

环磷酰胺诱导永生化人支气管上皮细胞恶性转化过程中的基因突变

袁素波^{1*}, 王治乔¹, 叶常青², 廖明阳¹, 夏英³, 杨梅英²

(军事医学科学院 1. 毒物药物研究所, 2. 放射医学研究所, 北京 100850;

3. 卫生部工业卫生实验所, 北京 100088)

摘要:环磷酰胺(CP)是国际癌症研究署确认的人类I组致癌原, 目前缺乏适宜的人类细胞模型开展致癌相关的细胞和分子机理的研究. 本室已经进行了CP诱导永生化人支气管上皮细胞(BEAS-2B)恶性转化的工作, 建立了CP的癌前转化细胞(BEAS-CP), 以此为细胞模型, 本实验运用聚合酶链式反应单链构象多态性和序列分析的方法进行了细胞转化过程中基因突变的动态分析. 分别关注了*p53*基因第5~8, *p16*基因第1~2和*ki-ras*基因第1外显子的突变情况. 研究表明: BEAS-CP细胞存在*p16*基因第1外显子多位点和*ras*基因第1外显子单位点的碱基突变, 晚代龄的转化细胞没有测到*p53*基因的突变. 综上实验结果认为: *p16*基因突变可能与BEAS-CP细胞周期的增殖性改变有关, *ki-ras*基因的突变则可能具有转化启动效应, 两者都是细胞转化过程中的重要分子事件.

关键词:环磷酰胺; 上皮细胞, 支气管, 人; 基因, *p53*; 基因, *p16*; 基因, *ki-ras*; 基因突变

中图分类号: R99

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2001)06-0447-06

环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是广为使用的抗癌烷化剂和重要的免疫抑制剂, 也是国际癌症研究署确认的人类I组致癌原. 细胞转化过程是在体外条件下模拟正常细胞向肿瘤细胞的演变过程, CP作为重要的药物致癌原, 迄今尚未建立人类上皮细胞的恶性转化模型, 更未进行细胞转化相关的细胞

和分子机理的系统研究. 为此, 本研究室以永生化人支气管上皮细胞(immortalized nontumorigenic human bronchial epithelial cells, BEAS-2B)为细胞模型, 进行CP诱导的BEAS-2B细胞(BEAS-CP)恶性转化和转化细胞生物学特性的系列研究^[1]. 基因毒药物具有同DNA直接作用, 诱发基因突变并破坏细胞基因组完整性的能力. 致癌原诱导的细胞转化过程中可能涉及了多个基因的突变事件, 其中癌基因的激活具有显性效应, 可引起细胞增殖分化的障碍; 抑癌基因的失活可导致细胞获得选择性的生长优势, 被视为肿瘤发病过程中起主导作用的因素. 目前对CP致癌过程中发生的重要癌基因和抑癌基因的突变情况的了解还相当缺乏. 为了解CP诱导人类细胞尤其是上皮细胞转化的相关分子机理, 利用已经建立的BEAS-CP转化细胞模型, 进行了转化相关的癌基因和抑癌基因突变的研究, 分析了*p53*基因进化高保区第5~8, *p16*基因第1~2和*ki-ras*基因第1外显子的突变.

1 材料与方法

1.1 细胞培养及转化方法^[1]

1.2 细胞DNA的提取

对数生长期状态良好的BEAS-2B及BEAS-CP细胞 2×10^6 , 胰酶-EDTA消化液(Gibco)消化收集, DNA提取使用DNAzol™试剂盒(Gibco), 方法参照试剂盒说明. 提取得到的DNA溶液经岛津分光光度计(Shimadzu UV-160A)检测后, -20°C 储存备用.

1.3 多聚酶链式聚合反应(polymerase chain reaction, PCR)引物及扩增

PCR引物由赛百盛生物工程公司合成. *p53*, *p16*和*ras*基因引物序列见表1~3.

PCR反应体系的设置同文献[2]. 扩增条件: 94°C 10 min, 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min, 35

收稿日期: 2001-05-08 接受日期: 2001-09-18

基金项目: 北京市科委实验动物专项基金资助(954024500)

作者简介: 袁素波(1962-), 女, 贵州省贵阳市人, 医学博士, 副研究员, 主要研究方向为化学致癌和药物毒理学.

*联系作者. Tel: (010)66931632, Fax: (010)68211656, E-mail: Liubx@nic.bmi.ac.cn

Tab 1. Oligonucleotide primer sequence of human *p53* exons 5 – 8

Exon	Primer	Oligonucleotide	Length /bp
5	P5A5'	TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG A 3'	181
	P5B5'	CGC TAT CTG AGC AGC GCT CAT G 3'	
6	P6A5'	GAT TGC TCT TAG GTC TGG CCC CTC CTC AGC 3'	132
	P6B5'	CAG ACC TCA GGC GGC TCA TAG G 3'	
7	P7A5'	CTA GGT TGG CTC TGA CTG TAC CAC CAT CC 3'	119
	P7B5'	TGA CCT GGA GTC TTC CAG TGT G 3'	
8	P8A5'	GTA GTG GTA ATC TAC TGG GAC GGA ACA GC 3'	143
	P8B5'	CTC GCT TAG TAC TCC CTG GGG GC 3'	

Tab 2. Oligonucleotide primer sequence of human *p16* exons 1 – 2 and *GAPDH* exon 8

Exon	Primer	Oligonucleotide	Length /bp
1	P1A5'	TCT GCG GAG AGG GGG AGA GCA GGC A 3'	238
	P1B5'	GCG CTA CCT GAT TCC AAT TC 3'	
2a	P2aA5'	ACA AGC TTC CTT TCC GTC ATG CCG 3'	244
	P2aB5'	CCA GGC ATC GCG CAC GTC CA-3'	
2b	P2bA5'	TTC CTG GAC ACG CTG GTG GT-3'	236
	P2bB5'	TCT GAG CTT TGG AAG CTC TCA G-3'	
<i>GAPDH</i>	P8A5'	AGT ACG CTG CAG GGC CTC ACT CCT T-3'	473
	P8B5'	AAG AGC CAG TCT CTG GCC CCA GCC A-3'	

GAPDH: human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene.

Tab 3. Oligonucleotide primer sequence of human *ki-ras* exon 1

Exon	Primer	Oligonucleotide	Length /bp
1	P1A5'	ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT 3'	157
	P1B5'	TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC 3'	

There are G-C and C-G mismatches on each primer to form the BstI and HphI restriction enzyme sites.

个循环后72℃延伸10 min. 反应在PE公司PCR GeneAmp System 仪上进行,反应结束,取5 μL扩增产物行1%琼脂糖凝胶电泳,扩增产物与DNA Marker (Gibco)对照确定分子量大小并摄影记录结果,所用紫外凝胶成像系统 UVP 为基因公司产品.

1.4 DNA 多聚酶链式聚合反应-单链构象多态性 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 分析

PCR-SSCP 分析按以下步骤进行,PCR 反应产物5 μL,2 倍体积的变性上样缓冲液[10 mmol·L⁻¹ NaOH, 10 mmol·L⁻¹ EDTA pH 8.0, 95% 甲酰胺, 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯腈蓝],混匀后煮沸10 min,冰上骤冷立即上样进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳. 电泳系统的电泳槽,电泳仪系 Bio-Rad 公司产品,电泳凝胶大小是16 cm×16 cm×0.75 mm,聚丙烯酰胺浓度15% (丙烯酰胺与甲叉丙烯酰胺之比为49:1),1×TBE(45 mmol·L⁻¹ Tris-硼酸,1 mmol·L⁻¹ EDTA)为电泳缓冲液,10 mA 恒流,电泳10 h 左右,完毕后小心取下凝胶作硝酸银染色. 染色步骤,10%乙醇10 min,1%硝酸10 min,12 mmol·L⁻¹ 硝酸银(含0.02% 甲醛)染色30 min,3% Na₂CO₃-0.02% 甲醛显影至条带清晰而背景不至过深时取出,摄影记录结果.

在该突变检测体系中以 BEAS-2B 细胞 *p53*, *p16* 和 *ki-ras* 基因外显子 PCR 扩增产物对 BEAS-CP 不同转化代龄细胞的相应基因外显子 PCR 产物进行 SSCP 电泳,以后者出现异常带型或迁移率的改变判断为 SSCP 结果阳性,提示该 DNA 片段可能存在点突变.

1.5 PCR 产物的克隆和测序

PCR 产物片段的克隆按 Promega PGEM-T Easy 试剂盒提供的方法进行. 阳性克隆的鉴定依据 pGEM-T 载体系列含有氨苄青霉素抗性基因和 *lacZ* 编码的 α 肽基因提供的阳性菌落筛选标志进行. 对重组质粒还进行了 EcoR I 限制性内切酶消化,电泳鉴定插入片段的正确性. 另外还以质粒 DNA 为模板,进行了被克隆的相应外显子片段的 PCR 反应,以扩增出该外显子片段证实该克隆含有所需的重组片段,反应设空白载体为模板的 PCR 阴性对照. 序列分析,克隆于 pGEM-T Easy 载体上的被测 DNA 片段,使用 T7 引物进行测序反应,序列测定在 ABI390 全自动 DNA 序列分析仪上进行,测序工作由赛百盛生物公司完成.

2 结果

2.1 *ki-ras*, *p53*, *p16* 基因的 PCR 扩增

对照 BEAS-2B 和不同代龄的 BEAS-CP 细胞, 分别提取基因组 DNA. 用相应外显子引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测其正确性. *p53* 基因第 5~8 外显子, *p16* 第 1, 2a, 2b 外显子 (图 1), PCR 参照 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 基因第 8 外显子和 *ki-ras* 基因第 1 外显子均扩增出了期望的目的片段.

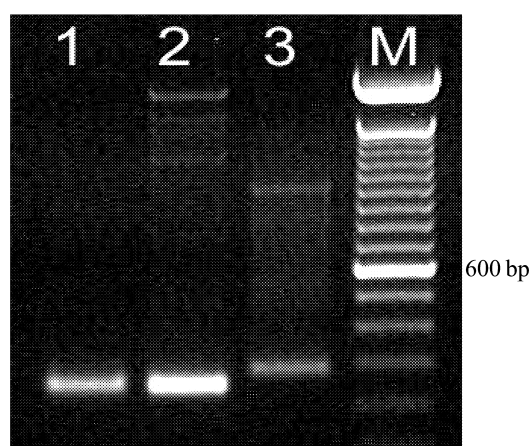


Fig 1. PCR product of *p16* gene exons 1, 2a, 2b of BEAS-CP cells. BEAS-CP: malignant transformation of BEAS-2B cells by cyclophosphamide; BEAS-2B: immortalized nontumorigenic human bronchial epithelial cells. Lane 1-3 showing PCR product of exons 1, 2a, 2b. Lane M is a 100 bp DNA ladder used as a size marker.

2.2 *p53*, *p16* 和 *ki-ras* 基因的 PCR-SSCP 检测

利用建立的 PCR-SSCP 检测体系, 以 BEAS-2B 细胞 SSCP 带型为正常参照, 分别对不同转化代龄的 BEAS-CP 细胞 *p53* 基因第 5~8, *p16* 第 1~2 和 *ki-ras* 基因第 1 外显子 PCR 扩增产物进行 SSCP 电泳, 以 SSCP 结果阳性判断该基因片段可能存在点突变.

实验对 BEAS-CP 细胞第 5, 9, 18, 24, 34, 38 代细胞 *p53* 基因第 5~8 外显子进行了 SSCP 分析, 以 BEAS-2B 第 22 代细胞 SSCP 带型作正常参照, 在第 5, 6, 8 外显子均未发现异常带型. 第 7 外显子第 5, 9, 18 代细胞 SSCP 结果呈阳性 (图 2), 示可能有突变存在. 对 *p16* 基因外显子 1, 2a, 2b 的 SSCP 分析, 在外显子 1 (图 3), 2a, 2b 均未发现明显的电泳迁移

率的改变. *ki-ras* 基因第 1 外显子 SSCP 电泳结果显示, BEAS-CP 第 5 及以上代龄的细胞 SSCP 电泳结果为阳性, 提示可能有突变发生 (图 4).

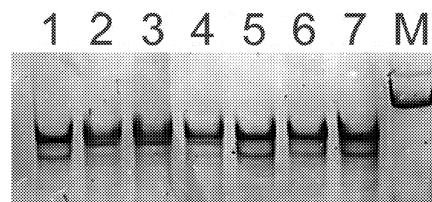


Fig 2. Detection of *p53* mutation in exon 7 by single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. Lane 1: BEAS-2B cells at passage 22 used as a normal control of SSCP. Lanes 2-4: the positive results representing BEAS-CP cells at passages 5, 9, 18, respectively. Lanes 5-7: the negative results of BEAS-CP cells at passages 24, 34, 38, respectively. Lane M: size marker.

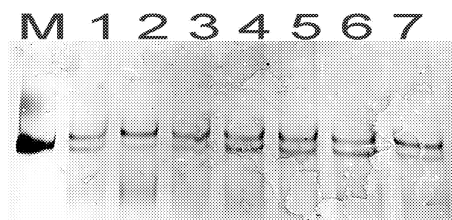


Fig 3. Detection of *p16* mutation in exon 1 by SSCP analysis. Lane M: size marker. Lane 1: normal control from BEAS-2B cell at passage 22; lanes 2-7: the negative results from BEAS-CP cells at passages 5, 9, 18, 24, 34, 38, respectively.

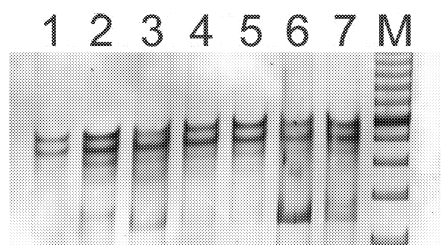


Fig 4. Detection of *ki-ras* exon 1 mutation by SSCP method. Lane M: DNA marker. Lane 1: the BEAS-2B cell at passage 22 used as the normal control. Lane 2-7: positive results of BEAS-CP cells at passages 5, 9, 18, 24, 34, 38, respectively.

2.3 *p53*, *p16* 和 *ras* 基因的序列分析

进行序列测定的原则是,分别选择 BEAS-2B 和 BEAS-CP 细胞有代表性的代龄,对 SSCP 结果阳性或可疑阳性的基因外显子,SSCP 结果阴性但仍可能存在突变的代表性基因外显子片段进行克隆(图 5)和测序.所选细胞,细胞代龄和被测基因的外显子及测序结果汇总于表 4.

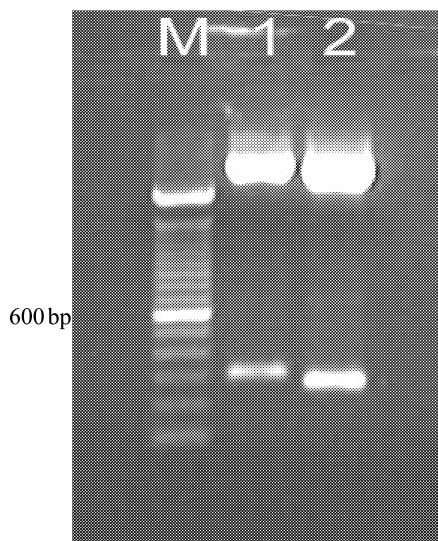


Fig 5. Recombinant plasmid restriction enzyme lysates of *p16* exon 1 from BEAS-CP cells at passage 34. Lane M: DNA marker. Lane 1: *p16* exon 1 of BEAS-CP cells at passage 34. Lane 2: the other sample.

Tab 4. Sequence analysis results of BEAS-2B and BEAS-CP cells

Cell	Passage	Gene and exon	Sequence
BEAS-2B	22	<i>p53</i> E 7	246 ATC→ATG/Met→Met, 248 CGC→CGG/Arg→Arg
		<i>p53</i> E 5,6,8	wide type
	22	<i>p16</i> E 1, E 2a	wide type
BEAS-CP	34,5	<i>p53</i> E 7	246 ATC→ATG/Met→Met, 248 CGC→CGG/Arg→Arg
		<i>p16</i> E 1	70 A→G, 75G del, 78A del
	41	<i>ki-ras</i> E 1	CAG→GAG/Gln-Glu

对照 BEAS-2B 第 22 代细胞 *p53* 基因第 5,6,8 外显子测序结果,与 GeneBank 序列完全吻合.第 7

外显子存在两个碱基转换,分别为第 246 位密码子 C→G 颠换(ATC→ATG),编码产物蛋氨酸不变;第 248 位密码子 C→G 颠换(CGC→CGG),产物精氨酸不变. BEAS-CP 细胞第 5 代和第 34 代细胞 *p53* 基因第 7 外显子测序结果与 BEAS-2B 第 22 代细胞的序列一致.

BEAS-2B 细胞 *p16* 基因第 1 外显子序列分析结果与 GeneBank 序列一致,为野生型. BEAS-CP 第 34 代细胞 *p16* 基因第 70 位碱基 A→G 转换,第 75 位碱基 G 缺失,第 78 位 A 缺失.

BEAS-CP 细胞 *ki-ras* SSCP 电泳结果显示在正常两条单链之外存在第三条单链,SSCP 结果阳性,序列结果第 41 代细胞第 1 外显子第 25 位密码子 CAG→GAG 颠换,引起编码的谷氨酰胺为谷氨酸所替代.

3 讨论

3.1 *ki-ras* 基因突变在环磷酸腺苷诱导的细胞转化过程中的作用

ras 基因家族是最重要的癌基因家族,也是多种化学致癌物共同作用的靶基因,在多种化学致癌的肿瘤模型中发生过高频突变或激活. *ras* 基因结构简单,突变位点相对固定,因此可以通过一些基于 PCR 的快速突变分析方法检测它的变化^[3].

一般认为动物的化学致癌模型 *ras* 基因的突变是癌变过程中的早期事件,突变热点集中于第 12 和 61 位密码子,另有一些化合物也存在 *ras* 基因其他位点的突变类型.由化学致癌物诱导的小鼠皮肤癌,部分肺癌以及大鼠乳腺癌,*ras* 基因的突变可归因于基因毒致癌物的遗传毒性作用,这种突变被视为肿瘤发病过程的启动事件,但部分肺癌病例的分析也发现突变和碱基加合物的形成并不一定有明确的关系.对肺癌高度易感的 Stain A,中等易感的 B6C3F1,AC3F1,B6AF1 和低度易感的 BALB/c 小鼠肺癌模型均存在 *ras* 基因的突变,碱基改变形式颠换和转换并存^[4,5]. Hei 等^[6,7]报道由 α 粒子和青石棉诱导转化的人支气管上皮细胞(BEP-2D),均未发现 *ki-ras* 基因第 12,第 13 位密码子的突变,但实验未检测 *ras* 基因其他位点的突变情况.本实验结果显示, BEAS-CP 细胞 *ki-ras* 基因第 1 外显子 SSCP 结果从 5 代开始阳性并持续至第 38 代,41 代序列证实了 25 位密码子点突变的存在,此突变发生早,突变

部位在第1外显子之内,因而可以认为 *ki-ras* 基因是 CP 基因毒作用的重要靶基因,其突变于转化早期发生并贯穿整个转化过程. 推测因点突变而激活的 *ras* 蛋白将给细胞传递连续的有丝分裂信号,对 BEAS-CP 细胞从分化状态转变为持续增殖状态有贡献,在 CP 的致癌过程中起着重要的始动和促增殖作用.

3.2 *p16* 基因突变与 BEAS-CP 细胞的细胞周期改变

肿瘤细胞的一个显著特征是细胞的失控性生长,由 P16 蛋白-细胞周期蛋白(cyclin)D1-CDK4-RB 构成的细胞周期调节环路控制着正常的细胞周期时序. 在这个环路中细胞周期蛋白 D1 协同细胞周期素依赖激酶引起 RB 蛋白的磷酸化失活, RB 蛋白因磷酸化而释出转录因子,并通过其促进细胞增殖,参与细胞恶性转化. 已有的研究显示细胞周期调控元件蛋白及组合形式也是遗传毒致癌物作用的靶点之一^[8].

BEAS-CP 第5~38代细胞 *p16* 基因第1外显子 SSCP 结果显示,其带型和迁移率始终一致为阴性. 而第34代细胞 *p16* 基因紧邻第1外显子的非编码区存在多个位点的碱基改变,两者不一致. 推测可能是 SSCP 出现了假阴性结果,而转化细胞在第5代时就已出现 *p16* 基因的突变,而且此突变还贯穿于整个细胞转化过程,这种发生于非编码区的突变在细胞转化过程中的作用究竟如何,尚待进一步的研究来回答. 在多种肿瘤细胞株, *p16* 基因常见的突变形式是基因的纯合缺失,无义突变和 CpG 岛的甲基化. 点突变和1至数个碱基的缺失也是肿瘤细胞株可见的突变形式. 本文 *p16* 基因的突变出现于转化过程的早期,即细胞形态、染色体和细胞周期明显异常之前. 从转化进程上看 CP 引起的这种突变有可能参与了细胞周期的增殖性改变.

3.3 BEAS-2B 和 BEAS-CP 细胞的 *p53* 基因改变

BEAS-2B 细胞 *p53* 基因第7外显子发生2次碱基替换,分别为第246位密码子 ATC-ATG 颠换,248位 CGC-CGG 颠换,两者均未导致编码氨基酸的改变. Greenblatt 等^[9]报道在100株肿瘤细胞株中有4株细胞 *p19* 基因第1外显子第30位密码子存在的 CGC-CGG 的碱基替换. 因未同时测定正常细胞株的碱基序列,因而难以分辨是沉默突变抑或是基因多态性,但倾向认为是基因多态性. Okamoto 等^[10]报道9株细胞 *p16* 基因第1外显子114位密码子 GGC-

GGT 的改变是基因多态性的而非沉默突变. 本文发现的碱基改变位于密码子第3个碱基,不引起氨基酸改变并与报道的基因多态性碱基类型相同,拟认为 BEAS-2B 细胞的序列改变可能是基因多态性的表现.

需要讨论的是 BEAS-CP 第5,9,18代细胞 *p53* 基因第7外显子 SSCP 结果与序列结果的矛盾之处,即第5代细胞 SSCP 结果阳性,而测序结果没有发现突变. SSCP 这种突变分析方法的属性看,它出现假阴性的情况可能存在,而假阳性的可能性则几乎没有,据此认为,早代细胞的 *p53* 基因第7外显子存在点突变. 其后代龄的细胞 SSCP 结果呈阴性,提示可能没有突变存在. 可能的考虑是:①第5,9,18代细胞的点突变未得到序列的证实,可能与基因克隆时随机挑取的菌落系含野生型等位基因片段的重组子,所以测序结果与对照 BEAS-2B 细胞相同;②24,34,38代 BEAS-CP 细胞 SSCP 结果阴性,序列结果同 BEAS-2B 细胞,考虑经 CP 诱导转化的早代龄 BEAS-CP 细胞中存在 *p53* 突变和非突变两种细胞,经传代筛选后,未发生突变的细胞逐渐扩增成为转化细胞的主体细胞,这种细胞很可能也是转化的起源细胞^[11]. 第24,34,38代细胞 SSCP 结果阴性,序列结果也与对照细胞一致,没有突变发生. 由此推测 CP 诱导 BEAS-2B 细胞转化的主要机制不是通过 *p53* 突变的途径介导的,而有可能与其他机制破坏了细胞增殖分化的稳态平衡有关.

4 参考文献:

- [1] 袁素波,王治乔,叶常青,廖明阳. 环磷酰胺诱发永生化人支气管上皮细胞的恶性转化[J]. 中国毒理学与药理学杂志, 2001, 15(6):441-446.
- [2] 袁素波,叶常青,廖明阳,王治乔,夏英,杨梅英. 塞替派诱发人支气管上皮细胞恶性转化过程中的基因突变[J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15(4):印刷中.
- [3] Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer [J]. *Trends Genet*, 1993, 9(4):138-141.
- [4] Barbacid M. Ras oncogenes: their role in neoplasia [J]. *Eur J Clin Invest*, 1990, 20(3):225-235.
- [5] You M, Candrian U, Maronpot RR, Stoner GD, Anderson MW. Activation of the *ki-ras* protooncogene in spontaneously occurring and chemically induced lung tumors of the strain A mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(9):3070-3074.
- [6] Hei TK, Piao CQ, Willey JC, Thomas S, Hall EJ. Malig-

- nant transformation of human bronchial epithelial cells by radon-stimulated-alpha-particles[J]. *Carcinogenesis*, 1994, **15**(3):431 - 437.
- [7] Hei TK, Wu LJ, Piao CQ. Malignant transformation of immortalized human bronchial epithelial cells by asbestos fibers [J]. *Environ Health Perspect*, 1997, **105** (Suppl 5): 1085 - 1088.
- [8] Gonzales AJ, Christensen JG, Preston RJ, Goldsworthy TL, Tlsty TD. Attenuation of G1 checkpoint function by the non-genotoxic carcinogen phenobarbital [J]. *Carcinogenesis*, 1998, **19**(7):1173 - 1183.
- [9] Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the *p53* tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis[J]. *Cancer Res*, 1994, **54**(18):4855 - 4878.
- [10] Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Husain SP, Bennett WP, *et al.* Mutations and altered expression of *p16* INK4 in human cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(23):11045 - 11049.
- [11] 袁素波, 王治乔, 叶常青, 廖明阳, 曹珍山. 环磷酰胺或塞替派诱导人支气管上皮细胞恶性转化的形态计量学[J]. 中国药理与毒理学杂志, 2000, **14**(5): 346 - 351.

Gene mutation in the oncogenic transformation process of immortalized human bronchial epithelial cells induced by cyclophosphamide

YUAN Su-Bo¹, WANG Zhi-Qiao¹, YE Chang-Qing², LIAO Ming-Yang¹, XIA Ying³, YANG Mei-Ying²

(1. *Institute of Pharmacology and Toxicology*, 2. *Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*; 3. *Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of Health, Beijing 100088, China*)

Abstract: Previous paper has described the neoplastic transformation of immortalized nontumorigenic human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) induced by cyclophosphamide (CP, BEAS-CP). Oncogene and tumor suppressor gene mutations are known to associate with cell transformation. In order to investigate gene alterations of BEAS-CP cells, using the established transformation model consisted of BEAS-2B and BEAS-CP cells, analysis of *p53*, *p16* and *ki-ras* genes mutations were made. The results were revealed as follows: detection of *p16* mutation disclosed an A → G transition at the 70th nucleotide. A single G and A deletion occurred at the 75th and the 78th nucleotides of non-codon region adjacent to exon 1, respectively. Analysis of *ki-ras* gene showing a

CAG → GAG transversion at codon 25 causes a glutamine to glutamic acid exchange. These results hinted that *p16* gene mutations may play an important role in the BEAS-2B cell cycle alterations and the *ki-ras* mutation may have the transformation initiation effect. A mixed role for *p16* and *ki-ras* mutations in CP mediated carcinogenesis therefore can be confirmed.

Key words: cyclophosphamide; epithelial cells, bronchial, human; genes, *p53*; genes, *p16*; genes, *ki-ras*; gene mutation

Foundation item: The project supported by Special Laboratory Animal Foundation of Beijing Municipal Committee of Science and Technology (954024500)

(本文编辑 乔虹)