

- Berlin, Springer, 1980.
- [7] Takashi, Ito.: *Photochemical and Photobiological Reviews*, 7, 141 (Ed. by Smith, K. C.), Plenum Press, New York and London, 1983.
- [8] Reddi, e. et al.: *Int. J. Rept. Protein Res.*, 18, 408, 1981.

- [9] Jori, G. et. al.: *Tomori*, 65, 425, 1979
- [10] Sery, T. W.: *Cancer Res.*, 39, 96, 1976.
- [11] Jori, G. et al.: *Lasers in Photomedicine and Photobiology*, 49, 1979 (Ed. by pratesi, R. et al.), Berlin, Springer, 1980.

[本文于 1984 年 6 月 5 日收到]

γ 射线对大鼠脾细胞核体外转录活性的影响

周建新 易禄康

(第三军医大学生物化学教研室,重庆)

细胞核体外转录模型比较接近于体内的生理状态,既能保持转录的忠实性,又便于人为精细地控制实验条件^[1,2],是研究电离辐射影响真核细胞转录过程的较理想的方法。以前有关的工作主要见于以胸腺为实验材料^[3,4]。脾脏也是辐射敏感的淋巴组织,研究其辐射损伤早期细胞转录过程的变化,可为辐射引起淋巴细胞损伤死亡、放射病的发病机理,以及辐射遗传效应等研究提供有意义的资料。

我们选用大鼠脾细胞核为材料,择其转录活性的最适条件,建立了体外转录的模型,了解亚致死剂量 γ-射线全身照射后早期转录活性的变化及特点。

一、材料和方法

1. 材料

健康雄性大白鼠,杂种,体重 180—220 克。

试剂: ³H-UTP (18 居里/毫克分子) 系中国科学院上海原子核研究所产品。GTP、CTP、ATP、UTP、甲苯磺酰氟 (PMSF) (上海东风生化试剂厂),放线菌素 D (上海第八制药厂),鹅膏蕈碱 (α-Amanitin) 西德 Boehringer 公司产。

2. 方法

(1) 细胞核的制备 采用 Ueno 等人^[6]的方法并加以改进。将大鼠断头处死,迅速取出脾脏(以下操作在 0—4℃ 进行),置冰冷的磷酸缓冲液 (0.15M, pH7.4) 中,纵向剪开,用镊

子挤压,使脾细胞释出,每组收集 4 只大鼠的脾细胞悬液,经 200 目的尼龙布过滤。滤液经 800 × g 离心 5 分钟,弃去上清,将沉淀的细胞按 1:10(V/V) 悬于低渗液 (1mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM NaCl, 6mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 5mM β-巯基乙醇) 中,置冰浴 5 分钟,使细胞肿胀后,用带有 Teflon 杆的玻璃匀浆器温和地匀浆数次,加入适量的 A 溶液 (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.33M 蔗糖, 3mM Mg (CH₃COO)₂, 2mM CaCl₂, 5mM β-巯基乙醇, 0.025% (V/V) Triton X-100, 0.1mM PMSF) 以提高匀浆液的渗透压接近等渗。混匀后迅速将匀浆液 800 × g 离心 5 分钟,弃去上清,将白色核沉淀以 1:10 (V/V) 重新悬于 A 溶液中,用同一匀浆器匀浆数次,所得的匀浆液以每 6ml 铺于 10ml B 溶液 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 2M 蔗糖, 5mM Mg (CH₃COO)₂, 5mM β-巯基乙醇) 垫上,于 4℃, 29000 × g 离心 1 小时,弃去上清,将沉淀的细胞核悬于 C 溶液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 25% (V/V) 甘油, 2mM Mg (CH₃COO)₂, 12mM β-巯基乙醇) 中,调整细胞核浓度约为 2mg DNA/ml,分装后 -20℃ 或液氮保存。核 DNA 测定参考 Burton^[7]方法进行。

(2) RNA 聚合酶活性的测定 参考 Dauphinais^[8]方法, 100μl 反应体积中含: 75mM Tris-HCl, pH8.0, 12.5% (V/V) 甘油, 12mM β-巯基乙醇, ATP、GTP、CTP 各 0.5mM, 0.02 mM UTP, 2μCi ³H-UTP, 200mM (NH₄)₂SO₄,

1mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 3mM MnCl_2 , 50 μl 核悬液。(为区别 α -Amanitin 敏感和不敏感的酶活性,加 α -Amanitin 至 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后,置 0 $^\circ\text{C}$ 30 分钟后升温反应),于 25 $^\circ\text{C}$ 水浴振荡保温 1 小时。反应完毕,加入 2ml 冰冷的 20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -10%TCA 终止反应,0 $^\circ\text{C}$ 放置 15 分钟后,1500 $\times g$ 离心 12 分钟收集沉淀,每次用 2ml 20mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -10%TCA 洗涤三次。每份沉淀加 0.1 ml 60% HClO_4 , 0.2ml 34% H_2O_2 , 70 $^\circ\text{C}$ 密封保温 2 小时,使成透明无色的液体,置闪烁瓶中,加 10ml 37.5% 乙二醇乙醚-0.375% PPO 甲苯闪烁液,用液体闪烁计数器计数^[9]。酶活性用 cpm/mgDNA (核)表示, RNA 聚合酶总活性指不加 α -Amanitin 反应后测得的活性。 α -Amanitin 不敏感的 (RNA 聚合酶 I) 酶活性指加至 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -Amanitin 反应后所测得的活性,因 RNA 聚合酶 III 的活性极低,忽略不计。 α -Amanitin 敏感的 (RNA 聚合酶 II) 酶活性即总活性减去 α -Amanitin 不敏感的酶活性^[8]。

(3) 动物照射条件及分组 室温下将大鼠置特制的有机玻璃盒内直立,距放射源 80 厘米,剂量率 137.8rad/分钟,连续照 5 分 43 秒,总剂量 800rad。照前动物正常饮食,照后禁食,给水。

实验采用随机区组设计。大鼠按照后不同时间共分 5 组: (1)未照射, (2)照后 10 分钟, (3)照后 4 小时, (4)照后 2 小时, (5)照后 4 小时,每组 4 支,在照射后指定的时间处死,用上述方法(1)分离脾细胞核,测定转录活性。整个实验重复一次,数据用 F 检验处理。

二、结 果

1. RNA 聚合酶活性测定条件及转录的 特异性

测定结果表明, 0—60 分钟内 RNA 聚合酶总活性、RNA 聚合酶 I 和 II 的活性与反应时间有良好的线性关系 (图 1), 与一定范围内的细胞核浓度也有良好的线性关系。 α -Amanitin、放线菌素 D 均对核体外转录活性有显著的抑制作用。当反应系统中缺少 CTP 时, 标记

前体的掺入极少 (表 1, 图 2)。

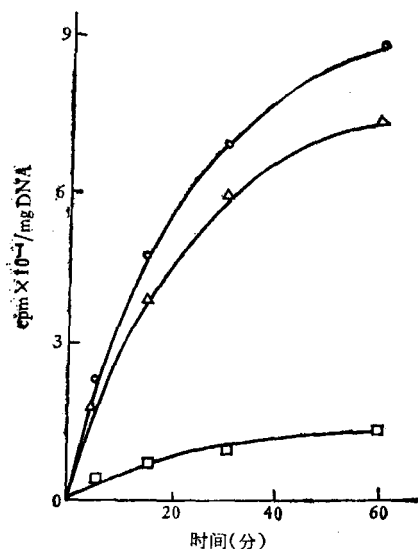


图 1 25 $^\circ\text{C}$ 时 RNA 聚合酶活性与反应时间的关系

○—○ RNA 聚合酶总活性
△—△ α -Amanitin 敏感的酶活性
□—□ α -Amanitin 不敏感的酶活性

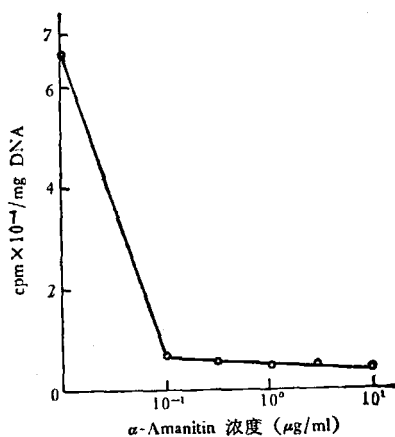


图 2 α -Amanitin 对转录的抑制作用

表 1 几种情况下的转录活性

反应条件	活力%
60 分钟	100
+ α -Amanitin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	11.5
+ Actinomycin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	26.5
-CTP	2.3

2. 电离辐射的影响

(1) 转录活性 照射后不同时间分离的脾细胞核的转录活性如图 3。

图 3 表明, 照后的各组的 RNA 聚合酶总

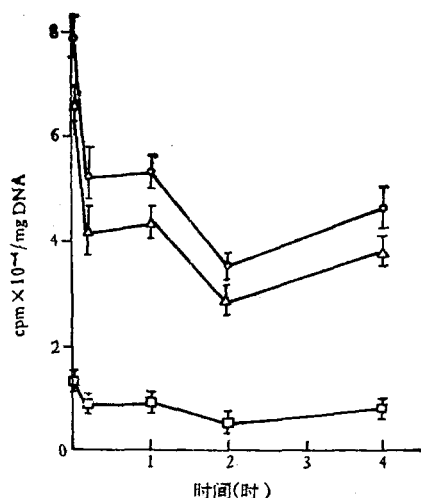


图3 全身照射后不同时间大鼠脾细胞核的 RNA 聚合酶活性

○—○ RNA 聚合酶总活性； △—△ α -Amanitin 敏感的酶活性； □—□ α -Amanitin 不敏感的酶活性。

活性、对 α -Amanitin 敏感和对 α -Amanitin 不敏感的酶活性，三者的变化与对照组比较均差异非常显著，这三种酶活性均与照射后的时间呈负相关。此外，照后 2 小时组与照后 4 小时及 1 小时组比较差异显著 ($p < 0.05$)。

(2) 反应时间与 ^3H -UTP 掺入量之间的关系 取分别保温 0, 5, 15, 30 和 60 分钟测得的

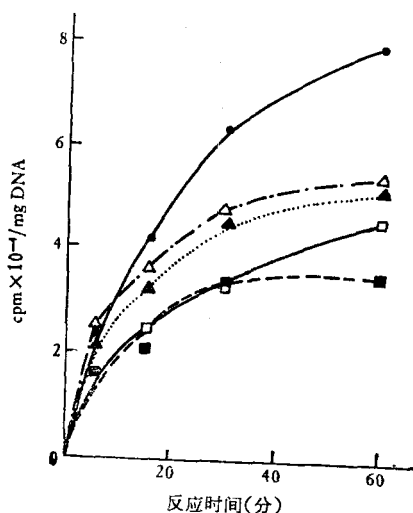


图4 电离辐射对 RNA 聚合酶总活性与反应时间相关的影响

●—● 未照射； ▲—▲ 照后 10 分钟， △—△ 照后 1 小时 ■—■ 照后 2 小时， □—□ 照后 4 小时

^3H -UTP 掺入量做统计处理，结果只有对照组和照后 4 小时组相关显著 (图 4)。

(3) 由表 2 可以看出，照射后对 α -Amanitin 敏感及对 α -Amanitin 不敏感的酶活性在 RNA 聚合酶总活性中的比值没有变化。

表2 照射后 α -Amanitin 敏感和不敏感酶活性的相对变化

	照射后时间				
	未照射	10 分	1 小时	2 小时	4 小时
1 RNA 聚合酶总活性(%)	100	100	100	100	100
2 α -Amanitin 敏感的酶活性(%)	83.2	82.2	82.5	82.3	82.1
3 α -Amanitin 不敏感的酶活性(%)	16.8	17.8	17.5	17.7	17.9
(2)/(3)	5.0	4.6	4.7	4.6	4.6

三、讨 论

1. 体外转录模型的建立

脾脏主要是淋巴细胞，因其体积小，胞浆少，机械匀浆难以除去细胞膜，过度的匀浆又易损伤核结构，降低核产率。我们采用低渗、匀浆与低浓度去垢剂相结合的方法，分离的细胞核在荧光显微镜或普通光学显微镜下观察，形态正常，有较高的转录活性和稳定性，产率一般在 30% 以上。

用我们选定的最适反应条件所建立的体外核转录模型，其 RNA 聚合酶总活性中的 83% 是 RNA 聚合酶 II 活性。 Mn^{++} 和高浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (200mM) 对转录活性有显著的促进作用。而放线菌素 D 和 α -Amanitin 对转录活性有显著的抑制作用，当缺少 CTP 底物时，转录活性极低 (图 2, 表 1)，这说明这一模型反映的是 DNA 依赖的 RNA 聚合酶活性，可用于转录研究。

2. γ 射线—照射对细胞核体外转录的影响 patil 等曾测定 1000rad X-线全身照射后大鼠胸腺细胞核的体外转录活性，结果表明照后 4 小时和 18 小时均受到抑制，且被抑制的程度接近。但最近有人报道胸腺细胞离体照射后，其 DNA 依赖的 RNA 聚合酶 I 活性没有变化，酶 II 的活性照后 25 分钟出现刺激性升

高^[4], 这表明在体和离体照射产生的效应不同, RNA 聚合酶 I 和 II 对电离辐射的敏感性可能有差异。

一般认为, 辐射引起 RNA 代谢改变, 出现在照后 1—3 小时^[12]。我们的实验, 三种酶活性, 均随着照射后时间的延长而抑制加深, 照后 2 小时可见到最大的抑制效应。而且, 照射后早期 (10 分钟) 即出现这种抑制效应, 过去未见这样的报道, 因此是研究淋巴细胞间期死亡的原因时值得注意的线索。

本实验照后 10 分钟、1 小时和 2 小时分离的细胞核, 转录活性均低于对照组, 在反应初期有明显的活性突发性升高, 且 0—60 分钟内的反应时间与 ³H-UTP 的掺入失去线性关系 (图 4)。这种现象类似于提高反应温度对转录活性的影响^[13], 这可能是因为电离辐射损伤了核结构, 因而降低了转录的稳定性。照后 4 小时的细胞核, 虽然转录活性较对照组也显著降低, 但是高于照后 2 小时组, 而且反应初期无明显的突发性升高, 因而 0—60 分钟的反应时间与标记前体的掺入呈线性关系。这可能反映了这些核结构没有或很少受到损伤, 或者损伤后已恢复了细胞活性。综上所述, 我们推测照后 4 小时, 由于辐射敏感细胞的损伤和死亡, 以及细胞核分离时人为地破坏了一些受损伤细胞, 致使最终具有转录活性的细胞核中, 辐射不敏

感的比例增加, 因而此时较多地表现出对辐射不敏感细胞的转录活性。而在之前较多地反映受损的辐射敏感细胞的转录活性。

受方法的限制, 全身照射后的组织匀浆处理难以分辨辐射敏感和不敏感细胞的生化改变。根据我们的经验, 如果选择照后 4 小时内的细胞核, 研究辐射对转录的影响, 是可以反映受损伤的辐射敏感细胞的情况。

参 考 文 献

- [1] Orkin, S. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 2475, 1977.
- [2] Robert, H. G. et al.: *Biochemistry*, **18**, 4923, 1979.
- [3] Patil, M. S. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **27**, 363, 1975.
- [4] Zhivotovsky, B. O. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **42**, 199, 1982.
- [5] 山村雄一·森沢成司编, 时常仁等译: 《免疫应答》, 191, 1981.
- [6] Ueno, K. et al.: *Biochemistry*, **20**, 634, 1981.
- [7] Burton, K. A. A.: *Biochem. J.*, **63**, 315, 1956.
- [8] Dauphinais, C.: *Eur. J. Biochem.*, **114**, 487, 1981.
- [9] 中国医学科学院第七研究室: 《同位素技术及其在生物医学中的应用》, 31, 1977.
- [10] Klovwen, H. M.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **42**, 366, 1960.
- [11] Agarwal, S. S.: *Cancer Res.*, **41**, 3973, 1981.
- [12] Altman, K. I. et al.: *Radiat. Biochem.*, Vol II, 49, 1970.
- [13] Ernest, M. J. et al.: *Biochemistry*, **15**, 824, 1976.

[本文于 1984 年 5 月收到]

微波辐射对小白鼠的生物效应研究

I. 血液淋巴细胞中 cAMP 水平的变化

吴同乐

(中国科学院生物物理所, 北京)

近年来, 微波技术已广泛应用于工农业生产和国防、医学、科研等方面, 并已普及到民用。因此, 有关微波辐射对人类健康的影响以及生物学效应已成为亟待解决的课题。

鉴于环磷酸腺苷 (cAMP) 是作为第二信使, 调节

着体内的生化过程和生理功能, 因而受到广泛的重视^[1-3]。本文从观察微波辐射引起小白鼠血液淋巴细胞中 cAMP 水平的变化入手, 为研究微波辐射作用机理提供资料。