

体机制尚不清楚。本实验室已证实了烷化剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)可以诱发出 vero 细胞的遗传不稳定状态,表现为延迟发生的非损伤部位 DNA 突变率增加(非定标突变),且突变谱明显不同于由 MNNG 直接攻击引起的定标性突变。转录抑制剂放线菌素 D 可抑制这种突变的形成,提示它的发生依存于基因表达的改变。本研究目的是分离筛选参与以非定标性突变为特征的遗传不稳定发生的相关基因。方法:利用反义核酸技术,对本实验室用差异显示方法分离得到的 EST 片段进行功能分析。首先改建了两个真核表达载体的抗性,利用抗性选择使之进入细胞后不会干乱利用穿梭质粒 pZ189 进行非定标性突变率检测的实验系统。利用此载体构建含反向插入片段的真核细胞表达重组体并转染细胞,以获得反义 RNA 阻断其相应基因的表达,再检测非定标性突变率的变化。结果:筛选得到两个 EST 片段(片段 9,片段 10),它们相关基因的表达被阻断后,非定标突变率均发生了显著的改变。9 号片段相关基因的表达阻断后,非定标性突变率显著增高,vero 细胞组、含空载体的 vero-pM-amp-细胞组及含正反向插入片段的表达质粒的细胞 vero-pM-amp-9,自发突变率均较接近,分别为  $1.6 \times 10^{-4}$ ;  $4.9 \times 10^{-4}$ ;  $4.7 \times 10^{-4}$  及  $4.0 \times 10^{-4}$ ,而 MNNG 处理后突变率均显著增高,分别为  $23.6 \times 10^{-4}$ ;  $36.1 \times 10^{-4}$ ;  $25.0 \times 10^{-4}$  及  $67.0 \times 10^{-4}$ ,与自发突变率相比  $P < 0.01$ ,而其中 vero-pM-amp-9-细胞系在 MNNG 处理后 pZ189 复制的突变率较其它各组的非定标性突变率进一步增高,  $P < 0.05$ ,在含反向插入片段的表达质粒的细胞 vero-pM-amp-10-中,10 号片段的相关基因表达阻断后,非定标性突变率下降至自发突变水平。vero 细胞组、含空载体的 vero-pM-amp-细胞组及 vero-pM-amp-10-细胞组,自发突变率较接近,分别为  $17.2 \times 10^{-4}$ ;  $4.6 \times 10^{-4}$  及  $5.2 \times 10^{-4}$ ,在 MNNG 处理后,突变率分别为  $17.2 \times 10^{-4}$ ;  $16.1 \times 10^{-4}$  及  $2.5 \times 10^{-4}$ ,vero-pM-amp-10 细胞组的非定标突变率与其它组比较  $P < 0.01$ 。结论:反义核酸技术筛选到两个分离片段的相关基因与哺乳类细胞非定标性突变发生有关,其中 9 号片段的相关基因可能参与维持细胞遗传稳定性,抑制非定标性突变的发生,而 10 号片段的相关基因则可参与引起烷化剂处理后细胞非定标性突变的产生。

## 1-6 MNNG 诱导的哺乳类细胞信号转导通路的改变

鲁 靖 余应年 谢海洋 (浙江大学医学院病理生理教研室 杭州 310031)

目的:本实验室曾用烷化剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)在非洲绿猴肾 vero 细胞上诱导出非定标性突变。进一步的研究提示细胞信号转导通路在非定标性突变的发生中扮演了重要角色。所以本实验的目的是研究与非定标性突变发生有关的细胞信号转导通路的改变。方法:本研究中,vero 细胞在  $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$  MNNG 处理 2.5h 后在不同的时间点制备全细胞抽提液,然后利用一种偶联抗体(Anti-Phosphotyrosine Peroxidase)进行 Western 印迹分析来观察细胞蛋白质酪氨酸磷酸化的变化。为了评估 MNNG 处理 vero 细胞引起的胞内 JNK/SAPK 通路激活情况,我们用 Western 印迹法和固相激酶活性测定法分别检测 JNK1 的磷酸化程度和 JNKs 的激酶活性。在这部分实验中,vero 细胞在 MNNG 或  $1 \text{mg L}^{-1}$  放线菌素酮(CHM)处理后在不同的时间点制备全细胞抽提液,Western 印迹法用抗 JNK1 兔多克隆 IgG 和羊抗兔 IgG-HRP 分别作为一抗和二抗。在固相激酶活性测定实验中,细胞抽提液在 [ $^{32}\text{P}$ ATP 存在下与 GST-cJun(79)-agarose 混合孵育,标记的磷酸化 GST-cJun 经 SDS-PAGE 分离后进行放射自显影。结果:在磷酸化酪氨酸 Western 印迹分析中发现 MNNG 处理 vero 细胞后再经 0h 和 12h,细胞内 45kDa 蛋白质酪氨酸磷酸化程度增强。在 MNNG 处理 vero 细胞后再经 6h,有 62kDa 蛋白质酪氨酸磷酸化程度增强。 $1 \text{mg L}^{-1}$  CHM 处理 vero 细胞 12h 也可引起胞内 45kDa 蛋白质酪氨酸磷酸化程度增强。在 JNK1 磷酸化程度和 JNKs 激酶活性测定中发现  $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$  MNNG 处理 vero 细胞 2.5h 和  $1 \text{mg L}^{-1}$  CHM 处理 vero 细胞 1h 都可引起细胞抽提液中磷酸化 JNK1 的比例增高,同时,通过测定 JNKs 的底物 cJun 的磷酸化水平,发现这两种处理也都可使 JNKs 的激酶活性大大增强(分别为对照的 6.7 倍和 3.0 倍)。结论:本研究发现  $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$  MNNG 处理 vero 细胞可引起胞内 45kDa 的 62kDa 蛋白质酪氨酸磷酸化改变,提示 MNNG 可诱导哺乳类细胞内应激信号转导通路激活。另外, $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$  MNNG 处理 vero 细胞 2.5h 和  $1 \text{mg L}^{-1}$  CHM 处理 vero 细胞 1h 都可引起全细胞抽提液中磷酸化 JNK1 的比例增高和 JNKs 的激酶活性成倍增强。证明用于诱导 vero 细胞产生非定标性突变的实验条件可以引起 vero 细胞内信号转导通路发生改变,并且至少可以激活 vero 细胞内 JNK/SAPK 通路。