DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.021

甲基硝基亚硝基胍诱导人胃粘膜上皮细胞恶性转化的观察*

刘 卫** 房殿春 梁后杰 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,630038

提 要 对甲基硝基亚硝基胍(MNNG)在诱发体外培养的人胃粘膜上皮细胞恶性转化中的作用进行了观察,结果发现,MNNG处理组各时相胃粘膜上皮细胞的增殖速率,非程序 DNA合成水平,脂质过氧化物和 ras p21蛋白含量均显著高于对照组($P<0.05\sim0.01$)。结果提示,MNNG可诱发胃粘膜上皮细胞恶性转化,其作用机理可能是通过损伤细胞 DNA,诱发脂质过氧化或导致 ras p21异常表达所致。

关键词 胃粘膜细胞;恶性转化;甲基硝基亚硝基胍
中图法分类号 R322.44

甲基硝基亚硝基胍(N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)是一种不依赖于酶的代谢而直接作用于胃肠道粘膜上皮,引起癌变的活性致癌剂,可诱发大鼠及犬实验性胃癌[1,2]。本文对 MNNG在诱发体外培养的人胃粘膜上皮细胞(GEC)恶性转化中的作用进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 实验设计

胃粘膜上皮细胞分离、培养、鉴定的方法和步骤见文献[3]。本实验分为 MNNG(Sigma公司)处理组和对照组。取第二代培养 24 h后的胃粘膜上皮细胞,对照组不作任何处理,处理组加 MNNG培养 40 d,观察培养过程中两组细胞各项指标的变化。

1.2 检测与方法

1.2.1 非程序 DNA合成(Unscheduled DNA synthesis, UDS)测定 取第二代培养 24 h细胞 10瓶,换含 1%胎牛血清的 DMEM-F_{12}培养液,加入羟基脲(Sigma公司)和 ^{3}H-TdR(中国原子能研究所),其在培养液中终浓度分别为 5 mmol/L及 5 μCi/ml。任选 5瓶细胞加入 MNNG(10^{-5} mol/L),另 5瓶不作处理。37℃继续培养 4 h。培养细胞用生理盐水洗 3次,胰酶消化,10%三氯醋酸处理,将细胞收集于玻璃纤维滤纸片上(49型,上海红光造纸厂产品),无水乙醇脱水,烤干,置闪烁液中,于 FJ-2115自动液体闪烁计数仪中测定每 10^6个细胞的 cpm均值,即为 UDS水平。

1.2.2 脂质过氧化物(LPO)测定 采用硫代巴比妥酸比色法。将细胞接种于培养瓶(1×10^6/瓶),MNNG处理后,每组取培养第 1、5、10、20、30、40天细胞,匀浆提取蛋白质,Lowry′s法蛋白定量。用丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)测定 MDA,方法按说明书进行。计算 LPO公式如下:

$$\text{细胞 LPO(nmol/mg蛋白)} = \frac{\text{测定管吸光度}-\text{测定对照管吸光度}}{\text{标准管吸光度}-\text{标准空白管吸光度}}\times 10\sim\text{mg蛋白/ml}$$

1.2.3 细胞生长曲线 将细胞以每瓶 2×10^5的密度接种于培养瓶内,次日起每天取 MNNG组及对照组细胞各 3瓶,消化后制备细胞悬液,计数细胞,取平均值共计 5 d,绘制出生长曲线,比较细胞生长速度。

1.2.4 软琼脂集落形成试验 取培养第 30天的细胞悬液 0.2 ml(含细胞 1000个)与 0.35%软琼脂 3 ml混匀后,注入含 0.6%琼脂底层平皿,置 CO_2孵箱中培养 10 d,取出计数集落形成个数。

1.2.5 培养细胞的光镜及电镜观察 细胞培养过程中,在倒置显微镜下观察各组细胞生长情况,并于培养第 40天收集细胞,3%戊二醛和 1%锇酸双重固定后,送电镜室制作透射电镜切片,电镜观察细胞超微结构。

1.2.6 ras p21酶联免疫吸附实验 取实验与对照组第 10、20、30、40天细胞,种入预先涂布多聚赖氨酸的 96孔板(2×10^4个/孔),离心弃上清,加入 0.05%冷戊二醛(100μl/孔),固定 10 min,再以 1%胎牛血清白蛋白(200μl/孔)室温中浸泡 1 h后,加入 1∶1000小鼠抗 ras p21蛋白抗体 50μl/孔,室温下作用 1 h,生理盐水洗 5次,加入二抗-辣根过氧化物酶交联的兔抗小鼠 IgG,室温下作用 30 min后,再以生理盐水洗 5遍,以邻苯二胺(OPD)底物显色 25 min,用 12.5%硫酸(50μl/孔)终止反应,将染色标本置 DG3022A酶联免疫检测仪,于波长 492 nm测其 A值。

1.2.7 癌基因 ras点突变分析 分别取对照组和 MNNG组第 10、20、30和 40天培养细胞少许,按文献[4]提取基因组 DNA。

取约 1μg细胞 DNA,溶于 50μl PCR缓冲液(10 mmol/L Tris·HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 1 mmol/L引物,1~3μ Taq DNA多聚酶)中,PCR扩增仪(Perkin Elmer Cetus)上操作:94℃变性 40 s,55℃复性 40 s,72℃延伸 70 s,35个循环后 72℃放置 10 min。每例取 5μl PCR

* 全军"八五"攻关项目
** 解放军 105医院 合肥 230000

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

产物,8%聚丙烯酰胺电泳,观察扩增效果。另取 10μl扩增产物用相应内切酶(美国 BPL公司产品)酶切,8%聚丙烯酰胺电泳分离,溴乙锭染色后紫外光下观察并照像。分析 ras基因点突变的引物由北京大学生命科学中心合成。引物序列见表 1。

表 1　分析 ras基因突变的引物

Tab 1　Primer sets used in analysing ras mutation

Priming region	Primer sequence	Product (bp)	Restriction enzymes	Result analysis
H-ras-12	5′CAGGGCCCTCCTTGGCAGG3′	170	Hpa/MSPI	wild 66+ 56+ 48 bp
	5′GTCGTATTCGTCCACAAAATGG3′			mutant 122+ 48 bp
H-ras-61	5′ACGTGCCTGTTGGACATCCT3′	95	BstN1	wild 60+ 20+ 15 bp
	5′CACACAGGAAGCCCTCCCCT3′			mutant 75+ 20 bp
K-ras 12	5′ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT3′	157	BstN1	wild 114+ 29+ 14 bp
	5′TCAAAGAATGGTCCTGGACC3′			mutant 143+ 14 bp
N-ras12	5′AACTGGTGGTGGTTGGACCA3′	98	BstN1	wild 79+ 19 bp
	5′CTCTATGGTGGGATCATATTC3′			mutant 98 bp

1.3　统计学处理

采用 t检验观察各组间差异的显著性。$P < 0.05$为差异显著,$P < 0.01$为差异非常显著。

2　结果

2.1　MNNG对胃粘膜上皮细胞 UDS的影响

对照组 UDS水平为 70.4± 12.5 min^{-1},而 MNNG组 UDS水平为 183.8± 20.5 min^{-1}。经统计学处理,MNNG组 UDS水平显著高于对照组($P < 0.01$)。

2.2　胃粘膜上皮细胞 LPO变化

MNNG处理后第 1天胃粘膜上皮细胞 LPO含量即显著升高,20 d达最高值,此后开始下降,第 1~ 30天细胞各时相点 LPO水平均显著高于对照组($P < 0.01$),40 d时与对照组差异不显著($P > 0.05$)(表 2)。

表 2　MNNG处理后不同时间胃粘膜上皮细胞 LPO含量变化(mmol/mg蛋白)($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Lipid peroxide contents at different time in GEC treated with MNNG ($\bar{x}\pm s$)

Groups	Time (d)					
	1	5	10	20	30	40
Control	3.49± 0.51	3.62± 0.54	3.62± 0.54	3.62± 0.54	3.35± 0.49	3.52± 0.46
MNNG	5.48± 0.64*	5.95± 0.65*	6.43± 0.63*	7.42± 0.68*	5.53± 0.69*	4.05± 0.52

*: $P < 0.01$ *vs* control

2.3　细胞生长曲线

经 MNNG处理后的细胞,生长速度明显加快,培养第 5天时的细胞计数为对照组的 2.1倍(图 1)。

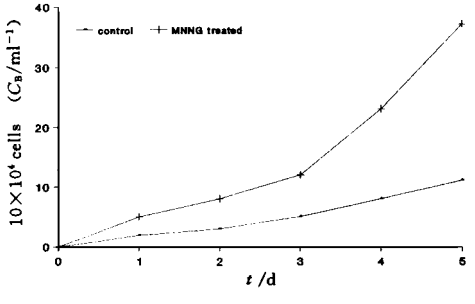


图 1　MNNG组及对照组细胞生长曲线

Fig 1　GEC growth curve of control and MNNG treated groups

2.4　软琼脂集落形成情况

MNNG处理后 30 d细胞,经在软琼脂中培养 10 d出现集落(6.2± 0.84),而对照组细胞未见集落形成。

2.5　细胞的光镜及电镜观察结果

与对照组相比,MNNG处理后的细胞生长旺盛,于 30 d后可见细胞排列紊乱,形态及大小不一,并出现复层生长(图 2)。培养第 40天细胞透射电镜观察见胞浆内核糖体丰富,细胞核增大,核膜不规则、凹陷、核内常染色质丰富、核仁明显增大,并可见假包涵体(图 3)。

2.6　ras p21检测结果

经 MNNG处理后,胃粘膜上皮细胞 ras p21水平明显升高,第 40天时达最高值,各时相点 ras p21水平均显著高于对照组($P < 0.01$)(表 3)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

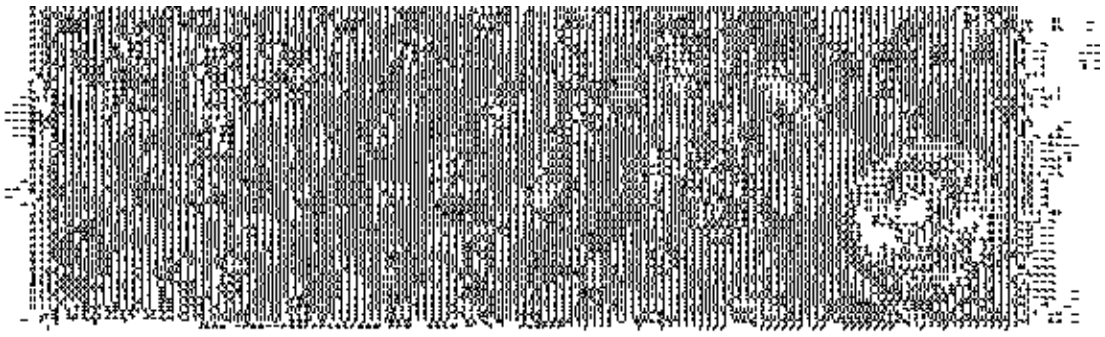


图 2 MNNG处理后细胞呈复层生长 (LM× 400)

Fig 2 GEC grew into multilayers after treated with MNNG (LM× 400)

图 3 转化细胞见核膜凹陷 (TEM× 10000)

Fig 3 Cave of nuclear membrane in the transformed cell (TEM× 10000)

表 3 胃粘膜上皮细胞 ras p21含量变化 (A值) ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Contents of ras p21 in GEC treated with MNNG (A value) ($\bar{x}\pm s$)

Groups	Time (d)			
	10	20	30	40
Control	0.58± 0.07	0.52± 0.08	0.53± 0.08	0.51± 0.07
MNNG	0.98± 0.09*	1.08± 0.11*	1.12± 0.11*	1.12± 0.12*

*: $P<0.01$ *vs* control

2.7 ras基因点突变分析

MNNG处理组和对照组细胞 DNA均能经 PCR有效扩增,其产物经酶切,电泳分离, Ha-ras基因第 12位和 61位密码子、K-ras基因第 12位密码子及 N-ras基因第 12位密码子均未发现有点突变。

3 讨论

MNNG是较强的胃粘膜化学致癌物,可诱发实验动物胃癌[5]。我们观察了其对人胃上皮细胞体外恶性转化作用,使用 10^{-5} mol/L MNNG一次性 24 h诱癌后,细胞增殖速度明显加快,第 5天细胞数高于对照组 2.1倍; 30 d时光镜观察见细胞形态大小不一、排列紊乱,并出现复层生长,在软琼脂中有集落形成,提示细胞失去接触抑制作用并具有了非贴壁生长能力,表明 MNNG处理 30 d后,细胞出现某些恶性表型。30 d时电镜观察,见细胞浆内核糖体丰富,细胞核增大,核膜不规则、凹缩,核内常染色质丰富、核仁明显增大、可见假包涵体,显示出细胞有增生性变化伴变性。以上实验结果表明, 10^{-5} mol/L MNNG可使体外培养的胃上皮细胞发生恶性转化。该方法的建立,为研究胃癌的发生机理及预防提供了良好的模型。

正常情况下,细胞 DNA合成仅见于 S期,但当细胞 DNA受到损伤进行修复时,其 DNA合成可发生在整个细胞周期,那些发生于 S期以外的 DNA合成,谓之非程序 DNA合成。测定 UDS是一种检测致突变因子的可靠生物学方法。本文观察了 MNNG诱导胃粘膜上皮细胞的 UDS,发现 MNNG组细胞 UDS水平显著高于对照组,提示 MNNG可损伤细胞 DNA而致突变。

LPO是指活性氧与不饱和脂肪酸作用产生的丙二醛等产物,它可致细胞 DNA染色体损伤,参与肿瘤的启动和促进过程。本研究发现, MNNG处理细胞后,细胞 LPO含量迅速上升, 20 d时达最高值, 30 d时开始下降,但仍显著高于对照组, 40 d时则与对照组差异无显著性。MNNG作用 30 d后,细胞才出现恶性表型变化,恰是 LPO含量高峰期后,据此推测 MNNG引起脂质过氧化作用可能是其致癌作用的又一机理。30 d后 LPO降低可能是由于细胞不饱和脂肪酸减少[6],或细胞已转化为癌细胞,其脂质过氧化作用降低所致。

点突变是 ras基因活化的重要方式。业已证明, ras族癌基因第 12 13和 61位密码子突变可使其获得转化细胞的能力[7,8]。我国学者报道,胃癌 ras基因突变率为 18.25% ~ 41% [9,10],国外报道突变率多在 10%以下[11]。本文分析了 MNNG诱癌 10 20 30及 40 d胃上皮细胞 Ha-ras基因 12位和 61位密码子、K-ras

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基因 12位密码子、N-ras基因 12位密码子点突变情况,结果未发现这些位点发生突变,提示 MNNG所致胃上皮细胞恶变不是通过引起 ras基因突变来实现的。我们同时还测定了细胞 ras p21表达情况,发现 MNNG组细胞 ras p21含量升高非常显著,而足量的 ras p21能促进细胞转化[1]。由此推测 MNNG可能通过启动其它活化机理引起 ras基因活化或通过直接诱导 ras p21过量表达而引起胃上皮细胞恶变。

参考文献

1 Sorbye H, Gislason H, Kvinnsland S *et al*. Effect of salt on cell proliferation and N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine penetration to proliferation cells in the forestomach of rats. J Cancer Res Clin Oncol, 1994; 120(4): 465

2 Sorbye H, Martmana M H, Svanes K *et al*. Gastric carcinogenesis in rats given hypertonic salt at different times before a single dose of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. J Cancer Res Clin Oncol, 1994; 120(2): 159

3 刘　卫,房殿春,梁后杰等.人胃粘膜上皮细胞分离、培养和鉴定.第三军医大学学报, 1996; 18(3): 255

4 Rogers BB, Alpert LC, Hine EA *et al*. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. Am J Pathol, 1990; 136(3): 541

5 Watanabe H, Takabashi T, Okamoto T *et al*. Effect of sodium chloride and ethanol on stomach tumorigenesis in ACL rats treated with N-methyl-N′-nitro-N-nirosoguanidine. A quantitative morphometric approach. Jpn J Cancer Res, 1992; 86(5): 588

6 Takahashi M. Enhanced lipid peroxidation in rat gastric mucosa caused by NaCl. Carcinogenesis, 1991; 12(11): 2201

7 Froment O, Boivin S, Barbin A *et al*. Mutagenesis of ras proto-oncogenes in rat liver tumors induced by vinyl chloroide. Cancer Res, 1994; 54(20): 5340

8 Yuan B, Heniford BW, Ackermann DW *et al*. Harvey ras (H-ras) point mutations are induced by 4-Nitroquinoline-1-oxide in murine oral squamous epithelial cell carcinomas and loss of heterozygosity occur without additional exposure. Cancer Res, 1994; 54(20): 5301

9 Deng GR, Liu XH, Wang JR. Correlation of mutation of oncogene C-Ha-ras at codon 12 with metastasis and survival of gastric cancer patients. Oncogene Res, 1994; 6(1): 33

10 房殿春,罗元辉,鲁　荣等.胃癌组织 ras族基因突变与预后的关系.胃肠病学和肝病学杂志, 1995; 4(1): 32

11 Nanus DM, Kelsen DP, Mentle IR. Infrequent point mutation of ras oncogene in gastric cancers. Gastroenterology, 1990; 98(4): 955

(收稿: 1995-10-12;修回: 1995-05-10)

(编辑　冯崇英)

Observation on malignant transformation of human gastric epithelial cells induced with N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine

Liu Wei, Fang Dianchun, Liang Houjie, Liu Weiwen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract　The induction of the malignant transformation of human gastric epithelial cells (GEC) cultured *in vitro* with N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) was observed. It was found that the cell proliferative rate, the level of unscheduled DNA synthesis, the contents of lipid peroxidation products (LPO) and the concentrations of ras p21 in the GEC at various phases in the group treated with MNNG were significantly higher than those in the normal control ($P < 0.01$). Our findings suggest that MNNG can induce the malignant transformation of GEC through damaging their DNA and provoking LPO or causing abnormal expression of ras p21.

Key words　gastric epithelial cell; malignant transformation; N-methyl-′-nitro-N-nitrosoguanidine

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net