核苷及核苷类似物在抗病毒逆转录酶的同时, 其最大的副作用就是对正常组织中存在的DNA聚合酶也有抑制作用, 从而对宿主细胞和线粒体具有较大的毒性, 因此本课题对该药物进行毒副作用的研究<sup>[5]</sup>。

迄今为止, 在哺乳类细胞中已发现数十种DNA聚合酶, 其中负责DNA修复的关键酶是DNA聚合酶 $\beta$ <sup>[6]</sup>, 而DNA聚合酶 $\delta$ 则是领头链的主要复制酶, 在染色体DNA复制中起着重要作用, 而且他与染色体DNA的修复也密切相关<sup>[7-8]</sup>。鉴于这两种DNA聚合酶的重要作用, 本课题购买DNA聚合酶 $\beta$ 并于国内首次提纯DNA聚合酶 $\delta$ 并鉴定其活性和纯度, 采用体外DNA聚合酶活性抑制实验来测定我们发现的新型化合物( $\beta$ -L-D4A)的毒副作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人DNA聚合酶 $\beta$ 购自R&D公司。  $\beta$ -L-D4A三磷酸盐由武汉大学药学院协助化学合成, 拉米夫定三磷酸盐由美国Yale大学药学院YC. Cheng教授提供。 HeLa细胞由华中科技大学同济医学院免疫教研室馈赠, 二乙氨基乙基纤维素即DEAE纤维素(DE-52)和磷酸纤维素(P11)购自Whatman公司, 羟基磷灰石(HTP)购自Bio-Rad公司, 检测酶活性所需要的底物 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dTTP购自Amersham, 活化小牛胸腺DNA购自Sigma公司, 抗DNA聚合酶 $\delta$ 的mAb购自ABR-Affinity BioReagents, 其他试剂购自Gibco。

### 1.2 方法

**1.2.1 人DNA pol  $\delta$ 的纯化及鉴定:** 无特殊说明, 所有的缓冲液均包含1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA和0.01% NP-40, 在P11层析中不加NP-40, 而在HTP层析步骤中不加EDTA。所有的步骤均在0-4℃进行。(1)细胞处理: 细胞进行常规培养, 收集处于对数生长期的HeLa细胞进行冰冻, 取40 g冰冻HeLa细胞于冰上重悬于含有50 mmol/L Tris-Cl(pH7.9), 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 300 mL/L甘油的溶液中, 用Dounce匀浆器30 min冰上匀浆进行破细胞。收集所得液体, 加入KCl使其终浓度为200 mmol/L, 缓慢搅拌10 min, 40 000 g离心60 min, 收集上清, 加入EDTA使其终浓度为2 mmol/L, 获得成分A。测定活性和蛋白浓度。(2)P11处理: 将上步所得成分A用Hepes调整pH为7.2, 用4倍体积的10 mmol/L Hepes(pH7.2), 100 mL/L丙三醇稀释。加入80 mL已用50 mmol/L Hepes(pH7.2), 100 mL/L丙三醇平衡好的P11中, 缓慢混合1 h, 4000 r/min离心5 min, 弃上清。沉淀用400 mL的Tris-Cl(pH7.6), 50 mmol/L KCl的缓冲液进行重悬和再沉淀。沉淀再次重悬于160 mL含有0.4 mol/L KCl的平衡液中, 4000 r/min离心5 min, 保留上清, 该步骤重复2次, 将两次所得上清混合后, 用滤网除去溶液中所含的P11颗粒, 获得成分B。取少量测定蛋白量及酶活性。(3)HTP层析: 将上步成分B加入已用50 mmol/L Tris-Cl(pH7.6)和0.2 mol/L KCl平衡好的P11柱子(2.6 cm×30 cm)上(参见Bio-Rad公司试剂说明书), 2倍于柱子体积的相同平衡液进行洗脱。然后, 选用含有0.2 mol/L KCl的5倍于柱子体积的0.005-0.04 mol/L阶梯浓度梯度的pH7.6的KPO<sub>4</sub>进行洗脱。收集洗脱液, 并进行测定A<sub>280</sub>, 结果显示在0.015-0.02 mol/L KPO<sub>4</sub>出现了一个较宽的峰值。将峰值处所得溶液分别收集后, 将其余所得成分用固体蔗糖浓缩12 h, 使其体积为1/5, 然后加到500 mL Tris-Cl(pH7.6)中透析12 h, 得到成分C。取少量测定蛋白量及酶活性。(4)DE-52层析: 将上步所得C用Tris-OH调整pH为8.5, 用4倍体积的10 mmol/L Tris-Cl(pH8.5)稀释后, 加入到已用50 mmol/L Tris-Cl(pH8.5)平衡好的DE-52的柱子(1.2 cm×10 cm)上, 用2倍于柱子体积的相同平衡液进行洗脱。然后, 选用含有50 mmol/L Tris-Cl(pH8.5)的8倍于柱子体积的0.01-0.35 mol/L阶梯浓度梯度的KCl进行洗脱。收集洗脱液, 并进行测定A<sub>280</sub>, 结果显示在0.1 mol/L KCl处出现了一个尖锐的峰值, 用15倍柱子体积的0.1 mol/L KCl缓冲液再次洗脱,

表 1 DNA聚合酶 $\delta$ 的每一步纯化结果检测

步骤	总蛋白/mg	总活力/Ukat	比活力/(Ukat/mg)	纯化倍数	收得率(%)
细胞粗提成分	88	4460	51	1	100
P11处理后成分	30	3321	110	2	74
HTP层析	13	2558	197	4	57
DE52层析	0.36	688	1911	37	15

收集洗脱液, 与0.05-0.15 mol/L处所得洗脱溶液相混合, 取少量测定蛋白量及酶活性. (5)蛋白浓度测定: 用Bradford法试剂盒测定, 按照使用说明进行操作. (6)酶活性检测反应体系: 反应体系包括: DNA pol  $\delta$  2  $\mu$ L, 50  $\mu$ mol/L dCTP, 50  $\mu$ mol/L dGTP, 50  $\mu$ mol/L dATP, 50  $\mu$ mol/L  $\alpha$ - $^{32}$ Pd TTP(100 cpm/pmol), 100 mg/L活化DNA, 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.5 mmol/L  $MnCl_2$ , 100 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L DTT, 总反应体系为50  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C孵育15 min后, 转到DE81滤纸上, 50 g/L  $Na_2HPO_4$ 洗涤3次, 每次10 min, 双蒸水洗涤2次, 每次5 min, 最后用液闪法进行计数测定. (7)SDS-PAGE变性-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 堆积胶5%, 所用电压为80 V, 分离胶为10%, 电压120 V, 考马斯亮蓝染色, 脱色后在凝胶成像系统下拍摄. (8)Western blot: DE52层析后组分进行Western blot, 4 $^{\circ}$ C转移过夜, 50 g/L脱脂奶粉封闭30 min, 鼠抗DNA聚合酶 $\delta$ (1:1000)室温孵育1.5 h, 羊抗鼠二抗孵育, 最后用DAB在膜上显色.

1.2.2 药物对DNA pol  $\beta$ 和 $\delta$ 的活性抑制测定: (1)测定 $K_m$ : 以拉米夫定的三磷酸盐为对照, 选择1, 3, 5, 7, 10  $\mu$ mol/L  $\alpha$ - $^{32}$ Pd TTP(100 cpm/pmol), 加入药物10  $\mu$ mol/L, 其他条件同酶活性检测反应体系, 当进行DNA pol  $\beta$ 的测定时, 将DNA pol  $\delta$ 换成等单位的DNA pol  $\beta$ , 进行液闪测定. 数据选用Graphpad prism 4 Demo软件进行Lineweaver-Burk双倒数作图求得 $K_m$ . (2)测定 $IC_{50}$ : 参照所求 $K_m$ ,  $\alpha$ - $^{32}$ Pd TTP(100 cpm/pmol)浓度为3  $\mu$ mol/L, 药物浓度进行浓度梯度设定, 其他同酶活性检测反应体系, 同样当进行DNA pol  $\beta$ 的测定时, 将DNA pol  $\delta$ 换成等单位的DNA pol  $\beta$ , 进行液闪测定. 抑制率(%) = (1-药物组液闪计数/空白对照液闪计数)  $\times$  100%. (3)测定 $K_i$ : 参照所求 $IC_{50}$ , 选择五个不同的药物浓度梯度, 分别与2和5  $\mu$ mol/L  $\alpha$ - $^{32}$ Pd TTP(100 cpm/pmol)作用, 其余试剂同酶活性检测反应体系, 同样当进行DNA pol  $\beta$ 的测定时, 将DNA pol  $\delta$ 换成等单位的

DNA pol  $\beta$ , 测定液闪计数. 用Dixon作图法求 $K_i$ .

## 2 结果

### 2.1 纯化并鉴定DNA聚合酶 $\delta$

2.1.1 HTP层析: 细胞的处理及P11处理的目的是去除大量的核酸及杂蛋白. HTP层析柱经梯度 $KPO_4$ 洗脱后依次测定收集管内的洗脱液 $A_{280}$ 值, 发现当用0.015 mol/L洗脱时, 在第21管开始逐渐出现一个较大的洗脱峰, 33管附近出现一个小的洗脱峰, 到用0.025 mol/L  $KPO_4$ 缓冲液洗脱大约45管时 $A_{280}$ 开始明显下降. 说明该蛋白主要集中在从0.015 mol/L至0.02 mol/L  $KPO_4$ 缓冲液洗脱的部分, 分别收集两峰部分的洗脱液, 进行酶的活性鉴定, 证实了前一个峰含有目的蛋白组分, 后一个峰则为杂蛋白. 用Bradford法试剂盒测定蛋白浓度, 经计算蛋白量是13 mg(图1A).

2.1.2 DE52层析: DE52层析柱经梯度KCl洗脱时测定 $A_{280}$ 值, 结果显示峰值集中在21-30管的收集液中, 这时所用的KCl缓冲液浓度是0.1 mol/L, 收集0.05-0.15 mol/L KCl洗脱的11-40管洗脱液, 取少量测定蛋白量及酶活性, 证实其正是目的蛋白, 量为0.36 mg(图1B).

2.1.3 SDS-PAGE和Western blot: 将每个步骤所得蛋白浓缩后进行SDS-PAGE电泳, 发现其杂蛋白条带逐渐减少, 最后显示仅余一条蛋白带, 为鉴定该条带是否为目的蛋白, 对DE52层析后组分进行Western blot, 证实了该蛋白确实是目的蛋白DNA聚合酶 $\delta$ , 说明该蛋白得到了有效的纯化(图2-3).

2.1.4 纯化过程中对每一步的总蛋白、总活力、比活力、纯化倍数以及收得率进行比较: 随着纯化步骤的深入, 总蛋白和总活力呈逐步下降的趋势, 而比活力和纯化倍数则逐步升高, 收得率则逐步降低, 表明杂蛋白逐渐减少而目的蛋白逐步得到纯化(表1).

### 2.2 $\beta$ -L-D4A对DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的酶动力学作用

2.2.1  $K_m$ 的测定:  $\beta$ -L-D4A对DNA聚合酶 $\beta$ 的作用, 无任何抑制剂时, 其直线回归方程为

### ■ 相关报道

既往研究显示, 绝大多数抗HBV或HIV的核苷类化合物在不同程度的抗病毒复制的同时, 也对正常人体内的人DNA聚合酶产生抑制作用, 而抑制作用的强度限制了很多具有高效抗病毒化合物的应用.

## ■创新盘点

本研究首次采用国际上公认的研究核苷类化合物毒副作用的系统来评价新型的化合物-β-L-D4A的安全性。

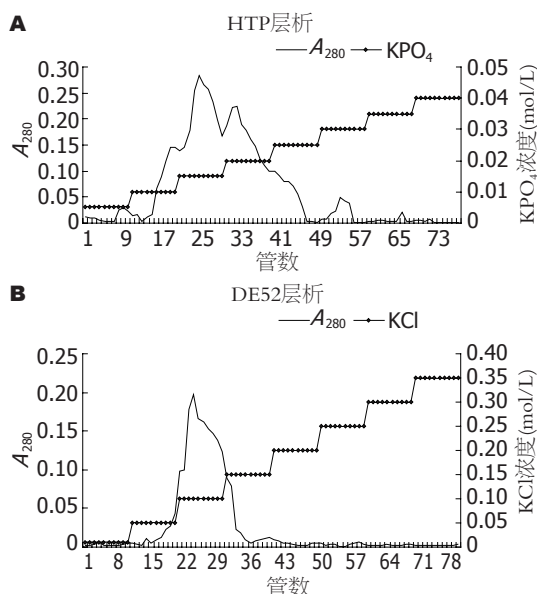


图1 洗脱峰由每次层析的 $A_{280}$ 测定和洗脱液的浓度梯度决定。

$y = 7.981x + 6.051 (r^2 = 0.9962)$ , 经计算得 $K_m$ 值为 $1.33 \mu\text{mol/L}$ ; 拉米夫定做抑制剂时,  $y = 11.640x + 6.165 (r^2 = 0.9992)$ ,  $K_m$ 值为 $1.89 \mu\text{mol/L}$ , 而β-L-D4A是抑制剂时,  $y = 10.984x + 5.918 (r^2 = 0.9994)$ ,  $K_m$ 值为 $1.86 \mu\text{mol/L}$ 如(图4A). β-L-D4A对DNA聚合酶δ的作用, 无任何抑制剂时, 其直线回归方程为 $y = 8.889 + 17.486x (r^2 = 0.9994)$ 经计算得 $K_m$ 值为 $1.96 \mu\text{mol/L}$ ; 拉米夫定做抑制剂时,  $y = 9.162 + 26.666x (r^2 = 0.9992)$ ,  $K_m$ 值为 $2.91 \mu\text{mol/L}$ , 而β-L-D4A是抑制剂时,  $y = 8.766 + 21.467x (r^2 = 0.9994)$ ,  $K_m$ 值为 $2.45 \mu\text{mol/L}$ (图4B).

2.2.2  $IC_{50}$ 的测定: 采用半对数作图, β-L-D4A对DNA聚合酶β的作用, 拉米夫定的 $IC_{50}$ 是 $20.14 \mu\text{mol/L}$ , 而β-L-D4A的 $IC_{50}$ 是 $25.21 \mu\text{mol/L}$ (图5A). β-L-D4A对DNA聚合酶δ的作用, 拉米夫定的 $IC_{50}$ 是 $127.5 \mu\text{mol/L}$ , 而β-L-D4A的 $IC_{50}$ 是 $150.1 \mu\text{mol/L}$ . β-L-D4A对两种酶的半数抑制浓度均大于拉米夫定(图5B).

2.2.3  $K_i$ 的测定: 图中两直线交点的横坐标的绝对值即是 $K_i$ . 图6是化合物对人DNA聚合酶β的 $K_i$ 测定. 图6A是拉米夫定, 两条直线回归方程分别是:  $y = 0.490x + 8.130 (r^2 = 0.9992)$ ,  $y = 0.394x + 6.567 (r^2 = 0.9994)$ , 计算得 $K_i = 16.15 \mu\text{mol/L}$ , 图6B是β-L-D4A, 两条直线回归方程分别为:  $y = 0.105x + 6.555 (r^2 = 0.9970)$ ,  $y = 0.037x + 4.926 (r^2 = 0.9944)$ , 计算得 $K_i = 24.03 \mu\text{mol/L}$ . 图7是化合物对人DNA聚合酶δ的 $K_i$

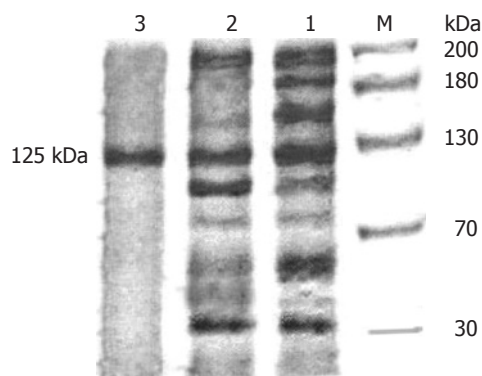


图2 将每一步提纯后组分进行SDS-PAGE电泳. 1: P11处理后组分; 2: HTP层析后组分; 3: DE52层析后组分; M: Marker.

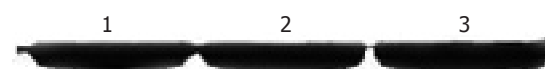


图3 对SDS-PAGE中DE52处理后组分用抗DNA聚合酶δ抗体进行Western blot, 证实其成分是DNA聚合酶δ. 1-3均是DE52处理后组分.

测定, 图7A是拉米夫定, 两条直线回归方程分别为:  $y = 0.078x + 22.896 (r^2 = 0.9948)$ ,  $y = 0.018x + 17.520 (r^2 = 0.995)$ , 计算得 $K_i = 89.6 \mu\text{mol/L}$ . 而图7B是β-L-D4A, 两条直线回归方程分别为:  $y = 0.121x + 21.432 (r^2 = 0.9986)$ ,  $y = 0.049x + 11.944 (r^2 = 0.9923)$ , 计算得 $K_i = 132.7 \mu\text{mol/L}$ .

### 3 讨论

近年来, 对HBV感染的治疗主要是α-干扰素和核苷类化合物<sup>[9]</sup>. 前者的持久应答率低, 需要胃肠外投药, 以及高费用等缺点限制了其应用<sup>[10-11]</sup>. 核苷类化合物如拉米夫定(3TC), 治疗费用较低, 而且可以经口服用, 比较方便, 但实验研究与临床应用结果均表明, 停药后病毒复制又重新恢复, 而且耐药株与变异株的产生随着用药时间的延长而增加<sup>[12-13]</sup>. 因此, 抗HBV新药的研制是一项十分紧迫的研究课题. 前期实验中β-L-D4A强大的抑制病毒逆转录酶的作用, 使其有可能成为新型的我国自主研发开发的临床药物<sup>[14-15]</sup>. 为对该药物做系统的全面的评估, 我们采用现在国际上公认的对核苷类药物毒副作用机制的研究体系即体外进行药物对酶的动力学研究, 观察药物对纯化的正常DNA聚合酶的抑制作用, 以便于作出全面的评价<sup>[16]</sup>.

在真核生物中存在着多种DNA聚合酶, 如DNA聚合酶α参与染色体DNA的复制<sup>[17-18]</sup>, DNA聚合酶β主要负责修复<sup>[19-20]</sup>, DNA聚合酶γ负责线

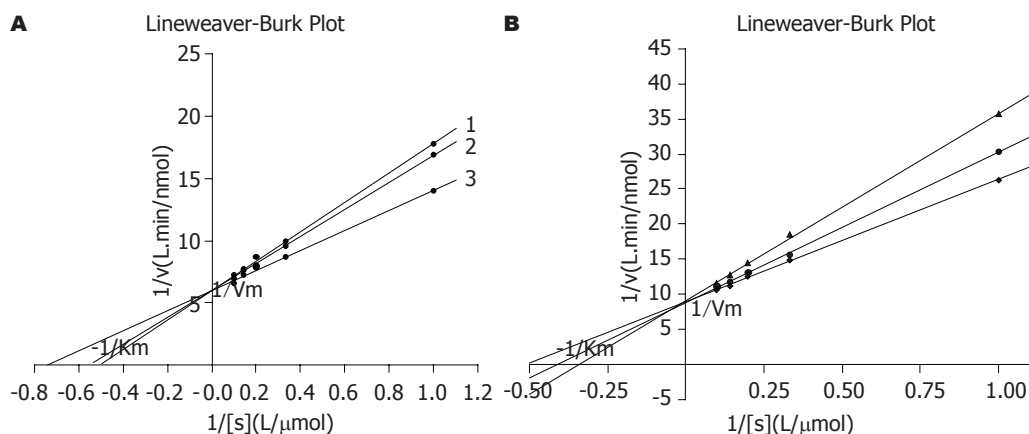


图 4 药物对人DNA聚合酶的 $K_m$ 测定. A: DNA聚合酶 $\beta$ ; B: DNA聚合酶 $\delta$ ; 1: 3TC; 2:  $\beta$ -L-D4A; 3: 无抑制剂.

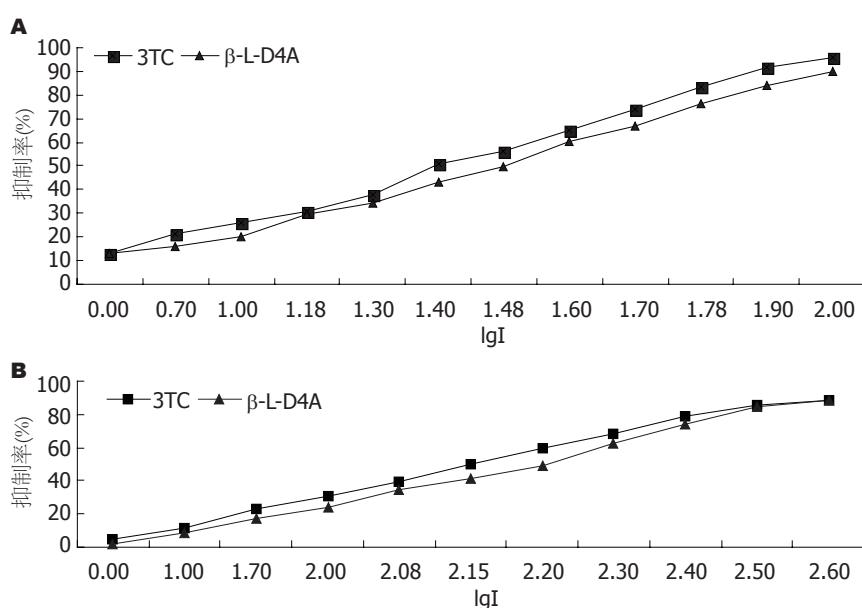


图 5  $IC_{50}$ 半对数作图测定. A: DNA聚合酶 $\beta$ ; B: DNA聚合酶 $\delta$ ; I: 抑制剂浓度( $\mu$ mol/L).

立体DNA的复制<sup>[21-22]</sup>, 而DNA pol  $\delta$ 则参与了复制和修复两个重要过程<sup>[23-24]</sup>. 因为他是细胞核染色体DNA领头链的主要复制酶, 同时也具有非常独特的内在的3'→5'核酸外切酶的活性<sup>[25]</sup>. 这四种DNA聚合酶占DNA聚合酶总量的90%以上, 因此, 我们对这四种主要的DNA聚合酶进行了研究, 其中DNA聚合酶 $\alpha$ 和 $\gamma$ 已投稿, 本研究主要报告 $\beta$ 和 $\delta$ 的研究结果.

在检测所有样本中DNA聚合酶活性之前, 必须建立体外检测酶活性的最佳条件. DNA聚合酶的最佳反应体系是:  $Mn^{2+}$ , 0.5 mmol/L; 50 mmol/L Tris-HCl; pH7.5; 37°C; 1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇和1 mmol/L EDTA. 缓冲液中 $\beta$ -巯基乙醇、EDTA和乙二醇的加入对保持缓冲液的稳定性和酶活性具有重要意义. 尽管离子交换层析的柱反应对条件改变相当敏感, 但是摸索到合适条件时, 层析分离的方法简单且具有重复性.

在本实验中, 经过SDS-PAGE有一条 $M_r$  125 000的带, 与不同方法获得的不尽相同. 这主要是因为酶的翻译后修饰有关, 而且在纯化过程中, 广泛的蛋白水解作用也会导致酶形式的不同<sup>[26]</sup>. 从结果中我们可以看到, 随着纯化的一步进行, 总蛋白和总活力在减少, 而比活力逐渐增加. SDS-PAGE中, 条带逐渐减少直至一条,  $M_r$  125 000, Western blot证实了其特异性, 而比活力为1911 Ukat/mg则证实了该纯化方法是有效的. 所得的DNA pol  $\delta$ 为核苷类药物毒副作用的研究打下了基础.

一般认为, 核苷类化合物在进入细胞后, 经过磷酸化由一磷酸化合物至二磷酸化合物, 最后形成三磷酸化合物才能类似于正常的核苷酸参与到核苷酸链的延伸反应, 从而达到DNA链的终止反应. 因此, 我们选择了两种药物的三磷酸形式进行本实验<sup>[27-28]</sup>.

#### 应用要点

新型核苷类化合物- $\beta$ -L-D4A有望成为新的更高效低毒的抗HBV病毒的药物.

## ■同行评价

本文创新性强,内容详实,具有一定的临床参考价值.

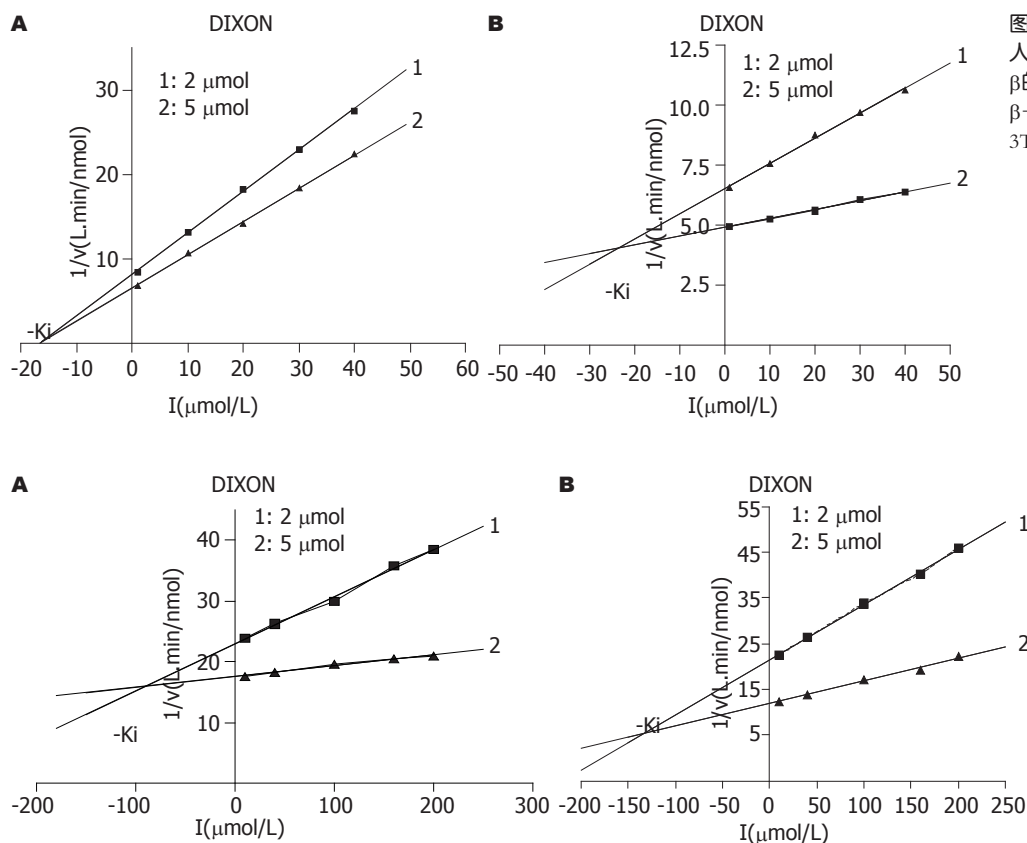


图 6 药物对人DNA聚合酶 $\beta$ 的 $K_i$ 测定: A:  $\beta$ -L-D4A; B: 3TC.

图 7 药物对人DNA聚合酶 $\delta$ 的 $K_i$ 测定: A:  $\beta$ -L-D4A; B: 3TC.

本实验结果显示: 两种药物对两种酶DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$   $K_m$ 的测定显示三条直线均交于y轴, 而在x轴的截距各不相同, 即抑制剂的加入, 改变了 $K_m$ , 而最大反应速度 $V_{max}$ 不变, 提示拉米夫定和 $\beta$ -L-D4A均是两种DNA聚合酶的竞争性抑制剂. 这提示拉米夫定和 $\beta$ -L-D4A可能都是在抑制HBV DNA复制的过程中, 由于DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 具有与HBV逆转录酶相同的作用底物, 因此对DNA聚合酶 $\delta$ 也形成了竞争性的抑制.

两个药物对DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的 $IC_{50}$ 的测定结果显示,  $\beta$ -L-D4A抑制酶活性降低为50%时的药物浓度分别是25.21  $\mu\text{mol/L}$ 和150.1  $\mu\text{mol/L}$ , 均大于拉米夫定的20.14和127.5  $\mu\text{mol/L}$ , 明显说明拉米夫定比 $\beta$ -L-D4A具有更强的抑制作用.

因为 $IC_{50}$ 的测定与底物和药物浓度梯度设置密切相关, 为了更客观的研究两个药物的抑制作用, 我们对两个药物的 $K_i$ (抑制常数)进行了测定. 结果显示 $\beta$ -L-D4A对DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的 $K_i$ 分别为24.03  $\mu\text{mol/L}$ 和132.7  $\mu\text{mol/L}$ , 均大于拉米夫定的16.15  $\mu\text{mol/L}$ 和89.6  $\mu\text{mol/L}$ , 证实了 $\beta$ -L-D4A对两种DNA聚合酶的抑制作用均更弱.

核苷及核苷类似物是一些化学合成类似于天然核苷的药物<sup>[29-30]</sup>. 他抗乙肝病毒复制主要有

通过抑制逆转录作用干扰负链DNA的合成和作用于闭合环状DNA<sup>[31]</sup>. 实验表明核苷类药物对闭合环状DNA作用不佳, 他主要是掺入新合成的HBV的DNA链中导致链终止, 从而抑制病毒复制<sup>[32]</sup>. 而且, 他们竞争性地抑制病毒的DNA依赖的逆转录酶活性<sup>[33-34]</sup>. 因为, 正常细胞的DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 与HBV DNA聚合酶在作用底物和机制上的相似性, 核苷类药物在抑制病毒聚合酶时同样会竞争性抑制正常的DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的活性<sup>[35-36]</sup>.

我们从 $K_m$ ,  $IC_{50}$ ,  $K_i$ 等不同的酶动力学参数对拉米夫定和 $\beta$ -L-D4A都进行了抑制作用的评价, 均显示拉米夫定具有更强的抑制DNA聚合酶 $\beta$ 和 $\delta$ 的作用, 提示拉米夫定对宿主细胞具有更大的毒副作用.

因此, 我国自主研发开发的新型核苷类化合物 $\beta$ -L-D4A可望成为更高效低毒的抗HBV类药物, 亦有望同拉米夫定联合用药提高疗效或减短用药疗程, 并减少变异株和耐药株的出现.

## 4 参考文献

- 1 Anderson RD, Chinnakotla S, Guo L, Perrillo RP, Klintmalm GB, Davis GL. Intramuscular hepatitis B immunoglobulin (HBIG) and nucleosides for

- prevention of recurrent hepatitis B following liver transplantation: comparison with other HBIG regimens. *Clin Transplant* 2007; 21: 510-517
- 2 Wu JM, Lin JS, Xie N, Liang KH. Inhibition of hepatitis B virus by a novel L-nucleoside, beta-L-D4A and related analogues. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1840-1843
  - 3 Wu JM, Lin JS, Xie N, Jiang FC, Liang KH. Effect and mechanism of beta-L-D4A (a novel nucleoside analog) against hepatitis B virus. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 268-270
  - 4 Wu JM, Lin JS, Xie N, Qiu GF, Hu XM. Synthesis of a novel L-nucleoside, beta-L-D4A and its inhibition on the replication of hepatitis B virus in vitro. *Yao Xue Xue Bao* 2005; 40: 825-829
  - 5 Oshige M, Takenouchi M, Kato Y, Kamisuki S, Takeuchi T, Kuramochi K, Shiina I, Suenaga Y, Kawakita Y, Kuroda K, Sato N, Kobayashi S, Sugawara F, Sakaguchi K. Taxol derivatives are selective inhibitors of DNA polymerase alpha. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 2597-2601
  - 6 Vens C, Hofland I, Begg AC. Involvement of DNA polymerase beta in repair of ionizing radiation damage as measured by in vitro plasmid assays. *Radiat Res* 2007; 168: 281-291
  - 7 Parsons JL, Preston BD, O'Connor TR, Dianov GL. DNA polymerase delta-dependent repair of DNA single strand breaks containing 3'-end proximal lesions. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 1054-1063
  - 8 Luciani MG, Campregheer C, Fortune JM, Kunkel TA, Gasche C. 5-ASA affects cell cycle progression in colorectal cells by reversibly activating a replication checkpoint. *Gastroenterology* 2007; 132: 221-235
  - 9 Marcellin P, Lada O, Asselah T. Treatment of chronic hepatitis B with the combination of pegylated interferon with lamivudine. *Hepatol Res* 2007; 37: S55-S61
  - 10 Kao JH. Appropriate use of interferon for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2007; 37: S47-S54
  - 11 Akyuz F, Kaymakoglu S, Demir K, Aksoy N, Karaca C, Danalioglu A, Onel D, Badur S, Besisik F, Cakaloglu Y, Okten A. Lamivudine monotherapy and lamivudine plus interferon alpha combination therapy in HBeAg negative chronic hepatitis B not responding to previous interferon alpha monotherapy. *Acta Gastroenterol Belg* 2007; 70: 20-24
  - 12 Lu HY, Zhuang LW, Yu YY, Ivan H, Si CW, Zeng Z, Li J, Hou DM, Chen XY, Han ZH, Chen Y. Intrahepatic HBV DNA as a predictor of antiviral treatment efficacy in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2878-2882
  - 13 Hou J, Schilling R, Janssen HL, Hansen BE, Heijtkink R, Sablon E, Williams R, Lau GK, Schalm SW, Naoumov NV. Genetic characteristics of hepatitis B virus genotypes as a factor for interferon-induced HBeAg clearance. *J Med Virol* 2007; 79: 1055-1063
  - 14 Wu J, Lin JS, Chen BT, Zheng XM, Zhao HB, Liang KH. Establishment and identification of highly expressing and replicating hepatitis B virus genome transgenic mouse models. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 338-340
  - 15 Wu JM, Lin JS, Jiang FC, Zhang JY, Liang KH. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by a novel nucleoside analogue (beta-L-D4A). *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 446
  - 16 Wang Z, Bennett EM, Wilson DJ, Salomon C, Vince R. Rationally designed dual inhibitors of HIV reverse transcriptase and integrase. *J Med Chem* 2007; 50: 3416-3419
  - 17 Beckman J, Kincaid K, Hocek M, Spratt T, Engels J, Cosstick R, Kuchta RD. Human DNA polymerase alpha uses a combination of positive and negative selectivity to polymerize purine dNTPs with high fidelity. *Biochemistry* 2007; 46: 448-460
  - 18 Maeda N, Kokai Y, Ohtani S, Sahara H, Kuriyama I, Kamisuki S, Takahashi S, Sakaguchi K, Sugawara F, Yoshida H, Sato N, Mizushima Y. Anti-tumor effects of dehydroaltenusin, a specific inhibitor of mammalian DNA polymerase alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 390-396
  - 19 Crespan E, Hubscher U, Maga G. Error-free bypass of 2-hydroxyadenine by human DNA polymerase lambda with Proliferating Cell Nuclear Antigen and Replication Protein A in different sequence contexts. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 5173-5181
  - 20 Hu DL, Tang HW, Liang HR, Tang DS, Liu YM, Ji WD, Yuan JH, He Y, Zhu ZY, Yang JP, Fang DK, Sha Y, Tu XZ, Zhuang ZX. Possible role of DNA polymerase beta in protecting human bronchial epithelial cells against cytotoxicity of hydroquinone. *Biomed Environ Sci* 2007; 20: 171-177
  - 21 Luoma PT, Eerola J, Ahola S, Hakonen AH, Hellström O, Kivistö KT, Tienari PJ, Suomalainen A. Mitochondrial DNA polymerase gamma variants in idiopathic sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2007; 69: 1152-1159
  - 22 Yakubovskaya E, Lukin M, Chen Z, Berriman J, Wall JS, Kobayashi R, Kisker C, Bogenhagen DF. The EM structure of human DNA polymerase gamma reveals a localized contact between the catalytic and accessory subunits. *EMBO J* 2007; 26: 4283-4291
  - 23 Rytönen AK, Vaara M, Nethanel T, Kaufmann G, Sormunen R, Läärä E, Nasheuer HP, Rahmeh A, Lee MY, Syväoja JE, Pospiech H. Distinctive activities of DNA polymerases during human DNA replication. *FEBS J* 2006; 273: 2984-3001
  - 24 Friedberg EC. The eureka enzyme: the discovery of DNA polymerase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 143-147
  - 25 Chen J, Zacharek A, Li Y, Li A, Wang L, Katakowski M, Roberts C, Lu M, Chopp M. N-cadherin mediates nitric oxide-induced neurogenesis in young and retired breeder neurospheres. *Neuroscience* 2006; 140: 377-388
  - 26 Wu T, Froeyen M, Kempeneers V, Pannecouque C, Wang J, Busson R, De Clercq E, Herdewijn P. Deoxythreosyl phosphonate nucleosides as selective anti-HIV agents. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 5056-5065
  - 27 Uckun FM, Qazi S, Venkatachalam T. N'-[2-(2-thiophene) ethyl]-N'-[2-(5-bromopyridyl)]thiourea (HI-443), a rationally designed non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor compound with potent anti-HIV activity. *Arzneimittelforschung* 2007; 57: 278-285
  - 28 Parikh UM, Zelina S, Sluis-Cremer N, Mellors JW. Molecular mechanisms of bidirectional antagonism between K65R and thymidine analog mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS* 2007; 21: 1405-1414
  - 29 Caccamo L, Agnelli F, Reggiani P, Maggi U, Donato MF, Gatti S, Paone G, Melada E, Rossi G. Role of lamivudine in the posttransplant prophylaxis of chronic hepatitis B virus and

- hepatitis delta virus coinfection. *Transplantation* 2007; 83: 1341-1344
- 30 Kawaoka T, Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Arase Y, Sezaki H, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Ikeda K, Kumada H. Efficacy of lamivudine therapy in elderly patients with chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol* 2007; 42: 395-401
- 31 Fung J, Lai CL, Yuen JC, Wong DK, Tanaka Y, Mizokami M, Yuen MF. Adefovir dipivoxil monotherapy and combination therapy with lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B in an Asian population. *Antivir Ther* 2007; 12: 41-46
- 32 Gish RG. Improving outcomes for patients with chronic hepatitis B. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 14-22
- 33 Leemans WF, Janssen HL, de Man RA. Future perspectives for the management of chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2554-2567
- 34 de Baar MP, de Rooij ER, Smolders KG, van Schijndel HB, Timmermans EC, Bethell R. Effects of apricitabine and other nucleoside reverse transcriptase inhibitors on replication of mitochondrial DNA in HepG2 cells. *Antiviral Res* 2007; 76: 68-74
- 35 Qi X, Xiong S, Yang H, Miller M, Delaney WE 4th. In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents. *Antivir Ther* 2007; 12: 355-362
- 36 D'Ugo E, Kondili LA, Canitano A, Catone S, Giuseppetti R, Gallinella B, Palmieri G, Orobello S, Argentini C, Glück R, Rapicetta M. Rapid emergence of a viral resistant mutant in WHV chronically infected woodchucks treated with lamivudine and a pre-S/S CHO-derived hepatitis B virus vaccine. *Vaccine* 2007; 25: 4895-4902

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知

**本刊讯** 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2008-11在上海市召开第二十次全国中西医结合消化系统疾病学术会议,并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为肝病、内镜与胃癌)新技术新理论继续教育学习班.学习班招收对象:中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等.参加学习班者授予国家级1类继续教育学分;大会论文报告者另授继续教育学分6分.

#### 1 征稿内容

消化内镜技术及其中西医结合临床应用;脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究;消化道肿瘤中西医结合诊疗;脾胃学说及其临床应用;其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

#### 2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编.稿件请附800字论文摘要,尽可能以电子信件的形式将稿件传送,截稿日期:2008-09-30.

#### 3 联系方式

刘成海, 201203, 上海市浦东新区张衡路528号上海中医药大学附属曙光医院肝病所, 传真: 021-51324445或51328500, shxhhy2008@yahoo.cn或czs.xiaohua@163.com