

# 维甲酸和维甲类 II 号对两种体外培养细胞 非程序性 DNA 合成(UDS)的影响

潘琼婧 薛新华 傅明 程书钧

(中国医学科学院肿瘤研究所, 北京)

紫外线作用于细胞后, 损伤 DNA 并进行非程序性 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis, 简称 UDS)<sup>[1-3]</sup>, 所以非程序性 DNA 合成可作为 DNA 损伤的观察指标。化学致癌物也损伤 DNA, 近年来以体外培养的动物或人的细胞的非程序性 DNA 合成作为化学致癌物的生物测定法常有报道<sup>[4-8]</sup>。我们曾从 24 种维甲酸衍生物中用体外长期培养的 Eca 109 细胞系筛选出 II 号衍生物对细胞增殖有明显抑制作用, 为了进一步了解维甲酸(RA)和维甲类 II 号(RA II)是否损伤 DNA, 观察了这两种药物对 Eca109 细胞和 V79 细胞引起的非程序性 DNA 合成, 并与已知致癌物 MNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)对这两种细胞的作用进行了比较, 同时还试验了 RA 和 RA II 对 MNNG 损伤 DNA 的影响。

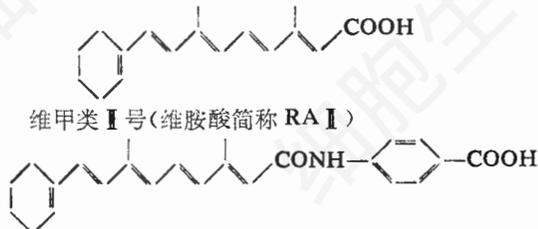
## 材料与方 法

### 一、细胞培养

人食管癌上皮细胞系 Eca 109 和中国地鼠肺成纤维细胞系 V 79, 均为单层培养细胞。Eca 109 细胞培养于含 20% 小牛血清的 MEM Eagle 培养液, 密闭培养。V 79 细胞培养于含 10% 小牛血清的 MEM Eagle 培养液, 在 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

### 二、药物与稀释

β-全反式维甲酸(简称 RA)



由中国医学科学院药物研究所合成, 均不溶于

水, 溶于丙酮, 95% 乙醇或二甲基亚砜, 本实验均用丙酮为溶剂。将 RA 或 RA II 溶于丙酮, 使成 10 毫克/毫升的溶液, 加小牛血清, 使成 1000 微克/毫升溶液, 再用培养液稀释为所需浓度的含药培养液。

羟基脲(HU): Sigma 厂产品。用磷酸缓冲液(PBS)溶解, 配成 60.8 毫克/2 毫升的溶液, 临用前配制。取 50 微升加到每瓶 2 毫升的培养液中, 最终浓度为 10 mM。

[甲基-<sup>3</sup>H]胸腺嘧啶核苷: 中国科学院上海原子能研究所产品。比度 27.2 居里/毫克分子。加到培养液后最终浓度为 10 微居里/毫升。

MNNG(N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍): Sigma, 用丙酮溶解, 配成 3 微克/毫升溶液( $\frac{\text{MNNG}(\text{微克})}{300} \times 0.5 = \text{溶 MNNG 的丙酮量}$ ), 取 10 微升加到每瓶 2 毫升培养液中。

丙酮: 分析纯, 北京酒精厂。

### 三、UDS 试验

羟基脲抑制 S 期的半保留 DNA 复制, 对 DNA 修复合成无抑制作用<sup>(4)</sup>。利用羟基脲抑制正常的 S 期 DNA 合成, 观察 RA 与 RA II 对两种细胞引起的非程序性 DNA 合成。用已知致癌物 MNNG 对两种细胞 DNA 的作用作为阳性对照, 同时观察 RA 与 RA II 对 MNNG 引起两种细胞非程序性 DNA 合成的影响, 以单独加羟基脲和丙酮加羟基脲作为阴性对照。

将 Eca 109 细胞种于培养瓶内培养 4 天, V 79 细胞培养 2 天, 倒去原有培养液, 空白对照组换不含任何药物的新鲜培养液, 丙酮对照组换含 0.5% 丙酮的培养液, 实验组换含 RA 10 微克/毫升或 RA II 10 微克/毫升的培养液, 每瓶 2 毫升, 同时加 3 微克/毫升 MNNG 溶液 10 微升。观察 RA 与 RA II 直接对细胞 UDS 影响的不加 MNNG, 阳性对照只加 MNNG, 1 小时后用 PBS 洗两遍, 换含 20% 小牛血清的 MEM Eagle 培养液(V79 细胞换含 10% 小牛血清的 MEM Eagle 培养液), 每瓶加 60.8 毫克/2 毫升浓度

的羟基脲 50 微升到 2 毫升培养液中, 2 小时后加  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶核苷, 最终浓度为 10 微居里/毫升, 作用 2 小时, 倒去加药培养液, 用含 1 微克/毫升 胸腺嘧啶核苷的 PBS 洗三遍, 再用预置 4 °C 冰箱的冷甲醇固定 5 分钟。取出培养瓶内有细胞的小盖玻片, 在室温下干燥。次日将小盖玻片用少量树胶粘于载玻片上, 有细胞的一面向上, 在 45 °C 温箱中放 1—2 日, 用冷的 5 % 三氯醋酸(放在 4 °C 冰水中)作用 30 分钟, 共两次。水冲洗三次, 每次 4 分钟。70 % 酒精 两次, 每次 1—2 分钟。再置 45 °C 温箱中过夜。涂薄层液体核乳胶, 作放射自显术。在 4 °C 冰箱中曝光一周, 显影, 定影后, 用 Giemsa 染液染色。每组实验在显微镜油镜下按顺序数 100 个细胞核内的放射颗粒数, 计算每组细胞的平均颗粒数, 用 T 检验进行组间比较。

## 结 果

### 一、两种细胞的 S 期 DNA 合成和非程序

### 性 DNA 合成的形态观察

两种细胞的正常 S 期细胞经  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶掺入后, 细胞核内的放射颗粒, 常密集成小团, 难以计数(图 1, 4)。用羟基脲将 S 期 DNA 合成抑制后, 只有很少量细胞有少量分散的颗粒。经 MNNG 作用后引起细胞的 UDS, 则显示有放射颗粒的细胞较多, 每个细胞的颗粒数较少并分散(图 2, 5)。

### 二、RA 或 RA II 作用 Eca109 和 V79 细胞后两种细胞的非程序性 DNA 合成

RA 或 RA II 作用细胞 1 小时后, 对两种细胞的 UDS 的影响, 见表 1。

两种细胞经 RA 或 RA II 作用后与单加羟基脲组比较或与丙酮加羟基脲组比较, 组间差别不显著。丙酮组与单加羟基脲组相比, 组间差别也不显著。说明丙酮作为溶剂在 0.5 % 浓度

表 1 RA 与 RA II 对两种细胞的 UDS 影响

细胞	作用物	浓度	放射颗粒平均数/核	P 值(T 测定)与丙酮组比
Eca 109	丙酮	0.5%	4.92	
	—		4.73	>0.05
	MNNG	0.03 微克/2 毫升	16.98	<0.001
	RA	10 微克/毫升	7.53	>0.05
	RA II	10 微克/毫升	5.94	>0.05
V 79	丙酮	0.5%	4.34	
	—		5.44	>0.05
	MNNG	0.03 微克/2 毫升	8.69	<0.001
	RA	10 微克/毫升	4.40	>0.05
	RA II	10 微克/毫升	4.93	>0.05

表 2 RA 与 RA II 对 MNNG 引起两种细胞 UDS 的影响

细胞	作用物	浓度	放射颗粒平均数/核	P 值(T 测定)	
				与 MNNG 组比较	与丙酮组比较
Eca 109	丙酮	0.5%	4.92		
	MNNG	0.03 微克/2 毫升	16.98		<0.001
	RA + MNNG	10 微克/毫升 + 0.03 微克/2 毫升	17.1	>0.05	<0.001
	RA II + MNNG	10 微克/毫升 + 0.03 微克/2 毫升	14.39	>0.05	<0.001
V 79	丙酮	0.5%	4.34		
	MNNG	0.03 微克/2 毫升	8.69		<0.001
	RA + MNNG	10 微克/毫升 + 0.03 微克/2 毫升	8.99	>0.05	<0.001
	RA II + MNNG	10 微克/毫升 + 0.03 微克/2 毫升	8.87	>0.05	<0.001

下不损伤两种细胞的 DNA, RA 或 RA II 在 10 微克/毫升浓度下作用一小时,也不损伤两种细胞的 DNA。而阳性对照 MNNG 组与丙酮组相比,则有显著差别,说明在 0.03 微克/2 毫升浓度的 MNNG 与细胞作用一小时,对两种细胞的 DNA 有明显的损伤并有 DNA 修复。

### 三、RA 与 RA II 对受 MNNG 作用的 Eca 109 或 V79 细胞的 DNA 损伤的影响

RA 或 RA II 各 10 微克/毫升与 MNNG 同时作用细胞一小时,用羟基脲抑制 S 期 DNA 合成,计算 100 个细胞核内的放射颗粒数,结

果列于表 2。

RA 或 RA II 与 MNNG 同时作用细胞,同单加 MNNG 组比较, T 测定组间差异不显著,表示 RA 与 RA II 在 10 微克/毫升浓度下不促进也不抑制 MNNG 对两种细胞的 DNA 损伤。

### 四、UDS 放射颗粒数在两种细胞(各 100 个细胞)内的分布

分析两种细胞在 RA, RA II 和 MNNG 作用后各 100 个细胞内的 UDS 放射颗粒分布情况见表 3。

表 3 两种细胞 UDS 放射颗粒数的分布

细 胞	作 用 物	细 胞 数					
		0—10	10—20	20—30	30—40	40—50	50粒/核
Eca 109	MNNG, Hu	36	32	23	5	2	2
	丙 酮, Hu*	7 78	2	1	4		
	Hu	14 63	19	4			
	RA, MNNG, Hu	37	30	19	11	1	2
	RA II, MNNG, Hu	2 48	32	10	8		
	RA, Hu	3 76	18	3			
	RA II, Hu	1 84	11	4			
V 79	MNNG, Hu	14 48	31	7			
	丙 酮, Hu	25 63	12				
	Hu	43 28	27	2	0		
	RA, MNNG, Hu	15 51	21	12	1		
	RA II, MNNG, Hu	21 44	17	17	1		
	RA, Hu	28 57	15				
	RA II, Hu	23 65	12				

\* Hu 不完全抑制 S 期 DNA 合成, 把不抑制的去除, 不足 100 个细胞。

上表中 UDS 放射颗粒的分布情况, 除 V 79 细胞不标记的细胞数(核内 UDS 颗粒数为 0)比 Eca 109 细胞多外, 两种细胞的核内颗粒分布基本上相似。RA 与 RA II 作用细胞后颗粒的分布同丙酮对照组和空白对照组相接近, 不出现 UDS 放射颗粒的细胞和含 1—10 个颗粒的细胞占绝大多数。RA + MNNG 组和 RA II + MNNG 组与 MNNG 组相接近, 每核含 10 个颗粒以上的细胞数增加, 这种颗粒分布情况也说明 RA 与 RA II 不损伤两种细胞的

DNA, MNNG 损伤两种细胞的 DNA 并有非程序性 DNA 合成。RA 与 RA II (浓度为 10 微克/毫升)与 MNNG 同时作用, 不促进也不抑制 MNNG 对两种细胞 DNA 的损伤。

### 讨 论

DNA 损伤, 虽然在大部分情况下可以修复, 但可能影响密码组成、复制和转录的正常功能, 故与变异和致死有关, 近年来已经有一些工作证明多种类型的可修复的损伤是致突变和致癌

的<sup>[9,10]</sup>,非程序性DNA合成可作为测定化学致癌物的指标之一。近年来有大量的工作认为维甲类药物是治疗和预防肿瘤中有潜在功能的药物,而且能诱导细胞分化<sup>[11,12]</sup>,我们的工作也曾观察到维甲酸和维甲类Ⅱ号对体外癌细胞有抑制增殖和促进分化的现象,为了初步检测这两种药物是否对细胞DNA有损伤,是否能促进或抑制已知致癌物对DNA的损伤,进行了RA和RAⅡ对两种细胞的非程序性DNA合成试验,初步结果显示RA与RAⅡ对两种细胞都无明显损伤作用,如与致癌物MNNG同时作用,不促进也不抑制MNNG对两种细胞DNA的损伤。

在分化中的细胞和分化后的细胞,DNA修复合成减低<sup>[13,14,15]</sup>,维甲类药物能诱导动物肿瘤细胞和人癌细胞分化<sup>[11]</sup>,本工作的初步结果显示维甲酸和维甲类Ⅱ号对Eca 109细胞或V 79细胞短时作用后对DNA修复合成无明显影响,分化后的细胞是否在DNA修复合成上有改变,有待进一步研究。

Clerkson与Yamada分别报道羟基脲能促进修复复制<sup>[16,17]</sup>,并能抑制S期的DNA合成,从放射自显影的结果看,羟基脲如完全抑制S期的DNA合成,UDS颗粒明显而易计数。在我们的工作中,5 mM羟基脲对两种细胞的S期DNA合成不能完全抑制,浓度增加到10-mM基本上可起到完全抑制作用。

用放射自显影术分析UDS,要计算每个细胞的颗粒数,比较费时间,但有其一定的优越性,尤其在羟基脲不能完全抑制正常的S期细胞的DNA半保留复制时,在自显影上可以从放射颗粒数量和颗粒的分布情况来区别S期细胞的DNA合成和其他间期细胞核内的非程序性DNA合成,S期DNA合成的放射颗粒

数多,而且常聚集成团,而UDS显示的放射颗粒是分散的单个颗粒。用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶掺入细胞,有的在细胞质中也出现少数放射颗粒,在自显影中可将细胞核和细胞质中的颗粒区分。

### 参 考 文 献

- [1] Rasmussen, R. E. et al. 1964, *Nature* 203, 1360—1362
- [2] Rasmussen, R. E. et al. 1966, *J. Cell Biol.* 29: 11—19
- [3] Cleaver, J. E. 1968, *Nature* 218: 652—656
- [4] Trosko, J. E. et al. 1974, *Exp. Cell Res.* 88: 47—55
- [5] San R. H. C. et al. 1975, *Int. J. Cancer* 16: 284—291
- [6] Williams, G. M. 1977, *Cancer Res.* 37: 1845—1851
- [7] Martin, C. N. et al. 1978, *Cancer Res.* 38: 2621—2627
- [8] Stich, H. F. et al. 1971, *Nature(Lond)* 229: 416—419
- [9] Lehmann, A. R. et al. 1981, *Int. Rev. Cytol.* 72: 106—146
- [10] Hanawalt, P. C. et al. 1972, *Ann. Rev. Biochem.* 48: 783—836
- [11] Soprna, M. B. et al. 1980, *Cancer achievements, Challenges and Prospect for the 1980s*, vol. 1, p. 541—548, edited by Burchenal, J. H. and H. F. Oettgen. Grune & Stratton Rapid Manuscript Reproduction
- [12] Strickland, S. 1979, "Hormone and Cell Culture" p. 671, Sato/Ross, Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation.
- [13] Chan, A. C. et al. 1976, *J. Cell Biol.* 70: 685—691
- [14] Counnis, M. F. et al. 1977, *Dev. Biol.* 57: 47—55
- [15] Hahn, F. M. et al. 1971, *Nature New Biol.* 230:242—244
- [16] Clarkson, J. M. 1978, *Mutation Res.* 52: 273—284
- [17] Yamada, K. et al. 1982, *Gann* 73: 63—69