

血清灭活对小鼠淋巴瘤试验结果的影响

任 萌^{1,2}, 张海娇^{1,2}, 康 玮^{1,2}, 张建军^{1,2}, 申秀萍^{1,2}, 刘 妍^{1,2*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

摘要: **目的** 探索小鼠淋巴瘤胸腺激酶(tk)位点基因突变试验中血清灭活对结果的影响。**方法** 取对数生长期的小鼠淋巴瘤细胞(L5178Y3.7.2c-tk^{+/+})设立阴性对照组和阳性对照组,阴性对照组加入100 μL DMSO,阳性对照组加入100 μL 10 μg/mL 4-硝基喹啉(4-NQO)诱导突变,测定细胞悬浮增长率(SG)、相对悬浮增长率(RSG)、平板效率(PE)、相对存活率(RS)和相对总增长率(RTG)等指标。根据血清灭活与否和选择突变剂三氟胸苷(TFT)的含量,在筛选突变集落过程中,将阴性对照组和阳性对照组各分为:灭活组、未灭活+1.5倍TFT组、未灭活组,测定突变频率(MF),对试验结果进行评价。**结果** 阴性对照组SG在8~32,细胞倍增速度符合试验要求;PE在65%~120%,符合试验成立条件。阳性对照的灭活组、未灭活+1.5倍TFT组、未灭活组中MF均比阴性对照组至少增加 300×10^{-6} 且小克隆突变频率至少占40%,符合试验要求。阴性对照灭活组的MF数值在标准范围内,未灭活组的MF数值明显高于灭活组,超过标准数值范围,且96孔板中的大小克隆不易区分;阴性对照未灭活+1.5倍TFT组使得MF数值在标准范围内,但远高于灭活组。**结论** 在小鼠淋巴瘤试验中,测定MF的平板一定要用灭活的血清,未灭活血清可能通过抵消TFT作用对结果产生很大影响。

关键词: 小鼠淋巴瘤细胞;胸腺激酶(tk)基因突变;热灭活血清;突变频率

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)08-1399-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.08.007

Effect of inactivated serum on mouse lymphoma test

REN Meng^{1,2}, ZHANG Haijiao^{1,2}, KANG Wei^{1,2}, ZHANG Jianjun^{1,2}, SHEN Xiuping^{1,2}, LIU Yan^{1,2}

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Drug Safety Assessment Co., Ltd., Tianjin 300301, China

2. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of inactivated serum on the mouse lymphoma tk gene mutation assay. **Methods** The negative control group and positive control group were set up for the mouse lymphoma cells (L5178Y3.7.2c-tk^{+/+}) during the logarithmic growth period. The negative control group was added to 100 L DMSO. The positive control group added 100 μL 10 μg/mL 4-nitroquinoline (4-NQO) induced mutation, and the cell suspension growth rate (SG), the relative suspension growth rate (RSG), plate efficiency (PE), relative survival rate (RS), relative total growth rate (RTG), and other indicators were measured. According to the inactivation of serum and the content of three fluorothoracoside (TFT), the negative control group and the positive control group were divided into inactivation group, not inactivated + 1.5 × TFT group and the not inactivated group. We measured the mutation frequency (MF) value and evaluated the test results. **Results** In negative control group, SG was from 8 to 32, and cell doubling speed accords with test requirement. PE from 65% to 120% conforms to the established condition of experiment. MF in positive control group increased by 300×10^{-6} than the negative control group, and the frequency of the small clone mutation was at least 40%, which was in line with the test requirements. MF value of the negative control inactivation group was within the standard range. The MF value of the not inactivated group was significantly higher than that of the inactivated group, exceeding the standard number, and Banzhong size clones were not easy to distinguish; The negative control not inactivated + 1.5 × TFT group made the MF value within the standard range, but much higher than the inactivated group. **Conclusions** In mouse lymphoma test, the plates with

收稿日期: 2018-04-16

基金项目: 国家科技重大新药创制项目(2015ZX09501004); 天津市科技计划项目(16PTGCCX00090)

第一作者: 任 萌(1991—), 主要从事药理毒理学研究。E-mail: renm@tjipr.com

*通信作者: 刘 妍, 主要从事药理毒理学研究。E-mail: liuy8@tjipr.com

measuring mutation frequency must use the heat inactivate serum, and the not inactivated serum may have a great effect on the results by counteracting TFT.

Key words: mouse lymphoma cell; tk gene mutation; heat inactivate serum; mutation frequency

小鼠淋巴瘤细胞胸腺激酶 (tk) 位点基因突变试验 (mouse lymphoma tk gene mutation assay, MLA) 是一种具有高敏感性的体外哺乳动物细胞遗传毒性评价试验方法^[1]。该方法可以检测基因突变和染色体结构改变, 是药品注册审批国际协调组织 (ICH) 推荐评价遗传毒的标准试验组成部分^[2]。

小鼠淋巴瘤细胞 (L5178Y3.7.2c-tk^{+/+}) 常染色体上的 tk 位点可以检测出以耐药性为指标的基因突变 (tk^{+/+}→tk^{-/-}), 选用 tk 位点代谢拮抗剂三氟胸苷 (TFT) 作为选择培养基, 观察细胞集落形成的增加, 检测受试物的致突变性^[3]。世界经济合作与发展组织 (OECD) 关于评价遗传毒的指导原则中提到, 该试验在筛选突变集落过程中要用灭活的血清^[4], 但未阐述原因。本研究旨在探索血清灭活与否对小鼠淋巴瘤试验结果的影响。

1 材料

1.1 细胞

小鼠淋巴瘤细胞 (L5178Y3.7.2c-tk^{+/+}), 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂

RPMI1640 培养基 (货号 11875-093)、马血清 (货号 26050-088) 和青链霉素混合液 (双抗, 货号 10378-016), 均购自于 Gibco 公司; 次黄嘌呤 (货号 H9636)、甘氨酸 (货号 G7126)、氨甲喋呤 (货号 M8407)、胸腺嘧啶核苷 (货号 T1895)、三氟胸苷 (TFT, 货号 T2255)、二甲基亚砜 (DMSO, 货号 A3411)、4-硝基喹啉 (4-NQO, 货号 M1390), 均购自 Sigma 公司。

1.3 主要试剂的配制

受试物处理用培养基 (含 5% 马血清, F5p), 常规培养用培养基 (含 10% 马血清, F10p) 和平板接种用培养基 (含 20% 马血清, F20p), 未特殊说明的, 所用的马血清均已灭活 (56 °C、30 min), 并加入 1% 双抗。配制 100× THMG (300 μg/mL 胸腺嘧啶核苷+500 μg/mL 次黄嘌呤+10 μg/mL 氨甲喋呤+750 μg/mL 甘氨酸) 和 100× THG (300 μg/mL 胸腺嘧啶核苷+500 μg/mL 次黄嘌呤+750 μg/mL 甘氨酸)。

1.4 主要仪器

二氧化碳培养箱 (SANYO); 倒置显微镜

(Olympus); 台式离心机 (Thermo); 高压蒸汽灭菌器 (ALP); 电子天平 (Mettler Toledo); 超净工作台 (无锡易纯净化设备有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

从液氮中取出小鼠淋巴瘤细胞于 37 °C 水浴中 1 min 内将细胞融化进行常规悬浮细胞培养, 静置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 每天控制细胞密度于 (2~4) × 10⁵/mL。

2.2 自发突变细胞的清除

取对数生长期的细胞, 用 F10p 调整细胞浓度为 2×10⁵/mL。在 49.5 mL 的 F10p 培养体系中加入 0.5 mL THMG (100×), 培养容器为 125 mL 规格的带盖锥形瓶, 拧松锥形瓶盖, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱。24 h 后, 计数细胞, 用 F10p 培养基调整细胞浓度为 2×10⁵/mL, 体积为 49.5 mL。在 49.5 mL 的 F10p 培养体系中加入 0.5 mL THG (100×), 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱 24 h。用含 THG 的培养基调整细胞密度为 2×10⁵/mL, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 24 h 后, 调整细胞密度为 2×10⁵/mL, 培养 1 d 后冻存。

2.3 阴性对照组和阳性对照组的设立

取对数生长期的细胞, 用 F5p 培养基调整密度到 6×10⁵/mL。设立阴性对照组和阳性对照组, 每组取 10 mL 细胞液, 于 25 cm² 培养瓶中。阴性对照组加入 100 μL DMSO, 阳性对照组加入 100 μL 10 μg/mL 4-NQO, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中震荡培养 4 h。每组用 F10p 培养基离心 2 次, 计数细胞, 调整密度到 2×10⁵/mL, 体积为 10 mL 继续培养。

2.4 表达培养

“2.3”项细胞培养 24 h 后计数, 并用 F10p 培养基调整细胞密度为 2×10⁵/mL, 体积为 10 mL 继续培养, 24 h 后再计数细胞, 计算相对悬浮生长率 (RSG)。

2.5 平板接种效率 (PE) 的测定

2 d 表达培养结束后, 每组用 F20p 稀释细胞浓度为 10 000/mL, 再稀释为 500/mL, 最终稀释为 8/mL。每组铺 2 块 96 孔板 (每孔加 200 μL 细胞液), 11 d 后计算 PE、相对存活率 (RS)、相对总生长率 (RTG)。

2.6 突变频率 (MF) 的测定

为了验证血清灭活与否对突变频率的影响,推测未灭活血清是否可抵消 TFT 的作用,将阴性对照组和阳性对照组各分为:灭活组、未灭活+1.5 倍 TFT 组、未灭活组。每组细胞用 F20p 梯度稀释为 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 。灭活组和未灭活组加入终质量浓度为 $3 \mu\text{g/mL}$ 的 TFT,未灭活+1.5 倍 TFT 组加入终质量浓度为 $4.5 \mu\text{g/mL}$ 的 TFT,每组铺 2 块 96 孔板(每孔加 $200 \mu\text{L}$ 细胞液),11 d 后计算 MF、小克隆突变频率 (Small MF)、大克隆突变频率 (Large MF)。

2.7 结果计算与数据分析

2.7.1 悬浮生长率 (SG) SG 可以衡量细胞在受试物处理和表达培养期间的增长倍数, $\text{SG1} = 1 \text{ d}$ 细胞计数浓度/接种起始浓度, $\text{SG2} = 2 \text{ d}$ 细胞计数浓度/接种起始浓度。2 d 培养后阴性对照组细胞总悬浮增长率 ($\text{SG} = \text{SG1} \times \text{SG2}$) 应在 $8 \sim 32$ ^[4],说明细胞生长状态良好。

2.7.2 RSG $\text{RSG} = \text{SG}_{\text{阳性对照组}} / \text{SG}_{\text{阴性对照组}}$

2.7.3 PE $\text{PE} = [-\ln(\text{EW}/\text{TW})] / 1.6$, 公式中 EW 为无集落生长的孔数, TW 为总孔数, 1.6 为每孔接种细胞数。OECD 指导原则规定, 阴性对照组的 PE 应在 $65\% \sim 120\%$ ^[4]。

2.7.4 RS $\text{RS} = \text{PE}_{\text{阳性对照组}} / \text{PE}_{\text{阴性对照组}}$

2.7.5 RTG $\text{RTG} = \text{RSG} \times \text{RS}$

2.7.6 MF $\text{MF} (\times 10^{-6}) = [-\ln(\text{EW}/\text{TW})] / 2000/\text{PE}$, 式中 EW 为无集落生长的孔数, TW 为总孔数, 2000 为每孔接种细胞数。OECD 指导原则规定阴性对照组的突变频率范围应在 $50 \sim 170 (\times 10^{-6})$ ^[4]。

2.7.7 小克隆突变频率百分比 (SC) $\text{SC} = \text{含有小集落的孔数} / (\text{含有小集落的孔数} + \text{含有大集落的孔数})$; 小集落是大小占 96 孔板孔直径 1/4 以下, 形态块状且致密的集落; 大集落是大小超过孔直径的 1/4, 呈薄层分布的集落。

2.7.8 Small MF $\text{Small MF} = \text{MF} \times \text{SC}$

2.7.9 Large MF $\text{Large MF} = \text{MF} - \text{Small MF}$

2.7.10 阳性对照组成立条件^[5] 阳性对照组的 MF 比阴性对照组至少增加 300×10^{-6} 且 Small MF 至少占 40%; 或与阴性对照组比 Small MF 至少增加 150×10^{-6} 。

3 结果

在非活化条件下, 用 4-NQO 作为阳性诱变剂短期处理小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 4 h。阴性对照组和阳性对照组经过 48 h 表达培养, 测定 SG、RSG; 将一部分细胞以 1.6/孔铺于 96 孔板, 11 d 后测定 PE、RS 及 RTG。结果如表 1 所示, 阴性对照组 SG 指标在 $8 \sim 32$ 细胞倍增速度符合试验要求。阴性对照的 PE 指标在 $65\% \sim 120\%$, 平板效率符合实验成立条件。

表 1 平板效率的测定

Table 1 Determination of plating efficiency

组别	SG1	SG2	SG	RSG/%	TW	EW	PE/%	RS/%	RTG/%
阴性对照	3.16	5.74	18.14	100	192	40	98	100	100
阳性对照	2.31	4.43	10.23	56	192	59	74	75	42

筛选突变集落过程中, 将阴性和阳性对照组按血清和 TFT 含量各分组, 以 2000/孔铺于 96 孔板, 11 d 后测定 MF 等指标。结果如表 2 所示, 阳性对照的灭活组、未灭活+1.5 倍 TFT 组、未灭活组中 MF 数值均比阴性对照组至少增加 300×10^{-6} 且 Small MF 至少占 40%, 阳性对照符合试验要求。阴性对照灭活组的 MF 数值在 $50 \sim 170 (\times 10^{-6})$, 而未灭活组的 MF 数值超过标准数值范围, 且 96 孔板中的大小克隆不易区分, 说明使用未灭活的血清影响试验结果; 阴性对照未灭活+1.5 倍 TFT 组增加了 TFT 含量, 使得 MF 数值在 $50 \sim 170 (\times 10^{-6})$, 但远高于灭活组, 说明通过增加 TFT 含量可以大部分

抵消未灭活血清对实验结果的影响, 但自发突变要高于灭活组。通过单因素变量控制, 说明未灭活的血清对小鼠淋巴瘤试验结果有很大的影响, 且推测未灭活的血清是通过抵消 TFT 的作用而扰乱试验结果的。

4 讨论

热灭活血清 (56°C 、30 min) 是免疫学研究中不可缺少的过程, 因为血清的补体系统可参与平滑肌收缩, 淋巴细胞、巨噬细胞的趋化等反应从而干扰实验^[6]。而通常经过高温处理的血清品质会有所下降, 造成细胞生长速率降低, 并且血清中沉淀物增多, 在显微镜下容易误导研究者认为细胞遭到污

表2 突变频率的测定
Table 2 Determination of mutant frequency

组别		PE/%	TW	EW	大克隆	小克隆	MF/10 ⁻⁶	SC%	Small MF	Large MF
阴性对照	灭活	98	192	161	13	18	89.81	58.06	52.15	37.66
	未灭活+1.5 倍 TFT	98	192	139	20	33	164.74	62.26	102.58	62.17
	未灭活	98	192	133	3	56	187.25	94.92	177.72	9.52
阳性对照	灭活	74	192	102	31	59	428.84	65.56	281.13	147.71
	未灭活+1.5 倍 TFT	74	192	85	24	83	552.46	77.57	428.54	123.92
	未灭活	74	192	46	7	139	968.75	95.21	922.30	46.45

染^[7]。所以对大多数细胞实验而言,若使用优质的血清则不需要热灭活。但是 OECD 指导原则指出在小鼠淋巴瘤试验突变选择过程中,需对血清进行热灭活,所以本研究对是否需要灭活血清进行验证,探讨未灭活血清对试验结果的影响。

在灭活组, TFT 可以筛选出突变基因型 $tk^{-/-}$ 和 $tk^{0/-}$ 的细胞形成克隆,而正常基因型 $tk^{+/-}$ 的细胞存活不了,所以 TFT 作为选择突变剂筛选出发生突变的细胞;在未灭活组,未灭活的血清有可能抵消了 TFT 的选择作用,导致部分正常细胞也形成克隆,由于是多种基因型细胞同时克隆,生长速度不一致,克隆大小不一,对试验结果有很大干扰;而未灭活+1.5 倍 TFT 组的 MF 数值虽然远高于灭活组,但增加 TFT 含量使得 MF 数值落在了标准范围内。推测可能通过改变加入 TFT 的含量使得未灭活血清组的 MF 数值可以与灭活血清组相当,这样就可以省去灭活血清的步骤,方便试验进行。然而究竟加入多少倍 TFT 以及究竟血清中何成分干扰 TFT 发挥作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] Zhang L S, Honma M, Matsuoka A, et al. Chromosome painting analysis of spontaneous and methanesulfonate-induced trifluorothymidine-resistant L5178Y cell colonies [J]. *Mutat Res*, 1996, 370(3/4): 181-190.
- [2] Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use [S]. 2011.
- [3] Mei N, Guo X, Moore M M. Methods for using the mouse lymphoma assay to screen for chemical mutagenicity and photo-mutagenicity [J]. *Methods Pharmacol Toxicol*, 2014: 561-592.
- [4] Guideline for testing of chemicals No. 490: in vitro mammalian cell gene mutation tests using the thymidine kinase gene [S]. 2016.
- [5] 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2018.
- [6] 彭 岳, 赵铁建, 谢海源, 等. 细胞培养实验中一些细节问题的探讨 [J]. *中华中医药学刊*, 2009(6): 1189-1191.
- [7] 张 良, 徐 立, 袁冬萍. 中药血清药理学方法的研究进展 [J]. *南京中医药大学学报: 自然科学版*, 2002, (4): 64-66.