

γ 线和N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG)组合对HeLa细胞 生物学效应的影响*

曹恩华 王菊君 辛淑敏

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

摘要 本文报道了 γ 线和N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)对HeLa细胞存活率、DNA链断裂和O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶活性的影响。结果表明两种因子的组合较单一因子增加了细胞的死亡率、DNA的链断裂及O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶活性的丢失。细胞存活曲线参数D₀, D_q值的下降表明 γ 线与MNNG有协同作用。

关键词 γ 线, N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍, DNA链断裂, O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶, HeLa细胞

许多物理和化学因素都能引起DNA的单链损伤, 并产生单链断裂。如果两个辐射诱发的单链断裂可以组合在一起形成双链断裂, 那么一个辐射诱发的单链断裂也应当能够同另一个由其它DNA损伤因素所引起的单链断裂相组合, 而形成双链断裂使细胞致死。根据这一论点, Elkind等^[1]测定了紫外线预照后的电离辐射存活曲线及电离辐射预照后紫外线存活曲线, 观察到两者在细胞毒性上的协同作用。Leenhouts等^[2]分析了抗肿瘤药物1, 3-双-2-氯乙基-1-亚硝基胍(BCNU)和1, 2-氯乙基-3-环己基-1-亚硝基胍(CCNU)和电离辐射对细胞存活的相互作用。最近Seidel等^[3]观察到X射线能增强甲基亚硝基胍(MNU)和丁基亚硝基胍(BNU)的致癌作用。

物理和化学因素显然存在着相互作用, 这一领域的研究, 对肿瘤放射治疗处理的最优化问题及环境诱变剂的危害度将是十分重要的。本文研究了 γ 线和N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)对HeLa细胞存活率, DNA链断裂及O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶的影响。观察到两种因子在杀伤细胞方面有协同作用。

材 料 和 方 法

1. 细胞

HeLa CLL 2 细胞生长在含有15%小牛血清, 青霉素100单位/ml, 链霉素0.1 mg/ml的199培养基中, 37℃培养, 通7%的CO₂。细胞的倍增时间为22 h。

2. 药品

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG), Sigma公司产品, 用乙醇溶解制成0.5 mg/ml的溶

* 国家自然科学基金资助项目

液, -20°C 下保存备用。

3. 存活率的测定

将对数生长期的细胞悬液接种于80 ml的培养瓶(2×10^2 个细胞/瓶)中,高剂量组为保证一定的集落数目增加细胞的接种量。每一剂量点有两瓶样品。细胞贴壁生长24 h后分别进行下

Tab 1. Survival curve parameters of HeLa cells after treatment with MNNG and γ -rays.

Groups	D_0	D_q	D_{10}
MNNG, $9.4 \mu\text{mol/L}$	$1.70 \mu\text{mol/L}$	$5.59 \mu\text{mol/L}$	$9.40 \mu\text{mol/L}$
γ -rays, 5.0 Gy + MNNG, $9.4 \mu\text{mol/L}$	$1.34 \mu\text{mol/L}$	$4.50 \mu\text{mol/L}$	
γ -rays, 5.0 Gy	1.35 Gy	2.00 Gy	5.05 Gy
MNNG, $9.4 \mu\text{mol/L}$ + γ -rays, 5.0 Gy	0.91 Gy	1.19 Gy	

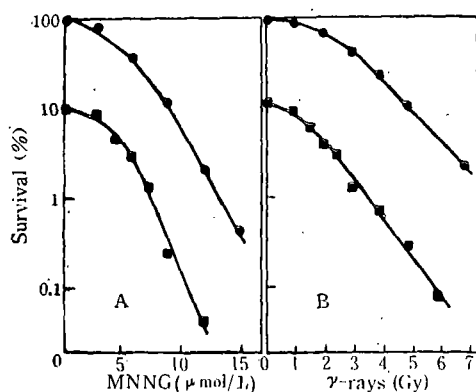


Fig 1. Survival curves of HeLa cells

A. Survival of HeLa cells following treatment with graded doses of MNNG ($\bullet$), and 5.0 Gy radiation and graded dose of MNNG ($\blacksquare$);

B. Survival of HeLa cells following treatment with graded doses of γ -radiation ($\bullet$), MNNG ($9.4 \mu\text{mol/L}$) and graded doses of γ -radiation ($\blacksquare$); Survival curve shoulders were fitted by eye, the straight portions of the curves were fitted by linear regression analysis. Survival curve parameters (D_0 , D_q) were counted (see Table 1.).

Tab 2. Comparison of effects of MNNG and γ -rays the content of dsDNA and O^6 -MTase activity in HeLa cells

Groups	Content of dsDNA %(N)	O^6 -MTase activity CPM(N)
Control	$90.4 \pm 3.9(5)$	$146.0 \pm 27.0(8)$
MNNG	$76.8 \pm 5.1(5)$	$89.9 \pm 12.8(7)$
γ -rays + MNNG	$63.1 \pm 3.7(5)$	$74.9 \pm 11.0(5)$
γ -rays	$81.6 \pm 4.3(5)$	$90.8 \pm 33.0(7)$
MNNG + γ -rays	$60.2 \pm 3.3(5)$	$64.0 \pm 7.9(5)$

γ -ray dose: 5.0 Gy for analysis of DNA, 4.0 Gy for analysis of enzyme. MNNG dose: $9.4 \mu\text{mol/L}$ for analysis of DNA, $3.6 \mu\text{mol/L}$ for analysis of enzyme. γ -rays + MNNG, cells were treated immediately by MNNG after γ -rays irradiation. MNNG + γ -rays, cells were irradiated immediately by γ -rays after treatment with MNNG.

列处理: A组: 加入含有不同浓度MNNG的培养基, 37°C 下保温1 h; B组: 细胞经5.0 Gy的 γ 线照射后, 立即更换含有不同浓度的MNNG新鲜培养基, 37°C 下保温1 h。

C组: 照射不同剂量的 γ 线; D组: 细胞经 $9.4 \mu\text{mol/L}$ MNNG处理1 h后立即用 γ 线照射不同剂量。各组细胞经上述处理后更换新鲜培养基, 在 37°C 的温箱中培养10天, 经甲醇-醋酸(3:1)固定, Giemsa染色, 计算集落数。

4. DNA链断裂的分析

生长3天后的细胞分别用 γ 线(5.0 Gy)或MNNG($9.4 \mu\text{mol/L}$, 37°C , 1 h)单独或组合处理后, 按文献[4]的方法用羟基磷灰石-荧光法检测单、双链DNA的百分含量。

5. 酶活性的测定

生长3 d后的细胞分别用 γ 线(4.0 Gy)或MNNG($3.6 \mu\text{mol/L}$, 37°C , 1 h)单独或组合处理后, 按文献[5]的方法测定 O^6 -甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(O^6 -MTase)活性。放射性强度越高表示酶活性越高。蛋白含量的测定按Lowry的方法^[6]。

6. 照射条件

照射源为中国科学院生物物理所 Co^{60} γ 线照射源, 剂量率为 1.66 Gy/min , 照射在室温下进行。

结 果

1. 对 HeLa 细胞存活率的影响

γ 线和 MNNG 单独或组合处理后的 HeLa 细胞存活曲线, 及其 D_{10} , D_0 和 D_q 值分别见图 1 和表 1。结果表明与 γ 线和 MNNG 单独处理的细胞相比, 两种因子组合处理的细胞存活率下降, 其参数 D_0 , D_q 值均减小。按 MNNG- γ 线顺序组合处理的细胞, 其生物学效应更强些。

2. 对细胞 DNA 损伤与修复的影响

由图 1 可见经两种因子组合处理的细胞存活曲线其肩区减小, 这种改变是否与细胞 DNA 损伤与修复有关, 我们测定了细胞 DNA 链断裂程度和 $\text{O}^6\text{-MTase}$ 活性, 结果见表 2。由表可见, 细胞经 γ 线和 MNNG 单独或组合处理后 DNA 链断裂增加, 酶活性下降, 按 MNNG- γ 线顺序处理效应最强。

讨 论

电离辐射和亚硝基化合物, 两者都是基因损伤因子, 致使细胞 DNA 损伤, 产生链断裂。本工作的主要理论依据是: (1) 辐射诱发的 DNA 双链断裂是关键性分子损伤, 它能造成细胞死亡、染色体畸变或突变; (2) 双链断裂可以在电离粒子通过时发生, 或是由各自独立事件的两个单链断裂相组合而构成。参照 Elkind 等^[1]研究 X 射线和紫外光结合作用的研究, 设计了上述实验。观察电离辐射和 MNNG 对细胞存活率的影响及其 D_0 , D_q 值的变化, 研究两种因子的相互作用。 D_0 的含义是在末尾指数区域存活率每下降 63% 所需要的剂量, 反映细胞在相对高剂量区域的敏感性。 D_q 为“拟阈剂量”, 它是存活曲线肩区大小的参数, 反映细胞在低剂量区对亚致死损伤的耐受力。实验结果表明经组合处理的细胞 D_0 、 D_q 值均下降, 指出所观察到的生物效应比电离辐射和 MNNG 各自效应简单相加要大, 显示协同作用。

组合效应除细胞的直接杀死之外, 也与 DNA 损伤及其修复有关。 γ 线照射可使细胞 DNA 产生单链断裂, MNNG 可使 DNA 烷基化, 由于去嘌呤等作用诱发单链断裂。DNA 烷基化的单链损伤可以发生在 DNA 分子的一条链上或相对链上, 导致单链或双链断裂。如果这种化学“亚致死损伤”加于放射性亚致死损伤, 则造成 DNA 双链断裂的增加。 O^6 -甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶的作用是将 O^6 位置上的甲基转移到酶分子的半胱氨酸残基上, 形成 Me-S-Cys 产物^[7]。酶活性的下降则表明细胞修复能力降低, 链断裂的增加。两种因子组合处理细胞双链 DNA 的百分含量及 $\text{O}^6\text{-MTase}$ 活性, 与两种因子单独处理的相比较, 均显著下降(见表 2), 这与存活率的结果一致。Wiggenhauser 等^[8]用 X 射线和乙基亚硝基脲结合处理孕鼠时, 发现后代肿瘤发生率更高。说明在估价环境因素危害度时, 应考虑到损伤因子之间的相互作用。

在本文中观察到按 MNNG- γ 线顺序处理细胞, D_0 和 D_q 值、双链 DNA 的百分含量及酶活性均有较大下降, 相反的顺序则效应较低。Bradley 等^[9]曾观察到当 γ 线与甲基亚硝基脲处理细胞使产生近似相等的 DNA 单链断裂时, 前者其单链断裂重接能力较高。因此按 MNNG- γ 线顺序处理的细胞其效应较强, 可能与 DNA 修复减少有关。根据损伤因子的性质、用量、处理的间隔时间及靶分子的性质进行优化组合, 将能增强辐射对肿瘤的作用, 或者根据辐射和另一种损伤因

子可能发生的相互作用,设计新型的双功能的辐射增敏剂。

本文有关放射性同位素的测定得到我所宋兰芝和侯桂珍同志的协助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] A. Han and M. M. Elkind, Photochem. Photobiol., 31, 281(1980).
- [2] H. P. Leenhouts, K. H. Chadwick and D. F. Deen, Int. J. Radiat. Biol., 37, 169(1980).
- [3] H. J. Seidel, Int. J. Radiat. Biol., 51, 1041 (1987).
- [4] 曹恩华,程龙生,实验生物学报, 21, 79(1988)。
- [5] 曹恩华,王菊君,生物化学杂志, 5, 164(1989)。
- [6] O. H. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr and R. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265(1951).
- [7] E. A. Waldstein, En-Hua Cao and R. B. Setlow, Nucleic Acid Res., 10, 4595 (1982).
- [8] A. Wigenhauser and W. Schmahl, Int. J. Radiat. Biol., 51, 1021(1987).
- [9] M. O. Bradley, G. Dysart, K. Fitzsimmons, P. Harbach, J. Lewin and G. Wolf, Cancer Res., 42, 2592(1982).

(稿件收到日期: 1989年10月10日)

INFLUENCES OF γ RAYS COMBIND WITH N-METHYL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINE(MNNG) ON THE BIOLOGICAL EFFECTS OF HeLa CELLS

Cao Enhua, Wang Jujun and Xin Shumin
(Institute of Biophyscs, Academia Sinica, Beijing)

ABSTRACY By measuring the survivals of HeLa cells, DNA strand breaks and the activity of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase, the biological effect of γ -rays and MNNG on HeLa cells was investigated. It was observed that the combined exposure of γ -rays and MNNG increased the cell lethality, DNA strand breaks and the inactivation of the O⁶-methylguanine DNA methyltransferase. The decrease of the survival curve parameters D₀, D_q shown a synergism between γ -radiation and MNNG.

KEY WORDS γ -rays, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, DNA strand breaks, O⁶-methylguanine DNA methyltransferase, HeLa cells