

秋水仙碱和长春新碱诱导 L5178Y 小鼠淋巴瘤细胞 *tk* 基因杂合性缺失分析

袁 健, 刘胜学, 刘晋祎, 曹 佳*

(第三军医大学军事预防医学院卫生毒理学教研室, 重庆 400038)

摘要: 目的 探讨秋水仙碱(Col)和长春新碱(Vin)诱导 *tk* 基因分子突变类型及机制。方法 挑选经 Col, Vin 诱导的 *tk* 基因突变子(*tk*^{-/-})和自发突变体,提取基因组 DNA,经等位基因特异性 PCR 扩增,杂合性缺失(LOH)分析等技术,分析其 *tk* 基因杂合性缺失。结果 Col 和 Vin 诱导突变体的 *tk* 基因 LOH 发生率分别为 91.5% 和 92.1%。由 LOH 分析结果显示,诱导突变体的 LOH 发生率在自发突变与诱导突变之间,大集落与小集落之间差异均没有显著性。结论 Col 和 Vin 诱导的 *tk* 基因是以功能性等位基因缺失为主的分子突变。

关键词: 秋水仙碱; 长春新碱; 基因, *tk*; 杂合性缺失

中图分类号: R394.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2006)04-0339-05

秋水仙碱(colchicine, Col)和长春新碱(vincristine, Vin)在临床应用中主要为抗肿瘤用药,由于 Col 具有特殊的结构和较强的抗癌活性,同时近期 Vin 的合成类似物特别对肺癌和乳癌的治疗有特殊意义,对其研究日益受到关注;并且这两种化合物由于可以诱导非整倍体的发生,其致癌和致突变作用受到重视。前期已报道 Col 可诱导 L5178Y 细胞 *tk* 基因发生突变^[1],本研究使用等位基因特异性 PCR 扩增,杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)分析等方法,分析 Col 和 Vin 诱导 *tk* 基因的分子突变。

收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100153); 国家自然科学基金资助项目(30471476)

作者简介: 袁 健(1968-),男,甘肃省兰州市人,讲师,硕士,主要从事遗传毒理和分子毒理方面的研究。

*联系作者 E-mail: caojia@mail.tmmu.com.cn Tel: (023)68752271

1 材料与方法

1.1 试剂

Col 为德国 Serva 产品, Vin 为杭州民生制药厂产品。*tk* 基因扩增反应引物全部由上海 Sangon 合成, Taq DNA 聚合酶、dNTPs 及 PCR 反应体系为 Sangon 产品。蛋白酶 K 为美国 Sigma 产品。

1.2 小鼠淋巴瘤细胞试验^[1]

小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y 细胞由日本国立医药食品卫生研究所惠赠,细胞登记号: CRL-9518。

Col 按 0, 10, 20, 30, 40 和 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (终浓度), Vin 按 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (终浓度)进行小鼠淋巴瘤细胞染毒,在含有三胸苷的培养基中培养 14 d,计数突变集落,分别计算相对存活率(relative survival, RS)、细胞增殖率(relative suspension growth, RSG)、细胞接种效率和突变频率^[1]。同时获得 L5178Y 突变的细胞(*tk*^{-/-})。阴性对照为 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙基亚硝基脲(ethylnitrosourea, ENU)。

1.3 基因组 DNA 提取^[2]

将 96 孔平板微孔中突变集落的细胞移入尖底离心管中,经过 PBS 液洗涤,蛋白酶 K 消化过夜,饱和酚抽提等步骤获得 L5178Y 细胞基因组 DNA。进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定,将鉴定后的 DNA 贮存于 -20°C 。

1.4 *tk* 基因的扩增及缺失分析

50 μL 体系中含有 100 ~ 200 ng 基因组 DNA, *tk* 引物各 25 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ Taq 酶。PCR 反应在 PE 9600 型 PCR 扩增仪上进行,PCR 反应由于特异性要求较高,故采用着陆(touchdown)反应条件。其 PCR 条件为 94°C 变性 60 s, 72°C 退火 20 s, 72°C 延伸 30 s 共 4 个循环。再经 94°C 变性 60 s, 72°C 退火 20 s, 并且每一个循环退火温度降低 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 72°C 延伸 30 s, 共 20 个循环。最后,稳定在 65°C 退火温度

20 s,共进行 20 个循环。同时,使用 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照。扩增 *tk* 基因引物为^[2],P1:5'agg gag gtg cct ggc taa ctg acc gca3'和 P2:5'gcg gca cac gga gtg ata ctt gtc ggc3'。 β -Actin 引物为,P1:5'gag acc ttc aac accc cca gcc3'和 P2:5'ggg aaa tcg tgc gtg aca tc3'。反应完成后,分别取 5 μ L *tk* (523 和 440 bp) 和 β -actin (256 bp) PCR 产物于 4% ,2% 琼脂糖凝胶电泳(5 V \cdot cm⁻¹, EB 250 μ g \cdot L⁻¹),在紫外灯下观察条带位置,判断等位基因缺失情况。

1.5 统计学分析

受试物组的突变频率达到自发突变频率的 2 倍或以上,并呈剂量反应效应,则可判定为阳性。LOH 发生率使用 SPSS10.0 软件包进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 秋水仙碱和长春新碱诱发 L5178Y 细胞 *tk* 基因的突变率

由图 1A 和 B 可以看出,Col 和 Vin 所诱发的突变频率与其相应的 RS0 和 RSG 呈负相关。当 Col 和 Vin 分别达到 50 和 2.5 μ g \cdot L⁻¹ 最高浓度时,上述细胞毒性指标降至最低。由表 1 结果可知,随着 Col 和 Vin 的浓度增加,*tk* 基因的突变频率也随之增加。其诱发的突变频率是自发突变频率的 1 ~ 3 倍。依据判断标准,两者均为明确的阳性结果。

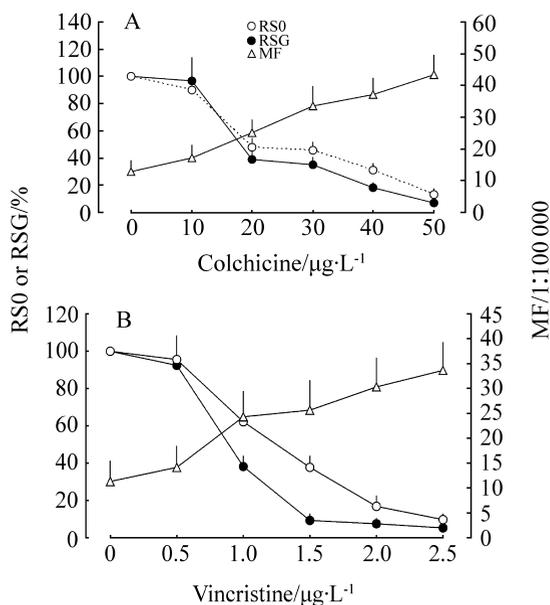


Fig 1. Cytotoxicity represented by RS0, RSG and MF at the *tk* locus in L5178Y cells after treatment with colchicine (A) and vincristine (B) for 24 h. Colchicine (Col) was removed and then resuspended in medium at a density of 5×10^8 L⁻¹, and maintained in the incubator for 2 d at 37°C. At the 0 and 48 h of expression, cells were seeded in 96 well plates(1.6 cells per well) in non-selective medium. Plates were incubated at 37°C in 5% CO₂. Colonies were counted to determine the cytotoxicity after 14 d. RS0% : 100% \times Col plating efficiency/control plating efficiency on d 0. RSG% : 100% \times CGR on d 1 \times CGR on d 2 in Col group/CGR on d 1 \times CGR on d 2 in control group. CGR: cell growth rate. MF: mutation frequency. $\bar{x} \pm s$, n = 3.

Tab 1. *tk* Gene mutation frequency and cytotoxicity induced by colchicine (Col) and vincristine (Vin) in L5178Y cells

Drug/ μ g \cdot L ⁻¹	RS0/%	RSG/%	PE2/%	10 ⁻⁵ \times MF	
Col	0	100 \pm 0	100 \pm 0	90.7 \pm 15.1	12.9 \pm 3.7
	10	90.4 \pm 10.3	97.0 \pm 17.3	74.8 \pm 11.5	17.2 \pm 4.1
	20	48.1 \pm 6.6	39.0 \pm 6.1	51.4 \pm 8.3	25.2 \pm 4.2
	30	45.7 \pm 6.1	35.5 \pm 5.3	50.4 \pm 7.6	33.6 \pm 6.2
	40	31.1 \pm 5.2	18.4 \pm 4.2	46.7 \pm 7.1	37.3 \pm 5.3
	50	13.6 \pm 4.2	7.4 \pm 2.1	33.6 \pm 5.2	43.5 \pm 6.3
Vin	0	100 \pm 0	100 \pm 0	83.7 \pm 18.2	11.3 \pm 4.2
	0.5	95.4 \pm 13.2	92.0 \pm 13.3	72.8 \pm 10.5	14.2 \pm 4.3
	1.0	62.2 \pm 8.2	38.1 \pm 5.9	44.7 \pm 5.3	24.3 \pm 5.2
	1.5	37.7 \pm 6.4	9.5 \pm 3.3	54.2 \pm 7.0	25.6 \pm 6.0
	2.0	17.1 \pm 5.6	7.4 \pm 3.1	51.7 \pm 6.7	30.4 \pm 5.7
	2.5	9.6 \pm 3.1	5.4 \pm 2.0	35.7 \pm 4.6	33.7 \pm 5.6
ENU	10 mg \cdot L ⁻¹	73.6 \pm 7.8	74.2 \pm 11.3	63.4 \pm 8.2	35.1 \pm 4.7

PE2% : 100% \times ln(total number of wells/number of empty cells)/cell number per well on d 2. ENU: ethylnitrosourea. $\bar{x} \pm s$, n = 3.

表明 Col 和 Vin 均可以诱发 L5178Y $tk^{+/-}$ 细胞 tk 基因突变, 具有明确的致突变性。

2.2 秋水仙和长春新碱诱导 tk 基因杂合性缺失的影响

tk 基因的扩增及缺失分析是在紫外灯下观察 PCR 扩增条带位置, 所扩增的 tk 等位基因 PCR 产物不同是由于非功能性等位基因缺少 83 个碱基所形成的(图 2 和图 3)。经检测 Col 诱导的 47 个 tk 基因突变体 LOH 的发生情况, 总发生率为 91.5% (表 2)。结果显示大集落 (large colony, LC) 发生了以功能性等位基因缺失为主的基因缺失 (81.8%), 而小集落 (small colony, SC) 全部失去了这个片段。对 20 个自发突变体进行 LOH 分析, 自发突变 LOH 的总发生率为 80.0%, 其 LOH 也显示了以失去了功能性 tk 等位基因为主的突变模式。在自发和诱导突变之间, SC 与 LC 之间 LOH 的差异均没有显著性。

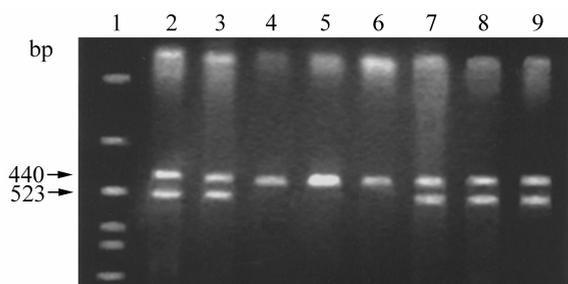


Fig 2. Analysis of loss of heterozygosity (LOH) of tk gene. The difference in product size was the cause of heteromorphic microsatellite within tk gene, indicating that there is approximately 83 bp shorter in the non-functional tk allele than in functional tk . Lane 1; DL2000 ladder; lanes 2 and 3; PCR products from L5178Y $tk^{+/-}$ cells; lanes 4-6; positive LOH of induced mutants; lanes 7-9; non LOH of induced mutants.

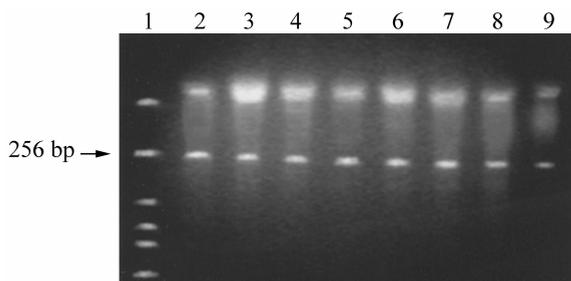


Fig 3. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification product of β -actin. The mouse gene of β -actin was internal controls. Lane 1; DL2000 ladder; lanes 2 and 3; PCR products from L5178Y $tk^{+/-}$ cells; lanes 4-9; PCR products from induced L5178Y $tk^{-/-}$ mutants.

Tab 2. Loss of heterozygosity analysis at $tk^{+/-}$ locus induced by colchicine and vincristine

Drug/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Frequency of LOH	
	LC	SC
Colchicine	0	6/10
	50	18/22
Vincristine	0	4/6
	2.5	15/18

LC; large colony; SC; small colony. L5178Y3.2.7c- $tk^{+/-}$ cells were treated with colchicine or vincristine. The cells were seeded in 96-well plates (2×10^3 cells per well) and cultured in the selective medium containing trifluorothymidine (TFT, $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) for 14 d to select the $tk^{-/-}$ mutants. There were no significant difference between spontaneous and induced mutants both in LC and SC.

经 Vin 诱导 tk 基因突变的 38 个突变体, LOH 的总发生率为 92.1% (表 2), 结果显示 LC 和 SC 发生了以功能性等位基因缺失为主的片段缺失。对 12 个自发突变体进行 LOH 分析, 自发突变 LOH 的总发生率为 83.3%。其 LOH 也显示了与诱导突变相近似的突变模式。在自发和诱导突变之间, SC 与 LC 之间 LOH 的差异均没有显著性。

3 讨论

LOH 是指在同源染色体上的一个或多个位点上存在不同等位基因的状态发生了丢失。较多的研究证实, 等位基因杂合性缺失是基因失活方式之一。而且 LOH 发生区域是非随机的, 如果某个染色体区域频繁发生 LOH, 则该区域很可能存在与细胞生长控制基因相关的基因失活, 最终可能与肿瘤和多种遗传疾病发生密切相关。本研究亦使用 LOH 分析进行 tk 基因的分子突变研究。

作者分别检测了 Col 及 Vin 诱导的 47 个和 38 个 tk 基因突变体 LOH 的发生, 由 LOH 分析的结果可知, 这两种纺锤体毒剂均诱导了 tk 基因较高比例 LOH 的发生 (91.5% 和 92.1%), 这一结果与相关报道一致^[3,4], 反映了 L5178Y 细胞 tk 基因诱导突变和自发突变均显示了以基因缺失为主的突变类型。虽然, 纺锤体毒剂不是以 DNA 为靶的致突变因素, 但同样证实了纺锤体毒剂可以诱导以基因缺失为主的突变。早期以分子杂交技术为手段的研究表明^[5,6], L5178Y 细胞在多种化合物的处理后, 其基

基因组经 Nco I 限制性酶切,发生了 *tk* 基因一段 6.3 kb 的基因片段(这一区域包含了 5, 6 及 7 外显子)的缺失,而其他部分片段却较少的发生缺失,提示了在这个区域好发的大范围突变,而本研究的结果也证实了发生在外显子 6 区域以功能性等位基因缺失为主的分子突变。对于 L5178Y 细胞纺锤体毒剂所引起的 LOH,染色体的缺失和重组均可以导致 *tk* 基因杂合性缺失的发生。Honma 等^[4]证实纺锤体毒剂的致突变机制,主要源自染色体不分离所导致的全染色体的丧失,这种现象可能与该细胞存在着其 *p53* 基因突变所导致的染色体不稳定性有关。同时,纺锤体毒剂可能会干扰 DNA 合成和修复有关的酶系统,而存在间接的致突变机制。

Col 和 Vin 诱导的 LOH 分析结果均显示 LC 和 SC 之间不存在显著差异,这一结果与点突变剂所致基因缺失存在差异。Chen 等^[5]用 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ENU 处理 L5178Y 细胞后,经等位基因特异 PCR 分析了发生在 *tk* 基因的 LOH。表明在 SC 中 97% 的诱导突变失去了功能性 *tk* 基因,LC 中诱导突变的 23% 发生了 LOH($P < 0.001$)。纺锤体毒剂与点突变剂在 LC 中所显示的这种差异,提示了与致突变剂相关的突变机制及 LC 可能对突变更为敏感。Storer 等^[7]对 L5178Y 细胞的多基因突变进行了研究,证实 *tk* 基因的突变同时也伴随着 *p53* 基因和 *gk* 基因的突变,指示 *tk* 等位基因的损伤伴随着邻近基因的改变。

结合本实验结果作者认为,这种由纺锤体毒剂诱导所产生 *tk* 基因的 LOH 对细胞增殖的抑制作用,会使纺锤体毒剂的抗癌作用向有利的一面发展,其可能并不是由于该突变基因直接参与细胞生长控制基因的活动,而可能是 *tk* 基因突变影响细胞物质代谢的某一或某些过程而引起有害代谢产物的生成和(或)蓄积,从而抑制细胞的生长,*tk* 基因的突变与众多的生长控制基因存在什么样的联系和作用,还需要进一步的研究和证实。

tk 基因分子突变的研究随着对 *tk* 基因的了解和试验技术的进步在不断发展,同时由于小鼠淋巴

瘤 L5178Y *tk*^{+/-}-3.7.2C 细胞,具备检测从染色体到基因点突变的能力,如何利用好这一载体和相关试验方法,对进行环境致突变检测和突变机制研究都具有重要的意义。

4 参考文献:

- [1] Yuan J, Liu SX, Cao J. Spindle poisons induce *tk* gene mutation in mouse lymphoma cells[J]. *Acta Acad Med Mil Tert* (第三军医大学学报), 2003, **25**(19):1688 - 1691.
- [2] Liechty MC, Crosby H Jr, Murthy A, Davis LM, Caspary WJ, Hozier JC. Identification of a heteromorphic microsatellite within the thymidine kinase gene in L5178Y mouse lymphoma cells[J]. *Mutat Res*, 1996, **371**(3-4):265 - 271.
- [3] Davies MJ, Phillips BJ, Rumsby PC. Molecular analysis of mutations at the *tk* locus of L5178Y mouse-lymphoma cells induced by ethyl methanesulphonate and mitomycin C[J]. *Mutat Res*, 1993, **290**(2):145 - 153.
- [4] Honma M, Momose M, Sakamoto H, Sofuni T, Hayashi M. Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction [J]. *Mutat Res*, 2001, **493**(1-2):101 - 114.
- [5] Chen T, Harrington-Brock K, Moore MM. Mutant frequencies and loss of heterozygosity induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea in the thymidine kinase gene of L5178Y/TK^(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells[J]. *Mutagenesis*, 2002, **17**(2):105 - 109.
- [6] el-Tarras A, Dubins JS, Warner J, Hoffman C, Cobb RR. Molecular analysis of the TK locus in L5178Y large and small colony mouse lymphoma cell mutants induced by hycanthone methanesulfonate[J]. *Mutat Res*, 1995, **332**(1-2):89 - 95.
- [7] Storer RD, Kraynak AR, McKelvey TW, Elia MC, Goodrow TL, DeLuca JG. The mouse lymphoma L5178Y *tk*^{+/-} cell line is heterozygous for a codon 170 mutation in the *p53* tumor suppressor gene [J]. *Mutat Res*, 1997, **373**(2):157 - 165.

Analysis of loss of heterozygosity in *tk* gene of L5178Y mouse lymphoma cells induced by colchicine and vincristine

YUAN Jian, LIU Sheng-Xue, LIU Jin-Yi, CAO Jia*

(Department of Hygiene Toxicology, College of Military Preventive Medicine, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **AIM** To investigate the type and mechanism of colchicine (Col) and vincristine (Vin) induced *tk* gene mutation. **METHODS** L5178Y cells were treated with Col at 0 – 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and Vin at 0 – 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Molecular mutation of *tk* locus was analyzed by the mouse lymphoma assay (microtiter procedure), and loss of heterozygosity (LOH) analysis with allele-specific PCR. **RESULTS** Loss of LOH analysis revealed that the most Col and Vin induced mutants lost the functional *tk* allele (LOH 91.5% and 92.1%, respectively), there were no significant difference between

spontaneous and induced mutants, and between large colony and small colony. **CONCLUSION** Functional *tk* allelic gene loss was major mutational event in colchicine- and vincristine-induced *tk* mutants.

Key words: colchicines; vincristine; gene, *tk*; loss of heterozygosity

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(30100153); National Natural Science Foundation of China(30471476)

* Corresponding author.

(本文编辑 石 涛)