

文章编号:1004 - 616X(2000)03 - 0136 - 03

反式 - BPDE 诱发人胎气管上皮细胞 p53 基因突变的研究

雷毅雄,陈家堃,吴中亮,易 菲

(广州医学院化学致癌研究所,广东 广州 510182)

摘要:目的:探讨苯并(a)芘在人肺癌发生中的作用。方法:用苯并(a)芘的代谢产物反式 - BPDE,作用于体外培养的人胎气管上皮细胞 8~12 周后,用 PCR - SSCP 方法检测 p53 抑癌基因第 6,7,8 外显子的点突变情况。结果:经反式 - BPDE 处理的人胎气管上皮细胞,p53 第 7,8 外显子有点突变,而这些细胞都未出现典型的转化细胞形态特征的改变。结论:反式 - BPDE 可诱发人胎气管上皮细胞 p53 基因点突变,此抑癌基因的点突变早于细胞形态学的改变。

关键词:苯并(a)芘;气管上皮细胞;p53 基因;点突变

中国分类号:R730.23 文献标识码:A

STUDY ON THE POINT MUTATION OF THE p53 TUMOR SUPPRESSOR GENE IN HUMAN FETAL TRACHEAL EPITHELIUM CELL TREATED WITH TRANS - BPDE

LEI Yi - xiong, CHEN Jia - kun, WU Zhong - liang, YI Fei

(Guangzhou Institute for Chemical Carcinogenesis, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

Abstract : Purpose : In order to study the effects of trans - BPDE on the development in human lung cancer, human fetal tracheal epithelium cells (HFTEs) cultured in vitro were exposed to trans - BPDE, a metabolite of benzo(a)pyrene B(a)P. **Methods :** For 8~12 weeks, the point mutations in exon 6~8 of p53 tumor suppressor gene in these HFTEs were detected by PCR - SSCP assay. **Results :** The results showed that the HFTEs treated with trans - BPDE had point mutations in exons 7 and 8 of p53 tumor suppressor gene, even though no malignantly transformed characteristics were observed in cellular morphology. **Conclusion :** these results suggest that trans - BPDE can induce point mutation in p53 tumor suppressor gene in these HFTEs and the point mutation and activation of p53 may occur in the cells before morphological transformation.

Key words : Benzo(a)pyrene; tracheal epithelium; p53 tumor suppressor gene; point mutation

70% - 80%的肿瘤发生与化学致癌物的作用有关,而人类肿瘤中最常见的一种遗传学改变是抑癌基因的突变或纯合性缺失^{1,2}。大量实验研究表明,乳腺癌、结肠癌、膀胱癌、宫颈癌、成骨肉瘤、胃癌、肝癌、肺癌等肿瘤中均有 p53 抑癌基因的突变³。因此,化学致癌物作用与 p53 原抑癌基因活化的关系便成为目前研究的热点。本实验用苯并(a)芘代谢活化的终致癌物,反式 - 7,8 - 二羟 - 9,10 - 环氧苯并芘(简称反式 - BPDE),作用于体外培养的人胎气管上皮细胞,观察其转化活性,并用 PCR - SSCP 方法检测细

收稿日期:1999 - 10 - 15; 修订日期:2000 - 02 - 14

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(940397);卫生部课题基金资助项目

作者简介:雷毅雄(1960 -),男,广东省广州市人,副教授,医学硕士。

胞中 p53 抑癌基因的点突变,以了解反式 - BPDE 对人胎气管上皮细胞中抑癌基因的激活情况,探讨苯并(a)芘在人肺癌发生中的作用。

材料与方法

1 细胞培养与染毒

气管取自 4~6 月胎龄的水囊引产胎儿。气管植块接种到鼠尾胶薄玻片上,在含 5%CO₂ 的 37 培养箱中培养,用 MCDB - 153 培养基,并补充 10μg/ml 胰岛素、20ng/ml 上皮细胞生长因子、5μg/ml 转铁蛋白、1μmol/L 氢化可的松和 2% 的胎牛血清。待上皮细胞细胞晕生长到 0.5cm 左右时,往细胞培养液中加入终浓度为 1.0μg/ml 的反式 - BPDE(SIGMA 公司),37 培养 24h 后,换正常培养液。每周染毒 1 次,共染毒 8~12 次。

2 DNA 抽提

用 PBS 冲洗细胞,直接加入小量细胞裂解液(含 SDS,EDTA,RNA 酶)后,37 裂解消化 1h。将裂解细胞液移管,加入 100μg/ml 蛋白酶 K,50 孵育 2h 后,于 37 中消化过夜,按常规的酚和氯仿抽提法进行 DNA 抽提⁴。用紫外分光光度法测定 DNA 浓度和纯度,OD 值(260nm/280nm)在 1.8~2.0 之间,则认为 DNA 纯度合格。

3 PCR 扩增

取少量 DNA 样本进行 p53 第 6,7,8,外显子基因扩增,总反应体系 100μl,扩增循环参数为 93 30s,60~67 45s,72 30s,共 34 个周期。引物为:

exon 6 sense 5 - CACTGATTGCTCT-TAGGTCTGGC - 3

antisense 5 - AGTTCAAACCA GAC-CTCAGGGG - 3

exon 7 sense 5 - CTCCTA GGTTG-GCTCTGACTGT - 3

antisense 5 - CAA GTGGCTCCT-GACCTGGA - 3

exon 8 sense 5 - CCTA TCCTGA G-TA GTGGTAA TCTAC - 3

antisense 5 - GTCCTGCTTGCT-TACCTCGCTTA GT - 3

4 p53 基因突变检测

p53 基因突变检测采用 PCR - SSCP 方法⁵。分别取 p53 第 6,7,8 外显子 PCR 扩增产物 10μl 与等量变性上样液混合,95 变性 5min,立即冰冻,行 8%聚丙烯酰胺(29:1)垂直电泳,100V,4h;将凝胶浸泡于含 0.5μg/ml 溴

化乙锭的溶液中,室温染色 30min,于紫外透射仪上观察样本与正常对照之间有无泳动速率的改变,根据标本 PCR 产物单链泳动状态判断 p53 突变结果。

结 果

1 细胞的形态学改变

经免疫组化检查和罗丹宁染色,证实培养的人胎气管上皮细胞是上皮细胞。反式 - BPDE 处理前后,其形态无显著的变化,细胞贴壁生长呈多边形铺路石样排列,无叠层生长,细胞界限清楚,胞质丰富,胞核和核仁清晰,为典型的上皮细胞形态。未发现有明显的转化细胞的形态特征。

2 人胎气管上皮细胞 p53 基因突变

以无染毒的人胎气管上皮细胞为正常对照,用 PCR - SSCP 方法分别检测经反式 - BPDE 染毒的人胎气管上皮细胞 p53 基因突变情况。结果可见图 1,经反式 - BPDE 染毒的人胎气管上皮细胞 DNA 单链电泳迁移率发生了明显变化,染毒 8 次的细胞 p53 基因第 7 和第 8 外显子均有突变,而染毒 12 次的细胞 p53 基因第 7 外显子缺失一条较大的 DNA 带,显示该样本 DNA 序列发生较大的改变。

1 2 3 4 5 6 7 8 9

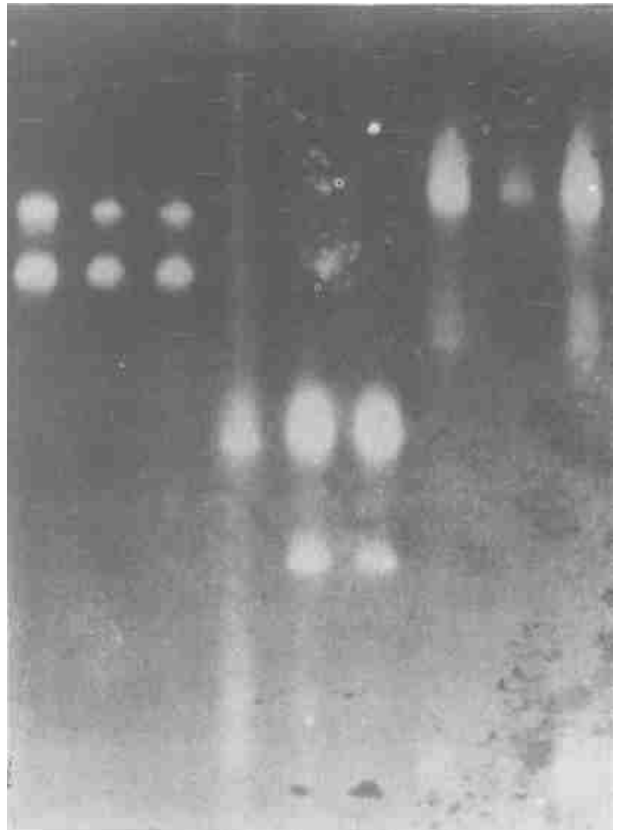


Figure 1 PCR - SSCP analysis of the point mutations in the p53 in human

fetal tracheal epithelium cells treated with trans - BPDE
Lines 1,4 and 7: Samples 1, 4 and 7, the non - treatment samples;
Lines 2,5 and 8: Samples 2,5 and 8, treated 8 times with trans - BPDE;
Lines 3,6 and 9: Samples 3,6 and 9, treated 12 times with trans - BPDE;
p53 exon 6 (Lines 1,2 and 3), no migration change (no mutation);
p53 exon 7 (Lines 4,5 and 6), there is migration change in samples 5 and 6 compared with non - treatment sample 4;
p53 exon 7 (Lines 7,8 and 9), there is a change in sample 8, in this sample, one major band is deleted that means the obvious change in DNA sequencing of the sample.

讨 论

苯并(a)芘是一种广泛存在的环境污染物,实验室研究和肿瘤流行病学调查均提示它与人类肺癌的发生有关⁶。苯并(a)芘是一种前致癌物,进入机体后需经微粒体酶代谢激活,才可转变成能与DNA共价结合的终致癌物⁷。有研究显示苯并(a)芘的终致癌物之一反式-BPDE可与鸟嘌呤形成加合物⁸,进而诱发点突变⁹。本实验结果显示,反式-BPDE可诱导人胎气管上皮细胞p53抑癌基因第7,8外显子点突变,而这些细胞尚未出现典型的转化细胞形态特征改变。表明反式-BPDE可诱发人胎气管上皮细胞p53基因点突变,抑癌基因的点突变早于细胞形态学的改变。过去,我们用人胎气管上皮细胞模型进行转化实验,也发现反式-BPDE有诱导气管上皮细胞H-ras癌基因12位点密码子点突变作用,而且癌基因的点突变早于细胞形态学的改变¹⁰。以上结果提示,人气管上皮细胞的体外转化,早期不一定出现明显的转化细胞的形态特征,癌基因和抑癌基因的点突变往往早于细胞的形态学改变。反式-BPDE不仅可以引起人气管上皮细胞癌基因的点突变,同时亦可引

起抑癌基因的点突变,这在某种程度上可以解释为什么苯并(a)芘是一种危险的致肺癌因素。用人胎气管上皮细胞模型进行化学致癌实验,更能反映出化学致癌物在人类肺癌发生中的作用,为人类肺癌化学病因的研究提供一种可供参考的模式。

参考文献:

- 1 Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene J. *Nature*, 1991, 351:453 - 456.
- 2 李伟峰,赵彤.p16基因与肺癌J. *国外医学呼吸系统分册*, 1997,17(1):5 - 7.
- 3 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutations in human cancersJ. *Science*, 1991, 253:49 - 53.
- 4 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术(M). 第一版. 北京:高等教育出版社,1993. 50 - 60.
- 5 Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter - Mackie MB. Diagnostic single strand conformational polymorphism (SSCP): a simplified non - radioisotopic method as applied to a Tay - Sachs BI variant J. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19:405 - 406.
- 6 Brislow L. Occupations and cigarette smoking as factors in lung cancerJ. *Am J Publ Health*, 1954, 44:177 - 180.
- 7 Koreeda M, Moore PD, Wislocki PG et al. Binding of benzo (a) pyrene 7, 8 - diol - 9, 10 - epoxides to DNA, RNA and protein of mouse skin occurs with high stereoselectivity J. *Science*, 1978, 199:778 - 781.
- 8 Jeffrey AM, Weinstein IB, Jennette KW et al. Structure of benzo (a) pyrene nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explantsJ. *Nature*, 1977, 269:348 - 350.
- 9 Carothers AM, Grunberger D. DNA base changes in benzo (a) pyrene diol epoxide - induced dihydrofolate reductase mutants of Chinese hamster ovary cellsJ. *Carcinogenesis*, 1990, 11:189 - 192.
- 10 詹德进,陈家坤,靳波,等. 反式-BPDE诱发人胎气管上皮细胞H-ras癌基因点突变的研究J. *卫生毒理学杂志*, 1992, 6(4):233 - 235.

书 讯

由第三军医大学曹佳教授主编,中、日、德、瑞典等国数名长期从事微核研究的专家共同撰写的《微核试验—原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用》一书,已由军事医学科学出版社出版。本书共十一章,详细介绍了微核实验的原理、形成动力学、以及在红细胞、淋巴细胞、上皮脱落细胞、肝细胞、植物紫露草等检测材料中的应用,及微核对非整倍体的检测,流式仪和图像的自动化检测。附录中收录了化学诱变剂中、英文目录、标准微核实验方案等。

该书定价 15.00 元(另加邮费 1.0 元)款到即寄书。汇款地址:重庆市高滩岩第三军医大学卫生毒理学教研室 孙华明 (电话:023 - 68752295)。