

effect on the activity of F_1F_o ; the ratio of the partition coefficients between lipid-phase and water-phase as high as 16 560: 1. So HB can be used as a ideal fluorescence quencher for the

study of conformational change of F_o moiety of membrane-bound F_1F_o complex.

Key words hypocrellin B, F_1F_o complex, F_o , fluorescence quenching, conformation

紫外辐射诱发 NIH3T3 细胞凋亡时 DNA 断裂的特性*

胡庆柳 丁振华 谭小华¹⁾ 王 红

(第一军医大学放射医学教研室, 广州 510515)

摘要 用常规琼脂糖凝胶电泳 UVB 照射后培养不同时间的 NIH3T3 细胞 DNA, 两个样本均未出现凋亡梯形带, 而用相同条件处理的昆明小鼠胸腺细胞 DNA 出现了典型的梯形带. 再用反转电场琼脂糖凝胶电泳 (FIGE) UVB 照射后培养不同时间的 NIH3T3 细胞 DNA, 发现 DNA 先断裂成低于 23 kb 的大分子片段, 然后进一步断裂成小分子片段, 但始终未出现梯形带, 说明 DNA 并不总是从核小体之间断裂的.

关键词 细胞凋亡, DNA 梯形带, 紫外辐射

学科分类号 Q523

凋亡 (apoptosis) 是与坏死 (necrosis) 不同的另一种细胞死亡方式. 在形态上表现为: 早期细胞膜、核膜、细胞器完整, 细胞质、细胞核固缩; 晚期部分胞膜包裹部分细胞质和细胞核形成凋亡小体. 在生化上通常表现为 DNA 在核小体之间断裂, 琼脂糖凝胶电泳时出现梯形带 (DNA ladder). 我们在研究紫外线所致 NIH3T3 细胞的凋亡时却发现其 DNA 电泳未出现凋亡梯形带.

1 材料和方法

1.1 材料

昆明小鼠购自本校动物所. NIH3T3 细胞由南方医院血液科馈赠. RPMI1640 由美国 GIBCO 公司生产. 新生小牛血清由广州畜牧场生产. 胰蛋白酶由德国 Serva 公司生产. 紫外线灯管 (单色光) 为上海顾村电光仪器厂产品 (功率为 15 W, UVB 波长为 320 nm). 普

通凝胶电泳仪为北京六一仪器厂产品. 反转电场凝胶电泳仪由美国 Hoefer 公司生产. CO_2 孵育箱为美国 Harris 公司生产. 琼脂糖为杭州微生物试剂厂生产.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 取昆明小鼠胸腺, 在 Hank's 液中漂洗干净, 去除其他组织, 放入消毒后的培养皿中, 用眼科剪反复剪成碎块, 加入少量完全培养基 (RPMI1640, 15% 小牛血清), 用吸管反复吹打后, 均匀点于六孔培养板. 吸掉多余的培养基, 以保证组织块不被悬浮起来. 放入 $37^\circ C$ 、5% CO_2 的孵箱中培养 12 h 后, 大部分组织块已紧密贴壁, 周围长出少量细胞. 加入适当的完全培养基继续培养, 直至细胞长满. NIH3T3 细胞的培养按常

* 国家自然科学基金资助项目 (39670192).

¹⁾ 南方医院消化科, 广州 510515.

收稿日期: 1996-11-20, 修回日期: 1997-02-28

规方法进行。

1.2.2 紫外线照射细胞及细胞的后处理: 细胞长满后吸去培养基, 每孔加入 1 ml 无酚红 Hank's 液后分别进行紫外辐射 (光源距样品垂直距离为 40 cm), 吸去 Hank's 液, 加入完全培养基。培养相应的时间后收集细胞, 细胞涂片用苏木素-伊红 (HE) 染色, 按常规方法提取 DNA。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳: a. 普通琼脂糖凝胶电泳: 琼脂糖凝胶浓度为 0.7%, 以 5 V/cm 的电压电泳 1 h, 在紫外线反射透射仪下观察、照相。b. 反转电场凝胶电泳 (field inversion gel electrophoresis, FIGE): 电压为 80 V (12 cm 电泳槽), 琼脂糖凝胶浓度为 1.5%, 电场改变时间从 0.5 s 到 10 s、前进与后退时间之比为 2:1。4℃电泳 19 h 后在紫外反射仪下照相^[1]。

2 实验结果

对 UVB 照射 10 min 后培养 24 h、36 h 的 NIH 3T3 细胞 DNA 和 UVB 照射 10 min 后培

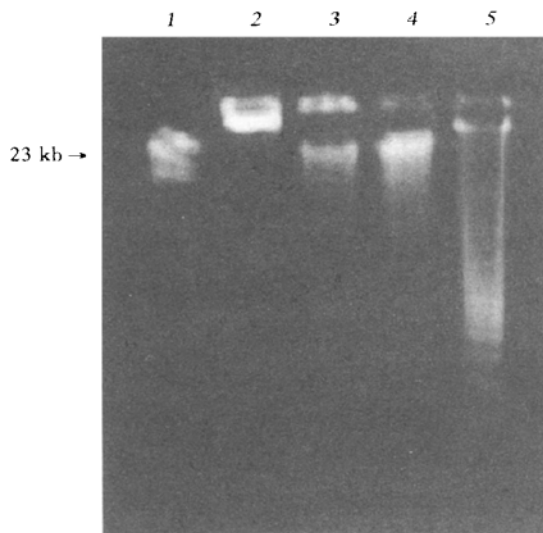


图1 普通琼脂糖凝胶电泳

1: λ Hind III; 2: 正常 NIH3T3 细胞基因组; 3: UVB 照射 10 min 后培养 24 h 的 NIH3T3 细胞 DNA; 4: UVB 照射 10 min 后培养 36 h 的 NIH3T3 细胞 DNA; 5: UVB 照射 10 min 后培养 24 h 的昆明小鼠胸腺细胞 DNA。

养 24 h 的昆明小鼠胸腺细胞 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳时, 两个样本的 NIH3T3 细胞 DNA 均未出现凋亡梯形带, 而胸腺细胞 DNA 出现典型的凋亡梯形带 (图 1)。

用反转电场凝胶电泳 (FIGE) 仪电泳 UVB 照射 10 min 后、分别培养 3 h、6 h、12 h、36 h、48 h 的 NIH3T3 细胞 DNA 和 UVB 照射 10 min 后培养 24 h 的昆明小鼠胸腺细胞 DNA 时在 NIH3T3 细胞 DNA 的几个样本中, 随着培养时间的增加, DNA 逐渐断裂成低于 23 kb 的小分子片段; 而胸腺细胞 DNA 则出现了典型的凋亡梯形带 (图 2)。

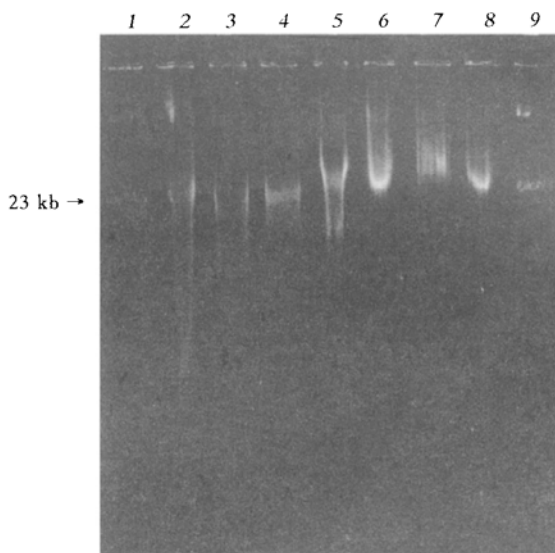


图2 反转电场凝胶电泳

1: λ + λ Hind III; 2: UVB 照射 10 min 后培养 24 h 的昆明小鼠胸腺细胞 DNA; 3: UVB 照射 10 min 后培养 48 h 的 NIH3T3 细胞 DNA; 4: UVB 照射 10 min 后培养 36 h 的 NIH3T3 细胞 DNA; 5: UVB 照射 10 min 后培养 12 h 的 NIH3T3 细胞 DNA; 6: UVB 照射 10 min 后培养 6 h 的 NIH3T3 细胞 DNA; 7: UVB 照射 10 min 后培养 3 h 的 NIH3T3 细胞 DNA; 8: 正常 NIH3T3 细胞基因组; 9: λ + λ Hind III。

UVB 照射 10 min 后培养 3 h 的 NIH3T3 细胞还没发生凋亡 (图 3); UVB 照射 10 min 后培养 12 h 的 NIH3T3 细胞中已有部分发生凋亡 (图 4, 单箭头所示); UVB 照射 10 min 后培养 24 h 的 NIH3T3 细胞大部分发生凋亡

(图 5, 单箭头所示), 还可看到凋亡小体 (图 5, 双箭头所示).

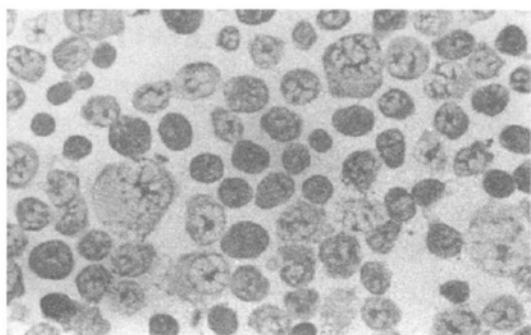


图 3 UVB 照射 10 min 后培养 3 h 的 NIH3T3 细胞形态
放大倍数: $\times 220$.



图 4 UVB 照射 10 min 后培养 12 h 的 NIH3T3 细胞形态
放大倍数: $\times 220$.

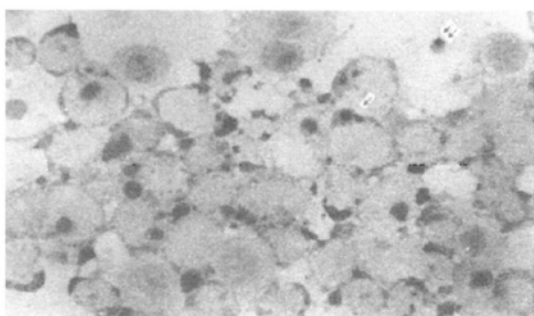


图 5 UVB 照射 10 min 后培养 24 h 的 NIH3T3 细胞形态
放大倍数: $\times 215$.

3 讨 论

NIH3T3 细胞经 UVB 照射 10 min 后培养 24 h, 大部分细胞发生凋亡, 并出现凋亡小体; 从普通电泳结果来看 DNA 已发生断裂,

但并不是从核小体间断裂 (没出现 DNA 梯形带). 而以相同的条件处理昆明小鼠胸腺细胞, 电泳出了典型的 DNA 梯形带.

经反转电场凝胶电泳和 HE 染色后可以看出, UVB 照射 10 min 后培养 3、6 h 的 NIH3T3 细胞 DNA 基本上未发生断裂, 细胞核尚未固缩; 照射后培养 12 h 的 NIH3T3 细胞 DNA 已有部分断裂成低于 23 kb 的大分子片段, 细胞核发生固缩. 随着培养时间的增加, 部分 DNA 进一步断裂成小分子片段, 但始终未出现梯形带.

以上结果表明: 在紫外辐射引起 NIH3T3 细胞发生凋亡时, DNA 是先断裂成大分子片段, 再逐渐断裂成小分子片段, 而不是通常实验中多见的核小体之间的断裂. 因此, 我们认为细胞凋亡与 DNA 梯形带的出现并不总是一致的, 不能把 DNA 梯形带作为细胞凋亡的唯一判断标志.

Roy Walker 等在研究中发现, 细胞凋亡过程中, DNA 的断裂分两个阶段进行. 第一阶段由一种内源性核酸酶把 DNA 切成大分子片段, 这一阶段足以引起染色质固缩. 第二阶段由依赖于 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的内源性核酸酶将 DNA 进一步降解成小分子质量的核小体片段. 因此, 凋亡细胞的 DNA 不一定断裂成核小体片段, DNA 电泳不一定出现梯形带^[2]. Zaker 等^[3]认为, 内源性核酸酶的激活既不是凋亡早期阶段的触发步骤, 也不是必要的和必需步骤.

Nicotera 等^[4]在研究人胸腺细胞的凋亡时发现, 依赖于 Ca^{2+} 的内源性核酸酶的活性也为大分子 DNA 片段形成所必需. 他们推测, 细胞内 Ca^{2+} 浓度的增高有促进染色质变化和激活依赖于 Ca^{2+} 的核酸酶的双重作用.

总之, 细胞凋亡的诱发存在多条途径, 是一个多步骤的过程^[5], 不能把 DNA 梯形带作为细胞凋亡的唯一标志, 而应与细胞凋亡的其他特征指标结合起来, 准确地判断细胞是否发生了凋亡.

参 考 文 献

- 1 Oberhammer F, Wilson J W, Dive C *et al.* Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J*, 1993, **12** (9): 3679~ 3684
- 2 Roy Walker P, Weaver V M, Lach B *et al.* Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res*, 1994, **213** (1): 100~ 106
- 3 Zakeri Z F, Qniela D, Latham T *et al.* Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB*, 1993, **7** (5): 470~ 478
- 4 Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Cal*, 1994, **16** (4): 279~ 288
- 5 Eileen White. Death-defying acts: a meeting review on apoptosis. *Genes Dev*, 1993, **7** (12A): 2277~ 2284

The Characteristics of DNA Cleavage of Apoptotic NIH3T3 Cells Induced by Ultraviolet Irradiation. HU Qing-liu, DING Zhen-hua, TAN Xiao-hua¹⁾, WANG Hong (*Department of*

Radiation Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;
¹⁾ *Department of Epidemiology, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China*).

Abstract When conventional gel electrophoresis was used, it was found that DNA of NIH3T3 cells cultured for different time after UVB irradiation had no DNA ladders, but thymocytes of Kunming mouse processed by the same method had DNA ladder. The results of field inversion electrophoresis showed that after UVB irradiation, the DNA of NIH3T3 cleaved into high molecular weight fragments at first, and then into low molecular weight fragments, still without the appearance of DNA ladders. It is suggested that DNA cleavage of apoptotic cell is not always initiate at internucleosome.

Key words apoptosis, DNA ladder, ultraviolet irradiation

MK 表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达

薛泳涛 黄文晋 石 斌 陈镔复 鞠 躬

(第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032)

摘要 MK 是属于肝素结合因子家族的一种多肽, 仅在胚胎中期和成年期肾脏表达, 在某些肿瘤细胞中也有异常表达. MK 能够促进细胞特别是神经细胞的生长和分化, 并抑制某些肿瘤细胞的生长. 通过 RT-PCR 从胚胎肾脏中获得了 MK 成熟肽 DNA 编码序列, 克隆入载体 pBV221 中, 并转入大肠杆菌, 建立了重组 MK 的高表达菌株.

关键词 Midkine (MK), 基因, 克隆, 表达

学科分类号 Q78

Midkine (MK) 是一种对细胞的生长和分化起重要作用的细胞因子, 1988 年由 Kadamatsu 等^[1]发现, 是属于肝素结合因子的一种多肽. 其基因表达见于胚胎中期多种组织及成年期肾脏. MK 含有 118 个氨基酸, 富含半胱

氨酸和碱性氨基酸. 具有高度的稳定性和严格的三维结构. 其前体含有 23 个氨基酸的信号肽序列. 人 MK 和小鼠 MK 基因同源性达 87%^[2].

收稿日期: 1996-12-25, 修回日期: 1997-03-17