

MNNG 处理引起猴肾 vero 细胞的 mRNA 差异显示^①

张小山 余应年

浙江医科大学病理生理学教研室及医学分子生物学实验室 杭州 310031

摘要 用 RT-PCR 方法对猴肾 vero 细胞及 MNNG 处理后的 vero 细胞进行了 mRNA 差异显示的研究,结果表明:MNNG 可引起 vero 细胞中一些基因表达的增强和抑制。

关键词 mRNA 差异显示;MNNG;哺乳类细胞

DIFFERENTIAL DISPLAY OF MESSENGER RNA FROM MONKEY KIDNEY VERO CELLS TREATED WITH MNNG VERSUS UNTREATED ONES

Zhang Xiaoshan, Yu Yingnian

Department of Pathophysiology, and Laboratory of Medical Molecular Biology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031

Abstract Differential display of mRNA from the monkey kidney vero cell treated with MNNG versus control ones was performed by means of the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that the expression of certain genes in the vero cells can be either induced or inhibited by the treatment of MNNG.

Key words differential display of mRNA; MNNG; mammalian cells

环境致突变物/致癌物在哺乳类细胞中诱发的延缓突变(delayed mutation)被认为可能是非定标性突变⁽¹⁾。本实验室^(2,3)应用穿梭质粒 pZ189 确认环境致突变物/致癌物可以在哺乳类细胞引起非定标性突变的发生,并获得其它实验室的支持⁽⁴⁾。我们认为这提示致突变物/致癌物诱发的突变除了通过对基因组 DNA 直接攻击引起外,还可通过导致细胞基因组不稳定(genome instability)而

发生。我们推测非定标性突变为 DNA 损伤因子诱导细胞中某些基因表达改变而使 DNA 复制的保真度(replication fidelity)下降的结果。这一领域的深入研究对于突变机制以及与突变有关的诸多生物学现象的研究有着极其重要的价值。

近两年来国外发展的用 PCR 方法研究真核细胞的 mRNA 差异显示(differential display)的技术^(5,6),对于分离差异表达的基

^① 国家自然科学基金资助项目

因已显示其方法学上的优势。我们以特定的多聚胸苷酸作为细胞 mRNA 逆转录的引物,然后以 5' 端特定的多聚胸苷酸引物及 3' 端的任意引物(arbitrary primer)加同位素标记的脱氧核苷酸掺入 PCR,对逆转录反应得到的 cDNA 进行扩增,对甲基硝基亚硝胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)及 MNNG 合并放线菌酮(cycloheximide, CHM)处理和未处理的猴肾 vero 细胞的 mRNA 进行差异显示分析,以分离有表达差异的基因。

材料和方法

1. 细胞培养 猴肾 vero 细胞在 DMEM 培养基(Gibco)中(含小牛血清 15ml/dl,青霉素 2000u/ml,链霉素 100 μ g/ml,卡那霉素 200 μ g/ml)贴壁培养。
2. MNNG 及 CHM 处理细胞 实验分三组进行:一组用 1% DMSO 处理作为对照,一组用 0.2 μ mol/L MNNG(Fluka)处理 2.5 小时,另一组 MNNG 处理后用 5 μ mol/L CHM(Sigma)处理 6 小时;MNNG 处理细胞前后均用 Hanks 液洗两遍。处理后的细胞在全培养基中培养 6 小时。
3. 细胞总 RNA 提取 用 TRIzol™ 试剂盒(Gibco)提取细胞总 RNA,方法按厂家说明书进行。细胞总 RNA 溶解在灭菌的经焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的水中。
4. 逆转录反应 2.2 μ g 细胞总 RNA,200 μ mol/L dNTP,0.1mol/L DTT,10-20u RNasin(Promega),5 μ mol/L 多聚胸苷酸引物(5'-T₁₁CA)及 300u M-MLV 逆转录酶在 20 μ l 总体积中 37℃ 反应 1 小时。
5. PCR 反应 2 μ l 逆转录反应混合液,1.5mmol/L MgCl₂,2.5 μ mol/L 多聚胸苷酸引物(5'-T₁₁CA),0.5 μ mol/L 任意引物(5'

-CTTGATTGCC),0.6 μ mol/L α -³²P dATP,及 1.5u Taq 聚合酶在 20 μ l 总体积中用 PCR 仪(Hyaid)扩增,扩增条件:94℃ 30sec,42℃ 1min,72℃ 30sec,共 40 个循环;72℃ 延长 5min。

6. 分子大小标记 在实验时按下述方法制备而得,即以一克隆在质粒 pBluescript SK 中的、其序列已知的 DNA 片段作为模板,用 TaqTrack Sequencing System 试剂盒(Promega),按厂家说明书进行单轨(ddA)序列分析反应,凝胶电泳后分得的条带的大小按已知序列推定。

7. PCR 扩增产物的电泳分离及差异片段的回收 取 1.5 μ l 95℃ 热变性的 PCR 反应产物及分子大小标记物,在 8% 聚丙烯酰胺序列分析凝胶中电泳,间隔加样三次,电泳条件:恒功率 70W;电泳后压片曝光过夜,洗片后根据条带的差异回收相应片段所在的聚丙烯酰胺凝胶,以备进一步纯化、定性及对相应基因的生物学功能的研究。

结果

对照组、MNNG 处理组的逆转录 PCR 反应产物在聚丙烯酰胺凝胶电泳后的结果显示:在 100-400bp 范围内共显示了约 100 个条带,三组间的绝大部分条带无差异,而 6 个条带(Z1-Z6)显示了明显的差异,其中 3 个条带在对照组无显示或显示很弱,在 MNNG 处理组及 MNNG 合并 CHM 处理组中则出现或明显增强;一个条带仅在 MNNG 处理组中出现,对照组及 MNNG 合并 CHM 处理组中无此条带;另有 2 个条带在 MNNG 处理后消失,其中一条在 MNNG 合并 CHM 处理后重现(见图 1)。差异显示的 6 个条带的 DNA 片段大小及相应的基因表达改变如表 1 所示。

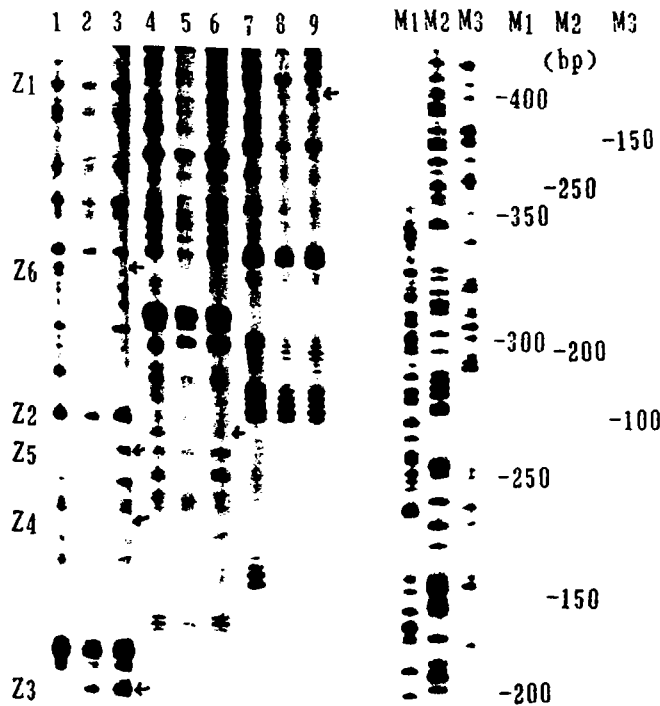


Fig. 1 Differential display of mRNAs from vero cells treated with MNNG versus untreated ones. RT-PCR products (lane 1-9) and ssDNA size markers of single track (ddA) DNA sequencing of a sequence known DNA fragment (lane M1-M3) were analyzed on a 8% DNA sequencing gel with three separate loadings each, (the first loading: lane 1-3 and M1, the second loading: lane 4-6 and M2, the third loading: lane 7-9 and M3). Lane 1, 4 and 7 were from the control. Lane 2, 5 and 8 were from the cells treated with MNNG. Lane 3, 6 and 9 were from the cells treated with MNNG and CHM. The arrowheads indicate the amplified mRNA species displayed differentially.

Table 1. Change of gene expression in vero cells treated with MNNG

Fragments displayed differentially	Size(bp) of fragments obtained	Mode of expression changes of indicated gene *			Classification of differentially displayed gene according to their mode of expression
		Control	Treated with MNNG	Treated with MNNG and CHM	
Z1	158	-	+++	+++	primary response gene
Z2	180	+++	-	+++	secondary response gene
Z3	200	-	+++	+++	primary response gene
Z4	230	-	+++	-	secondary response gene
Z5	255	+	+++	+++	primary response gene
Z6	330	+++	-	-	primary response gene

* "-" ; not expressed; "+" ; low expressed; "+++" ; high expressed

已有足够资料证实:哺乳类细胞中存在非定标性突变,而且后者有与定标性突变不同的序列特异性^(6,7),这提示哺乳类细胞中存

在一个在 DNA 损伤后在未损伤的碱基部位发生突变的机制。Wang 的研究表明:在着色性干皮病变种(XP-variant)细胞中存在一

个错误倾向的复制系统⁽⁸⁾。Branch 报道在人 Raji 细胞和中国仓鼠 CHO 细胞用小剂量单功能烷化剂 MNU (N-methyl-N-nitrosourea) 诱导后得到的对 MNU 呈获得性耐受的细胞克隆,其细胞提取液缺乏与 G·T 误配碱基相结合的活性(蛋白),而且子代细胞中的自发突变频率增高⁽⁹⁾。这显示自发突变频率增高为细胞 DNA 误配修复(mismatch repair)功能缺陷导致 DNA 复制保真度下降所致。在人遗传性非息肉病性结直肠癌中也已证明:90%的这些患者有定位于染色体 3P 或 2P,分别编码两个误配碱基修复蛋白的 hMLH1 或 hMSH2 基因有遗传性缺陷^(10,11)。这些证据都提示哺乳类细胞中的突变形成可以因负责维持 DNA 复制正确性的机制或误配修复机制有缺陷而引起。

本研究结果表明:MNNG 处理和未处理猴肾 vero 细胞存在着 mRNA 的差异表达,表现为一些基因在 MNNG 处理后表达或表达增强,及一些基因的关闭。这些基因表达改变有的不受翻译抑制剂的影响,可归类为初级反应基因;有的基因表达改变在蛋白合成抑制剂存在下消失,即后者的表达或抑制由 MNNG 处理诱导的其它蛋白的合成所调控可归类为次级反应基因。本研究用一对引物分析了 MNNG 引起猴肾 vero 细胞的 mRNA 差异显示,观察到了 6 个基因表达的改变,用更多的特定多聚胸苷酸引物与任意引物配对的研究,则可能了解 MNNG 处理 vero 细胞后基因表达改变的全貌。这些通过 MNNG 诱导后表达改变的基因是否与 DNA 复制的保真度或 DNA 修复功能有关,是否

为非定性突变形成的机制所在尚待进一步研究。

参考文献

1. Boesen JJB, Stuijvenberg S, Thyssens CHM, et al. Stress responses induced by DNA damage leads to specific, delayed and untargeted mutations. *Mol Gen Genet*, 1992; 234:217.
2. 张小山, 余应年, 陈星若. MNNG 诱导猴肾细胞中的非特异性突变. *癌变·畸变·突变*, 1993; 5:1.
3. 王卫萍, 余应年, 陈星若. 菜油烟凝聚物诱导人羊膜 FL 细胞的非特异性突变. *癌变·畸变·突变*, 印刷中.
4. 王浩. 建立 FL 细胞诱变检测系统及其诱变特性的分析研究. 私人通讯.
5. Liang P and Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992; 257:967.
6. Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, et al. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 1992; 52:6966.
7. 张小山, 余应年, 陈星若. Evidence for nontargeted mutagenesis in a monkey cell line and analysis of its sequence specificity using a shuttle-vector plasmid. *Mutat Res*, 1994; 323:195.
8. Wang YC, Maher VM, Mitchell DL, et al. Evidence from mutation spectra that the UV hypermutability of xeroderma pigmentosum variant cells reflects abnormal, error-prone replication on a template containing photoproducts. *Mol Cell Biol*, 1993; 13:4276.
9. Branch P, Aquilina G, Bignami M, et al. Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature*, 1993; 362:652.
10. Service RF. Stalking the start of colon cancer. *Science*, 1994; 263:1559.
11. Modlich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Ann Rev Genet*, 1991; 25:229.

欢迎邮购本刊(1990—1995)

本刊 1990—1995 年尚有存书(仅缺 1990 年第二期),欢迎广大读者邮购。1990—1993 年的每册 1.90 元,1994—1995 年的每册 2.50 元,需要者请通过邮局汇款到本刊编辑部购买。