

acrylamide gel electrophoresis of membrane enzymes with detergents. *Methods in Enzymology*, 1974; Vol. 32. Part B, P82.

1982; 119: 325-329.

6. 蔡晓丹, 王理开, 徐晓利, 等. 一种改良的蛋白质双向电泳银染色法. *生物化学与生物物理进展*, 1986; (3): 66-68.
7. Dubray G, Bezard G. A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1, 2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*.

8. Tauber R. *Membranes in Tumour Growth*. Elsevier Biomedical Press, 1982: 97.

9. Robinson JM, Smith DF, Davis EM, et al. Partial characterization of rat hepatoma cell-surface glycoproteins possession concanavalin A receptor activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976; 72: 81-88.

=====

转染了细胞色素 P450 1A1 基因重组表达质粒的 CHL 细胞 (CHL-1A1) 可代谢活化多环芳烃类化合物^①

蔡朱男 董海涛 余应年

浙江医科大学病理生理教研室 杭州 310031

摘要 本研究应用我室建立的稳定表达 Cyt P450 1A1 的转基因细胞株 CHL-1A1 对一组前致突变物/前致癌物进行双核细胞微核试验, 同时以母细胞系 CHL 为对照, 结果表明, 在不加 S9 的情况下, 五种前致突变物, 苯并(a)芘、3-甲基胆蒎、苯并蒎、二甲基苯蒎和蒎均能诱导 CHL-1A1 细胞的微核率显著增高, 并具有剂量反应关系, 证明 CHL-1A1 细胞具备代谢活化多环芳烃类化合物的能力。因此, 转基因细胞株 CHL-1A1 在化学致癌物的遗传毒理学研究方面具有重要的应用价值。

关键词 细胞色素 P450; 前致突变物; 微核试验

BIOACTIVATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN CHL-1A1 CELL LINE ESTABLISHED BY TRANSFECTION OF RECOMBINANT HUMAN CYT P450 1A1 cDNA EXPRESSION PLASMID

Cai Zhunan, Dong Haitao, Yu Yingnian

Department of pathophysiology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031

Abstract The bioactivation of a panel of promutagens [Benzo(a) pyrene (B(a)P), 3-Methylcholanthrene (3-MC), 1, 2-Benzanthracene (BA), 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), Anthracene (A)] in CHL cell line and that transfected with recombinant

① 国家和浙江省自然科学基金资助项目, No. 39370760, 393028

human Cyt P450 1A1 cDNA expression plasmid (CHL-1A1 cell line) were studied. The end point selected was the induction of micronuclei assay. All chemicals tested induced reproducible micronuclei, and the dose-response relations were observed. This study demonstrates the benefit of using transgenic cell line CHL-1A1 in short term mutagenicity assay in vitro for polycyclic aromatic hydrocarbons and also the potential use in metabolic pathway study.

Key words cytochrome P450; promutagens; micronucleus assay

许多环境化合物都需通过体内代谢活化后,才能成为致突变/致癌物。细胞色素 P450 是代谢活化许多前致突变/前致癌物的主要酶系。大多数建株细胞的细胞色素 P450 基因(下简作 Cyt P450)表达很低或完全不表达而丧失了代谢活化前致突变/前致癌物的能力,因此必需在细胞外添加微粒体活化系统,才能在前致突变/前致癌物的生物效应和短期筛选试验研究中应用。但致突变/致癌物在细胞外活化,活化了了的终致癌物的半寿期短和细胞膜屏障的存在,而使灵敏度降低。加上多环芳烃类化合物对环境的污染日益严重,体内代谢该类化合物的酶主要由 Cyt P450 1A1 基因编码,为此我室应用 RT-PCR 技术和 DNA 重组技术,从由 3-甲基胆蒎诱导的人羊膜 FL 细胞中克隆出 Cyt P450 1A1 基因的 cDNA 片段,构建真核细胞高表达重组体,导入 FL、V79 和 CHL 细胞中已获得高效稳定表达⁽¹⁾。本研究采用 Fenech 建立的双核细胞微核法⁽²⁾,以转基因的 CHL-1A1 表达株为靶细胞,分析鉴定 Cyt P450 1A1 对一组多环芳烃类化合物的代谢活化作用。

材料和方法

1. 细胞株

中国仓鼠 CHL 细胞株及由本室建立的 CHL-1A1 细胞株。均用含 15% 灭活小牛血清(杭州四季青生物公司)的 MEM(Gibco)培养基培养。

2. 化学试剂

细胞松弛素 B(cytochalasin-B, Sigma)溶于二甲基亚砜(DMSO,江苏无锡洪声化工

厂)配成终浓度 3mg/ml,储存于-70℃。使用时终浓度为 3μg/ml。

苯并(α)芘(Benzo[α]pyrene, B[α]P)、3-甲基胆蒎(3-Methylcholanthrene, 3-MC)、苯(并)蒎(1,2-Benzanthracene, BA)纯度为 95%,二甲基苯蒎(7,12-Dimethylbenz[α]anthracene, DMBA)纯度为 95%,蒎(Anthracene, A)纯度为 99.9%。上述多环芳烃类均系 Sigma 产品,使用时用 DMSO 溶解,配制成相应所需浓度。

3. 体外双核细胞微核试验

5×10⁵ 细胞接种于 25cm² 的细胞培养瓶中,经 37℃ 培养 24h, PBS 洗后,换以 5ml 无血清 MEM 培养基,加入受试前致突变物,使达到所需测试浓度, DMSO 的终浓度为 1%, 37℃ 作用 5h。随后抽弃培养基,再用 PBS 洗涤 4 次,加入含 15% 灭活小牛血清及 3μg/ml 细胞松弛素 B 的 MEM 5ml, 37℃ 培养 24h。然后再经含 0.05% 胰酶和 0.02% EDTA 消化液消化后,细胞悬浮于 2ml PBS 中,缓慢加入 1/5 体积的冰乙酸甲醇(1:3)固定液,预固定 30min, 1000r×10min 离心,沉淀细胞再用 2ml 固定液冲散固定 2 次,每次 30min,固定后的细胞,滴片,空气干燥,再用新鲜配制 10% Giemsa 染液染色 10min,在油镜下,按 Ciaravino 标准计数 1000 个双核细胞中出现含微核细胞的频率⁽³⁾。实验结果用 Kastenbaum-Bowman 法进行统计分析⁽⁴⁾。

结果

双核细胞微核法试验的结果如图 1 所示。

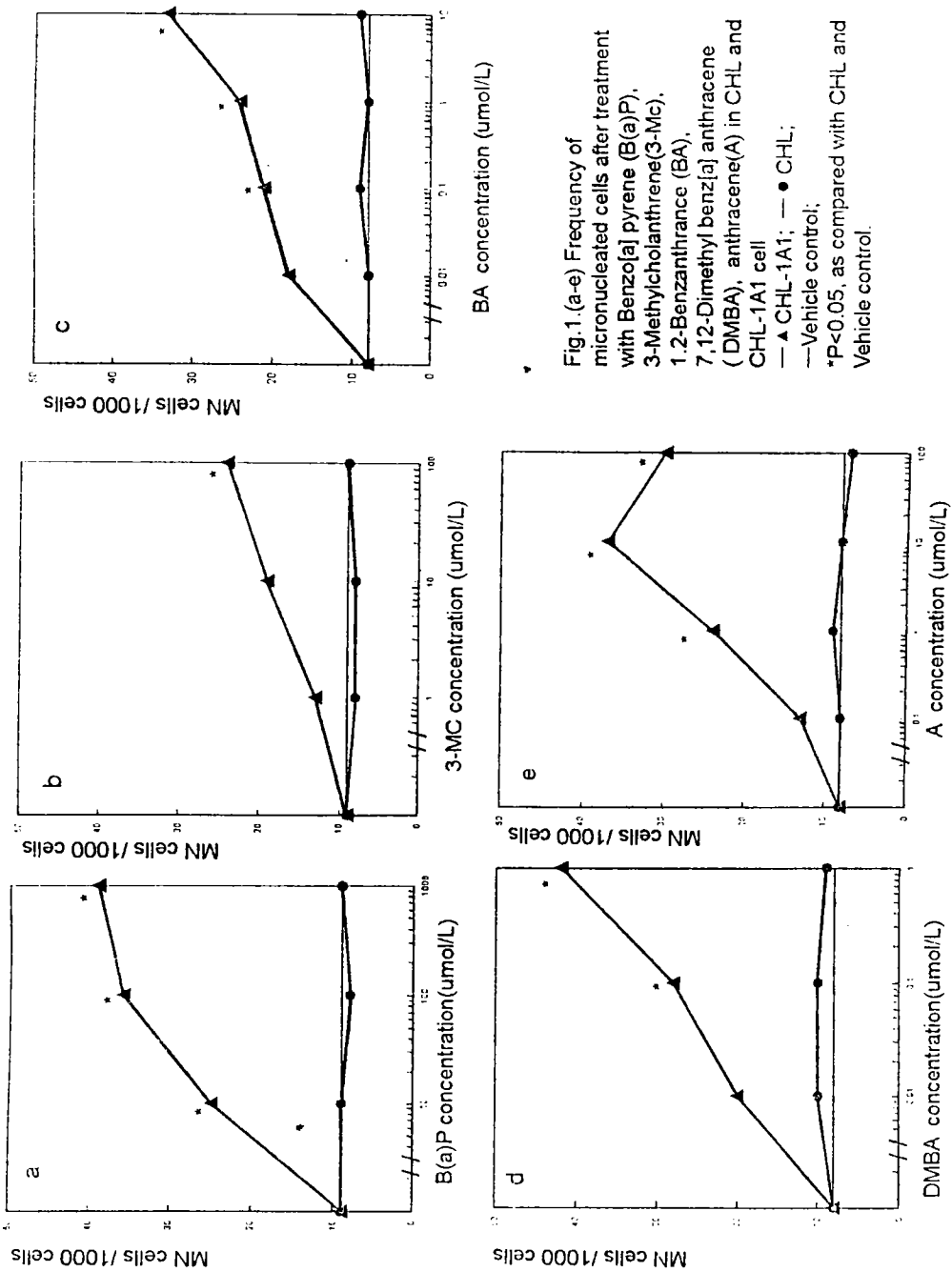


Fig.1.(a-e) Frequency of micronucleated cells after treatment with Benzo[a] pyrene (B(a)P), 3-Methylcholanthrene(3-Mc), 1,2-Benzanthracene (BA), 7,12-Dimethyl benz[a] anthracene (DMBA), anthracene(A) in CHL and CHL-1A1 cell
 —▲ CHL-1A1; —● CHL;
 — Vehicle control;
 *P<0.05, as compared with CHL and Vehicle control.

可见 5 种前致突变物 B[α]P, 3—MC, BA, DMBA 和 A 在 CHL 细胞中, 均不能诱发微核形成。但在 CHL—1A1 细胞中双核细胞微核率明显增加, 而且还具有明确的剂量反应关系, 经统计检验 B[α]P, 3—MC, BA, DMBA 和 A 能诱发 CHL—1A1 细胞的含微核细胞率, 与溶剂对照相比, 增加有显著意义的最低浓度分别为 1 μ mol/L, 100 μ mol/L, 0.1 μ mol/L, 0.01 μ mol/L, 1 μ mol/L。与母细胞系 CHL 相比, 差别也非常显著, 在统计学上有显著性差异的最低浓度, 除 DMBA 为 0.1 μ mol/L 外, 其余浓度与上述相同。

讨论

用 B[α]P, 3—MC, BA, DMBA 处理 CHL1A1 细胞所获结果与最近文献报道的该类化合物的体内试验⁽⁵⁾, 以及体外加 S9 试验的结果完全一致^(6,7)。并且灵敏度提高。如 B[α]P 浓度在 100 μ mol/L—750 μ mol/L 范围内, DMBA 浓度在 25 μ mol/L—100 μ mol/L 范围内, 不外加 S9, 都不能诱发人淋巴细胞微核产生。在 G1 期加 S9 处理, B[α]P 浓度至少需达 250 μ mol/L, DMBA 由于毒性过大未做。在 G2 期加 S9 处理, B[α]P 浓度需达 50 μ mol/L, DMBA 浓度需达 150 μ mol/L, 才能诱发人淋巴细胞微核明显增加。而在我们系统中无需外加代谢活化系统, B[α]P 和 DMBA 浓度分别在 10 μ mol/L 和 0.1 μ mol/L 就能诱发 CHL—1A1 细胞微核显著增加。Matsuoka 以 CHL 为靶细胞, 不加 S9, B[α]P 同样无法诱发微核产生, 加了 S9 后能诱发微核细胞率增加有显著意义的最低浓度也需 5 μ g/L, 即使把浓度提高到 8 倍, 所产生的微核细胞率也只是对照的 3 倍, 然而在我们的系统中, 只需其最低浓度的一半, 所产生的微核细胞率已是对照的 2.8 倍。A 在原核生物鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验中, 往往显示不出诱变活性^(8,9), 即使在真核细胞程序外 DNA 合成 (UDS)、细胞转化等试验系统中, 应用常规剂量, 也只能偶尔检出^(10—12), 在整

体动物致癌试验中, 需高剂量才能诱发肿瘤^(13,14), 然而在我室建立的转基因细胞株 CHL—1A1 试验系统中, 无需外加微粒体活化系统, 1 μ mol/L 照样能检出它的致变活性, 这就更进一步证明了 CHL—1A1 细胞具备高效代谢活化多环芳烃类化合物的能力, 并能模拟细胞内代谢活化实际情况, 从而提高了短期试验的灵敏度和可靠性。同时由于该细胞具备专一表达 Cyt P450 1A1 酶系功能, 因此还可应用于前致癌物及其他化合物经 Cyt P450 1A1 代谢途径的研究。我室将建立一系列的 CYP 转基因细胞系, 为不同 Cyt P450 同功酶的代谢功能研究提供非常有用的工具。

参考文献

1. 董海涛, 吴健敏, 余应年. 人细胞色素 P4501A1 基因 cDNA 的克隆和鉴定. 中国病理生理学杂志, 1995; 11: 417—421.
2. Fenech M, et al. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*, 1985; 147: 29.
3. Ciaravino V, et al. High capacity in vitro micronucleus assay for assessment of chromosome damage: results with quindone/naphthyridone antibacterials. *Mutat Res*, 1993; 298: 227.
4. Kastenbaum MA, et al. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res*, 1970; 9: 527.
5. Zhong BZ, et al. Micronucleus formation induced by three polycyclic aromatic hydrocarbons in rat bone marrow and spleen erythrocytes following intratracheal instillation. *Mutat Res*, 1995; 326: 147.
6. Vian L, et al. The in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes. *Mutat Res*, 1993; 291: 93.
7. Matsuoka A, et al. Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test. *Mutat Res*, 1993; 272: 223.
8. Abbas AB, et al. Evaluation of the antimutagenic potential of anthracene in vitro and ex vivo studies. *Mutat Res*, 1994; 309: 101.
9. Gerald M, et al. The azo — arence as mutagens for *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res*, 1982; 102: 201.
10. Freeman AE, et al. Transformation of cell cultures as an indication of the carcinogenic potential of chemicals. *J Natl Cancer Inst*, 1973; 51: 799.
11. Kocher GR, et al. Mutagenicity of polycyclic hydrocarbons V. induction of sister — chromatid exchanges in vivo. *Mutat Res*, 1979; 66: 65.

12. Kolber AR, et al. In vitro toxicity testing of environmental agents current and future possibilities part A: survey of test systems. 1983:124.
 13. Searle CE, et al. Chemical carcinogens. second edition, volume 1. ACS monograph 182 American chemical soci-

ety, Washington D. C. 1984;130.
 14. Mccaun J, et al. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test; Assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975;72:5135.



菜油油烟凝聚物诱发人羊膜 FL 细胞中的非定标性突变^①

王卫萍 张小山 余应年 陈星若

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 本研究以穿梭质粒 pZ189 作为探针,用菜油油烟凝聚物 Rape Seed Oil Condensate, RC) 诱发人羊膜 FL 细胞中的非定标性突变。结果显示:12.5 和 50 μ g/ml RC 处理组的突变频率较自发突变频率增加了 3.5 和 4.1 倍;两个处理组的点突变频率分别为 11.9×10^{-4} (19/15996) 和 11.6×10^{-4} (17/14701), 比自发点突变频率 2.9×10^{-4} (2/6822) 分别增加了 4.1 和 3.9 倍, 其卡方检验的 *P* 值均小于 0.05。

关键词 非定标性突变;菜油油烟凝聚物;穿梭质粒

NONTARGETED MUTAGENESIS IN HUMAN AMINO FL CELLS INDUCED BY RAPE SEED OIL CONDENSATE

Wang Weiping, Zhang Xiaoshan, Yu Yingnian, Chen Xingruo

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

Abstract The nontargeted mutagenesis in human amino FL cells was induced by Rape Seed Oil Condensate (RC) with a shuttle plasmid pZ189 as probe. The results showed that mutation frequencies increased by 3.5—and 4.1—fold over the spontaneous mutation frequency in the 12.5 and 50 μ g/ml RC pretreated cells, respectively. The scored point mutation frequencies were 11.9×10^{-4} (19/15996) and 11.6×10^{-4} (17/14701), in the two dose groups respectively. Thus 4.1— and 3.9—fold increased in point mutation frequencies were found comparing with the spontaneous mutation frequency of 2.9×10^{-4} (2/6822). Chi square test showed that the *P* value is small than 0.05.

Key words Nontargeted mutation; Rape Seed Oil Condensate (RC); Shuttle plasmid

突变不仅是一些遗传病的根本起因,而且也是化学致癌启动中最有说服力的理论。在细菌中已证明 DNA 损伤剂诱发的突变可区分为定标性及非定标性突变,前者发生在 DNA 损伤部位,而后者发生在未遭受外源 DNA 损伤因子攻击的部位,但两者都是原核

^① 国家 (No. 39170343) 和浙江省 (No. 391036) 自然科学基金资助项目