DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.004
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
1426 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)16-1426-03

硫芥诱导L5178Y细胞 *tk* 基因突变的研究

李奇慧[1],朱明学[2],张黎明[2],董兆君[1] ([1]第三军医大学预防医学院军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]第二军医大学海医系防化教研室,上海 200433)

提 要:目的 检测硫芥对小鼠淋巴瘤L5178Y3.7.2c-$tk^{+/-}$细胞的诱变性。方法 采用96孔微孔板接种法检测平板接种效率和突变频率。结果 硫芥可诱导L5178Y3.7.2c-$tk^{+/-}$细胞 *tk* 位点的突变,诱发突变是自发突变的2~15倍。在 *tk* 位点诱发了大克隆和小克隆两种不同表型的突变集落,以小克隆为主。结论 硫芥有明确的致突变性和较强的细胞毒性,产生了大范围的DNA损伤。

关键词:*tk*;基因;突变;硫芥
中图法分类号:R394;R73-354;R827.174 文献标识码:A

tk gene mutation of L5178Y cells induced by sulfur mustard

LI Qi-hui[1], ZHU Ming-xue[2], ZHANG Li-ming[2], DONG Zhao-jun[1] ([1]Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To detect the mutagenicity of sulfur mustard in the *tk* gene of L5178Y3.7.2c-$tk^{+/-}$ mouse lymphoma cells. **Methods** The plating efficiency and the mutant frequency were detected by the microtiter procedure. **Results** Sulfur mustard induced *tk* locus mutation with mutation frequency 2—15 times higher than that of spontaneous mutation frequency of L5178Y3.7.2c-$tk^{+/-}$ cells. There were two different phenotypes of mutation colonies induced, which were large and small colonies, but most of them were small colonies. **Conclusion** Sulfur mustard is characterized by marked mutagenic activity and cytotoxicity. The compound may result in large range of DNA damage.

Key words: *tk*; gene; mutation; sulfur mustard

tk 基因突变试验是一种国外已广泛使用的体外短期致突变实验。它能够检出包括点突变、大的缺失、重组、染色体异倍性和其他较大范围基因组改变在内的多种遗传改变。具有很高的灵敏度[1]。小鼠淋巴瘤L5178Y3.7.2c-$tk^{+/-}$细胞是 *tk* 基因突变试验的标准靶细胞株[2]。应用L5178Y细胞建立的小鼠淋巴瘤细胞突变试验称之为MLA(mouse lymphoma assay)。硫芥是一种重要的化学战剂,也是使用较多的药物[3]。硫芥中毒可对DNA产生强烈损伤[4]。除了细胞毒作用外,硫芥可能尚具有遗传毒作用[5]。本研究应用MLA评价硫芥的致突变性,以期进一步阐明硫芥的遗传毒理学基本特征,为探讨硫芥的遗传毒性以及可能的致肿瘤作用机制提供一定的实验依据。

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划指令性课题(01L054)
Supported by the Mandatory Scientific Research Project of the "Tenth-five Year Plan" of PLA (01L054)
作者简介:李奇慧(1976—),女,黑龙江省肇东市人,硕士研究生,主治医师,主要从事遗传毒理学方面的研究。电话:(023)68752356
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2003-10-31;修回日期:2003-12-28

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验用毒剂硫芥由军事医学科学院第六研究所提供,纯度为97.5%,用1,3-丙二醇配成3%母液,实验当日用无菌生理盐水配成工作液使用。

1.1.2 细胞株 L5178Y3.7.2c-$tk^{+/-}$细胞株由日本国立卫生研究所惠赠。

1.1.3 主要试剂 RPMI1640培养液为Hyclone公司产品,马血清(horse serum)为GIBCO公司产品,次黄嘌呤(hypoxanthine)购自衢州化学工业公司,氨甲喋呤(aminopterin)、脱氧胞苷(deoxycytidine)为瑞士进口产品,脱氧胸腺嘧啶核苷(thymidine)购自中科院上海生化所,三氟胸苷(trifluorothymidine,TFT)及阳性N-ethyl-N-nitrosourea对照(ENU)均为Sigma公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用RPMI1640培养液,加入100 U/ml青霉素,100 μg/ml链霉素和200 μg/ml丙酮酸钠,另加10%、20%灭活马血清作为生长培养基和集落培养基,分别用于细胞增殖和在96孔培养板中培养细胞。细胞在含5% CO_2、37 ℃恒温培养箱中培养。培养期间每天计数细胞,使细胞浓度不超过1.5×10^6/ml。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.2　自发突变细胞的清除　　将对数增长期的细胞配制成 3×10^5/ml, 100 ml, 加入 1 ml 100× THMG, 培养 24 h 后离心细胞 (800 r/min, 5 min), 弃去上清, 加入新培养基, 配制成 $1\times10^5\sim3\times10^5$/ml(100 ml 以上)。加入 1%量的 100× THG, 培养 2 d, 注意避免过度培养。

1.2.3　硫芥剂量设计实验(dose range finding test)　　剂量设计实验在与正式实验相同的条件下处理细胞, 处理后 2 d(48 h)每天测定细胞浓度, 求算细胞日细胞增长率(DCG)和相对增殖率(RSG)。将使细胞增殖率为阴性对照组的 10%～20%剂量设为最高剂量, 其它剂量从最高剂量以等比或等差设定。同时设溶剂对照组。

1.2.4　诱变实验

1.2.4.1　染毒处理　　将处于对数增长期的细胞用 RPMI10 培养基配成 10^6/ml(1 次处理约需 10^7 个细胞), 按细胞悬液: RPMI 10∶培养基∶150 mmol/L KCl∶硫芥= 10∶8.8∶1∶0.2 的比例配制受试物混合液。将 20 ml 容量的受试物混合液置 37 ℃处理 3 h, 然后用无血清培养液洗涤细胞 2 次, 重新悬浮于 RPMI 10 培养基中, 将细胞浓度调整为 2×10^5/ml, 进行 48 h 的表达培养, 期间每天计数细胞浓度, 同时计算 DCG、RSG。

1.2.4.2　平板接种效率(PE0)测定　　取少量经染毒处理的细胞, 逐步稀释至细胞密度为 8 个/ml, 接种于 96 孔板, 每孔 0.2 ml, 即平均每孔约 1.6 个细胞。在 5% CO_2、37 ℃, 饱和湿度下培养 12～14 d, 计数每块平板有集落生长的孔数。

1.2.4.3　表达 2 d 的平板接种效率(PE2)和 TFT 抗性突变频率(MF)测定　　将经过 2 d 表达培养的细胞用 RPMI20 培养基调整为 1×10^4/ml, 取少量逐步稀释至 8 个/ml, 于 96 孔板中每孔接种 0.2 ml, 按照 PE0 方法接种, 每孔 1.6 个细胞。将剩余之细胞 (1×10^4/ml)加入 TFT, 使 TFT 终浓度为 3 μg/ml, 混匀后接种于 96 孔板, 每孔 0.2 ml, 即每孔约 2 000 个细胞。每个剂量作 2 个平行板。培养 12～14 d 后, 分别计数有大小克隆生长的孔数。据此计算出突变频率(MF)。

1.3　统计学方法

按照泊松分布计算平板接种效率和突变频率[6]。

2　结果

2.1　硫芥剂量设计实验结果

硫芥剂量设计实验结果见表 1。在硫芥终浓度为 10、15、20、25、30 μmol/L 时, L5178Y 细胞的相对悬浮增长率(RSG)分别为 93.4%, 65.8%, 47.3%, 31.0%, 22.5%。符合剂量设计要求。

表 1　硫芥处理 **L5178Y** 细胞后的日细胞增长率(**DCG**)和相对悬浮生长率(**RSG**)

Tab 1　Daily cell growth (DCG) and relative suspension growth (RSG) of L5178Y cells treated with sulfur mustard

Concentration of sulfur mustand (μmol/L)	d0 cell number	d1 cell number	d2 cell number	DCG d1	DCG d2	RSG (%)
0	2×10^5	9.17×10^5	14.11×10^5	4.59	7.06	100
10	2×10^5	7.53×10^5	16.05×10^5	3.77	8.03	93.4
15	2×10^5	7.17×10^5	11.83×10^5	3.59	5.91	65.8
20	2×10^5	6.33×10^5	9.72×10^5	3.17	4.86	47.3
25	2×10^5	4.94×10^5	8.11×10^5	2.47	4.06	31.0
30	2×10^5	3.89×10^5	7.50×10^5	1.95	3.75	22.5

2.2　硫芥对 L5178Y3.7.2c-*tk*$^{+/-}$ 细胞的细胞毒作用

硫芥对 L5178Y3.7.2c-*tk*$^{+/-}$ 细胞的毒性作用见表 2。随着染毒剂量的增加, 细胞接种效率(PE0)、相对存活率(RS)、相对悬浮增长率(RSG)、总相对增长率(RTG)均相应下降(图 1)。

表 2　硫芥与 **L5178Y** 细胞毒性指标之间的关系 (%)

Tab 2　Relationship of PE0, RS, and RTG with concentration of sulfur mustard (%)

Concentration of sulfur mustand (μmol/L)	PE0	RS0	RSG	RTG
0	86.6	100.0	100.0	100.0
10	70.6	81.5	93.4	49.0
15	42.0	48.5	65.8	26.0
20	19.7	22.7	47.3	15.2
25	9.9	11.4	31.0	6.2
30	9.1	10.5	22.5	5.0
ENU (10 μg/ml)	54.7	63.2	33.1	17.4

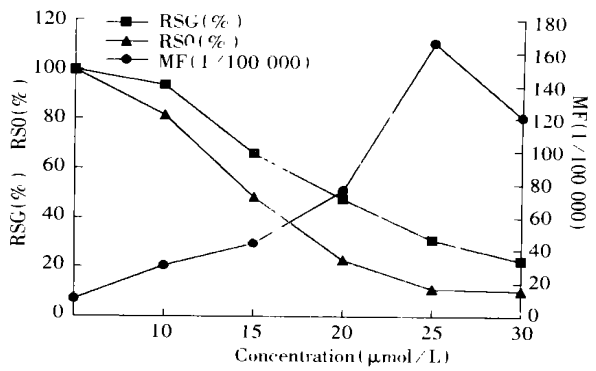


图 1　硫芥 3 h 处理后 **L5178Y** 细胞的细胞毒性与突变频率

Fig 1　Cytotoxicity represented by relative survival (RS0), relative suspension growth (RSG), and mutation frequency (MF) at the *tk* locus in L5178Y cells treated with sulfur mustard for 3 h

2.3　硫芥诱发 L5178Y3.7.2c-*tk*$^{+/-}$ 细胞 *tk* 基因突变率的变化情况

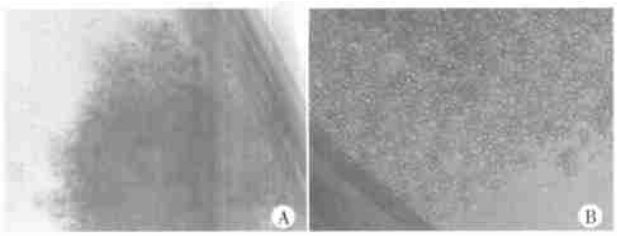
由表 3 可知, 随硫芥剂量的增加, *tk* 基因的突变频率亦随之增加。硫芥诱发的突变频率是自发突变频率的 2～15 倍, 为明确的阳性结果。观察到两种表型的突变集落, 即大集落(large colony)和小集落(small colony)。大集落超过微孔直径的 1/4, 呈薄层分布, 小集落在微孔直径的 1/4 以下, 致密, 呈块状分布(图 2)。硫芥对 L5178Y3.7.2c-*tk*$^{+/-}$ 细胞 *tk* 位点的诱发突变主要以小克隆为主。

表 3　硫芥对 **L5178Y** 细胞 ***tk*** 基因的致突变性

Tab 3　*tk* gene mutation frequency (MF) and percentage of small colonies induced by sulfur mustard in L5178Y cells

Concentration of Sulfur mustrad (μmol/L)	PE2(%)	RS2(%)	MF($\times10^{-5}$)	SC(%)
0	127	100.0	10.9	51.6
10	66.7	52.5	31.0	46.2
15	50.2	39.5	44.4	56.5
20	40.8	32.1	76.3	58.4
25	25.3	19.9	165.7	73.4
30	28.3	22.3	120.6	69.5
ENU (10 μg/ml)	66.7	52.5	51.2	72.6

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A: Small colony; B: Large colony

图2 96孔平板微孔底部生长的突变L5178Y细胞大、小克隆 (×400)

Fig 2 The large and small colonies of mutant L5178Ycells grew at the bottoms of 96-well culture plate (×400)

3 讨论

硫芥因其理化性质稳定,毒性大,穿透性强,作用隐蔽,持久性大等特点,备受外军青睐,是外军装备的最重要的化学战剂之一和医学防护研究对象[7]。硫芥是一种烷化作用很强的化合物,曾经作为候选抗癌药物进行动物实验[8]。但长期接触硫芥的生产工人上呼吸道癌症发生率增加[9],接触硫芥的渔民外周血淋巴细胞姐妹染色单体交换率升高[10]。这些资料提示,硫芥很可能具有遗传毒性的远期危害。本实验选择检测范围广泛的L5178Y3.7.2c-*tk*$^{+/-}$细胞为实验材料,研究了硫芥的致突变作用。结果显示:

3.1 硫芥的细胞毒作用特点

由表2和图1数据可以看出,细胞培养体系中加入硫芥后,L5178Y3.7.2c-*tk*$^{+/-}$细胞的接种效率(PE0)、相对存活率(RS)、相对悬浮增长率(RSG)和总相对增长率(RTG)均下降,硫芥剂量越大,上述指标的下降越明显,提示硫芥具有明显的细胞毒作用,与杨清武等[11]报道的淋巴细胞实验结果相吻合。

3.2 硫芥诱导 *tk* 基因突变的特点

L5178Y3.7.2c-*tk*$^{+/-}$细胞接触硫芥3 h即导致 *tk* 基因突变。在10~30 μmol/L 剂量范围内,硫芥浓度愈大,*tk* 基因突变率愈高(图1)。硫芥浓度为25 μmol/L 剂量时,*tk* 基因突变频率高于对照组的14倍,说明硫芥有明确的致突变性。但当硫芥浓度增至30 μmol/L 时,突变频率未见继续增加,其原因尚不明了,推测可能与硫芥的烃化作用所造成的细胞坏死或凋亡[12]有关。Storer等[13]报道,L5178Y *tk*$^{+/-}$细胞的 *tk* 基因突变可能伴有p53基因突变,后者与细胞凋亡的关系正日益得到证实。

3.3 硫芥诱导的 *tk* 基因突变体以小克隆为主

MLA 大、小克隆形成的机制尚不十分清楚,但初步认为与遗传损伤轻重程度相关。有研究表明[14],大克隆较少发生染色体异常,而小克隆可检测到染色体重排(缺失、重组)等改变。本实验观察到的经硫芥诱导的 *tk* 基因突变集落以小克隆为主,说明存在着大范围的DNA损伤。但对于硫芥的致突机制及大、小克隆突变体细胞的分子生物学及细胞遗传学改变仍有待于进一步深入研究。

综上所述,硫芥能诱发小鼠淋巴瘤L5178Y3.7.2c-*tk*$^{+/-}$细胞 *tk* 基因突变,有明确的致突变性和较强的细胞毒性。有关的机制尚需深入研究。

(致谢:本实验得到第三军医大学预防医学院卫生毒理学教研室刘晋副主任和刘胜学、杨录军、周燕红、袁健、贾庆军等老师的热情指导和帮助,在此深表谢意!)

参考文献:

[1] Benigni R. Relationships between *in vitro* mutagenicity assays[J]. Mutagenesis, 1992, 7(5): 335-341.

[2] Mitchell A D, Auletta A E, Clive D, *et al*. The L5178Y/*tk*$^{+/-}$ mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene Tox Program[J]. Mutat Res, 1997, 394(1-3): 177-303.

[3] 魏相德. 芥子气中毒机制的研究进展[J]. 国外医学军事医学分册, 1992, 9(1): 7-12.

[4] Lakshmana Rao P V, Vijayaraghavan R, Bhaskar A S. Sulphur mustard induced DNA damage in mice after dermal and inhalation exposure[J]. Toxicology, 1999, 139(1-2): 39-51.

[5] Dacre J C, Goldman M. Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard[J]. Pharmacol Rev, 1996, 48(2): 289-326.

[6] Furth E E, Thilly W G, Penman B W, *et al*. Quantitative assay for mutation in diploid human lymphoblasts using microtiter plates[J]. Anal Biochem, 1981, 110(1): 1-8.

[7] 罗成基, 欧阳子倩. 核、化学武器损伤防治学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1994. 138-140.

[8] 袁素波, 王治乔. 肿瘤化疗药物的致癌性及致癌机制[J]. 癌变·畸变·突变, 1998, 10(6): 386-391.

[9] Goldman M, Dacre J C. Lewisite: its chemistry, toxicology, and biological effects[J]. Rev Environ Contam Toxicol, 1989, 110: 75-115.

[10] Wulf H C, Aasted A, Darre E, *et al*. Sister chromatid exchanges in fishermen exposed to leaking mustard gas shells[J]. Lancet, 1985, 1(8430)690-691.

[11] 杨清武, 董兆君, 魏相德, 等. 硫芥对大鼠淋巴细胞毒性作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 27-30.

[12] 赛 燕, 陈志龙, 刘 勇, 等. 硫芥诱导淋巴细胞凋亡与细胞周期的关系[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(5): 521-522.

[13] Storer R D, Kraynak A R, Mckelvey T W, *et al*. 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.

[14] Liechty M C, Scalzi J M, Sims K R, *et al*. Analysis of large and small colony L5178Y *tk*$^{-/-}$ mouse lymphoma mutants by loss of heterozygosity (LOH) and by whole chromosome 11 painting: detection of recombination[J]. Mutagenesis, 1998, 13(5): 461-474.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net