

维生素C阻断MNNG毒性的实验细胞模型

艾 军 何兰欣 张志学

河北省肿瘤研究所 石家庄 050011

食管癌高发地区环境病因的研究表明亚硝胺化合物可能是人类食管癌发病因素之一⁽¹⁻³⁾。为了探讨食管癌病因预防的措施,除了降低饮用水等亚硝胺类⁴的含量和致癌活性作用外,阻断进入体内的或体内合成的亚硝胺类对细胞的毒性也是一个重要环节。

阻断亚硝胺类的毒性研究,以往以整体动物实验肿瘤为主要对象,而近年来,研究正迅速地转向细胞水平。建立维生素C阻断或亚阻断亚硝基胍(N-Metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)毒性的实验细胞学研究模型,目的在于筛选阻断致癌物毒性的非细胞毒性药物,并为食管癌高发区的病因预防上,提供实验和理论根据。

材料和方法

1. 细胞培养:梨型四膜虫无性繁殖系 HS₁株(本室83年培养建株)。培养基为1g 胰胍、0.5g葡萄糖溶于100ml 双蒸水中,溶解后用G₆号滤器滤过,5%NaOH调至pH=7.2,分装高压灭菌后放置4℃冰箱中备用。

2. 药物:MNNG为西德Kühl Lagen 公司的产品。用二甲基亚砷配成1mg/ml 浓度的溶液,0℃保存。Vc是石家庄第一制药厂产品,用双蒸水配成1mg/ml 浓度的溶液,避光0℃保存。

3. 方法:采用饥饿的方法⁽⁵⁾,诱导无性繁殖系 HS₁株细胞进入有性繁殖过程。HS₁株无菌传代培养,细胞浓度为 2×10^4 /ml,40hr后进入指数生长期。使用40m/mG₆号滤器,用0.01M, pH为7.2的Tris-HCL缓冲液反复抽滤洗涤 HS₁细胞三次以上,以达到饥饿诱导 HS₁细胞进入有性繁殖过程。将处

理好的 HS₁细胞分为两组:一组加入不同浓度的MNNG,另一组先加入终浓度为4:1克分子 Vc, 27℃ 温育1hr后,再相应加入不同浓度的MNNG。两组分别混匀后放入27℃ 温箱内40hr,观察其对细胞接合的抑制率。每个浓度组做三瓶,求其平均数计算。

全部试验设计和试验测得数据的处理,使用日本 SHARP:PC-1500 袖珍电子计算机。

结果

1. 不同浓度 MNNG 对细胞结合的抑制率:结果表1。

表 1 不同浓度 MNNG对细胞接合的抑制率

| MNNG μg/ml | 计数 细胞 | 接合细 胞数 | 细胞结合抑制 率±SP% | P值 |
|---------------|----------|-----------|-----------------|-------|
| 0 | 400 | 332.8 | | |
| 2 | 400 | 206.0 | 33.1±2.7 | <0.01 |
| 4 | 400 | 187.3 | 43.7±2.7 | <0.01 |
| 8 | 400 | 141.0 | 57.6±2.7 | <0.01 |
| 16 | 400 | 116.5 | 65.0±2.6 | <0.01 |
| 32 | 400 | 71.0 | 78.7±2.2 | <0.01 |
| 64 | 400 | 25.5 | 92.3±1.5 | <0.01 |
| 128 | 400 | 1.5 | 99.5±0.4 | <0.01 |

使用电子计算机对表1所列数据处理的结果:见图1

相关系数 $r = 0.9454$, 相关系数显著性检验 $P < 0.01$, 有非常显著意义。说明MNNG毒性剂量与抑制细胞接合反应之间存在着极为密切的关系。将 MNNG 浓度改成对数浓度,抑制率转换成概率单位后, MNNG 的浓度反应曲线即呈直线。直线回归方程 $\hat{Y} = 3.9271 + 1.47355X$, 回归系数的 t 检验有极显著意义 $P < 0.01$ 。

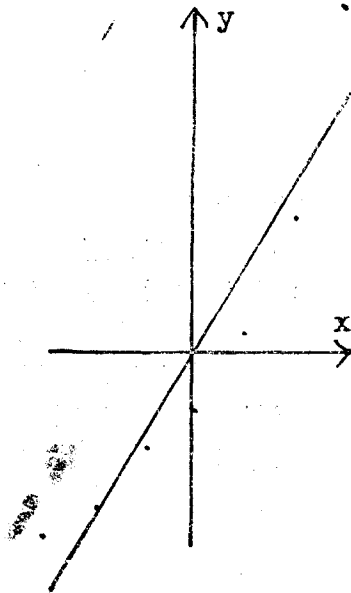


图 1 MNNG 毒性剂量反应的回归直线

2. Vc 阻断 MNNG 的毒性效应：结果见表 2

表 2 Vc 阻断 MNNG 对细胞接合的毒性效应

| MNNG μg/ml | Vc μg/ml | 计数 细胞 | 接合 细胞数 | 细胞接合 率 ± SP% | P 值 |
|---------------|-------------|----------|-----------|-----------------|-------|
| 1 | 4 | 400 | 322.5 | 80.6 ± 2.0 | >0.05 |
| 2 | 8 | 400 | 326.0 | 81.8 ± 1.9 | >0.05 |
| 4 | 16 | 400 | 336.5 | 84.1 ± 1.8 | >0.05 |
| 8 | 32 | 400 | 336.5 | 84.1 ± 1.8 | >0.05 |
| 16 | 64 | 400 | 332.0 | 83.0 ± 1.9 | >0.05 |
| 32 | 128 | 400 | 334.5 | 83.6 ± 1.9 | >0.05 |
| 64 | 256 | 400 | 327.5 | 81.9 ± 1.9 | >0.05 |
| 对照 | | | | | |
| Tris | - | 400 | 320.8 | 80.2 ± 2.0 | >0.05 |
| Vc | 128 | 400 | 330.0 | 82.6 ± 1.9 | >0.05 |

电子计算机对表 2 所列数据处理分析结果见图 2:

相关系数 $r = 0.0237$, $P > 0.05$, t_r 检验, 差别无显著性。散点排列不呈直线趋势, 呈无相关, 说明 Vc 完全阻断了 MNNG 对细胞接合的毒性反应。

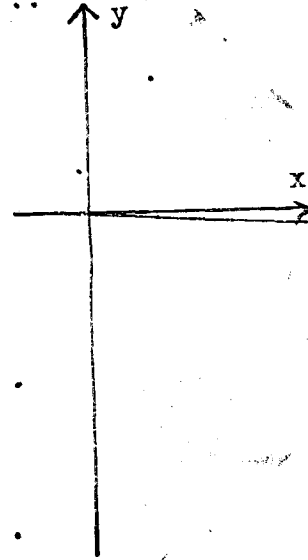


图 2 Vc 阻断 MNNG 剂量反应的相关

讨论

“防止和减少化学物质与人类遗传物质相互作用而产生的有害影响”是国际预防环境致突变物和致癌物委员会(ICPEMC)的主要目标⁽⁶⁾。这一目标也应该列为我国食管癌高发地区环境病因预防工作的主攻方向。

美国肿瘤研究协会的一个年会上, 曾有人提出在恶性阶段前期开展综合性化学预防, 对于发展预防肿瘤用的非细胞毒性药物⁽⁷⁾, 颇具重要性。作者们建立阻断致癌物毒性的实验模型正是为了给研究筛选预防肿瘤用的非细胞毒性药物, 提供了必要的研究方法和手段。

Vc 是活跃的生物物质, 它极易与致癌物烷化分子发生反应, 以竞争致癌物同细胞大分子、核酸、蛋白质的作用, 而且它能消除人体内在氧化过程中所产生的自由基, 自由基对正常细胞有损伤作用, 故 Vc 可以保护正常细胞预防细胞中毒或恶变。国内外有许多探讨 Vc 预防肿瘤的研究资料, 其中用 Vc 抑制致癌物的实验报告, 结果很不一致。Vc 用于肿瘤的预防在实验根据上存在

(下转第 22 页)

- 卫生出版社, 1985
11. Sieber SM and Adenso RH. Acad Pres New York, 1975
 12. 赵寿元, 等. 遗传学报 1981; 8: 126
 13. 贺田恒夫和石馆基. 环境变异源子データ集. サイエイスト社, 1980
 14. 林飞, 等. 现代应用药学. 1987; 4(4): 1
 15. 徐友梅, 等. 河南医科大学学报 1986; 21: 87
 16. 赵寿元, 等. 实验生物学报 1979; 12: 41
 17. 黄念君, 等. 药学报 1982; 17: 54
 18. 林飞. 中国药理通讯 1984; 3-4: 321
 19. 肖定辉. 中成药研究 1981; 5: 15
 20. 姜延良. 中草药 1980; 11(9): 425
 21. 林飞, 等. 中国药理学通报 1985; 2: 51
 22. 中国环境诱变剂学会第三届学术会议论文集. 第1, 2册, 1987
 23. 黄念君, 等. 中国临床药理学杂志 1985; 1(2): 110
 24. Speit G and Vogel W. Mutat Res 1979; 59: 223
 25. Stich HF, et al. Nature 1976; 260: 722

(上接第25页)

- Publication 1980 No27: 3-22
4. SStephen W, et al. Int J Cancer 1981: 27: 357
 5. Roberts J J. British Medical Bulletin 1980; 36(1): 25
 6. Ishikawa T, et la. JNCI 1984; 74: 101
 7. Bimal CP, et al. Caneer Res 1978; 38: 1378

(上接第29页)

- vivo somatic mutation in mice induced by tritiated water. The third Japan - US workshop on tritium radiobiology and health physics Nov. 11, 1988. Tyoto.
3. 董金蝉, 等. 氚水诱发小鼠胎肝嗜多染红细胞微核细胞率的比较研究. 中华放射医学与防护杂志 1991; 3(11): 176
 4. 周舜元, 等. 氚水在小鼠体内的代谢. 中华放射医学与防护杂志 1985; 5(1): 22
 5. 郭芙蓉, 等. 小鼠不同方式氚中毒的代谢比较. 辐射研究与辐射工艺学报 1987; 5(2): 87
 6. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis, In: A. Hollaender (Ed) Chemical Mutation: principles and methods for their detection, Vol. 4. Plenum, New York, 1976: 31-53
 7. 周湘艳, 等. 氚相对生物效应的实验研究及遗传危害的估计. 中华放射医学与防护杂志 1988; 6(8): 369

(上接第34页)

着争论。作者们研究结果表明：细胞在接触MNNG之前，给与适量Vc，具有保护正常细胞功能，且可以阻断MNNG对细胞的毒性作用。这一结果为应用Vc于食管癌高发区的病因预防上，提供了初步的实验根据。此实验细胞模型，为在体外研究、筛选、阻断毒性因子提供一项简单、快速的细胞生物学方法。但这一实验细胞模型尚有待进一步充实和完善。

参考文献

1. 王英林, 等. 林县姚村公社饮水井中硝酸盐与亚硝酸盐含量的测定. 中华肿瘤杂志 1979; (3): 201
2. 中国医学科学院肿瘤研究所, 等. 河南省安阳地区食管癌死亡率分布与地理环境及饮水食物中化学元素的初步分析. 中华肿瘤杂志 1980; 2(1): 29
3. 赵玉环, 等. 食管癌高发区饮水亚硝酸盐的检测. 中华肿瘤杂志 1983; 5(3): 184
4. 张振东, 等. 降低亚硝酸盐致癌作用的研究. 中华肿瘤杂志 1983; (4): 270
5. 陈阅增, 等. 一个自配型梨形四膜虫的接合及细胞学过程. 动物学报 1982; 4: 319
6. 王菊凝. 国际预防环境致突变物和致癌物委员会简介. 《国外医学》卫生学分册 1985; 1: 62
7. Michael BP. Combination chemoprevention of cancer. Nature 1980; 287(5778): 1107