

B(α)P 诱导的 V79 细胞 HGPRT 位点突变的检测

曹毅 徐洪兰 段志凯 吴启庆

中国辐射防护研究院 太原 030006

摘要 在加与不加 S9 两种情况下,用 V79 中国仓鼠细胞检测了 B(α)P 诱导的 HGPRT 突变频率和细胞毒性。结果表明,无论加与不加 S9 混合液,B(α)P 对 V79 细胞都具有明显毒作用,但在不加 S9 时,不会导致 6-巯基鸟嘌呤抗性细胞发生率的明显增加。在存在 S9 混合液时,B(α)P 诱导的 HGPRT 突变频率随 B(α)P 浓度的加大而明显增加。剂量在 0.5—8 μ g/ml 范围时,每 1 μ g/ml B(α)P 诱发的 V79 细胞 HGPRT 位点突变频率为 7—24/10⁶ 细胞

关键词 突变;HGPRT 位点;V79 细胞;苯并芘

DETECTION OF THE B(α)P—INDUCED HGPRT MUTATION IN V79 CELLS

Cao Yi, Xu Honglan, Duan Zhikai, Wu Qiqing

China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006

Abstract The induction frequencies of mutation at the hypoxanthine—guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) locus and cytotoxicities of benzo— α —pyrene (B(α)P) were examined in V79 Chinese hamster cells with and without S9 mixture. B(α)P was cytotoxic to V79 cells in the presence and absence of S9 mixture, but failed to produce significant increase in the frequency of 6—thioguanine—resistant mutants without S9 mixture. The mutation frequencies induced by B(α)P (with S9 mixture) were dependent on the dose of B(α)P. When doses of B(α)P ranged from 0.5—8 μ g/ml, the induction frequencies were 7—24 mutants/10⁶ cells/1 μ g/ml.

Key words Mutation; HGPRT; V79 cell; B(α)P

苯并(α)芘[B(α)P]是典型的多环芳烃(PAH),和人类的肿瘤,尤其是肺癌有关⁽¹⁾。因此检测 B(α)P 的细胞毒性及致突效应,对研究化学物致突、致癌的机理,及预防人类肿瘤具有重要意义。

用哺乳动物进行致突研究,费用高、实验

周期长,缺乏生化特性明确的遗传标记;用原核生物进行突变检测,也具有一定的局限性⁽²⁾。与动物实验及细菌回复突变实验相比,V79 细胞 HGPRT 位点正向突变具有快速、灵敏、可靠、可检测遗传学改变等许多优点,已在遗传毒理学机理研究、诱变剂的筛选,致

癌剂、抗癌剂的筛选等领域得到越来越广泛的应用⁽³⁾。本文报道了用 V79/HGPRT 测试系统检测的 B(α)P 诱发的 HGPRT 位点的突变频率。

材料和方法

1. 细胞培养 V79 细胞由军事医学科学院二所刘国廉主任惠赠。经常规方法检测, V79 细胞染色体数为 22 ± 1 , 倍增时间为 12—16h。细胞接种于含 15% 胎牛血清, 200u/ml 庆大霉素的 RPMI1640 (GIBO 产品) 培养液中, 5% CO₂, 37℃ 条件下培养。为了减少 HGPRT 位点自发突变频率, 使用前, 细胞用 HAT 培养基处理 3h, 换成 HT 培养基培养 48h, 再换成 RPMI1640 完全培养液培养 7—10d, 分成若干小瓶冻存储备用。

2. 细胞与检品的接触 将 B(α)P (FLUKA 产品) 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 无血清培养液稀释。B(α)P 的浓度分别为 0, 0.5, 1, 3, 5, 8 μg/ml, DMSO 的最大浓度为 1%。根据文献报道⁽⁴⁾, DMSO 的浓度 ≤ 1% 时, 不会引起 HGPRT 位点突变频率的明显升高, 故本实验对照组为不含 B(α)P 的培养液, 及含 1% DMSO 的培养液。将指数生长期的细胞弃去培养液, 然后加入含不同浓度受试物的无血清培养液, 染毒 2.5h 后, 弃去受试物, D-Hank's 液洗两次, 更换新培养液。

3. 代谢活化系统 因为 V79 细胞不具有对一些间接致突剂的代谢活化能力^(5,6), 因此必须加入外源的代谢活化系统。本实验中 B(α)P 的诱变测试在加与不加 S9 混合液两种情况下进行。S9 混合液的制备参照 Ames 方法⁽⁷⁾, 染毒时与 B(α)P 同时加入。

4. 细胞毒性测定 细胞染毒 24h 后, 胰酶消化, 制成细胞悬液并计数, 取直径 60mm 的培养皿, 每皿接种细胞 200 个, 每组 3 个培养皿, 培养 7d, 10% 甲醛固定, 龙胆紫染色, 计数克隆 (50 个细胞以上的集落称为一个克隆)。计算各组相对于对照组的存活率, 以此

表示不同剂量作用后的细胞毒性效应。

5. 突变分析 在测细胞毒性效应的同时, 将 2×10^5 个细胞接种于 75cm² 的培养瓶中, 培养 8d, 使突变体表达。这期间每隔 2—3d 传代一次。表达结束后消化计数细胞, 将 2×10^5 个细胞接种于 90mm 的平皿内 (每个剂量组 5 皿), 加入 10ml 含 6-TG (SIGMA 产品) 的选择培养液 (6-TG) 的终浓度为 10 μg/ml, 培养 10d, 固定染色, 计数克隆。同时接种 200 个细胞于 60mm 培养皿内 (每个剂量组 5 皿), 在无 TG 培养液中培养 7d, 计数克隆, 计算各组克隆形成率。

$$\text{绝对 CE} = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

突变频率 (MF) 一般以 10^6 个存活细胞中出现的突变细胞数表示⁽⁸⁾。

$$MF = \frac{\text{突变克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times \frac{1}{\text{绝对 CE}}$$

结果

本实验中 1% 的 DMSO 对照组与培养液对照组的突变频率一致, 均为 9×10^{-6} 。

B(α)P 在加与不加 S9 时对 V79 细胞的毒性作用如图 1 和图 2 所示, 从图中可以看出, 无论加与不加 S9, B(α)P 均显示出对 V79 细胞的明显毒性作用, 且细胞杀死程度随 B(α)P 浓度的加大而增加。经直线回归分析得出在加 S9 时细胞存活率 $Y = 94.62 - 2.53X$, $R = -0.948$, $P < 0.001$, 不加 S9 时细胞存活率 $Y = 81.51 - 1.37X$, $R = -0.855$, $P < 0.05$ 。加 S9 组在 2 μg/ml 浓度以上, B(α)P 对细胞的杀死作用大于不加 S9 组。

如图 1 和图 2 所示, B(α)P 对 V79 细胞 HGPRT 位点的致突作用, 在加 S9 与不加 S9 时明显不同。在加 S9 时, B(α)P 的致突作用随 B(α)P 浓度的加大而明显增高, 数据符合线性平方模型 $MF = 10.30D - 0.48D^2$, 相关系数 $R = 0.997$ ($P < 0.001$)。剂量在 0.5—8 μg/ml 时, 每 1 μg/ml 诱发的 V79 细胞突变频率为 7—24 个/ 10^6 细胞; 不加 S9 时, 突变

频率与 B(α)P 浓度无相关性,即 B(α)P 不表现致突作用。

能。

B(α)P 诱变实验中的代谢活化问题 B(α)P 属于前致突剂(promutagen),本身无直接致突作用,只有经过一系列酶的作用,所产生的终致突物才具有致突作用。V79 细胞不具有代谢 B(α)P 的酶系统,必须加入一定的活化酶后才能诱导一系列致突反应⁽⁹⁾。因此本实验中,加 S9 时,B(α)P 对 V79 细胞具有明显致突作用,不加时,则 B(α)P 不表现出对 V79 细胞的致突作用。S9 混合液中混合功能氧化酶(MFO)可以催化 B(α)P 形成 7,8-二醇-B(α)P,再进一步催化形成 B(α)P-二醇-环氧化物(BPDE),BPDE 可共价结合于 DNA、RNA 和蛋白质。但 S9 混合液中也含有较多的亲核物质(nucleophiles),可以和终致突物相结合,如果 S9 浓度不适当,反而会影响和降低实验的敏感性⁽⁹⁾。P. Clay 和 M. F. Cross 的研究结果表明,S9 的浓度为 2%,5%,10%时,B(α)P 都表现出对 V79 细胞的明显致突性⁽¹¹⁾,本实验采用的 S9 浓度为 4%。

B(α)P 浓度范围的选择 在作致突实验前,应先测定存活曲线,决定化合物的剂量。剂量太小时,突变率接近背景值;剂量过大时主要表现为细胞的杀伤效应,使得突变率的检测难以进行⁽¹²⁾。因此我们选择的 B(α)P 剂量使细胞存活率保持在 20%以上,满足诱变实验要求。

自发突变频率的控制 自发突变频率过高会影响检测的灵敏度。V79 细胞 HGPRT 位点的自发突变频率应低于 1×10^{-5} ⁽¹³⁾。本次实验为减少自发突变频率,实验前将 V79 细胞用 HAT 培养基处理。由于自发突变体在每次传代后有所增加,我们将 HAT 处理过的细胞分成若干瓶冻存,每次实验前重新复苏。本次实验中 V79 细胞 HGPRT 位点的自发突变频率低于 10^{-5} ,符合实验要求。

突变表达 V79 细胞经 B(α)P 诱变处理后,HGPRT 基因位点突变并不能立即在

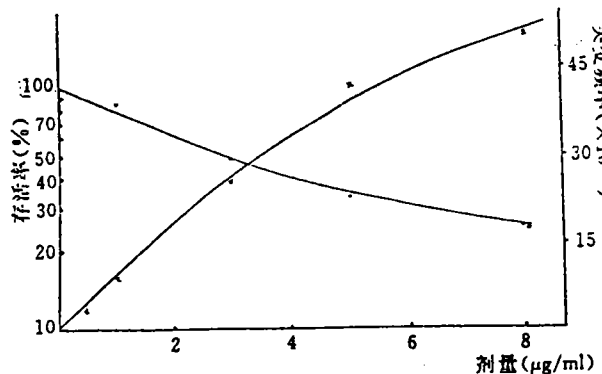


图 1. B(α)P+S9 对 V79 细胞的毒性

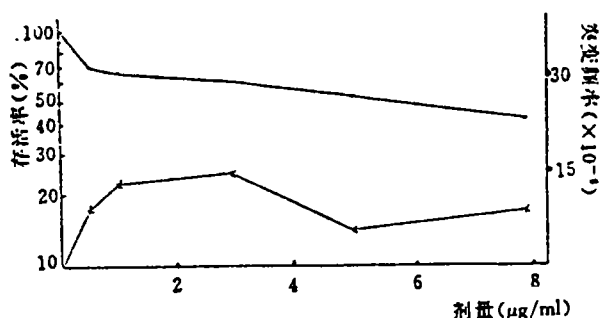


图 2. B(α)P-S9 对 V79 细胞的毒性(·)及对 HGPRT 位点的致突效应(X)

讨论

HGPRT 基因位点突变分析的特点 本实验用哺乳动物体细胞 HGPRT 基因位点正向突变检测了 B(α)P 的细胞毒性和致突性,并得出了 B(α)P 的剂量与 HGPRT 基因位点突变诱导率的剂效关系的数学模式。定量的剂效关系数学模式的建立,一方面有利于对环境致突剂生物危害的定量评价,另一方面使得不同类型环境致突剂(例如辐射和化学污染物)生物危害效应的定量比较成为可

细胞表现型上得到反映,这是因为 HGPRT 基因位点发生损伤时,细胞质中仍有不少的 HGPRT 分子及仍可以继续形成 HGPRT 的 mRNA,只有等细胞内已存在的正常基因产物被突变基因产物取代而降至可忽略的水平时,才会表现出异常表现型。因此一般突变实验在与化合物完成反应后,要有一段表达时间⁽¹²⁾。V79 细胞的表达时间一般取 7—9d^(13,14,15)。本次实验选择的表达时间为 8d。

突变选择时的细胞密度 在突变表达结束时,大量的细胞(约 $1.5-2 \times 10^6$)要转移到选择培养液中去。细胞太密集时,野生型细胞与突变型细胞间会互换 HGPRT 分子及嘌呤类似物的代谢产物。如正常细胞 HGPRT 以 TG 为底物产生的毒性核苷—5—单磷酸交叉喂饲(cross-feeding)给 HGPRT 突变细胞,而使突变细胞不能显示出对 TG 的耐受性。因此每 cm^2 只可覆盖 500 个细胞^(13,16)。本次实验细胞密度控制在 2.5×10^5 个细胞/ 9cm^2 平皿。

HGPRT 基因的研究目前已经进入分子水平,最近已经分析了其全部序列及突变的基因图谱,这就为研究提供了充分的参考资料⁽¹⁶⁾。便于广泛地在遗传毒理、放射毒理及环境监测等领域应用。

参考文献

1. 程元恺,杨光桂主编. 环境致癌物—多环芳烃研究. 中国科学技术出版社,1990;246.
2. Patrick O'Neill J, et al. A quantitative assay of mutation induction at the HGPRT locus in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system). *Mutat Res*, 1977; 45: 91.
3. Bradley MO, et al. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. A report of the Genetox program. *Mutat Res*, 1981; 87: 89.
4. Brien KAF, et al. Induction of mutation in TK6 human lymphoblastoid cells by ethyl methanesulphonate, benzo (a) Pyrene and benzidine. *Mutagenesis*, 1990; 5: 55.
5. Huberman E et al. Cell mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical carcinogens. *Int J Cancer*, 13: 326.
6. Jenssen D et al. Mutagenicity testing on Chinese hamster V79 cells treated in the in vitro liver perfusion system. Comparative investigation of different in vitro metabolizing systems with dimethylnitrosamine and benzo (a) pyrene. *Chem Biol Interact*, 1979; 27: 27.
7. 黄幸纤主编. 环境化学物致突变、致畸、致癌实验方法. 浙江科学技术出版社, 1985; 31.
8. Li AP et al. A guide for the performance of the Chinese hamster ovary cell/HGPRT gene mutation assay. *Mutat Res*, 1987; 189: 135.
9. 程元恺,杨光桂主编. 环境致癌物——多环芳烃研究. 中国科学技术出版社, 1990; 225.
10. Huberman E et al. Mutability of different genetic loci in mammalian cells by metabolically activated carcinogenic polycyclic hydrocarbons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976; 73: 607.
11. 程元恺,杨光桂主编. 环境致癌物——多环芳烃研究. 中国科学技术出版社, 1990; 270.
12. Clay P et al. Mccrowell mutation assays: evaluation of ethylmethanesulphonate, benzo(a)pyrene and benzidine using the tk locus in 15178Y mouse lymphoma cells. *Mutagenesis*, 1990; 5: 45.
13. 黄幸纤主编. 环境化学物致突变、致畸、致癌实验方法. 浙江科学技术出版社, 1985; 160.
14. Bradley MO et al. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. A report of the Genetox program. *Mutat Res*, 1981; 87: 81.
15. Hise AW et al. The user of Chinese hamster ovary cells to quantify specific locus mutation and to determine mutagenicity of chemical. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res*, 1981; 86: 193.
16. Albertini RJ et al. Meeting Report: mutation at the hprt locus. *Mutat Res*, 1989; 216: 65.