

PARP 酶抑制剂诱导转化细胞逆转及 外源 *ras* 癌基因丢失的研究^①

杨其伟 董元舒 陈雅文 陈德凤

(南开大学分子生物学研究所, 天津 300071)

摘要 用 5mmol/L PARP 抑制剂苯甲酰胺处理经 *c-Ha-T24-ras* 活化癌基因转染得到的转化细胞系, 处理 4 周后发现转化细胞系的某些细胞生物学特性发生了改变, 呈现出正常细胞的某些特性。伴随这一现象, 检测到细胞中整合的外源 *T24-ras* 基因发生了丢失。

关键词 转化细胞逆转, *ras* 癌基因, 基因丢失

Studies on Reversion of a Transformant Line and Loss of Exogenous *ras* Oncogene after Treatment with an Inhibitor of PARP Enzyme

Yang Qiwei Dong Yuanshu Chen Yawen Chen Defeng

(Institute of Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract A transformant line obtained by transfection of NIH3T3 cells with *c-Ha-T24-ras* gene was treated with 5mmol/L benzamide, an inhibitor of PARP enzyme for 4 weeks. Some changes in cellular properties of the transformant line were observed. Concomitant with these changes was the deletion of the exogenous *c-Ha-T24-ras* which had been integrated into genomic DNA of recipient cells.

Key words Poly(ADP-ribosyl)ation, Transformed cell reversion, *ras* oncogene, Deletion

聚腺苷二磷酸核糖基化作用 (PAR) 是在生物体内的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP, E C.2.4.2.30) 催化下, 以 NAD 为底物, 对蛋白质进行翻译后修饰, 从而使聚腺苷二磷酸核糖共价连接到受体蛋白上的过程^(1,3)。从 PARP 酶发现至今的短短二十多年中, 已经证明它与染色质的结构与功能的调节, DNA 的修饰、复制、重组与重排、RNA 的转录、染色体畸变及生物信息传递等许多重要的生物事件密切相关^(1,3-9)。

近年来, 已有实验表明 PAR 还与肿瘤的发生和细胞分化有关。Ohashi 等⁽¹⁰⁾曾报道了 PARP 抑制剂 3-氨基苯甲酸能够诱导鼠畸胎瘤的分化; Tseng 等⁽¹¹⁾以该酶的另一抑制剂香豆素阻断了 *ras* 基因诱导的细胞转化; Diamond⁽¹²⁾等也发现 3-氨基苯甲酸能够抑制 *v-src*, *v-mos*, *v-raf* 及 *ras* 基因对 NIH3T3 细胞的转化。我们利用 PARP 酶的 NAD 位点抑制剂苯甲酰胺 (BA) 诱导了 *c-Ha-T24-ras* 基因转化细胞系 3T3(T24) 的逆转。对其机制的进一步研究发现, 逆转细胞基因组 DNA 中整合的外源 *T24-ras* 基因发生了丢失。

1 材 料 和 方 法

1.1 细胞及质粒

^①国家自然科学基金资助项目。

小鼠成纤维细胞 NIH3T3 由北京师范大学生物系王永潮教授赠送。质粒 pMAMneo-T24-ras 和 pSV2neo-T24-ras 均为本实验室构建⁽²⁾。

1.2 细胞培养

NIH3T3 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 或 RPMI1640 培养基中。培养箱中 CO₂ 浓度为 5%, 温度为 37℃。

1.3 DNA 转染

外源 DNA 以磷酸钙法转染 NIH3T3 细胞, 培养液中加入 G418 至终浓度为 400 μg/ml 筛选抗性细胞, 每 4—5 天换液一次。15 天后观察抗性细胞的出现。

1.4 BA 对细胞的处理

将 2.5×10^4 个细胞接种于 100ml 培养瓶中, 第二天加入 BA, 培养至细胞达到 30—50% 汇合度, 胰酶消化细胞, 再重复上述步骤数次。BA 处理细胞时间为 4 周。

1.5 细胞基因组 DNA 的提取及探针的制备

细胞基因组 DNA 的提取按文献〔13〕进行。用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶解本室构建的 pSV2neo-T24-ras 质粒, 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 0.88kb 的 *c-Ha-T24-ras* cDNA 片段, 纯化后用 [α -³²P] dCTP 按 Nick Translation 方法标记。

1.6 定量 Southern 杂交

参见文献〔13〕的方法进行, 基因组 DNA 用紫外分析仪测定浓度, 每种细胞均取 50 μg DNA 同步进行酶切、电泳、转移, 经过 6 小时预杂交和 18—20 小时杂交后进行放射自显影。

2 结果与讨论

2.1 T24-ras 基因转化细胞系的获得与鉴定

将本室构建的重组质粒 pMAMneo-T24-ras(物理图谱见图 1)以磷酸钙法转染小鼠成纤维细胞 NIH3T3, 经药物筛选后得到抗性细胞系 3T3(T24)。细胞学观察表明, 该细胞形状变圆, 生长无方向性, 在培养瓶中生长失去接触抑制能力(图版 I, A、B), 能够在软琼脂上形成集落, 为恶性转化细胞系。

以 α -³²P dCTP 标记的 T24-ras cDNA 为探针, 与 NIH3T3 及 3T3(T24) 基因组 DNA *Hind*III+*Bam*HI 酶解产物杂交。以 NIH3T3 基因组为对照, 发现 3T3(T24)在预期位置(1.7kb 处, 图版 I, C)出现外源性杂交带。表明外源 T24-ras 基因已稳定整合于受体细胞基因组中并能稳定遗传。

2.2 BA 对恶性转化细胞 3T3(T24)逆转的细胞学观察

经 5mmol/L BA 处理 3T3(T24)细胞 4 周后, 观察到该细胞形态转变为类似 NIH3T3 的梭状, 细胞生长具有明显的方向性, 具有接触抑制能力, 表明该细胞出现了一定程度的逆转(图版 I, D、E)。

2.3 BA 对外源 T24-ras 癌基因整合稳定性的影响

以 α -³²P dCTP 标记的 T24-ras cDNA 为探针与 BA 处理的 3T3(T24)基因组 DNA 进行杂交检测。图版 I, F 为 BA 处理 4 周的 3T3(T24)DNA 杂交结果。其基因组 DNA 由限制性内切酶 *Bam*HI 单酶酶解, 由图版 I, F 可见, NIH3T3 杂交结果为阴性, 未加 BA 的 3T3(T24)杂交后出现 3 条明显的外源性带, 且杂交密度较高, 可能是以多拷贝形式整合于受体细胞基因组中; 而经 BA 处理达 4 周的 3T3(T24)基因组检测不出外源性带。这一结果说明, PARP 酶的抑制剂 BA 对 3T3(T24)的处理引起了外源 T24-ras 基因的丢失。

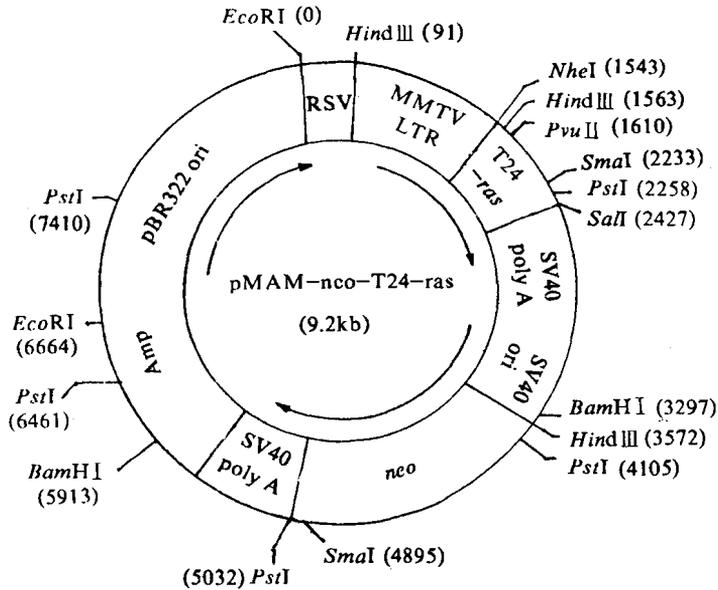


图1 质粒 pMAMneo-T24-ras 的物理图谱

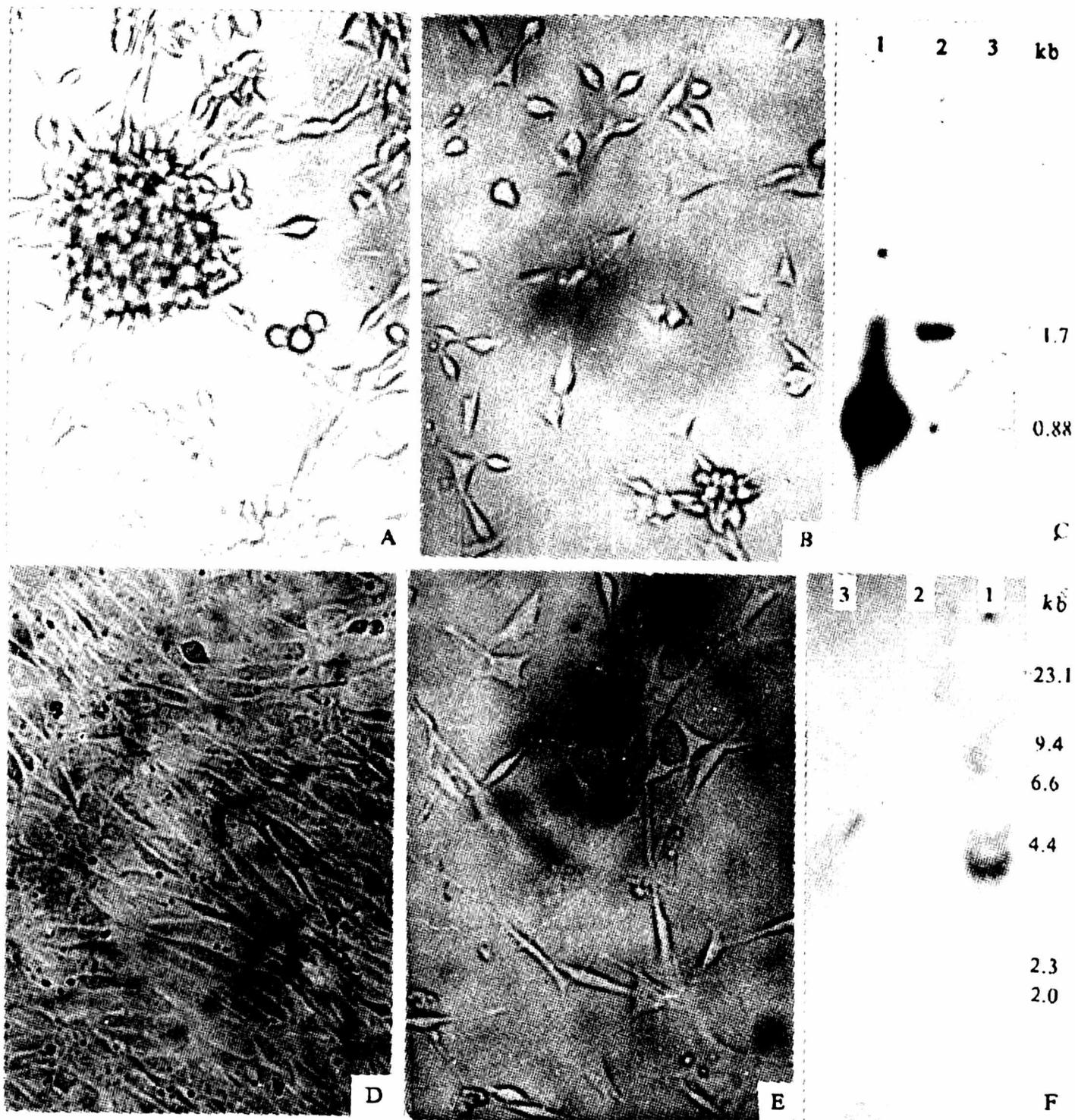
Nakayasu 等^[14]曾报道了 PARP 酶的抑制剂可诱导外源的 *c-Ha-ras*、*c-raf* 及 *ref-II* 等基因的丢失。我们的实验与 Nakayasu 等的结果相吻合。结合本文结果和 Nakayasu 的报道可以看出，外源基因丢失现象并不局限于某一特定基因，丢失现象已在数种外源整合基因中发现。

有研究表明，PAR 能够修饰 DNA 聚合酶、DNA 连接酶、拓扑异构酶、DNA 内切酶等多种涉及 DNA 复制和修复的酶蛋白，PAR 作用水平的下降会引起 DNA 修复的阻断和姐妹染色单体交换频率的增加^[5-10]。此外，PAR 作用的主要受体是组蛋白，表明它与染色质的结构和功能密切相关。由于外源基因整合于基因组中，导致这些额外基因整合位点附近染色质结构发生了变化，而增加了被 DNA 内切酶切割的机会，当 PARP 酶抑制剂存在时，由于 DNA 修复被阻断，所以，在 DNA 复制过程中所引起的姐妹染色单体交换可能使扩增的外源整合基因丢失。随着对基因丢失机制深入研究，将有可能揭示基因定点整合与丢失的详细过程与机制。

参 考 文 献

- (1) 陈德风等, 1991. 科学通报, 13: 1018—1020.
- (2) 刘 强, 陈德风等, 1992. 南开大学学报(自然科学版), 2: 1—6.
- (3) Cleaver J E *et al*, 1991. *Mutation Res.*, 257: 1—18.
- (4) Banasik M *et al*, 1992. *J. Biol. Chem.*, 267: 1569—1575.
- (5) Rankin P W *et al*, 1989. *J. Biol. Chem.*, 264: 4312—4317.
- (6) Yoshihara K *et al*, 1992. *Experi. Cell Res.*, 200: 126—134.
- (7) Ferro A M *et al*, 1984. *J. Biol. Chem.*, 259: 547—554.
- (8) Alkhatib H M, Chen Defeng *et al*, 1987. *PNAS USA*, 84: 1224—1228.
- (9) Cherney B W, Chen Defeng *et al*, 1987. *PNAS USA*, 84: 8370—8374.
- (10) Ohashi Y *et al*, 1984. *PNAS USA*, 81: 7132—7136.
- (11) Tseng A *et al*, 1987. *PNAS USA*, 84: 1107—1111.
- (12) Diamond A M *et al*, 1989. *Carcinogenesis*, 10: 383—385.
- (13) Sambrook J *et al*, 1989. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 9.14—9.23.
- (14) Nakayasu M *et al*, 1988. *PNAS USA*, 85: 9066—9070.

本文于 1995 年 4 月 13 日收到, 1995 年 8 月 9 日修回。



A. 3T3(T24)细胞; B. 3T3(T24)细胞(低汇集度细胞); C. NIH3T3 和 3T3(T24)细胞的 *ras* 基因分析: 1. T24-*ras* cDNA marker, 2. 3T3(T24), 3. NIH3T3; D. NIH3T3 细胞; E. 经 BA 处理的 3T3(T24) 细胞; F. Southern 杂交分析经 BA 处理的 3T3(T24)细胞: 1. 3T3(T24), 2. 3T3(T24)+BA, 3. NIH3T3.