

示着额叶在颜色信息处理中起着重要作用。

关于颞抗色

Hering 就颜色信息在视觉系统中的传递和处理提出了“四色颞抗”的色觉理论。但近年的资料表明,在视网膜上只存在对红、绿、蓝敏感的三种锥体细胞,在视觉通路各级水平上也只存在对红、绿、蓝敏感的细胞,它们的相互作用是颞抗的。我们诱发电位的研究也支持这一点。

本工作承蒙梅磊教授指导,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Shipley, T. et al.: *Science*, **150**, 1162, 1965.
- [2] Shipley, T. et al.: *Vision Res.*, **8**, 409, 1968.
- [3] Cignek, L. et al.: *Acta physiol. Scand.*, **76**, 82, 1969.
- [4] Yamanaka, T. et al.: *Vision Res.*, **13**, 1319, 1973.
- [5] 张香桐:《生理科学进展》, **2**, 124, 1958.

[本文于 1984 年 7 月 25 日收到]

多-ADP-核糖基化和 DNA 切除修复的关系

陈鸿书 彭家和 李蓉芬 苏礼民

(第三军医大学生化教研室,重庆)

早在三十年前就发现某些化学物质或电离辐射造成 DNA 损伤时,细胞内 NAD^+ 含量减少。现在证明, NAD^+ 除作为脱氢酶的辅酶外,还作为多-ADP-核糖合成酶的底物,用以合成多-ADP-核糖,从而修饰核蛋白发挥生物效应,如参与 DNA 的复制及修复等^[1,2]。多-ADP-核糖合成酶的活性是 DNA 依赖的,而且和 DNA 链上的切口数有关^[3,4],但多-ADP-核糖基化和 DNA 修复过程中的哪些反应步骤有关,目前尚无定论。

本文以人淋巴细胞为材料,紫外线(UV)照射造成 DNA 损伤,研究多-ADP-核糖基化和 DNA 切除修复的关系。

材 料 和 方 法

1. 淋巴细胞的培养及 UV 照射:

正常成人的静脉血以肝素抗凝,于 37℃ 直立静置 1—2 小时,待红细胞沉降后吸取富含白细胞的血浆层,移入另一试管中混匀备用。每培养瓶加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 3ml, PHA 适量,青霉素及链霉素各 100u/ml 及细胞悬液 1×10^6 个/ml,置 37℃ 孵箱中培养。把需要照射的细胞离心除去上清液,仅剩 0.1 ml 培养液,转入直径为 2.5 cm 的广口玻

璃杯内,用波长为 253.7 nm 的 8W 消毒紫外灯距样品 40 cm 处进行照射。光照射的强度用草酸铁钾化学法测定。

2. NAD^+ 的测定:

(1) 细胞内 NAD^+ 的提取:按 Korp 等^[4]的方法略加改良。细胞用 0.9% NaCl 溶液洗一次,加 70% 乙醇(内含 0.01 M pH 7.0 磷酸钾缓冲液) 2 ml,混匀置冰水浴中。用 UR-200 P 型(20 kHz),ToMy 超声波发生器以 60 W 破碎细胞 30 秒钟,室温振荡 20 分钟后,于 4℃, $3000 \times g$ 离心 20 分钟。吸出全部上清液于刻度离心管中,置 80℃ 水浴用氮气吹至 0.6 ml。

(2) NAD^+ 的测定 参照 Nisselbaum 微量法的原理^[5],用本室建立的方法测定。反应混合物包含氯化硝基四氮唑蓝水溶液(2.5 mg/ml) 0.2 ml, 吩嗪硫酸甲酯水溶液(1mg/ml) 0.8 ml, 乳酸脱氢酶溶液(5 mg/ml) 0.1ml 及磷酸钠缓冲液(0.1 M, pH 7.4, 内含 0.5 M 乳酸钠及 0.02% Brij-35) 1.8ml。上述操作均在 10℃ 以下进行。将反应混合物置 37℃ 温育 10 分钟后转入冰水浴中。分别在测定管中加细胞提取液 0.2 ml,标准管中加 NAD^+ 标准 0.2 ml,空白管中加 pH 7.0 磷酸钾缓冲液 0.2 ml,摇匀后置 37℃ 保温 15 分钟,取出加 2M HCl 0.1 ml 终止反应。于

560 nm 波长以空白调零,用日制岛津分光光度计进行比色测定。

3. DNA 期外合成的测定:

细胞预先经适量 PHA 刺激 72 小时后,在培养液中加入羟基脲,终浓度为 10 mM.培养 30 分钟将培养液吸出,以 UV 照射细胞。未照射细胞为对照组。每瓶加 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 8 μCi ,培养 3 小时后分别将每瓶细胞悬液转入离心管中,离心除去上清液。沉淀的细胞团粒分别以生理盐水洗二次及 5% 三氯醋酸洗一次,以洗净细胞外的 ^3H 放射性。沉淀加 5% 三氯醋酸 1 ml,置 90°C 水浴保温 15 分钟,经常以玻棒搅动,离心后吸取上清液 0.2 ml 置于 5 ml 闪烁液中,置暗处过夜后用 FJ-353 型双道液体闪烁计数器计数。将样品的 cpm 减去对照的 cpm 即为 UV 诱导的 DNA 期外合成。闪烁液为 0.4% PPO, 0.06% POPOP 及 11% 萘的二氧六环溶液。

4. 类核的蔗糖密度梯度离心:

淋巴细胞以适量 PHA 刺激 42—66 小时,加 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 培养 6 小时;换为不含 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 的培养液。根据实验目的对细胞作各种处理,然后将细胞转入离心管中,以 500 rpm 离心 5 分钟,除去上清液。以 Dulbecco 磷酸盐缓冲液洗细胞一次,制成 $3\text{--}5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液。按 Lavin 等^[6]的方法进行类核蔗糖密度梯度离心:吸取 300 μl 溶胞液 (2 M NaCl, 0.01 M EDTA 及 0.5% Triton X-100, pH 8.0), 仔细加到 12 ml 10—30% 蔗糖密度梯度液 (1.95 M NaCl, 0.01 M Tris 及 0.001 M EDTA, pH 8.0) 的液面上,加 100 μl 细胞悬液 (含 $3\text{--}5 \times 10^5$ 个白细胞) 到溶胞液中,静置 15 分钟后用 MSE-75 超速离心机,荡平式转头 CatNo 43127-111,在 12°C, 35000 rpm 离心 35 分钟。将不锈钢细管插入离心管底,用蠕动泵将梯度液抽吸到玻砂滤器上的 49 型玻璃纤维滤纸上,每滤纸片的直径为 2.5 cm 接收 24 滴 (约 0.63 ml)。依次用生理盐水, 5% 三氯醋酸 5 ml 及无水乙醇 3 ml 各洗滤纸片一次。滤纸片置 60—70°C 烘箱烘干 15 分钟。冷却后放入含 0.4% PPO,

0.01% POPOP 的甲苯闪烁液 5 ml 中进行放射性计数。

结果及讨论

经 PHA 刺激 72 小时的淋巴细胞接受不同剂量 UV 照射后,结果如图 1 所示。随 UV 的剂量增大 DNA 期外合成逐渐加强,当 UV 的剂量为 $30 \text{ J}/\text{m}^2$ 时, DNA 期外合成达最大。本文实验均用这一照射剂量。

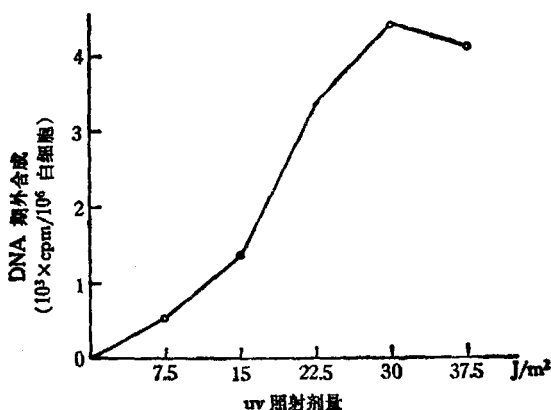


图 1 UV 照射剂量和 DNA 期外合成的关系

据 Riklis 等报道^[7], DNA 损伤的类型和 UV 的波长有关,波长大于 365 nm 主要引起 DNA 链断裂,小于 254 nm 主要引起嘧啶二聚体 (PP) 形成,本工作用 254 nm UV 照射细胞。

1. UV 照射对淋巴细胞内 NAD^+ 含量的影响:

淋巴细胞经 PHA 刺激 72 小时后分为三组,对照组和实验一组及实验二组。实验二组的细胞在 UV 照射后,在含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 嘌呤霉素培养液中培养。结果如表 2 所示,对照组细胞的 NAD^+ 含量平均为 37 ng/ 10^6 白细胞,实验一组平均为 21 ng/ 10^6 白细胞,二者有显著差异 ($P < 0.01$),平均减少 43.1%,此结果与文献报道类似。由于 NAD^+ 在真核细胞内除作为脱氢酶的辅酶外,又是多-ADP-核糖合成酶的底物,因此,上述结果提示多-ADP-核糖基化和 PP 的切除修复有关。表 2 结果还证明细胞经 UV 照射后以嘌呤霉素进行培养,并不影响 UV

表 1 UV 照射对细胞内 NAD⁺ 含量的影响

组 别	处理 方 式		NAD ⁺ 含 量 (ng/10 ⁶ 白细胞)	显 著 性	NAD ⁺ 减少程度 (%)
	UV 照射 (J/m ²)	嘌呤霉素 (μg/ml)			
对照组(5)	(-)	(-)	37±6.96		
实验一(4)	30	(-)	21±1.63	P<0.01	43.2
实验二(5)	30	10	19±1.92	P<0.01	48.6

注: 1) 组别一项中, 括号内的数字为样品数

2) 显著性, 是指实验组与对照组相比较的结果

引起细胞内 NAD⁺ 减少的作用。这说明 DNA 损伤时多-ADP-核糖合成酶的活性升高, 是激活酶的活性, 而不是诱导酶的合成。

2. 茶碱对 DNA 期外合成的影响:

将细胞分成四组培养, 除对照组外, 其余各组在 UV 照射前 30 分钟及照射后的保温期间, 以不同浓度茶碱培养细胞, 结果说明, 茶碱对 DNA 期外合成的抑制作用与浓度有关(图 2)。未被茶碱处理的细胞, 在 UV 照射后 3 小时, DNA 期外合成掺入的 [³H]-TdR 为 2856 cpm/10⁶ 白细胞。被 8 mM 茶碱处理的细胞, 则为 101 cpm/10⁶ 白细胞有明显减低 (P < 0.01)。这说明多-ADP-核糖基化和 DNA 期外合成有关, 而且是参与 DNA 上切口封合以前的过程。

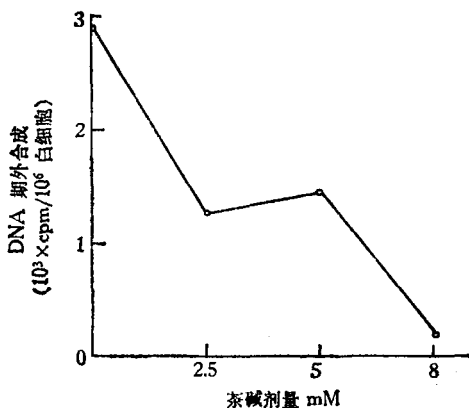


图 2 茶碱对 DNA 期外合成的影响

3. UV 照射及茶碱对类核沉降的影响:

近年提出的类核沉降技术, 为研究 DNA 损伤时拓扑结构的改变及断链 DNA 修复提供简便的方法^[8]。Mattern 等^[9]证明, DNA 切除修复途径是起始于超螺旋的松解, 完成于超螺旋的

恢复; 超螺旋的松解受拓扑异构酶 II 的抑制剂 (萘啶酮酸) 所抑制。本文的实验结果如表 2 所示。淋巴细胞被 UV 照射后 30 分钟, 类核在中性蔗糖密度梯度液中的沉降速率明显减慢 (P < 0.01), 其沉降距离仅为正常类核的 67%, 以后随培养时间加长, 类核的沉降速率逐渐加快; 到照射后 3 小时, 其沉降距离已恢复到正常类核的 84%。这说明 UV 照射后 30 分钟引起 DNA 超螺旋松解, 以致类核的沉降速率明显减慢, 以后随 DNA 的损伤部位被修复, 恢复成原来的超螺旋结构, 因而类核的沉降速率又逐渐加快, 这和 Mattern 等^[9]的结果相似。

表 2 茶碱及 UV 照射对类核在蔗糖密度梯度液中沉降的影响

UV 照射 后培养时 间(分钟)	沉 降 距 离 (cm)		
	对照组 (未 经 UV 照射)	实验一 (UV 30J/m ²)	实验二 (UV 30 J/m ² + 茶碱 10mM)
0	8±1(27)		
30		5.4±2(13)*	8.1±1.3(12)
60		6.3±1.5(16)*	7.3±1.4(12)
120		7±1.3(7)*	7.4±1.2(14)
180		6.7±1.2(12)*	6.1±1.4(14)*

注: 1) 括号内的数字为样品数

2) * 表示和对照组的沉降距离相比有显著差异 (P < 0.01)

若在 UV 照射前 1 小时及照射后用茶碱培养细胞, 则类核的沉降速率推迟到照射后 3 小时才明显减低。Mattern 等的结果表明, 拓扑异构酶 II 的抑制剂 (萘啶酮酸) 的作用是持续地抑制类核沉降。因此, 上述结果提示多-ADP-核糖基化被茶碱抑制时, 不是直接影响拓扑异构酶 II, 可能是抑制超螺旋松解前某一过程的启动, 从而推迟 DNA 超螺旋的松解。

已知 DNA 链断裂时超螺旋松解, UV 引起 PP 形成时, PP 被切除即可在 DNA 链上形成空隙及切口, 进而引起拓扑结构的改变。若对 PP 的识别和切除受阻碍, 则会推迟超螺旋的松解。Poirier 报道^[10], 当染色质发生多-ADP-核糖基化时, 即从紧密的锯齿状结构转变为松散的串珠状结构, 组蛋白 H₁ 是多-ADP-核糖基化的主要部位。可以设想, 染色质从紧密结构

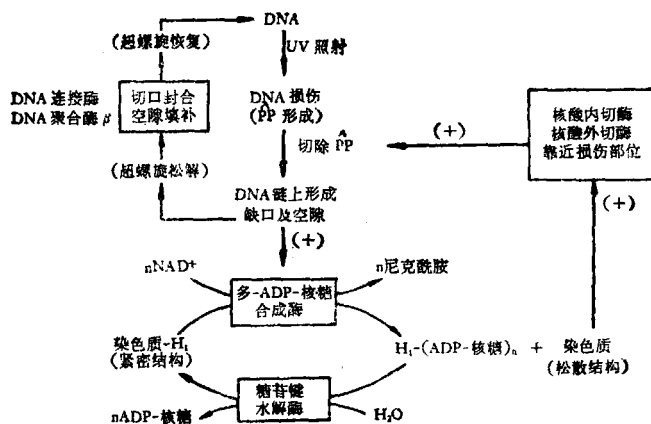


图 3 多-ADP-核糖基化和 DNA 切除修复的关系
(+): 促进或激活 H₁: 组蛋白 H₁ PP: 嘧啶二聚体

转变为松散结构时,将使 DNA 上的损伤部位进一步暴露,必然有利于核酸内切酶及核酸外切酶识别和切除损伤部位,因此,上述结果可能是茶碱抑制染色质的多-ADP-核糖基化,使染色质的松解过程受到抑制,影响 PP 的切除,因而推迟 DNA 超螺旋的松解。

综上所述,多-ADP-核糖基化和 DNA 上 PP 切除修复的关系可初步设想如图 3,即 UV 引起 DNA 损伤时,首先对暴露于外容易靠近修复酶的损伤部位进行切除修复。在 DNA 链上形成的空隙及切口引起多-ADP-核糖合成酶活性升高,于是使染色质蛋白(主要是组蛋白 H₁)发生多-ADP-核糖基化,使结构紧密的染色质松解。松解有利于 DNA 修复酶靠近损伤部位,从而促进 DNA 的修复过程。

参 考 文 献

- [1] Purnell, M. R. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 215, 1980.
- [2] Durkacz, B. W. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **121**, 65, 1981.
- [3] Halldorsson, H. et al.: *FEBS Letters*, **85**, 349, 1978.
- [4] Korp, M. T. et al.: *Anal. Biochem.*, **128**, 175, 1983.
- [5] Nisselbaum, J. S. et al.: *Anal. Biochem.*, **27**, 212, 1969.
- [6] Lavin, N. F. et al.: *J. Cell Sci.*, **48**, 283, 1981.
- [7] Rikilis, E.: in *Lymphocyte stimulation* (Amleto Castellani eds), pp. 131, Pleum press, New York and London 1980.
- [8] Cook, P. R. et al.: *Nature*, **263**, 679, 1976.
- [9] Mattern, M. R. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **697**, 6, 1982.
- [10] Pointer, G. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3423, 1982.

[本文于 1984 年 9 月 19 日收到]

L615 白血病小鼠肝、脾中 cAMP 依赖的蛋白激酶活力变化

凌义和 胥彬

(中国科学院上海药物研究所,上海)

cAMP 不仅参与细胞的多 种代谢调节过程,而且还和细胞的增殖、分化有关。cAMP 要发挥其生理效应,需通过 cAMP 依赖的蛋白激

酶才能实现^[1,2]。有报道认为肿瘤细胞的恶性行为可能和其细胞内 cAMP 水平下降有关。另有人认为肿瘤细胞内 cAMP 下降不是主要原