

文章编号:1004 - 616X(2000)03 - 0133 - 03

氟化钠对人胚肺成纤维细胞 p16 基因改变的研究

刘春生,马道新

(山东医科大学附属生物工程中心,山东 济南 250012)

摘要:目的与方法:为研究氟化物的遗传毒性,我们采用 PCR - SSCP 和免疫组化方法从基因和蛋白水平研究氟化钠对人胚肺成纤维细胞抑癌基因 p16 改变的影响,结果与结论:结果未发现氟化钠能引起 p16 基因的改变。

关键词:氟化钠;人胚肺成纤维细胞;p16 基因

中图分类号:R994.6

文献标识码:A

THE EFFECT OF NaF ON p16 GENE OF HUMAN EMBRYONIC LUNG FIBROBLAST CELLS

LIU Chun-sheng, MA Dao-xin

(Hematology Institute, The Affiliated Hospital of Shandong Medical University, Jinan, 250012, China)

Abstract: Purpose and Methods: To explore the genetic toxicity of NaF, we used PCR - SSCP and immunohistochemistry methods to detect the effects of NaF on p16 gene and P16 protein of human embryonic lung fibroblast (HEL F) cells. **Results and Conclusion:** The results show that NaF can't induce the change of p16 gene.

Key words: NaF; HEL F; p16 gene

由于环境氟污染及氟在医学上的应用,人们越来越多地暴露于综合作用的高氟环境。氟化物的遗传毒性日益引起人们的重视。但目前人们对其研究多局限于细胞水平和染色体水平。本研究从分子水平探讨氟化钠(NaF)对抑癌基因 p16 的影响。

材料与方 法

1 材料 人胚肺成纤维细胞(Human Embryonic Lung Fibroblast, HEL F)取自山东医大附院产科四个月水囊引产胎儿。p16 PCR - SSCP 试剂盒购自北京医科大学分子病理学实验室。P16 一抗、SABC 试剂盒购自北京中山生物技术公司。

2 方法

2.1 原代人胚肺成纤维细胞(HEL F)的分离与培养

取四个月水囊引产胎儿,无菌条件下取出肺组织,剪碎后铺于培养瓶底壁上进行组织块培养,待有大量 HEL F 细胞长出后取走组织块,将细胞消化传代培养。

2.2 HEL F 细胞的染毒及一般形态学观察 取第 5 代 HEL F 细胞,当细胞长至 70% - 80% 汇合时,分别加以不同浓度的 NaF (1mmol/L, 2mmol/L, 4mmol/L, 6mmol/L),以生理盐水作为阴性对照(0mmol/L),染毒 36h 后,弃去含受试物的培养液,用 D - Hank's 液冲洗 3 次,换用正常培养液,传代培养,并观察各组 HEL F 细胞形态、胞内颗粒、折光性、细胞密度等。

2.3 p16 的 PCR - SSCP 检测 取染毒后第 5 代 HEL F 细胞,按常规方法提取染色体 DNA 并测定其浓度。按以下条件进行 PCR 扩增:模板 DNA 1μg,

收稿日期:1999 - 10 - 14;修订日期:2000 - 01 - 04

基金项目:国家自然科学基金资助课题(39670624)

作者简介:刘春生(1961 -),男,山东省淄博市人,副教授,硕士生导师,硕士,研究方向:遗传与免疫毒理。

上、下游引物各 $1\mu\text{mol/L}$, dNTP $200\mu\text{mol/L}$, MgCl_2 2.5mmol/L , Taq 酶 1U , $10\times\text{Buffer}$ $2.5\mu\text{l}$,加水补至 $25\mu\text{l}$,所加引物为 p16 基因第 2 外显子上游区和下游区引物。循环参数为: 94°C 1min , 62°C 1min , 72°C 1min , 35 循环。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 观测是否有特异性条带; 然后将扩增产物在 8% PAGE 上进行垂直电泳, 银染显色, 若染毒组与对照组电泳条带不一致, 说明有突变。

2.4 p16 的免疫组化检测 无菌条件下, 胰酶消化各染毒组 HELF 细胞, 适当稀释后滴到无菌载玻片上, 37°C 、5% CO_2 及一定湿度条件下培养 24h, 用 PBS 液洗玻片 2 - 3 次, 晾干后放入含 0.3% H_2O_2 的丙酮中固定 15min, 用双蒸水冲洗干净。

向各染毒组细胞玻片上滴加 1:50 正常山羊血清封闭 20min, 弃掉后, 不用 PBS 洗; 加入 1:100 稀释一抗, 37°C 20min, PBS 洗 2min $\times 3$ 次; 加 1:100 稀释生物素化二抗, 37°C 20min, PBS 洗 2min $\times 3$ 次; 加 1:100 稀释 ABC, 37°C 20min, PBS 洗 2min $\times 3$ 次, DAB 室温显色 3 - 10min, 自来水冲洗后封片, 镜检拍照。用 PBS 代替一抗作阴性对照。细胞内有棕黄色颗粒者为阳性。

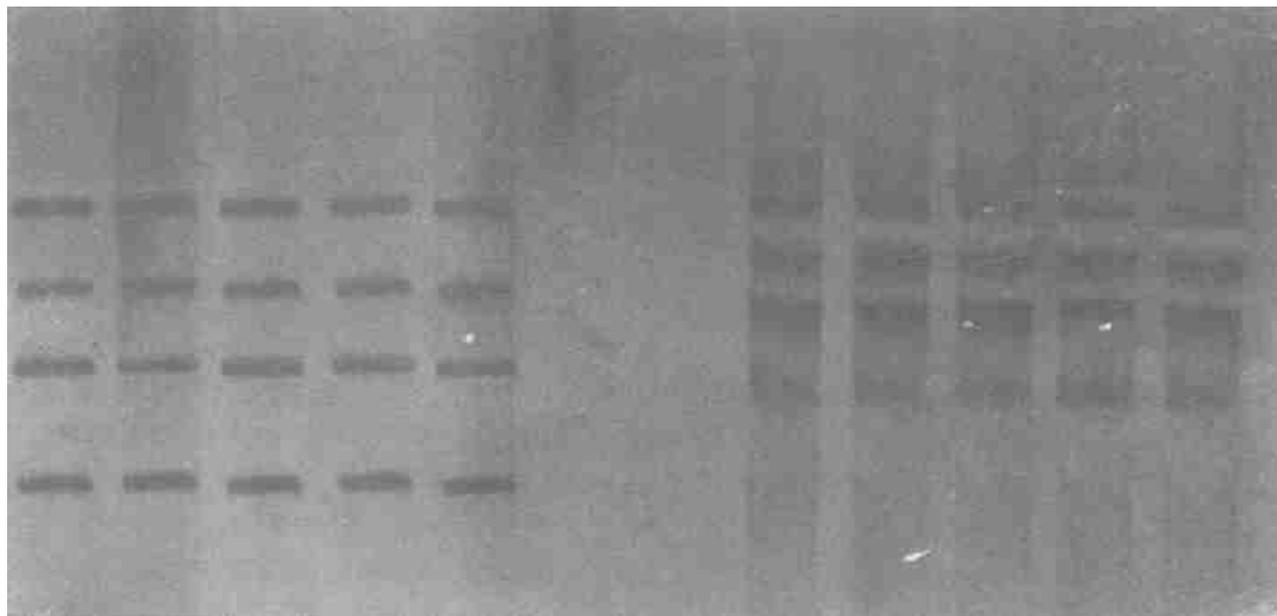
结果

1 一般形态学 NaF 染毒组 HELF 细胞均出现明显细胞毒性反应。多数细胞皱缩变圆或拉长呈细丝状, 折光性降低, 立体感变差, 细胞轮廓增强, 细胞内颗粒增多, 细胞密度降低。且随着 NaF 浓度增高, 细胞毒性逐渐增强。

2 NaF 对 p16 基因改变的影响 PCR 扩增后 2% 琼脂糖凝胶电泳显示, p16 第 2 外显子上游区和下游区均出现特异性扩增条带(图 1), 说明 PCR 扩增成功。其 PAGE 电泳结果显示(图 2), 1 - 6mmol/L NaF 染毒组与溶剂对照组电泳条带一致, 提示 NaF 未能引起 p16 基因第 2 外显子上游区和下游区的改变。



marker
上游区 下游区
图 1 p16 基因第 2 外显子上游区和下游区 PCR 结果



0 1 2 4 6 mmol/L 0 1 2 4 6 mmol/L
p16 exon 2 上游区 p16 exon 2 下游区
图 2 p16 基因第 2 外显子上游区和下游区 SSCP 结果

3 NaF 对 P16 蛋白改变的影响 对 1 - 6mmol/L NaF 染毒组及溶剂对照组的 HELF 细胞作 P16 的免疫组化染色。结果显示,各染毒组细胞胞核为正常的

蓝色,而胞浆内未见有特异性棕黄色颗粒(图 3),说明 NaF 不能引起 HELF 细胞 P16 蛋白的改变。

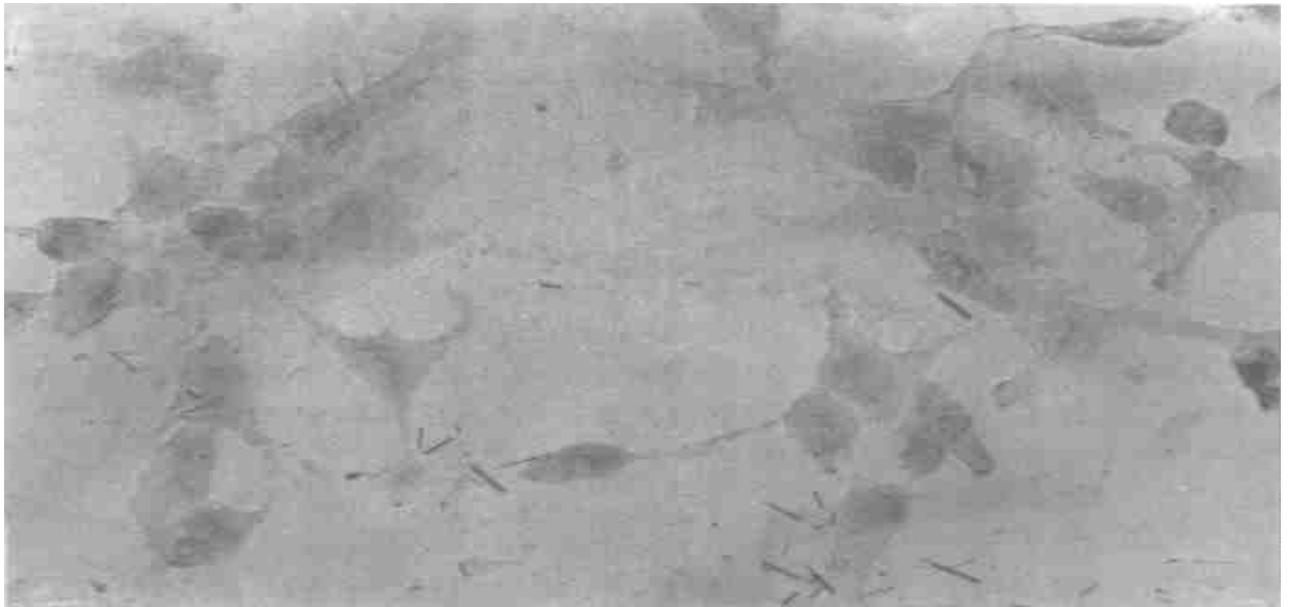


图 3 p16 免疫组化结果

讨 论

国内外不少学者对氟污染的致癌研究已作了不少工作,但其观测指标大都局限为染色体畸变、程序外 DNA 合成(UDS)、姊妹染色单体交换(SCE)以及微核实验等指标,极少从分子生物学水平深入研究氟化物的致癌机制问题。本文从 NaF 对 p16 的影响方面初步探讨氟化物的潜在致癌性。

p16 基因是一种抑癌基因^{1,2},定位于 9q21, Serano 等人³证明 p16 基因是一个细胞周期相关基因,其编码的蛋白可与调节正常细胞生长的细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CD4)结合,并抑制其活性,阻止细胞从 G1 期进入 S 期。p16 基因的突变将会导致细胞无控制的生长和癌症的发生。已有很多报道认为在多种恶性肿瘤中如肺癌、宫颈癌、胃癌等组织中 p16 基因发生多种遗传变异。PCR - SSCP 是近年发展起来的检测基因有无突变的比较可靠的手段。本研究利用 PCR - SSCP 方法及免疫组化方法未能发现 NaF

可引起 p16 基因第 2 外显子和蛋白的改变。但因 p16 基因是由 3 个外显子和 2 个内含子组成,本研究只检测了第 2 外显子的上、下游区,因而还不能完全肯定 NaF 不能引起 p16 基因的改变。

肿瘤的发生是一个复杂的过程,是由多个基因参与、分多步骤完成的,而本研究仅检测 p16 基因的第 2 外显子及 P16 蛋白表达情况,据此不能推断 NaF 是否具有致突变特性,但本研究为进一步研究 NaF 的潜在致癌性提供了一定的实验方法和依据。

参考文献:

- 1 Kamb A, Gruis NA, Weaver Feldhaws J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types J. *Science*, 1994, 264:430 - 434.
- 2 Nabori J, Miura K, Wu DJ, et al. Deletions of the cyclin - dependent Kinase 4 inhibitor in multiple human cancers J. *Nature*, 1994, 368:753 - 759.
- 3 Wahi PN, Mali S, Luthra UK. Factors influencing cancer of the uterine cervix in north india J. *Cancer*, 1969, 23:1221 - 1226.