

昆明山海棠诱导人白血病细胞 *HPRT* 基因突变的研究

刘胜学,曹佳,安辉,周紫垣

(第三军医大学分子毒理实验室,重庆 400038)

摘要:为研究昆明山海棠 (THH) 的遗传毒性和药理作用,采用单细胞克隆培养,双向筛选计数,多重 PCR 扩增与电泳分析,研究了 THH 诱导 HL-60 细胞 *HPRT* 基因突变率及分子突变谱。发现随着染毒剂量的增加,细胞接种存活率逐渐下降,突变频率明显升高;THH 诱发突变主要由缺失和点突变两部分组成 (46.6% 和 53.4%),而自发突变几乎全是点突变 (92.3%);*HPRT* 基因突变位点在各个外显子的分布较集中于基因的 3' 末端,且外显子 1 缺失只出现于全基因缺失中,外显子 7/8 与 9 多表现为连锁缺失 (71.4%)。结果提示,THH 具有明确的诱导 *HPRT* 基因突变的作用,且诱发突变与自发突变的分子图谱不一样,这可能与其作用机制有关。上述发现有助于阐明 THH 遗传毒性作用机理。

关键词: *HPRT* 基因;昆明山海棠;致突变作用;HL-60 细胞;多重 PCR

中图分类号: R733.72

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)05-0305-04

Molecular Analysis of THH-Induced Mutations at the *HPRT* Locus in Human Promyelocytic Leukemia Cells by Multiplex Polymerase Chain Reaction

LIU Sheng-xue, CAO Jia, AN Hui, ZHOU Zi-yuan

(Department of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: The genotoxicity and pharmacologic activity of a Chinese medicinal herb, *Tripterygium hypoglaucum* (Lévl) Hutch (THH), was investigated by methods of single cell clone culture, two-way screening count, multiplex PCR amplification and electrophoresis technique. THH showed clear cytotoxicity and mutagenesis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. When doses were increased, cell plating efficiency reduced and mutation frequency increased. The analysis showed that the spectra of spontaneous and THH-induced mutants were different. 46.6% of THH-induced genetic changes were deletions, whereas the majority of spontaneous mutants (92.3%) exhibited point mutations. Mapping of all intragenic deletion breakpoints showed a random distribution of breakpoints in 9 exons, but toward the 3' end of the *HPRT* gene. Exon 1 deletion only appeared in total gene deletion, and exon 7/8 and 9 deletion often showed chain deletion (71.4%).

Key words: *HPRT* gene; *Tripterygium hypoglaucum* Hutch; mutagenesis; HL-60 cells; multiplex PCR

昆明山海棠 (*Tripterygium hypoglaucum* (Lévl) Hutch, THH) 为卫茅科雷公藤属植物,主要化学成分包括生物碱、萜类及色素剂,在中医学中常用于治疗风湿性关节炎、红斑狼疮等自身免疫性疾病,由于发现 THH 具有可逆性抗生育及抗肿瘤效应而引起人们的关注^[1]。有资料表明 THH 有明显的细胞分裂抑制效应、非整倍体毒性和可能的染色体损伤作用

^[2,3],最近我室还发现 THH 对肿瘤细胞具有很强的诱导凋亡作用,但关于 THH 在基因水平上的影响作用还很少报道^[4]。*HPRT* 基因作为一个内源性结构基因,编码产生嘌呤代谢补充途径的关键酶,由于其本身具有的一些独特性质,如定位于 X 性染色体上,为非必需基因,对于突变型与野生型细胞株均可鉴定,以及自发突变率低等,*HPRT* 基因目前最有希

收稿日期:1999-10-08;修回日期:2000-02-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(批准号:39970650);九五"军队基金资助项目(98M090)

作者简介:刘胜学(1969-),男,山东沂水,硕士,讲师,专业方向:遗传毒理。曹佳(1962-),男,四川江油,博士,博导,论文联系人,Tel: 023-68752295, E-mail: caoqq@yahoo.com。

望成为突变与癌变研究的主要分子标记物之一。因此,本实验采用人白血病 HL-60 细胞作为观察对象,研究 THH 对 *HPRT* 基因的致突变作用,为探讨 THH 的遗传毒性以及潜在的抗肿瘤作用的机理提供一定的材料与信息。

1 材料与方 法

1.1 昆明山海棠水提取液的制备

THH 购自昆明市中药材公司。制备时称取 20g THH 粉碎物,以 400 ml 去离子水浸泡过夜,文火煮沸 3 次,过滤去渣,浓缩至 30 ml,离心去除沉淀,上清液过滤除菌,浓缩的水提取液以 0.67 g 生药/ml 计 4℃ 保存。

1.2 细胞培养与筛选

HL-60 细胞属人急性早幼粒白血病细胞株,细胞核型 46(43~48),倍增时间 12~16 h。为了降低细胞 *HPRT* 位点自发突变频率,实验前用 1% HAT 选择培养基(内含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷)处理 24 h。

1.3 细胞毒性与突变频率的测定

细胞接种存活率、克隆效率和突变频率的测定方法参见文献^[5]。

1.4 突变细胞的筛选 扩增与 DNA 提取

从阳性微孔中把明确的单个克隆对应地转入含有 2μg/ml 6-TG 筛选培养液的 24 孔培养板中初次扩增。然后以 10³ 个细胞/孔浓度分别接种于含 HAT 选择培养基的培养板中,只有细胞出现明显死亡者才认为是突变克隆细胞,其余细胞转入培养瓶中再次扩增。最后以常规方法分离提取细胞 DNA。

1.5 PCR 引物的设计、合成与鉴定

引物序列参考了已报道的研究资料^[6],并运用计算机设计 *HPRT* 基因 9 个外显子相对应的 8 对引物。引物合成与鉴定由北京贝克曼示范实验室,美国赛百盛公司和中科院上海细胞生物所共同完成。

1.6 DNA 多重 PCR 反应与电泳分析

取上面提取的细胞 DNA 0.5~2.0μl,大约 36~50 ng,加入 50 pmol 引物,50μl 反应液中含 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.8), 0.3~1.05 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 2.5U *Taq* DNA 聚合酶。多重 PCR 反应条件是 98℃ 预变性 7 min 后, 94℃ 1.5min, 52℃ 1.5min, 72℃ 2.0min, 循环 40 次; 外显子 1 扩增条件是 98℃ 预变性 7 min 后, 95℃

0.5min, 64℃ 1.0min, 72℃ 1.0min, 循环 30 次。最后一个 PCR 循环完成后,继续在 72℃ 温度上延伸 5 min。扩增完成后,取 10μl 反应液在 3% 琼脂糖凝胶中电泳。

2 结果与讨论

2.1 THH 对 HL-60 细胞的毒性及致突变性的测定

随着 THH 染毒剂量的增大,细胞死亡数量相应地增加,细胞接种存活率逐渐下降;同时,细胞发生突变的数目相应地增多,*HPRT* 基因突变频率明显升高。*HPRT* 基因突变频率在 10~60μl/2ml 剂量间呈明显的剂量-反应关系,但当剂量增至 100μl/2ml 时,因细胞毒性太大,接种存活率降至 6.5% 而不能培养形成克隆,所以无法统计突变频率(表 1)。本实验的研究结果表明,THH 有明显的细胞毒性,并能诱导 HL-60 细胞发生 *HPRT* 基因突变,但对细胞本身的克隆能力无明显的影响。

表 1 THH 剂量与 HL-60 细胞接种存活率,克隆效率以及突变频率之间的关系

Table 1 The relationship among mutation frequency, cloning efficiency, plating efficiency and THH dose

剂量 (μl/2ml)	接种存活率 (%)	克隆效率 (%)	突变频率 (×10 ⁻⁶)
0	108.6	98.5	1.11
10	71.3	91.6	4.85
20	52.9**	80.2	12.84**
30	40.5**	87.5	13.15**
40	29.0**	82.5	20.00**
60	22.6**	76.2	49.69**
100	6.5**	#	#

与对照组比较 ** $P < 0.01$, # 细胞死亡数量太大,无法接种。

2.2 多重 PCR 分析

HPRT 基因 8 对 DNA 寡核苷酸引物具体序列见表 2。由于外显子 7 与 8 只间隔 163 bp,所以二者共用一对引物,以 379 bp 大小的片断一起被扩增合成。因此实际操作中,将 8 对外显子引物按外显子 2、5、6、7/8 和外显子 3、4、9 分为 2 组,参与两个多重 PCR 反应,而外显子 1 单独扩增合成。

本实验用多引物 PCR 方法共分析了 71 个突变克隆,通过分析 PCR 电泳图谱,发现 43 个突变细胞能扩增到所有 9 个外显子,说明这些突变细胞中无外显子缺失或插入突变,可能发生的是个别碱基的突变(点突变),其比例约占 60.6%;在另外 21 个突

表 2 人 *HPRT* 基因进行多重 PCR 反应的寡核苷酸引物Table 2 Oligonucleotide primers for the multiplex PCR of the human *HPRT* locus

外显子	引物序列 (5' - 3')									片断大小 (bp)
1	F	TGG	GAC	GTC	TGG	TCC	AAG	GAT	TCA	626
	R	CCG	AAC	CCG	GGA	AAC	TGG	CCG	CCC	
2	F	CCT	GTA	ATG	CTC	TCA	TTG	AAA	CA	211
	R	GCT	GCT	GAT	GTT	TGA	AAT	TAA	CAC	
3	F	GTT	TAA	TGA	CTA	AGA	GGT	GTT	TG	311
	R	GAA	AAC	CTA	CTG	TTG	CCA	CTA	AA	
4	F	GTG	TGT	GTA	CAT	AAG	GAT	ATA	CA	165
	R	TTC	TTC	CCT	TTC	AAG	ATA	CAT	AC	
5	F	GGA	AAT	ACC	GTT	TTA	TTC	ATT	GT	125
	R	GTG	CAT	ACT	AAG	TTA	GAA	AAG	TC	
6	F	GTG	ACT	CTG	AAT	TTA	AAG	CTA	TG	150
	R	CTG	TGT	CAA	AAT	GTC	ATA	CAT	AC	
7/8	F	GTC	TCT	CTG	TAT	GTT	ATA	TGT	CAC	379
	R	TGC	GTG	TTT	TGA	AAA	ATG	AGT	GAG	
9	F	GCT	ATT	CTT	GCC	TTT	CAT	TTC	AG	136
	R	CAA	ACT	CAA	CTT	GAA	CTC	TCA	TC	

变细胞中检测到数个外显子缺失,表现为相应部位无扩增带出现(29.6%);另有7个突变细胞中未能扩增到任何 *HPRT* 基因片断,归属为外显子全缺失(9.9%)。

以前对 *HPRT* 基因突变的分析多采用 DNA 杂交方法,近来 PCR 技术应用于基因突变的研究,提高了基因突变分析的精确度^[7]。本实验中采用的多重 PCR 技术由于引物对较多,易造成反应体系难于控制与优化,以及突变体可能发生外显子内部的插入与缺失,所以此技术也不是引物对“越多越好”,而且产物分子量大小也应拉开一定的距离,这样才不易发生假阳性或假阴性结果,因此本实验中的8对引物经过多次预实验摸索条件后,将其共分为3组进

行多重 PCR,取得了良好的效果。

2.3 *HPRT* 基因分子突变谱

表3列出了自发突变与 THH 诱发突变的 *HPRT* 位点的变化情况。突变体的电泳图谱主要分为三种类型:包含点突变的“正常型”、全部缺失型与部分缺失型(包括5'端、3'端或基因内部缺失)。20~60 μ l/2ml 剂量组 THH 诱导 HL-60 细胞产生的突变谱与自发突变谱之间有明显的差异,二者主要的区别有三点:第一,自发突变无外显子全部缺失型,而 THH 诱发突变有,约10%~14%左右;第二,缺失型突变所占的比例不一样,自发突变仅有7.7%,而诱发突变却为25%~50%之间;第三,自发突变中电泳图谱“正常型”(提示仅为点突变)所占的比例很高,达

表 3 THH 诱导的 HL-60 细胞 *HPRT* 基因突变体多重 PCR 分析结果Table 3 Summary of multiplex PCR analysis of THH-induced *HPRT* mutants in the HL-60 cells

处理因素	分析数目	PCR产物改变数目(%)		缺失百分数(%)	缺失程度(数目)	PCR产物无改变数目(%)
		全部缺失	部分缺失			
自发	13	0(0.0)	1(7.7)	7.7	0.08(1)	12(92.3)
THH (μ l/2ml)						
10	4	0(0.0)	1(25.0)	25.0	0.25(1)	3(75.0)
20	9	1(11.1)	3(33.3)	44.4*	1.33(12)**	5(55.6)*
30	10	1(10.0)	4(40.0)	50.0*	2.10(21)**	5(50.0)*
40	14	2(14.3)	5(35.7)	50.0*	2.29(32)**	7(50.0)*
60	21	3(14.3)	7(33.3)	47.6*	1.71(36)**	11(52.4)*

* 与对照组比较 $P < 0.05$, ** 与对照组比较 $P < 0.01$ 。

