

代谢活化系统在人细胞转化模型中的应用

李文学^{1,2}, 陈丽萍¹, 肖勇梅¹, 黄耀南³, 庞雅琴¹, 李道传¹, 魏青¹, 陈雯^{1*}

(1. 中山大学公共卫生学院 预防医学系, 广东 广州 510080;

2. 广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510080; 3. 华南师范大学附属中学, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨不同的代谢活化系统在人细胞转化模型中潜在的应用价值。【方法】在永生化人肝细胞 L02 中导入第 12 密码子突变的 H-RAS 癌基因(L02-R 细胞),使其处于恶性转化前的易感状态。选择具有代表性的间接致癌物黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 作用于永生化和转化前期细胞株,采用三种代谢系统:高表达代谢酶 P450 CYP1A2,低剂量底物诱导和加入经典的大鼠 S9 代谢辅助系统,通过软琼脂克隆形成试验和裸鼠皮下成瘤试验来比较在不同的代谢活化系统下,间接致癌物诱导细胞转化的效能。【结果】蛋白印迹验证 H-Ras 稳定高表达的转基因细胞株构建成功。通过 Ames 试验,蛋白印记和 CYP1A2 酶活性等方法比较三种代谢系统酶活性。在未加代谢系统的条件下,经 AFB₁ 染毒后第 17 周 L02-R 细胞发生转化,而对照组细胞 L02-V 在染毒 20 周未能发生转化。而加入 S9 代谢系统时,AFB₁ 诱导 L02-R 细胞在第 8 周发生转化,比未加代谢系统缩短了 9 周;经低剂量 0.1 μmol/L AFB₁ 诱导和高表达 CYP1A2 均使 L02-R 的转化间期缩短 6 周,于第 11 周发生转化。【结论】三种代谢系统都能够促进间接致癌物 AFB₁ 的代谢活化,缩短细胞转化的时间,提高细胞转化效率。与传统的 S9 代谢活化系统相比,低剂量诱导作为新的代谢活化的方法在细胞转化试验中有着良好的应用前景。

关键词: 代谢活化; 黄曲霉毒素 B₁; 人永生化肝细胞; 细胞转化; 间接致癌物

中图分类号: R739.63; Q257

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)02-0224-04

Application of Metabolic Activation System in Human Cell Transformation Model

LI Wen-xue^{1,2}, CHEN Li-ping¹, XIAO Yong-mei¹, HUANG Yao-nan³, PANG Ya-qin¹,

LI Dao-chuan¹, WEI Qing¹, CHEN Wen¹

(1. Department of Preventive Medicine, School of Public Health, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Guangzhou Disease Prevention and Control Center, Guangzhou 510080, China;

3. The Affiliated High School of South China Normal University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To study the potential application value of different metabolic activation systems in human cell transformation models. 【Methods】L02-R cells were established through introduction of an oncogenic allele of H-RAS V12 into an immortal hepatic cell line L02 and were set in the susceptible condition of premalignant transformation. The immortal L02 and pre-transformation stage L02-R cells were treated with the representative indirect carcinogen aflatoxin B₁ (AFB₁), under three in vitro metabolic activation systems: overexpression metabolic enzyme P450 CYP1A2, low-dose substrate induction, and the metabolic auxiliary system added with classic rat S9. Through soft agar colony formation assay and subcutaneous tumor formation assay in nude rats, the efficiency of indirect carcinogens inducing cell transformation in different metabolic activation systems was evaluated. 【Results】Western blot analysis showed that the H-Ras stable overexpression transgenic cells were established successfully. Through Ames test, Western blot, and detection of CYP1A2 enzyme activity, the enzyme activity of these three metabolic activation systems were compared. Without an additional metabolic system, AFB₁ exposed L02-R cells transformed at the 17th week, while control cells L02-V could not be transformed in 20 week after AFB₁ treatment. When S9 metabolic system was added, AFB₁ inducing L02-R cells transformed at the 8th week which was 9 weeks shorter than that of adding no metabolic systems. Low-dose

收稿日期: 2008-12-25

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30630055)和面上项目(3057158); 广东省自然科学基金(5001763); 新世纪优秀人才支持计划(05-0722); 教育部高等学校博士学科点专项(20060558024)

作者简介: 李文学, 硕士, 研究方向: 分子、遗传毒理学; * 通讯作者: 陈雯, E-mail: wenchen1107@163.com

0.1 $\mu\text{mol/L}$ AFB₁ induction and overexpression CYP1A2 could shorten the transformation latency of L02-R for 6 week and L02-R transformed at the 11th week. 【Conclusions】 The three metabolic activation systems can promote the metabolic activation of indirect carcinogens AFB₁, shorten the transformation latency, and increase the transformation efficiency. The low-dose chemical induction seems to be a prospective metabolic activation system used in cell transformation assay compared with the traditional S9 metabolic activation system.

Key words: metabolic activation; aflatoxin B₁; human immortal liver cell; cell transformation; indirect carcinogen

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2): 224-227, 240]

细胞转化是细胞在某些因素作用下, 细胞逃脱正常的调控而发生的形态学和生长特性的改变。细胞转化试验既可以检出遗传毒性效应, 又能检出非遗传毒性的效应^[1]。所以在毒理学研究中应用广泛, 其中可用来预测化学物的致癌活性。本课题组在以往的研究证明基因缺陷型人原代细胞恶性转化模型在筛查化学致癌物具有很好的应用前景^[2-3]。由于环境中存在的化学致癌物绝大部分是间接化学致癌物, 必须经过代谢活化才具有致癌活性。目前在体外代谢系统研究中, 大鼠肝微粒体酶 S9 混合液作为体外代谢活化系统是经典的方法, 但存在很多不足之处^[4], 例如诱导大鼠酶活性的多氯联苯是一种持续性有机污染物, 酶活性维持时间过短, 不同批次的实验误差较大, S9 复合液里含有许多亲核物质容易产生细胞毒性作用等。为了提高人细胞转化模型的检测效能, 本研究建立了三种不同的代谢系统: AFB₁ 代谢关键酶 CYP1A2 的高表达细胞株, 低剂量 AFB₁ 诱导以及 S9 混合液, 选择间接致癌物 AFB₁ 作为测试对象作用于永生化肝细胞株 L02, 探讨活化系统在人细胞转化模型中应用的可行性, 为间接化学诱变物和致癌物的检测提供灵敏度高、特异度好和更接近人体的代谢系统。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究所用的质粒载体 pBabe-puro、pBabe-puro-H-RAS、pMIG 质粒均由美国哈佛大学医学院 William C. Hahn 教授赠送。永生化人肝细胞(L02)由深圳疾病预防与控制中心赠送^[5-7]。BALB/c 裸鼠由广州中医药大学试验动物中心提供。AFB₁ 购自英国 Alexis Biochemicals 公司。CYP1A2 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.2 方 法

1.2.1 H-RAS^{V12} 高表达细胞株 L02-R 的建立 用

逆转录病毒载体质粒 pBabe-puro-Ras 和空白质粒 pBabe-puro) 分别转染包装细胞 293T 以获得含有目的基因的病毒颗粒。将病毒颗粒通过 0.45 μm 滤器过滤后感染靶细胞 L02, 利用目的质粒携带的抗性基因嘌呤霉素进行筛选 (浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$)。

1.2.2 大鼠肝微粒体酶 S9 的制备和检测

多氯联苯 (Polychlorinated biphenyls, PCBs) 诱导大鼠, 常规方法制备 S9, BCA 法测定 S9 的蛋白含量, Ames 试验测定 S9 的代谢活性。

1.2.3 高表达 CYP1A2 细胞株的建立

用逆转录病毒 pMIG-CYP1A2 表达载体在 L02-R 的基础上建立高表达 CYP1A2 的细胞株 L02-R-CYP1A2。蛋白印迹测定 CYP1A2 的表达, P450-GLO™ 试剂盒测定 CYP1A2 的酶活性。

1.2.4 AFB₁ 对 L02-R 细胞中 CYP1A2 的诱导效应

用 0.1 $\mu\text{mol/L}$ AFB₁ 诱导 48 h 后换成新鲜培养基继续维持培养到 96 h, 分别在诱导的 24、48、72 和 96 h 测定 CYP1A2 的表达, 来确定诱导效应最强的时间点。用免疫印迹测定 CYP1A2 的表达, P450-GLO™ 试剂盒测定 CYP1A2 的酶活性。

1.2.5 细胞转化试验

根据有 S9 活化时 AFB₁ 的半数抑制浓度 IC₅₀ 确定三种活化系统的染毒浓度为 0.03 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 。每周染毒 1 次, 连续染毒 4 次。染毒后第 5 周开始每隔 2 周做 1 次软琼脂试验。将 5×10^4 个细胞接种到含 0.4% 琼脂的培养基中, 接种后 4 周, 计数每皿中克隆形成数。并将能够在软琼脂中形成克隆的细胞, 各取 2×10^6 接种到 3 只裸鼠双侧的皮下验证其恶性转化表型。

2 结 果

2.1 H-RAS 高表达细胞株的建立

用逆转录病毒介导的基因转染方法, 导入癌基因 H-RAS^{V12}, 利用抗性基因筛选出 H-RAS 高表

达细胞株 L02-R, 蛋白印迹检测到 L02-R 中 H-RAS 表达比对照细胞升高约 5 倍 (图 1)。与 L02 相比, L02-R 和 L02-V 在形态上没有明显改变。上述结果表明转基因 L02-R 细胞株构建成功。

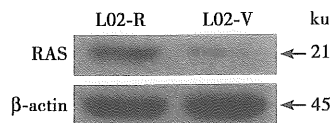


图 1 H-RAS 在 L02-V 和 L02-R 中的表达

Fig.1 Expression of H-RAS in L02-V and L02-R cells

2.2 大鼠肝微粒体酶 S9 的代谢活性检测

通过毒理学经典试验 Ames 试验检测结果表明在 S9 作用下, 间接致癌物 2-乙酰氨基苄 (2-acetaminofluorene, 2-AAF), 可以使三个菌株 TA97、TA98、TA100 出现阳性结果, 与标准相比克隆数目在预期的范围内, 说明 S9 能有效代谢间接致癌物 (图 2)。

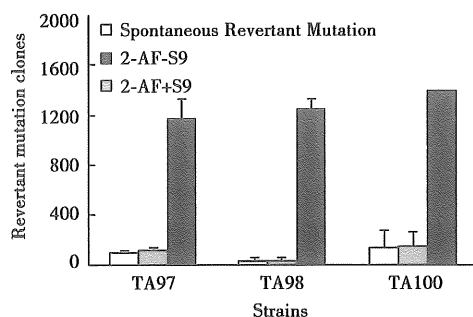


图 2 S9 代谢活化 2-氨基苄的 Ames 试验

Fig.2 Ames test on 2-AAF activated by S9 metabolic activation system

2.3 CYP1A2 高表达细胞株的建立和低剂量诱导

用逆转录病毒介导的基因转染方法把 pMIG-CYP1A2 导入 L02-R 细胞中, 建立了 L02-R-CYP1A2 细胞株, 蛋白印迹结果显示 CYP1A2 的表达比空白质粒对照升高约 5 倍 (图 3A)。CYP1A2 酶活性的测定结果与蛋白印迹的结果一致 (图 3B)。此外我们用低剂量的 AFB₁ 诱导 L02-R 细胞, 检测到 CYP1A2 的高表达 (图 3A), 诱导 48 小时达到高峰, 72 和 96 h 仍维持较高水平 (图 3A)。酶活性测定的结果显示, AFB₁ 诱导使 CYP1A2 酶活性增加, 并呈剂量-反应关系 (图 3B)。

2.4 AFB₁ 诱导细胞转化试验

AFB₁ (染毒浓度为 0.03 μmol/L、0.1 μmol/L 和 0.3 μmol/L) 经三种代谢系统活化后均可诱导

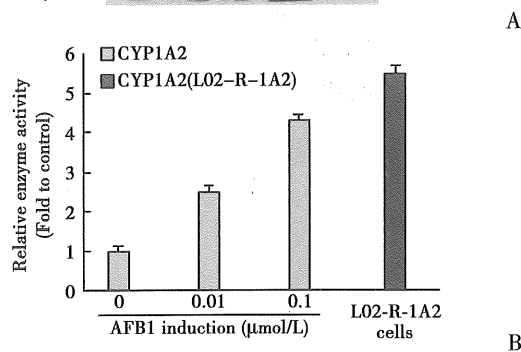
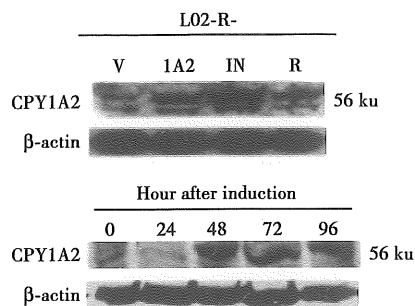


图 3 CYP1A2 的表达和酶活性的测定

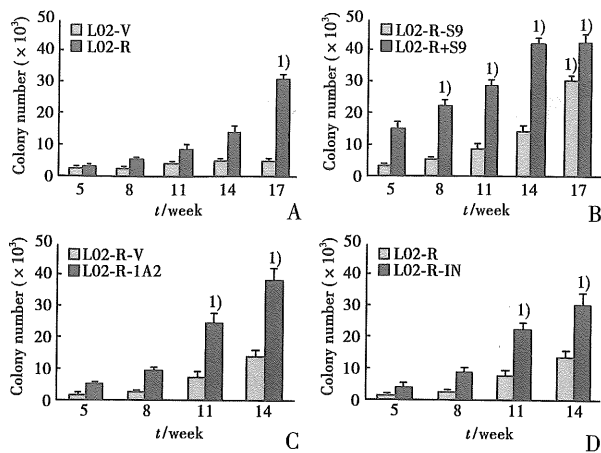
Fig.3 Expression of CYP1A2 and detection of enzyme activity

A: CYP1A2 expression level of cells induced by L02-R-CYP1A2 and treated with 0.1 μmol/L AFB₁, expression changes of AFB₁-induced CYP1A2 at different time points; B: enzyme activity determination of CYP1A2 in L02 cells induced by AFB₁ with different doses and in L02-R-1A2

L02-R 细胞在不同的时间发生恶性转化。在未加代谢系统的条件下, L02-R 细胞在染毒后的第 17 周发生转化, 而对照细胞未见转化 (图 4A), 在加入 S9 混合物的条件下, 细胞在第 8 周发生转化 (图 4B)。高表达 CYP1A2 的 L02-R-CYP1A2 细胞在第 11 周发生转化 (图 4C)。染毒前 48 h 经低剂量 0.1 μmol/L AFB₁ 诱导的细胞在第 11 周发生转化 (图 4D)。所有发生转化的细胞均在裸鼠试验中得到阳性结果。上述研究结果说明三种代谢系统均能增加细胞对 AFB₁ 诱导细胞转化的敏感性。

3 讨论

发展短期快速检测试验对化学物质的致癌作用进行初步筛查具有重要的意义。细胞转化试验是短期试验的一种, 不仅广泛应用在机制学研究中^[6], 而且对致癌物的甄别具有潜在的应用价值。目前, 细胞转化试验主要采用的细胞有哺乳动物细胞和人细胞两种。与人细胞相比, 动物细胞对致癌物诱导的细胞转化更敏感^[7,8], 但是人与动物之

图4 AFB₁诱导细胞转化试验Fig.4 Cell transformation assay induced by AFB₁

A: L02-V and L02-R cells treated with 0.3 $\mu\text{mol/L}$ AFB₁ formed cell clones in soft agar; B: Effect of adding S9 mixture on cell clone formation of L02-R cells treated with 0.3 $\mu\text{mol/L}$ AFB₁; C: Effect of overexpression of CYP1A2 on cell clone formation of L02-R cells treated with 0.3 $\mu\text{mol/L}$ AFB₁; D: Effect of 0.1 $\mu\text{mol/L}$ AFB₁ induction for 48 h on cell clone formation of L02-R cells treated with 0.3 $\mu\text{mol/L}$ AFB₁.

1) indicates positive results in nude mice experiments

间存在种属的差别,使得试验结果外推到人时存在一定的局限性。并且动物细胞在体外培养时,容易出现基因组的不稳定和发生遗传变异^[7]。正常的人原代细胞是研究外源化合物理想的细胞类型,但是它们在体外存活的时间较短,培养困难。在人原代细胞中表达人端粒酶催化亚基和猿猴病毒 SV40 的大 T 抗原,能使大多数的人原代细胞逃脱老化的威胁获得永生化^[1]。永生化的细胞株克服了原代细胞的缺点,容易在体外培养,但是,永生化细胞株很难发生诱导转化,转化的周期很长,在培养过程中污染的机会增大。永生化细胞中继续导入 Ras 或 Myc 后,细胞虽然处在转化前期,并没有恶性表性,当继续导入高表达癌基因或抑制抑癌基因,永生化细胞可以发生恶性转化或被致癌物诱导转化^[2,3]。我们的前期研究为人细胞转化试验的应用奠定了基础。

目前,已知绝大部分的环境化学物需要有 CYP450s 参与的代谢活化^[9,10],这促进了转基因动物和基于培养细胞的代谢系统的发展。在短期体外试验中,传统的活化代谢系统大鼠肝微粒体混合功能氧化酶 S9 应用最广泛,但此方法具有局限性如种属差异和细胞毒性作用等^[4]。此外 S9 是细胞外的代谢系统,经 S9 活化产生的终致癌物必须

透过细胞膜进入细胞内,才能与靶分子结合。许多终致癌物是高活性的物质,存在时间很短,容易和周围的分子发生反应。而且膜的穿透性很低,对于短寿命的或离子型的代谢产物甚至不能通过,所以与细胞内的代谢系统相比细胞外代谢产生的终致癌物只有很少一部分能进入到靶细胞中,因此降低了系统的敏感性^[4]。本研究比较了三种代谢系统:①大鼠肝微粒体混合功能氧化酶系统(S9);②细胞高表达关键代谢酶 CYP1A2;③低剂量 AFB₁ 诱导 L02 细胞表达 CYP1A2,来检测人细胞转化模型对间接致癌物的检测敏感度,进而比较三种代谢活化系统的实用性。通过已知的间接致癌物 AFB₁ 对 L02 细胞诱导转化效能的检测,我们证实 AFB₁ 在加入三种代谢系统的条件下均可以使细胞发生转化的周期缩短,比未加代谢系统的对照细胞提前 3~9 周。比较此三种代谢系统,与 S9 相比,低剂量诱导 CYP1A2 具有发展的潜能,但还需要进一步的研究,掌握多种化学物诱导的代谢酶谱以及诱导规律,另外剂量的选择还需标准化。而高表达关键酶的模型细胞应用价值不大,因为对于大多数的化学物,代谢关键酶并不明确。综上所述,本研究在前期转基因细胞转化模型建立基础上,进一步阐明外来代谢系统的加入,可以进一步提高和优化细胞模型的检测灵敏性,为人细胞转化模型筛查化学物致癌活性中的应用奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] Walen KH. The origin of transformed cells: studies of spontaneous and induced cell transformation in cell cultures from marsupials, a snail, and human amniocytes [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2002,133 (1):45-54.
- [2] 马儒林,庞亚琴,李文学,等. 癌基因高表达人上皮细胞转化模型的构建及应用 [J]. 中华预防医学杂志, 2008,42(6):395-399.
- [3] 甘德秀,马儒林,庞雅琴,等. 端粒酶在人胚肾上皮细胞转化中的作用 [J]. 肿瘤, 2006,26(7):628-631.
- [4] Brambilla G, Martelli A. Failure of the standard battery of short-term tests in detecting some rodent and human genotoxic carcinogens [J]. Toxicology, 2004,196(1-2):1-19.
- [5] Pfeifer AM, Cole KE, Smoot DT, et al. Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics

(下转 240 页 to page 240)