

## MNNG 对细胞 DNA 合成及其分布的影响\*

曹恩华 辛淑敏 吴维 曹绍桀 张幼苓 林波海

(中国科学院生物物理研究所,北京)

### 提 要

本文用流式细胞光度术 (FCM) 等方法研究了 MNNG, ENNG 和 DMS 对 HeLa 细胞 DNA 含量分布的影响。经 MNNG ( $6.8\mu\text{mol/L}$ ) 处理后, 细胞分裂减少, DNA 合成速率下降, S 期细胞的比例随处理时间的延长而增加。DMS 显示有类似的现象而 ENNG 的效应则较小。

**关键词** 流式细胞光度术, DNA, N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍, HeLa 细胞

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG), N-乙基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (ENNG) 和硫酸二甲酯 (DMS) 具有强烈的烷基化作用, 在体内和体外均能迅速地与 DNA 反应, 形成多种加成物, 这些产物具有致突、致癌作用<sup>[1,2]</sup>。一些研究表明烷基化的位置对其生物学效应有重要影响, 认为鸟嘌呤 N<sup>7</sup> 位烷基化与细胞毒性有关, 而鸟嘌呤 O<sup>6</sup> 位的烷基化则是致突的主要因素<sup>[3]</sup>。本文采用流式细胞光度术 (flow cytometry FCM) 首次观察了 MNNG, ENNG 和 DMS 三种不同功能的烷化剂对 HeLa 细胞 DNA 含量及细胞周期各时相分布的影响。

### 材 料 和 方 法

**细胞** HeLa CCL2 细胞株, 生长在 15% 的小牛血清, 3mmol/L 谷氨酰胺, 青霉素 100 单位、链霉素 0.1mg/ml 的 199 培养基中。每毫升  $10^5$  细胞悬液接种到玻璃培养瓶中, 生长 24h 后用药物处理, 对照组在相同的条件下保持 5 天的生长周期, 对照组细胞倍增时间为 22h, 细胞存活率大于 90%, 细胞存活率使用台盼蓝染料排斥方法进行<sup>[4]</sup>。

放射自显影及 DNA 合成速率参照文献 [5] 的方法进行。每毫升  $10^4$  细胞生长在放有载玻片的 60mm 的培养皿中, 用  $7.4 \times 10^4 \text{ Bq/ml}$  [<sup>3</sup>H] TdR ( $2.8 \times 10^{12} \text{ Bq/mmol}$ , New En-

gland Nuclear) 处理 20 min。载玻片浸入 Kodak NTB<sub>2</sub>-0.05% 的十二烷基硫酸钠的混合物中, 涂有乳胶的片子在暗盒中放 5d。显然以后用 Giemsa 染色 pH 5.75。有丝分裂指数以每 1000 个细胞中所含的中期细胞数表示。单层培养的细胞用  $3.7 \times 10^4 \text{ Bq/ml}$  [<sup>3</sup>H] TdR 处理 2h 后用 Hank 溶液洗, 经胰酶消化, 细胞悬浮液用滤纸法, 在 Beckman 液闪仪上测定。计算每个细胞 DNA 合成速率。

**药物处理** MNNG, ENNG 和 DMS 均为 Sigma 产品, 用无水乙醇配制成 500  $\mu\text{g/ml}$  的溶液, -20°C 冰箱保存。处理细胞前按实验要求用培养基稀释并立即加到培养瓶中, 对照组加入等量的用培养基稀释的无水乙醇。

**FCM 分析** 1. 细胞悬液的制备, 贴壁生长的 HeLa 细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) 小心洗涤后, 加少量的 0.25% 胰酶消化后, 立即加入 5ml PBS, 用吸管将细胞吹打成悬液移入离心管中, 用 PBS 洗涤 2 次, 留下 0.5ml 的细胞悬液, 用注射器将细胞迅速注入冰冷的 70% 乙醇中, 保存于 4°C 冰箱中备用。2. 染色: 将乙醇固定的细胞 (每个样品含细胞  $10^6$  个), 离心去除乙醇, 用 PBS 洗 2 次, 弃去上清液, 留下约 0.5ml, 加入 RNase (结晶 Seraral Labora-

\* 国家自然科学基金资助项目, 3860155

lies LTD 英国) 1—2 滴 (40  $\mu\text{g/ml}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  保温 30min 后立即放冰浴中停止 RNase 的作用, 加 PBS 至 2.0 ml, 然后加入溴化乙锭 (EB) 100 $\mu\text{l}$  于上述细胞悬液中 (EB 最终浓度为 50  $\mu\text{g/ml}$ ) 摇匀, 样品在冰浴中避光放置 30min 后备用。3. FCM 测定: 用 FCM-1 型流式细胞光度计进行细胞 DNA 含量分布测定, 该机由中国科学院生物物理研究所研制, 数据处理是由 IBM 微机完成。以输出功率为 2W 的氩离子激光器作激发光源, 激发波长为 488nm, 细胞发出的荧光信号被光电倍增管接收, 放大后的信号送到带有多道脉冲分析器功能的计算机上以一维直方图显示, 图形和数据输入计算机或打印在记录纸上。使用前仪器用鳖血调试。细胞类型分布、细胞百分率的估计参照文献[6]的方法。

## 结 果

### 一、MNNG 对细胞生成的影响

在最初的 24h 内 6.8 $\mu\text{mol/L}$  的 MNNG 对细胞生长影响不大, 细胞倍增时间大于 24h, 存活的细胞下降到 80%。当浓度为 10.2 $\mu\text{mol/L}$ , 活细胞数的增加受抑制, 细胞总数增加缓慢。浓度为 13.6  $\mu\text{mol/L}$  时, 呈现高度的细胞毒性, 活存的细胞减少到 20%, 细胞总数也随之缓慢下降 (表 1)。

图 1 表明 HeLa 细胞经 MNNG (6.8 $\mu\text{mol/L}$ , 2h) 处理后细胞分裂减少, 有丝分裂指在 17h 时达最低水平。虽然 [ $^3\text{H}$ ]TdR 参入的细胞数增加, 但细胞 DNA 合成速率下降。平均每个细胞的合成速率下降 50%。在相同条件下 [ $^3\text{H}$ ]TdR 标记的间期细胞占细胞总数的 70%, 未经 MNNG 处理的对照组平均为 38% (图 1)。

### 二、DNA 含量的 FCM 分析

用 6.8 $\mu\text{mol/L}$  MNNG (图 2 的 4) 处理 24 h 后 C (S 期)、d (S 后期和  $G_2 + M$  期) 部分细胞比例增加, 并随加入 MNNG 后的培养时间延长而加大 (图 2 的 7、8、9), 96h C 和 d 部分的细胞分别增加 2.3 倍和 2.2 倍, 而 b 部分

表 1 MNNG 对 HeLa 细胞生长的影响  
Table 1 Effect of MNNG on the growth of HeLa cells

| 组别<br>groups | 剂量<br>Dose             | 时间(小时)<br>time(h) | 存活率%<br>viable | 存活细胞总数<br>total $\times 10^3$ |
|--------------|------------------------|-------------------|----------------|-------------------------------|
| 1            | 0                      | 24                | 97.5           | 3.8                           |
|              |                        | 48                | 96.0           | 7.0                           |
|              |                        | 72                | 94.0           | 15.0                          |
|              |                        | 96                | 94.0           | 30.1                          |
| 2            | 6.80 $\mu\text{mol/L}$ | 24                | 95.0           | 3.0                           |
|              |                        | 48                | 94.0           | 4.3                           |
|              |                        | 72                | 85.0           | 6.0                           |
|              |                        | 96                | 80.0           | 10.0                          |
| 3            | 10.2 $\mu\text{mol/L}$ | 24                | 84.0           | 2.6                           |
|              |                        | 48                | 80.0           | 3.2                           |
|              |                        | 72                | 65.0           | 4.0                           |
|              |                        | 96                | 50.0           | 4.8                           |
| 4            | 13.6 $\mu\text{mol/L}$ | 24                | 70.0           | 2.4                           |
|              |                        | 48                | 40.0           | 2.3                           |
|              |                        | 72                | 30.0           | 2.0                           |
|              |                        | 96                | 20.0           | 1.8                           |

Cultures were set up at  $10^5$  cells/ml 24h before MNNG exposure. Viable cells only were counted. Each datum represents the mean of 3 experiments.

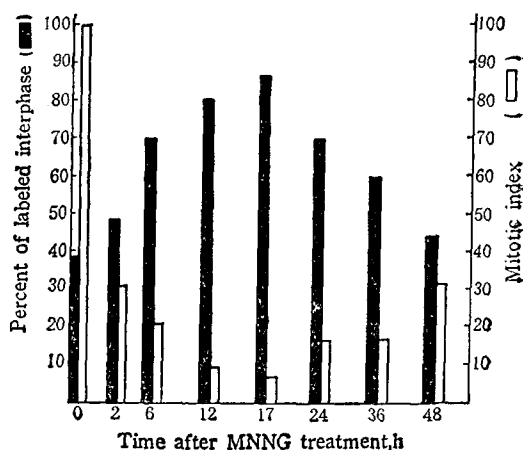


图 1 MNNG (6.80  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 HeLa 细胞分裂和 [ $^3\text{H}$ ] TdR 掺入 DNA 的影响

Fig. 1 The effect of MNNG 6.8  $\mu\text{mol/L}$ , on Cell division of a random population of HeLa cells and the incorporation of [ $^3\text{H}$ ] TdR into DNA.

a: percent of interphase cells incorporating [ $^3\text{H}$ ] TdR following 2h MNNG exposure, (■) control averages are 38% at each point. b: The effect of 2h MNNG exposure on Mitotic index of a random population of HeLa cells, (□) control mitotic index is expressed as 100%.

(G<sub>1</sub> + S 前期)细胞下降为原来的 45%。其它 2 种浓度 (10.2 μmol/L 和 13.6 μmol/L) 的 MNNG 也引起类似的变化, 并出现 DNA 含量

较低的碎片 (a 部分) 但在对照组和 6.8 μmol/L 剂量组中没有观察到 (图 2 的 5, 6) 随 MNNG 浓度增高, 或延长处理时间, a 部分的比例增

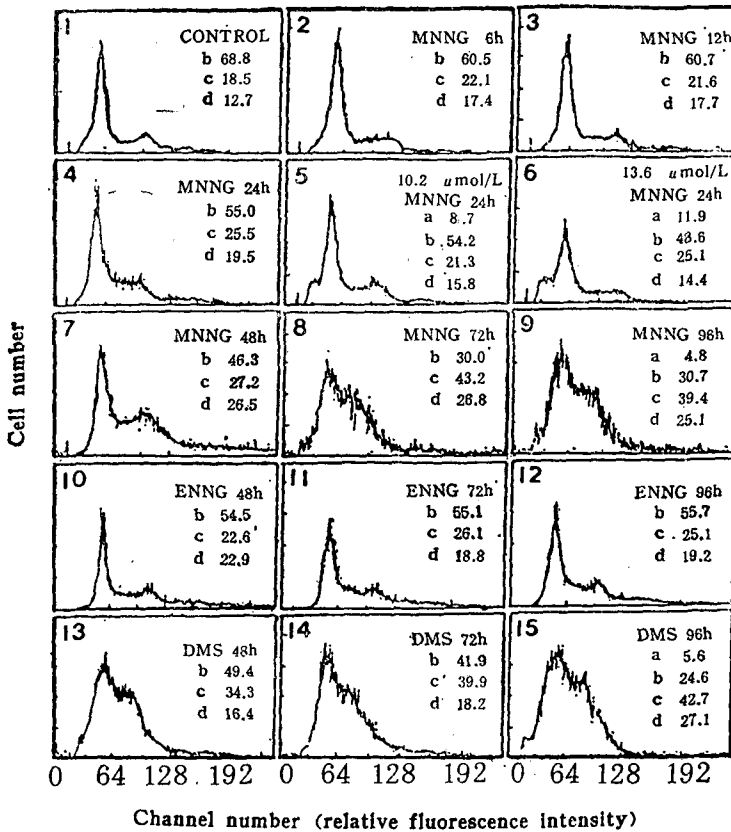


图 2 MNNG、ENNG 和 DMS 对 HeLa 细胞 DNA 分布的影响

Fig. 2 Effect on MNNG, ENNG and DMS on the pattern of DNA distribution in HeLa cells

Number 2—4, 7—15: 6.80 μmol/L, The percentage of cells showed in above figures a: channels 16—39, b: channels 40—59 c: channel 60—98 d: channels 99—125

加。

### 三、三种烷化剂作用的比较

ENNG 与 MNNG 相比较, 相同浓度时 (图 2 的 10、11、12) 只能引起 C 部分细胞比例少量增加, 而 d 部分不明显。但相同浓度的 DMS 对细胞却有明显的影响 (图 2 的 13、14、15), 96h 后 C 部分细胞是对照组的 2.4 倍, d 部分的细胞增加 2.3 倍。

## 讨 论

本文用 FCM 观察到 MNNG 处理的细胞其 S 期细胞的增加是与放射自显影及液闪技

术所观察到的有丝分裂指数下降, [<sup>3</sup>H]TdR 标记的间期细胞数的增加及 DNA 合成速率的下降相吻合的。在此基础上我们比较了 MNNG、ENNG 和 DMS 三种烷化剂对 DNA 含量, 细胞周期各时相的分布的影响。应着重指出这三种烷化剂的性质是不同的, MNNG, ENNG, DMS 的 N<sup>7</sup> 烷基鸟嘌呤的产额分别为 68%, 11%, 83%。O<sup>6</sup> 烷基鸟嘌呤的产额分别为 7.5%, 7%, 0.2%<sup>[7]</sup>。从三种烷化剂处理的 HeLa 细胞的 DNA 分布图可见影响 S 期细胞的累积可能与 N<sup>7</sup> 位烷基化有关, 即与细胞毒性或者说与 DNA 碱基不稳定位置的损伤相关,

而 O<sup>6</sup> 位置的烷基化是细胞突变的主要因素之一,对 S 期细胞累积可能不是很重要的。

Taylor 等人<sup>[8]</sup>在用 MTX 处理的人白血病 T 细胞的实验中,第一次观察到 DNA 含量较低的“颗粒”,本文用 MNNG 处理的细胞也出现类似的现象,当药物处理的时间延长时,DMS 组在 G<sub>1</sub> 峰前也出现小峰。这是细胞毒性的反映,可能由于 DNA 产生变性所致,其中部分细胞病变严重出现死亡和裂解<sup>[9]</sup>。

### 参 考 文 献

1 Pegg A E. *Reviews in biochemical toxicology*. New

York: Elsevier, 1983: 83—133

2 Setlow R B *et al.* *N-nitroso compounds, occurrence, biological effects and relevance to human cancer*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1984: 561—570

3 Pegg A E. *Cancer Investigation*, 1984; 2: 223—231

4 Phillips H J. *Tissue Culture, Methods and Applications*. New York and London: Academic press, 1973: 406—408

5 Kelly F *et al.* *Mutation Res*, 1970; 10: 237—246

6 Krishan A. *J Cell Biology*. 1975; 66: 188—193

7 Singler B *et al.* *Ann Rev Biochem*, 1982; 52: 655—693

8 Taylor I W *et al.* *Flow cytometry universitetsforlaget*. 1980: 516—521

9 Searle J *et al.* *J Path*, 1975; 116: 129—138

[本文于 1989 年 3 月 11 日收到]

## EFFECTS OF MNNG ON DNA SYNTHESIS AND ITS DISTRIBUTION IN CELLS

Cao Enhua Xin Shumin Wu Wei Cao Shaoqi Zhang Youling Lin Bohai  
(The Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

### ABSTRACT

The effect of three alkylation agents MNNG, ENNG and DMS on HeLa cells grown in culture were examined and the pattern of DNA distribution in cells were analysed by flow cytofluorometry. The results show the cell division was partly inhibited and the rate of DNA synthesis in cells decreased after treatment of MNNG. The proportion of cells in S phase increased with increasing of exposure time to above control levels. DMS shown a similar phenomenon but ENNG only caused a little increase of S phase cells.

**Key words** Flow cytofluorometry, DNA, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, HeLa cell

### 应用技术培训班讯息

北京市星火技术研究所与某外贸厂联合举办下列应用技术培训班:

(1) **胆红素瞬取法** 国内首创,不用氯仿,不用煤火加热,只需往胆汁里加几种化学药品,10分钟左右即可出含量在 90% 以上的精品。本所指导产品销售并提供 48 家产品收购单位地址。培训费:单位 500 元,个人 400 元。函授费:单位 150 元,个人 100 元。

(2) **第三代血红素生产技术** 血红素是从动物血

液中提取的抗癌新药,生产利润高。本技术不用电,不加热,不用冰醋酸,40 分钟出精品,投资 200 元即可生产,300 公斤猪血可提取 1 公斤血红素。培训费:单位 400 元,个人 350 元;函授费:单位 150 元,个人 100 元。

汇款及通讯处:北京 867 信箱 20816 组李涵,邮政编码:100024 (汇款时请注明学习名称,来信咨询请附四角邮资)。本所安排到京用户食宿,费用自理。