

双丁酰 cAMP 对人胃腺癌细胞 (SGC-7901) 周期的影响

赵孟莲 牛敏英 方家椿

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物室)

薛绍白 宋平根 汪堃仁

(北京师范大学生物系细胞生物室)

近年来有关外源性 cAMP 及其衍生物对于培养正常细胞与恶性细胞增殖的抑制,进行了大量的工作。cAMP 及其衍生物将正常细胞生长周期阻断在 G₁ 期,而对恶性细胞,有的是作用于 G₁ 期^[1-3],有的作用于 S 期^[4-6]、或 G₂ 期^[5,7,8]。因而可使用 cAMP 及其衍生物来探索培养人肿瘤细胞增殖失调的机理,对于深入探讨人肿瘤的发生、发展以及细胞增殖的抑制。从已有资料来看,双丁酰 cAMP 对人恶性肿瘤

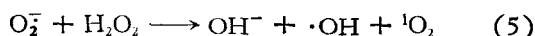
上皮细胞影响的研究报道不多。我们在过去工作^[9]的基础上,采用流式细胞光度术 (FCM) 测定技术以及其它有关参数相结合的方法,探索双丁酰 cAMP 对人体胃腺癌细胞周期进程的影响进行了比较研究。

材料及方法

一、材料及试剂

人体胃腺癌细胞 (SGC-7901) 的单层培养

催化 O₂⁻ 发生歧化反应速度很快,在产生 O₂⁻ 的系统——黄嘌呤氧化酶 (XO)、黄嘌呤 (X) 或次黄嘌呤 (HX) 系统中,10ng/ml SOD 抑制程度可达 90% 以上^[4],而这里所用的 SOD 浓度比 XO-HX 系统中所用的要高 10⁴ 倍,这说明就单独 O₂⁻ 而言,并不能说明吞噬发光作用。同等浓度的甲酸钠或苯甲酸钠与 DMF 相比,DMF 的抑制作用十分显著,这说明在粒细胞吞噬发光中,单线态氧 ¹O₂ 的作用是主要的。单线态氧是分子氧(基态)中两个未偶电子的自旋方向颠倒后产生的激发态产物,反应活性很高。已有实验证明,¹O₂ 可以由 O₂⁻ 的自发歧化产生,也可以由 O₂⁻ 和 H₂O₂ 反应生成:



反应(5)称为 Haber-Weiss 反应。反应中还生成了活性很高的 $\cdot\text{OH}$ 自由基,这可以解释甲酸钠或苯甲酸钠以及单独甲醇所具有的抑制作用。但是单独的 O₂⁻ 或 H₂O₂ 似乎对吞噬发光作用都不重要。¹O₂ 除了上述的产生途径外,

是否还有别的途径,DMF 本身对粒细胞吞噬作用是否有影响等问题尚待深入研究。

本文承吴蔚教授审阅,特此致谢。

参考文献

- [1] Allen, R. C.: *Photochem. Photobiol.*, **30**, 157, 1979.
- [2] Gabig, T. G. et al.: *Superoxide Dismutase*, Vol. II, 1—3, 1979, Ed. L. W. Oberley, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- [3] 李益新等:《上海免疫学杂志》5(1): 25, 1985.
- [4] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》, **2**, 59, 1983.
- [5] Trush, M. A. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol LVII, 462—494, 1978, Ed. M. A. Deluca, Academic Press, New York.
- [6] Allen, R. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 679—684, 1972.
- [7] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》, **3**, 38—41, 1983.
- [8] Bodaness, R. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 8554—8560, 1977.

[本文于 1984 年 8 月 18 日收到]

物,生长于含 15% 小牛血清的 Eagle 培养液中(含青、链霉素)。

双丁酰 cAMP 及丁酸钠,均以盐水或单纯 Eagle 液配成贮备液(保存 1—2 周)。

二、方法

1. 双丁酰 cAMP 对 SGC-7901 细胞增殖和细胞形态影响的观察方法

以 $3-3.5 \times 10^4$ 个细胞/毫升的密度接种。接种后 24—48 小时,实验组换 $10^{-3}M$ 双丁酰 cAMP 的培养液,对照组换正常培养液。隔天分别换相应培养液。加药前及加药后 1、2、3 及 4 天各取 2—3 瓶进行细胞计数,求出平均值,并观察细胞形态变化。

2. 双丁酰 cAMP 对 SGC-7901 细胞周期分布影响的观察方法

细胞接种后 18—24 小时,实验组分别换 $10^{-3}M$ 双丁酰 cAMP 或 $3 \times 10^{-3}M$ 丁酸钠的培养液。对照组换正常培养液。培养 2 天后,分别进行下述测定:

1) 以台盘蓝 (Trypan blue) 排除法测定活细胞比率。

2) 进行细胞有丝分裂指数 (MI) 的测定。

3) DNA 荧光染色和 FCM 分析: 70% 酒精固定后的细胞,按 Dean 等^[10]的方法,用碘化丙锭 (Propidium iodide, PI) 进行荧光染色,再用 FACS III 型荧光激活细胞分类器 (Becton-Dickinson) 测定每个细胞的 DNA 荧光强度: 氩离子激光器的激发波长为 514nm,细胞的 DNA 荧光通过 570nm 阻断滤片后,由光电倍增管检测,多道脉冲分析器分析。数据通过接口,直接贮存于 Cromenco 2D 微计算机的磁盘上,按 Dean 和 Jett 的多正态拟合程序进行曲线拟合分析,计算出 G_1 、S、 $G_2 + M$ 各组细胞所占百分比。

3. 细胞 MI 的动态观察(去药物后)

生长于盖片上的 SGC-7901 细胞,以双丁酰 cAMP (1mM) 或丁酸钠 (3mM) 预处理 2—3 天,然后换入正常培养液中培养。在一定时间间隔各取二个盖片固定及染色。计数 1000 个细胞中的有丝分裂细胞的数目。

实验结果

一、双丁酰 cAMP 对 SGC-7901 胃腺癌细胞形态和细胞增殖的影响: 实验组经双丁酰 cAMP 处理 1 天后即可观察到细胞形态的改变,由多角形上皮样细胞逐渐变成长梭形或有长突的多角形等形态,48 小时后更为明显。随药物处理时间的加长,细胞对容器壁的粘着性也增加。对细胞生长抑制情况见图 1。

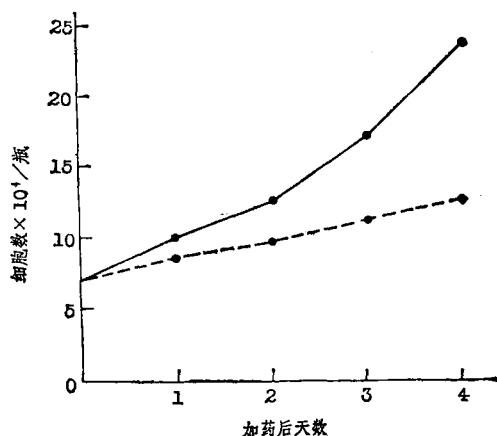


图 1 双丁酰 cAMP 对 7901 细胞生长的抑制

— 对照组, ---- 加双丁酰 cAMP 组

二、双丁酰 cAMP 对 SGC-7901 细胞周期分布的影响:

1. 以台盘蓝排除法测定对照组及双丁酰 cAMP 实验组活细胞的比率均占 98% 左右。

2. MI 的测定结果: 对照组为 2.6%, 双丁酰 cAMP 组为 1.8%。

3. FCM 的分析结果: 以 FACS III 进行 FCM 分析,细胞 DNA 相对含量的测定结果如图 2 所示。从图 2 中可看到各组均有两个峰,左侧的高峰为 G_1 期的细胞,右侧的小峰为 $G_2 + M$ 期的细胞,两峰之间的区域为 S 期的细胞。双丁酰 cAMP 作用 2 天后,处于 $G_2 + M$ 期的细胞比例增加(对照组: 11.66%, 双丁酰 cAMP 组: 20.31%),而 G_1 期的细胞比例则减少(对照组: 58.64%, 双丁酰 cAMP 组: 50.24%)。由于双丁酰 cAMP 组 MI 的数值是低于对照组,这提示 $G_2 + M$ 期细胞的增加

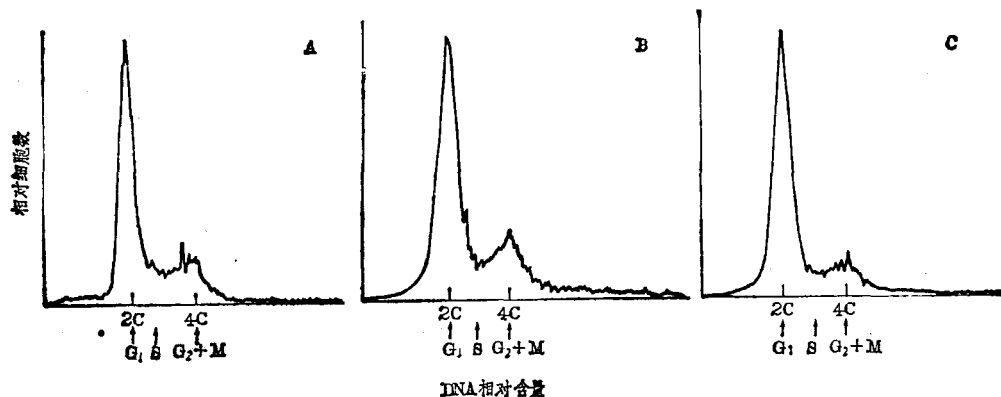


图2 双丁酰 cAMP (1mM) 及丁酸钠 (3mM) 对 7901 细胞周期的影响(处理 48 小时)

A. 对照组, B. 双丁酰 cAMP 组, C. 丁酸钠组

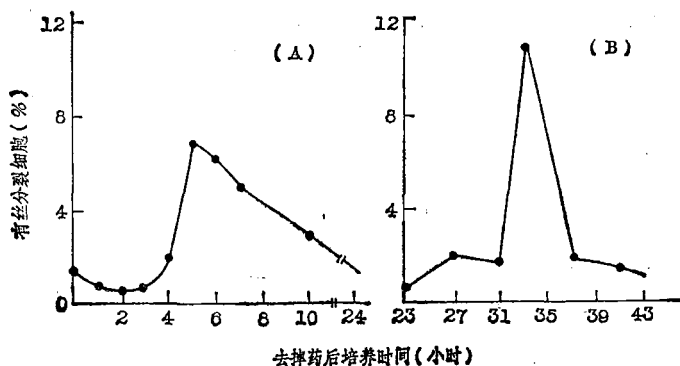


图3 双丁酰 cAMP (1mM) (A), 丁酸钠 (3mM) (B) 处理 7901 细胞 3 天, 撤去药物后的 MI 的变化

不是由于 M 期细胞增加所致。丁酸钠作用后 2 天, 处于 G_1 期的细胞比例增加 (68.92%), 而 S 期细胞比例减少 (对照组: 29.70%, 丁酸钠组 19.50%)。

三、药物抑制的可逆性实验观察

以双丁酰 cAMP 处理的细胞 MI 的动态观察表明, 在换入正常培养液后 5 小时出现 MI 峰值 (图 3A), 而以丁酸钠处理的细胞, 在换入正常培养液后, 两次实验分别在 28 及 33 小时出现 MI 高峰。图 3B 示后一次实验结果。

讨 论

本实验观察到人胃腺癌细胞经双丁酰 cAMP 作用后的形态改变和前人报道的一致, 实验组细胞较对照组细胞难以从瓶壁上消化脱落。1mM 双丁酰 cAMP 可抑制 SGC-7901 细

胞的生长。FCM 测定的细胞周期分布结果表明, 双丁酰 cAMP 组的 $G_2 + M$ 期的细胞比例增加, G_1 期细胞比例则相应减少; 而在 MI 测定结果中, 双丁酰 cAMP 细胞的 MI 低于对照组, 说明双丁酰 cAMP 阻断 SGC-7901 细胞于 G_2 期。进一步从药物抑制的可逆性实验观察, 撤去双丁酰 cAMP 后 5 小时, MI 出现峰值 (图 3A), 根据细胞周期时相分布的概念 (G_2 期约为数小时) 可以认为细胞是被阻断于 G_2 早期或 S- G_2 期间。这一结果说明 cAMP 及其衍生物对于不同类型细胞的阻断作用是不同的。Jastorff^[11] 提出这些差异可能是由于 cAMP 和它的受体蛋白质间分子相互作用的类型不同所致。Küng 等^[12] 认为 1mM 双丁酰 cAMP 对人乳腺 MCF-7 细胞的作用可能是由于其中的丁酸成分所产生的。我们对丁酸钠 (3mM) 处

用病毒探针研究紫外线诱导的 DNA 损伤的致死效应

苏兆众 罗祖玉

(复旦大学生物系生物物理组, 上海)

胡蓓华

(上海财经学院经济信息系)

紫外线 (254nm) 能诱导一系列 DNA 损伤。嘧啶二聚体是至今所知的主要损伤产物^[1]。然而, 由于细胞基因组结构和复制方式的复杂性以及 DNA 损伤修复途径的多样性, 定量地研究特定 DNA 损伤的生物学效应是困难的。微小病毒是一种良好的探针, 因它们有特有的基因组结构和复制方式, 它们已被成功地用于探测细胞的诱发性易错修复功能和突变过程^[1,5,13]。在此项研究中, 自主性微小病毒 MVM (Minute Virus of Mouse) 被用做探针。它的基因组由一个含有五千多个核苷酸的单链线状 DNA 分子组成, 其复制过程包括通过延伸 3' 端自我引物把单链亲代 DNA 变成双链的复制形

式、加倍复制形式和合成子链等三个步骤^[6]。如果在亲代单链上存在复制阻遏性损伤, DNA 复制过程就无法完成。我们用不同剂量的紫外线照射 MVM, 作出受损病毒的存活曲线; 分析了在一定辐射剂量下含胸腺嘧啶的二聚体的形成率, 再换算成一定辐射剂量下嘧啶二聚体的形成率, 比较遗传与生化实验结果, 可以说明嘧啶二聚体的形成是受照射病毒失活的主要原因。

一、材料与方 法

1. 细胞及其培养条件 小鼠 L 细胞系 A9 细胞株^[7] 单层贴壁生长于塑料培养皿中, 用含

理 2 天后的 SGC-7901 细胞所进行的 FCM 分析表明, G₁ 期的细胞比例增加, S 期的细胞比例减少 (图 2); 在丁酸钠 (3mM) 抑制的可逆性实验中观察到, 在换入正常培养液后 28 及 33 小时, SGC-7901 细胞的有丝分裂指数达到最高峰, 这说明丁酸钠阻断细胞于 G₂ 期。薛绍白等使用丁酸钠阻断 HeLa 细胞于 G₁ 早期, 其他一些作者使用 Friend 细胞、CHO 细胞以及 HTC 细胞也得出类似结果。丁酸钠似能特异地阻断细胞于 G₁ 期。有人提出丁酸钠和双丁酰 cAMP 对细胞均可产生某些类似效应, 但二者作用不尽相同。我们的实验结果支持后一观点。

参 考 文 献

[1] Rozenfurt, E. and Pardee, A. B.: *J. Cell Physiol.*

80, 273—280, 1972.

[2] O'Neill, J. P. et al.: *Exp. Cell Res.*, 97: 213—217, 1976.

[3] Knightbridge, A. and Ralph, R. K.: *Mol. Cell Biochem.*, 34, 153—164, 1981.

[4] Williams, G. M. *Cancer Letter*, 2, 237—246, 1977.

[5] Tayler-Papadimitriou, J.: *Int. J. Cancer*, 13, 404—411, 1974.

[6] Van Meeteren, A. et al.: *In Vitro*, 18, 891—899, 1982.

[7] Smets, L. A.: *Nature New Biol.*, 239, 123—124, 1972.

[8] Stambrook, P. J. and Velez, C.: *Exp. Cell Res.*, 99, 57—62, 1976.

[9] 王代树、赵孟莲: 《解剖学报》, 14, 87—92, 1983.

[10] Dean, P. N. et al.: *Cytometry*, 3, 188, 1982.

[11] Jastorff, B.: In 'Cell regulation by intracellular signals' (Edited by Stephane Swillens and Jacques E. Dumont), Plenum Press, New York, 1982.

[12] Küng, W. et al.: *Cell Biol. Int. Rep.*, 7, 345—351, 1983.

[本文于 1985 年 1 月 3 日收到]