

微凝胶电泳法检测照射后单个凋落胸腺细胞的 DNA 变化

耿勇志

(苏州医学院医学放射生物学教研室, 苏州 215007)

大山ハルミ 山田武

(日本放射线医学综合研究所, 千叶)

提 要

胸腺细胞受照后发生凋落——一种与坏死不同的主动性细胞死亡。为了检测单个凋落细胞的 DNA 变化, 我们建立了微凝胶电泳法。受照的大鼠胸腺细胞培养后用本法进行电泳, 结果可见细胞被分为二群, 一群细胞的 DNA 几乎没有泳动, 另一群细胞的 DNA 则泳动成大小相似的水滴或慧星形状。DNA 泳动细胞的比例与细胞死亡的比例一致。实验说明凋落细胞的 DNA 分解十分迅速, 一旦开始就很快达到一定程度。

关键词 凋落, 胸腺细胞, DNA 分解, 微凝胶电泳, 照射

近年来细胞死亡被分为坏死 (necrosis) 和凋落 (apoptosis) 二类^[1,2]。坏死是由各种病理性因素引起的被动性细胞死亡, 常累及组织中的大片细胞。凋落也称为程序性细胞死亡 (programmed cell death), 多为生理性细胞死亡, 可由生理性及病理性因素引起, 组织中散在发生。凋落可发生在胚胎发育、肿瘤生长、激素依赖性萎缩、电离辐射等情况下, 是一种主动的自杀现象, 与细胞分裂增殖一起, 共同对组织的大小与形状起着调节作用^[1-3]。凋落过程中一个特征性的生化改变是染色质 DNA 分解成以核小体 (nucleosome) 为单位的寡核小体片段^[4,5]。以往的实验都是从细胞群中提取了 DNA 后进行电泳来检测 DNA 变化的, 而单个细胞的 DNA 是怎样变化的还不清楚。本实验建立了可以检测单个细胞 DNA 变化的微凝胶电泳法, 对受照的大鼠胸腺细胞进行了研究, 得到了一些有意义的结果, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 大鼠胸腺细胞制备、照射及培养

4个月左右的雄性 Wistar 大鼠, 乙醚麻醉活杀, 立即取出胸腺, 用 Krebs-Ringer 磷酸缓

冲液 (KRP) 制成单细胞悬液, 细胞浓度 $10^8/\text{ml}$, 0°C 下接受 X 线照射, 剂量率 $1\text{Gy}/\text{min}$, 然后加葡萄糖 (最终浓度 $10\text{mmol}/\text{L}$) 37°C 培养一定时间, 方法参见有关文献^[6], 或细胞悬于 RPMI1640 培养液中, X 线照后 37°C 培养一定时间, 然后置于 0°C 环境。

1.2 微凝胶电泳

1.2.1 琼脂糖准备

小管内加低熔点琼脂糖 (Sigma) 60mg 和 $154\text{mmol}/\text{L}$ NaCl 1ml , 70°C 干浴至琼脂糖融化, 转移到 40°C 干浴, 保持液状。

1.2.2 凝胶样本制备

用 KRP 稀释细胞到 $10^7/\text{ml}$, 水浴到 37°C , 1 份细胞悬液与 2 份液状琼脂糖混匀, 取 $15\mu\text{l}$ 滴到载玻片 ($26\text{mm}\times 70\text{mm}$) 上, 盖上盖玻片 ($24\text{mm}\times 40\text{mm}$), 轻压使其扩展为 $24\text{mm}\times 26\text{mm}$ 的单细胞薄层, 置 4°C 10min 变为凝胶样本。轻轻揭除盖玻片, 加 $300\mu\text{l}$ 溶液液 (含 0.5% 十二烷基肌氨酸钠、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K, $10\text{mmol}/\text{L}$ pH7.4 Tris, $10\text{mmol}/\text{L}$ pH8.0 EDTA, $154\text{mmol}/\text{L}$ NaCl) 置 4°C 5min , 用 TAE

缓冲液 (40mmol/L 醋酸 Tris-1mmol/L EDTA) 洗去溶胞液。

1. 2. 3 电泳、镜检

将样本水平放到电泳仪 (MUPID-2, Cosmo, 日本) 中, 加 TAE 缓冲液使之浸过样本, 4℃ 下电泳 4min (电压 50V)。取出样本, 滴加 200 μ l 二盐酸-4', 6-二脒基-2-苯吡啶 (DAPI, 一种对 DNA 特异的荧光染料) 染液 (含 DAPI 0.25 μ g/ml, 盐酸巯基乙胺 50mmol/L, 10mmol/L Tris, 10mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl), 5min 后用盖玻片盖上, 在荧光显微镜 (Olympus) 下观察及拍照。

1. 3 藻红 B 排除实验

细胞的死活由藻红 B 排除法^[7]确定, 即 0.02% 藻红 B (用 KRP 配制) 1ml 中, 加 10^8 /ml 的细胞悬液 10 μ l, 取一点转移到血细胞计数板上, 静置 1min, 光镜下观察, 红染的细胞为死细胞, 未着色的细胞为活细胞。

2 结 果

2. 1 细胞微凝胶电泳图象

经 10Gy X 线照射并培养 4h 的细胞电泳后, 细胞明显地分为二群 (图 1a): 一群细胞的 DNA 泳动很少; 另一群细胞则泳动成大小相近的水滴或慧星状, 即少部分 DNA 残留在原点, 大部分分解的 DNA 泳动形成尾部。几乎不见介于二群之间的细胞。未照射也未培养的对照细胞中, DNA 泳动的细胞极少, 比例少于 1% (图 1b)。在底片上测量 DNA 泳动的长度 (从头到尾全长), 画出泳动长度的分布直方图 (图 2), 可见受照细胞的 DNA 泳动长度分布有 2 个峰, 与上述细胞的 2 群相对应。

2. 2 照后不同培养时间的影响

细胞 10Gy 照后培养 1—4h, 存活细胞 (藻红 B 排除法) 逐渐减少, 微凝胶电泳后正常细胞也逐渐减少, DNA 泳动细胞增加, 与藻红法相比, 二者比例基本一致, 各时间点上无显著差异 (图 3)。受照细胞如不培养, DNA 泳动细胞的比例就很低, 低于 1%, 与对照细胞一样。照后培养于 RPMI1640 的细胞电泳后, DNA

分解的细胞比例高于照后培养于 KRP 中的细胞, 照后 2, 3, 4h 三点上二者差异显著 ($P < 0.05$ 或 0.01) (图 3)。照后不同时间 DNA 分解细胞的比例不同, 但 DNA 泳动图形的大小和形状仍然一致。

2. 3 剂量效应关系

随着照射剂量的增大, 电泳后可见 DNA 分解的细胞比例增多, 图 4 为细胞 0.5—8Gy X 线照射后培养于 RPMI1640 中 4h, 电泳后正常细胞的比例。0.5Gy 照射后正常细胞比例就明显下降, 与对照相比差异显著 ($P < 0.01$)。不同剂量条件下 DNA 分解细胞的 DNA 泳动形状和大小仍然一致。

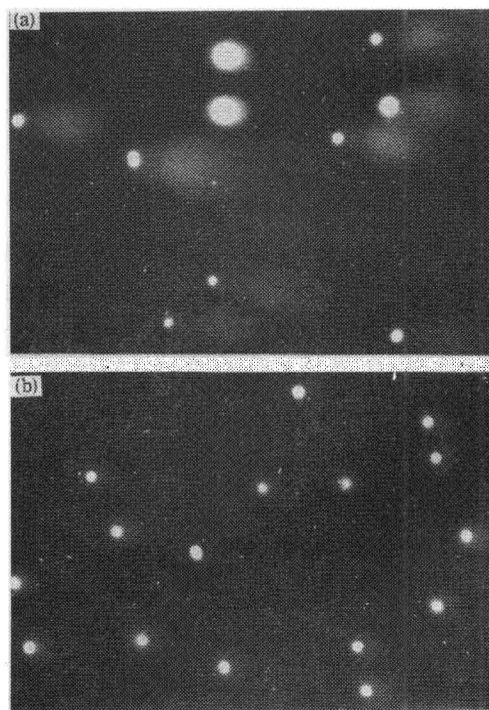


图 1 大鼠胸腺细胞微凝胶电泳图象

- a 10Gy 照后培养 4h 的细胞
b 未培养的正常对照细胞

3 讨 论

胸腺细胞受照后发生的间期死亡被认为就是凋落, 凋落细胞的比例与照后培养时间及照射剂量有关^[2,8]。本实验受照样本中 DNA 泳动细胞的比例随培养时间的延长而增加, 与细胞死亡即凋落的比例一致 (图 3), 说明只有凋落

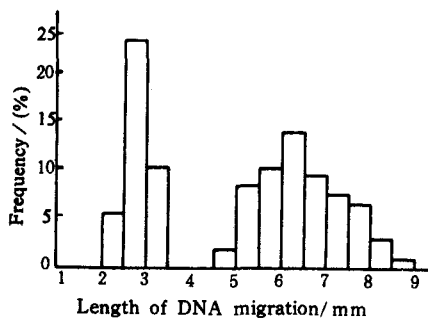


图 2 10Gy 照后培养 4h 的细胞的 DNA 泳动长度分布直方图

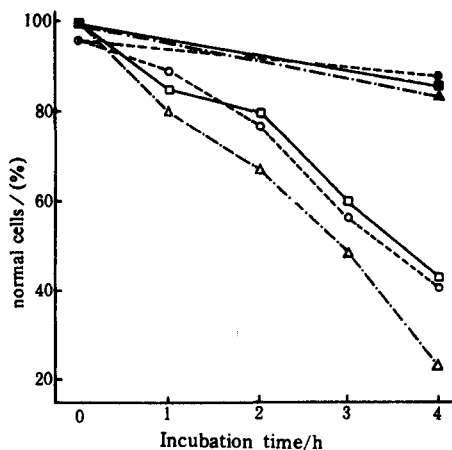


图 3 10Gy 照后不同时间微凝胶电泳法和藻红法检测的正常细胞比例

■—对照和□—受照细胞培养于 KRP, 微凝胶电泳法
●—对照和○—受照细胞培养于 KRP, 藻红法
▲—对照和△—受照细胞培养于 RPMI1640, 微凝胶电泳法

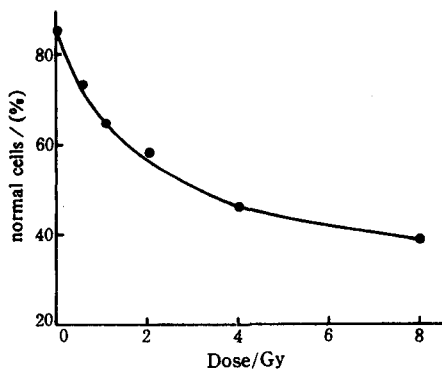


图 4 胸腺细胞微凝胶电泳的剂量效应关系

的比例也随照射剂量的增大而增多. 但不管照射后培养时间及照射剂量如何, 微凝胶电泳后细胞都明显地分为二群, DNA 分解细胞的泳动形状及大小相近, 几乎不见介于二群之间的细胞, 这说明细胞在凋落过程中 DNA 分解速度很快, 一旦开始就迅速分解达到一定程度.

由图 3 可见, 照射后未培养的细胞几乎不发生 DNA 分解, 与对照细胞一样, 而只有培养一段时间后才发生, 说明这种分解不是由射线直线引起的, 与照射后即刻发生的 DNA 链断裂不同. 一些学者证实凋落细胞的染色质 DNA 特征性地分解为以核小体 (180bp) 为单位的片段^[4,5], 并认为这种分解是由核酸内切酶引起的, 因为染色质 DNA 有组蛋白包绕, 只有核小体与核小体之间连接部分的裸露 DNA 可以被核酸内切酶切断. 最近 Schwartzman 发现凋落细胞内的核酸内切酶活性确实增高^[9], 至于这种增高是通过什么机制引起的还不清楚.

许多实验发现细胞的凋落过程需要活跃的代谢活动, 用蛋白质和 RNA 合成抑制剂处理细胞可以阻止细胞的凋落及 DNA 分解^[5,10]. 本实验中照射后用 RPMI1640 培养的细胞中 DNA 分解细胞的比例高于照射后在 KRP 中培养的细胞, 可能是由于前者营养较好而细胞代谢较活跃所致.

本实验建立的微凝胶电泳法, 简便、省时、所需细胞量少, 可检测单个细胞的 DNA 分解, 为细胞凋落及 DNA 变化的研究提供了一个新方法.

参 考 文 献

- 1 Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; **26**: 239
- 2 Yamada T and Ohyama H. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int J Radiat Biol*, 1988; **53**: 65
- 3 Wyllie A H. Apoptosis: Cell death in tissue regulation. *J Pathol*, 1987; **153**: 313
- 4 Yamada T, Ohyama H, Kinjo Y *et al*. Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated *in vitro*. *Radiat Res*, 1981; **85**: 544

的细胞才发生这种 DNA 分解. DNA 分解细胞

- 5 Sellins Y S and Cohen J J. Hyperthermia induces apoptosis in thymocytes. *J Immunol*, 1987; **139**: 3199
- 6 Ohyama H and Yamada T. Reduction of rat thymocyte interphase death by hyperthermia. *Radiat Res*, 1980; **82**: 342
- 7 Phillips H J and Terryberry J E. Counting actively metabolizing tissue cultured cell. *Exp Cell Res*, 1957; **13**: 341
- 8 Ohyama H, Yamada T, Ohkawa A *et al.* Radiation-induced formation of apoptotic bodies in rat thymus. *Radiat Res*, 1985; **101**: 123
- 9 Schwartzman R A and Cidlowski J A. Internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity in apoptotic thymocytes: Detection and endocrine regulation. *Endocrinology*, 1991; **128**: 1190
- 10 Wyllie A H, Morris R G, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*, 1984; **142**: 67

放射受体法测定表皮生长因子

贺师鹏 黄天贵 黄力新

(北京医科大学生物物理教研室, 北京 100083)

郭淑英

(北京医科大学生理教研室, 北京 1000083)

提 要

介绍用大鼠肝细胞膜为材料 EGF 放射受体分析方法, ^{125}I -EGF 采用 Iodogen 方法, 其标记率为 50% 左右, ^{125}I -EGF 对受体的结合率为 20—30%。大鼠肝细胞膜 EGF 放射受体法的灵敏度为 28pg/管, 精密度为 6.3%。应用此法测定了大鼠血清, 颌下腺和唾液中的 EGF 的含量。

关键词 EGF, 放射受体分析, Iodogen

表皮生长因子 (EGF) 是分子量为 6405 的小分子多肽, 它能刺激许多类细胞的增殖, 而且能影响细胞分化, 促进细胞内外离子交换, 增加氨基酸和葡萄糖运转, 加速蛋白质和 DNA 合成。因此, EGF 具有广泛的生物学作用。它在肿瘤生物学和胚胎发育等领域的研究中具有突出的地位。

在从事 EGF 的生物学研究中, 需要建立灵敏度高、特异性强、操作简便的测定体液和组织内 EGF 含量的方法。Cohen 等人^[1]首先建立了 EGF 的放射免疫分析, 其标准曲线的范围为 0.03—4ng。稍后 Carpenter 等人^[2]建立了以纤维母细胞为材料的 EGF 放射受体分析, 其标准曲线的工作范围为 1—100ng/ml, 灵敏度较低。我们以大鼠肝细胞膜为材料建立了 EGF 放射受体分析, 标准曲线的工作范围为 0.03—3ng,

灵敏度为 28pg/管, 达到放免分析相同的灵敏度, 方法的稳定性良好。利用它测定了各种组织中的 EGF 含量, 得到相当满意的结果。

1 材料和方法

1.1 材料

表皮生长因子: EGF 标准品购自美国 Sigma Chemical Co. $\text{Na } ^{125}\text{I}$; 购自中国科学院原子能研究所。Tris-HCl 缓冲液: 50mmol/L Tris-HCl pH7.4 + 1mmol/L EDTA + 1mmol/L EGTA。Beckman5500Y 计数器。

1.2 方法

1.2.1 ^{125}I -EGF 制备 1mg Iodogen 溶于 1ml 二氯甲烷, 每反应瓶取 20 μg , 室温真空