

- Hum Gene Ther, 1994, 5: 19~ 28
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 9. 16~ 9. 19
 - 5 James L M, Ferrara H, Joachin D. Graft-versus-host disease. N Engl J Med, 1991, 324 (10): 667~ 674
 - 6 Kernan N A, Collins N H, Juliano L, *et al.* Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. Blood, 1986, 68 (3): 770~ 773
 - 7 Anderson W F. Gene therapy for cancer [editorial]. Hum Gene Ther, 1994, 5 (1): 1~ 2
 - 8 Moolten F L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Res, 1986, 46: 5276~ 5281
 - 9 Tiberghien P. "Suicide" gene for the control of graft-versus host disease. Curr Opin Hematol, 1998, 5 (6): 478~ 482
 - 10 Verzeletti S, Bonini C, Marktel S, *et al.* Herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer for controlled graft-versus host disease and graft-versus-leukemia: clinical follow-up and improved new vectors. Hum Gene Ther, 1998, 9 (15): 2243~ 2251
 - 11 Ljungman P, De Bock R, Cordonnier C, *et al.* Practices for cytomegalovirus diagnosis, prophylaxis and treatment in allogeneic bone marrow transplant recipients: a report from the working party for infectious diseases of the eBMT. Bone Marrow Transplant, 1993, 12 (4): 399~ 403
 - 12 Winston D J, Gale R P. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection and disease after bone marrow transplantation in the 1990s. Bone Marrow Transplant, 1991, 8 (1): 7~ 11

Experimental Study of Cytotoxic Effect of CD/5-FCyt on T-lymphocyte. SONG Yan-Bin, WU Zhi-Jian, YIN Fang, MA Wen-Li, YANG Guang-Cai,

WU Bo-Song, XU Qian (*Department of Biochemistry, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

Abstract T-lymphocyte depletion of the marrow graft can prevent graft versus-host disease (GVHD) effectively. T-lymphocytes of mice were transfected with high-titer (1.5×10^5 CFU/ml) retrovirus supernatant, and by selection with G418 positive cell clones (T/pCD₂) were obtained. PCR and RT-PCR showed that CD gene was transferred into the T-lymphocyte and expressed successfully. T-lymphocyte and T/pCD₂ cells were exposed to different doses of 5-FCyt for various hours, and were then observed under light microscope and the viability of these cells was determined by MTT colorimetric cell proliferation assay. The results showed that retrovirus mediated CD gene transferred to T/ pCD₂ cells could confer them high sensitivity to 5-FCyt, and T/ pCD₂ cells exposed to 5-FCyt ($> 1 \mu\text{mol/L}$) can be killed. But 5-FCyt was not harmful to normal T-lymphocyte cells. The survival time of T/ pCD₂ cells in the presence of 5-FCyt (3~ 5 d) was significantly shorter than that of T-lymphocyte (> 14 d).

Key words CD gene, 5-fluorocytosine, T-lymphocyte, retrovirus, gene therapy

DNA 末端定量及其应用的研究*

彭黎明¹⁾ 江 虹

(华西医科大学附属第一医院医检专业, 成都 610041)

J. J. LIU C. J. BRADLEY

(Department of Pathology, University of Melbourne Austin Hospital, Herdberg, VIC 3084, Australia)

摘要 为定量 DNA 断裂末端评价 DNA 的降解程度, 以饱和标记 (TdT) 法定量 DNA 末端最大标记量 ($L_{\max}$); 并用流式细胞分析 (FCA)、原位 DNA 末端标记 (TUNEL) 和琼脂糖电泳检测或标记 DNA 降解片段。结果发现: a. TdT 法最低检测限 5 ng DNA, 线性范围为 5~ 5 000 ng, 较检测 DNA 降解片段的琼脂糖电泳敏感 200 倍以上; b. 地塞米松 (DEX) 诱导淋巴瘤 (Raji) 细胞凋亡产生的 $L_{\max}$ 呈 DEX 剂量与诱导时间依赖性增加; c. 自发

* 国家自然科学基金资助项目 (39870296)。 ¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (028) 5422608, E-mail: penglim@mcw.cums.cn 收稿日期: 1999-08-02, 修回日期: 2000-01-02

性高血压大鼠 (SHR) 心肌的 $L_{\max}$ 呈年龄依赖性增加并与正常对照鼠 (WKY) 相比差异非常显著 ($P < 0.01$); d. TdT 法定量 $L_{\max}$ 与 FCA、TUNEL 或电泳分析的相关性良好 ($r > 0.98$). TdT 法定量 $L_{\max}$ 敏感、特异、准确, 可应用于分子生物学、细胞生物学, 尤其是细胞凋亡动力学 DNA 降解评价的定量研究.

关键词 DNA 末端, 饱和标记, 终末核苷酸转移酶

学科分类号 Q343.1⁺1, Q733.72

DNA 降解或断裂是细胞凋亡最明显而富有特征的生化标志, 也是基因分析中使有效目的基因减少的重要原因, 因而在很多生物医学领域如分子生物学、细胞生物学、细胞凋亡动力学的研究中受到广泛的重视^[1,2]. 目前检测 DNA 降解的方法主要有电泳、流式细胞分析 (FCA), 原位末端标记 (TUNEL) 和 PCR 等^[2,3]. 我们在原有利用 α -³²P 脱氧三磷酸胞苷 (α -³²P dCTP) 标记断裂 DNA 末端^[4]的基础上, 建立了定量 DNA 末端最大标记量 ($L_{\max}$) (TdT 法), 即用不同浓度 α -³²P dCTP 与双脱氧三磷酸胞苷 (ddCTP) 在外源性终末核苷酸转移酶 (TdT) 的催化下, 对同一 DNA 样本的 3'-羟基末端进行饱和标记, 分析 $L_{\max}$ 并与 FCA、TUNEL、电泳结果进行比较; 还将 TdT 法用于诱导淋巴瘤细胞 (Raji) 凋亡的动力学研究 and 评价不同年龄自发性高血压大鼠 (SHR) 心肌 $L_{\max}$ 的变化.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系: Burkitt 淋巴瘤细胞株 (Raji) (澳大利亚墨尔本大学医学院 Austin 医院血液科提供), 常规培养于 10% 热灭活小牛血清 PRMI1640 液中. 实验用细胞均处于指数生长期.

1.1.2 实验动物: 不同年龄 (3~64 周龄) SHR 与正常大鼠对照 (WKY), 每组各 6 只. 由澳大利亚墨尔本大学 Austin 医院提供.

1.1.3 主要试剂: ddCTP 5 mmol/L, TdT 2400U (Pharmacia 公司); α -³²P dCTP 比活度 1.11×10^{14} Bq/mmol, 放射性浓度 370 GBq/L (Bresatec 公司); FCA 试剂购置于 Bender Med System 公司, TUNEL 试剂来自 Boehringer Mannheim 公司, 其他化学试剂由 Sigma 公司提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞凋亡的诱导培养^[5]: 5 ml Raji 细胞 (1×10^7 /ml) 与 1.0 μ mol/L 地塞米松 (DEX) 培养, 分别收集 0、2、4、8 h 细胞进行动态观察, 对照组不加 DEX 培养 8 h.

1.2.2 DNA 抽提和凝胶电泳^[6]: Raji 细胞或 SHR 和 WKY 心肌 DNA 抽提按标准的酚/氯仿/异戊醇抽提法进行. 通过测定 DNA 溶液在 260 nm 和 280 nm 的吸光度确定 DNA 的量与纯度. 凝胶电泳时, 取约 1 μ g DNA 样品, 在 TBE 电极缓冲液, 1% 琼脂糖凝胶上, 5.0 V/cm 电泳 3 h, EB 染色, 在紫外发射仪上观察结果.

1.2.3 TdT 法. a. 饱和标记: 20 μ l 反应液中含 4 μ l 5 $\times$ 缓冲液 (Boehringer-Mannheim 公司), 2 μ l 2.5 mmol/L CoCl₂, 5~4 000 ng DNA, 不同量 ddCTP: α -³²P dCTP (1.93 pmol: 0.41 pmol, 3.85 pmol: 0.82 pmol, 7.76 pmol: 1.65 pmol, 15.5 pmol: 3.3 pmol, 31.0 pmol: 6.6 pmol, 62.0 pmol: 13.2 pmol, 93.1 pmol: 19.8 pmol, 124 pmol: 26.4 pmol) 取 2 μ l 反应液做本底测量, 加 20 U TdT, 37 $^{\circ}$ C 60 min. 以 2 μ l 0.5 mol/L EDTA 终止反应. b. 标记物测定: 取上述各管标记反应混合液 2 μ l 加入 48 μ l 0.5 g/L 携带标记 DNA 的小牛胸腺 DNA 液中, 用其中 5 μ l 测总放射性, 在余下 45 μ l 加入 1.0 ml 10% 冷三氯醋酸 (TCA), 冰浴 10~15 min. 用直径 2.5 cm 的玻璃纤维滤膜 (Whatman 公司) 过滤. 以 10% TCA 3 ml 冲洗滤膜 5 次, 无水乙醇 3 ml 冲洗 3 次; 滤膜干燥后置于以甲苯为溶剂的闪烁液中, 用液体闪烁计数器 300-CD (Packard 公司) 测量每分钟计数 (cpm 值). c. 计算: 放射性结合率 = (样本放射性/总放射性) $\times$ ($V_{\text{总}}/V_{\text{样}}$); 样本的特异放射性/ $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ = (样本放射性 - 本底) $\times$ ($V_{\text{总}}/V_{\text{样}}$) $\times \frac{1}{m(\text{DNA})/\mu\text{g}}$ ($V_{\text{样}}$ 与 $V_{\text{总}}$ 为测定样本与总放射性体积); DNA 末端标记量/ $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ = 样本的特异性放射性/加入 α -³²P dCTP 的放射性 (cpm 值每皮摩尔); $L_{\max}/\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ = [动力学常数 (K_m) $\times$ DNA 末端标记量/加入 α -³²P dCTP 的放射性] + DNA 末端标记量; ($K = -1/\text{斜率}$). 为获得准确的 $L_{\max}$, 每一 DNA 样本至少需 6 个递增 α -³²P dCTP 浓度, 数据分析由微机进行, 求 K_m 的 Scatchard 散点图用 Cricket 制图软件.

1.2.4 FCA 与 TUNEL: 采用我们已建立的 Annexin法和原位末端标记法^[7].

2 结 果

2.1 实验条件的选择

2.1.1 ddCTP 与 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 的比例: 在标记反应中, 以相同的 DNA (200 ng) 与不同比例的 ddCTP: $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 进行实验. 结果表明, DNA 3' 端结合 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 量与 ddCTP: $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 的比例呈负指数关系 (图 1a), $y = 0.0027307 \times 10^{0.2493x}$, $r^2 = 0.983$; 经曲线拟合后, ddCTP: $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 的比例与 DNA 3' 端结合标记 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 量 (pmol) 的对数呈良好的线性关系 (图 1b), $r = 0.99$. 当 ddCTP: $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 为 4: 1~ 8: 1 时, 标记反应灵敏, 结果稳定准确. 本研究采用 4.7: 1.

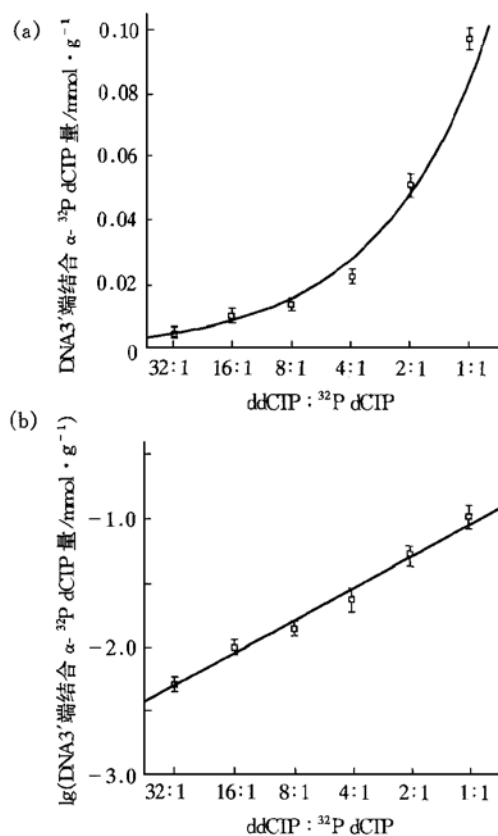


图 1 TdT 法 ddCTP: $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 的比例 (a) 及其拟合曲线 (b)

2.1.2 放射性结合率: 指 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 结合 DNA 3' 端的比例, 正常情况下为 1 000: 1^[8]. 在本标记反应条件下, 此结合率相当稳定, 为 0.25~ 0.35 (x 为 0.31, s 为 0.05%), 即每一 DNA 末端约结合 3 个 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 残基.

2.1.3 反应时间与 TdT 用量: 从标记反应与酶促反应的动力学曲线可知, 60 min 时 DNA 末端标记达最大标记反应平台; TdT 为 12~ 48 U 时结果稳定. 本研究选用 60 min, TdT 为 20 U.

2.2 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 对 $L_{\max}$ 的影响

在测定 $L_{\max}$ 时, 以同一比例但不同量的 ddCTP: $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 作用于 DEX 诱导 8 h 的 Raji 细胞 DNA 200 ng, 结果表明, 此标记反应为一典型的饱和标记曲线 (图 2a); 通过 Scatchard 散点图分析显示, 随着 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 量的增加, DNA 末端达饱和标记, $K_m = 1.4$ pmol, $L = 0.62$ mmol/g (图 2b). 同时, 实验结果表明 6 个不同浓度的 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (0.021~ 0.66 mmol/L) 可常规用于 DNA 末端的饱和标记, 并获得满意的 K_m 和 $L_{\max}$.

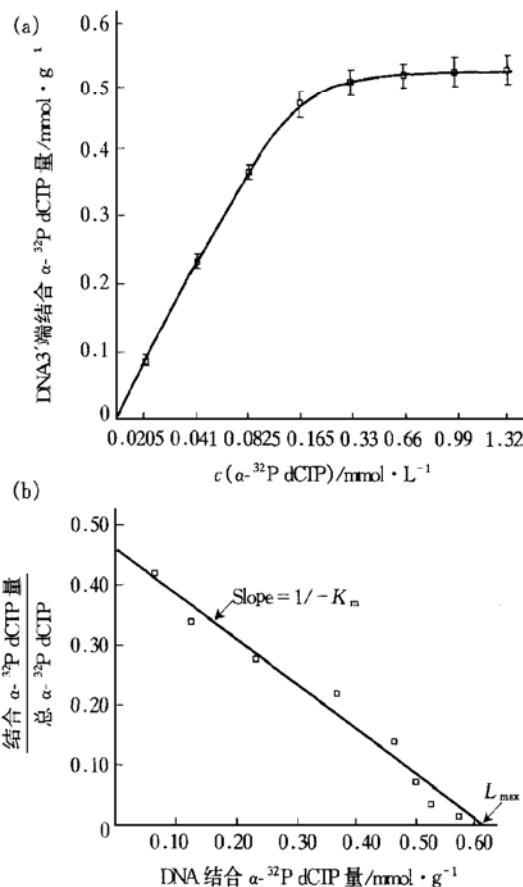


图 2 不同浓度 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 对同一 DNA 的饱和曲线 (a) 及分析 K_m 、 $L_{\max}$ 的 Scatchard 散点图 (b)

2.3 实验的线性

将 DEX 作用 Raji 细胞 8 h 的 DNA 5~ 500 ng 进行 $L_{\max}$ 测定 (图 3). 结果表明, $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 标记 DNA 末端量 (< 2 pmol) 与 DNA 降解有非常好的线性关系 ($r = 0.99$). 为进一步证实 TdT 法

测定的 $L_{\max}$ 只与 DNA 末端量有关而与 DNA 量无关, 我们将 DEX 作用 0 h (正常组) 和 8 h (降解组) 的 Raji 细胞 DNA 以不同比例混合, 让 DNA 总量均为 200 ng, 测定 $L_{\max}$ (图 4). 结果显示, 正常与降解 $L_{\max}$ 分别是 0.011 和 0.45. 经不同比例混合, $L_{\max}$ 与 DNA 降解量相关性良好, 经对数转移后, $r = 0.984$.

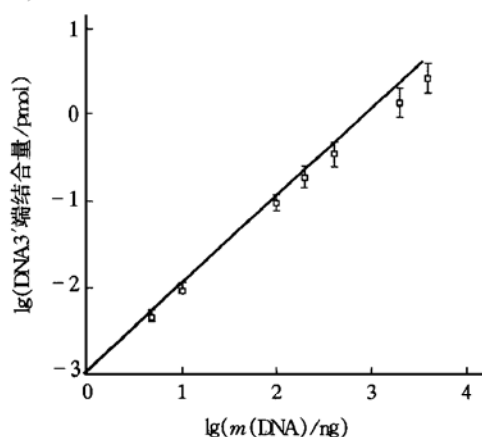


图3 TdT 法的线性

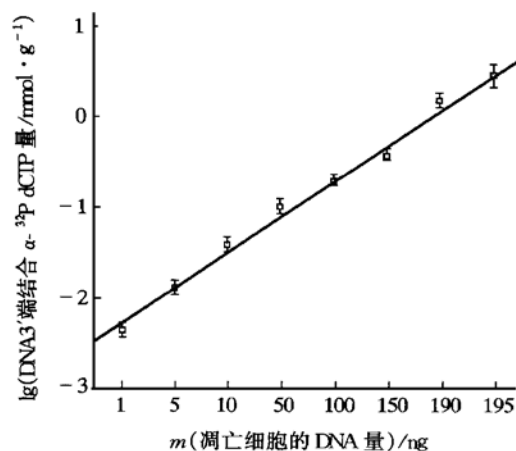


图4 不同 DNA 末端对 TdT 法结果的影响

2.4 $L_{\max}$ 测定的应用

2.4.1 细胞凋亡的动力学研究: 以 TdT 法测定不同量 DEX (0、1.0、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$) 作用 Raji 细胞不同时间 (0、2、4、8 h) 的 $L_{\max}$ (图 5). 结果表明, 对照组或未经 DEX 诱导的 Raji 细胞, 随培养时间的延长, 其 $L_{\max}$ 增加甚微, 仅为 $(2.50 \pm 0.43) \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 然而, 经 1.0、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ DEX 的诱导, $L_{\max}$ 呈显著增加, 分别是 $(3.75 \pm 0.49) \times 10^{-2}$, $(7.5 \pm 0.52) \times 10^{-2}$ 和 $(0.12 \pm 0.01) \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $L_{\max}$ 分别较对照组增加约 150、300 和 480 倍, 表

明 DNA 末端标记量随 DEX 剂量与孵育时间的增加而增加. 同时, 将 $L_{\max}$ 结果与 Annexin 法分析凋亡细胞数的结果进行比较 (图 6). 结果显示二种方法的结果有较好的相关性 ($r = 0.98$, $P = 0.002$). 而且, TUNEL 原位标记凋亡细胞核 DNA 断裂末端检测凋亡细胞数与 TdT 法结果亦有很好的相关性 ($r = 0.99$).

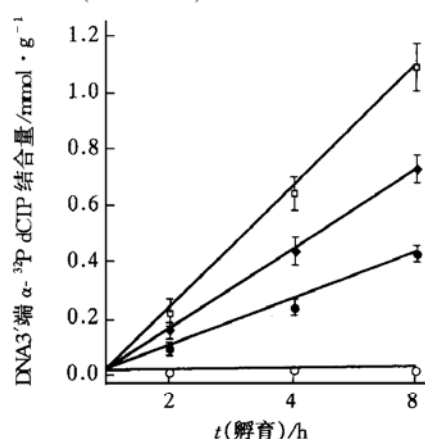


图5 TdT 法分析不同浓度 DEX 诱导 Raji 细胞凋亡的动力学试验

○—○: 0 $\mu\text{mol/L}$; ●—●: 1.0 $\mu\text{mol/L}$; ◆—◆: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; ■—■: 5.0 $\mu\text{mol/L}$.

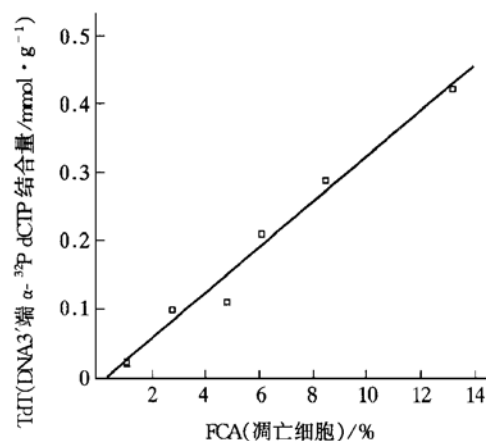


图6 TdT 法与 FCA 的相关性

2.4.2 SHR 与 WKY 心室肌 $L_{\max}$ 测定: 3~64 周龄 SHR 与 WKY 大鼠心室肌 $L_{\max}$ 分析结果显示, 各年龄组 WKY 的 $L_{\max}$ 差异不显著, 3 周龄与 16 周龄 WKY 的 $L_{\max}$ 分别为 $(0.98 \pm 0.10) \times 10^{-2}$ 和 $(1.10 \pm 0.10) \times 10^{-2} \text{ mmol/g}$ ($P > 0.1$). 然而, SHR 的 $L_{\max}$ 呈年龄依赖性增加, 在 4 周龄时为 $(0.012 \pm 0.001) \text{ mmol/g}$, 16 周龄时到一高峰平台期 $(0.038 \pm 0.002) \text{ mmol/g}$ ($P < 0.01$) (图 7); SHR 与 WKY 的 $L_{\max}$ 相比差异非常显著 ($P <$

0.01), 其结果为 TUNEL 和放射标记 DNA 梯形带的分析所证实^[7].

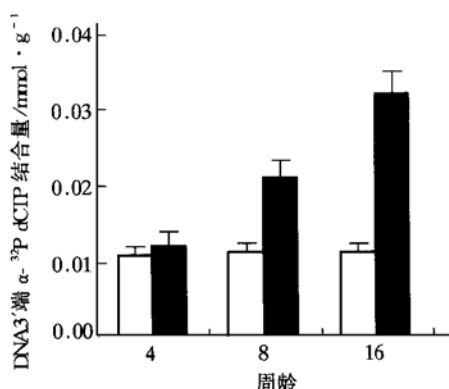


图7 不同年龄 SHR 与 WKY 的心肌 DNA 末端定量

3 讨 论

通过一系列实验研究显示 TdT 法有以下特点: a. TdT 催化 DNA 末端的标记反应特异、可靠; b. 以不同量 α - 32 P dCTP 对同一 DNA 末端进行饱和标记, 克服了单点不饱和标记的致命弱点——分析结果欠准确, 随 α - 32 P dCTP 衰变而受影响, 缺乏可比性; c. $L_{\max}$ 能客观定量 DNA 末端 (nmol/g), 克服了 DNA 末端结合标记量 (每微克 DNA 的 cpm 值) 的不确定性^[9]; d. 灵敏度非常高, 最低检测限仅 5 ng, 较琼脂糖电泳敏感至少 200 倍以上; e. $L_{\max}$ 分析不受 DNA 量的影响, 只与断裂 DNA 末端量有关^[9]; f. 在标记反应中适量使用 DNA 末端终止剂 ddCTP 既可增加标记反应的灵敏度, 又能阻止标记反应无限进行, 而且较单用 α - 32 P dCTP 节约 2/3 的费用; g. TdT 法的定量结果与其他 FCA、TUNEL、电泳及 PCR 结果的相关性良好 ($r > 0.98$), 同时克服了 TUNEL 和电泳不能定量 DNA 降解及 PCR 易受污染影响的不足^[10].

本文用饱和标记分析 DNA 末端最大标记量 ($L_{\max}$) 以定量 DNA 断裂末端, 并与 FCA、TUNEL、电泳的比较, 而且成功应用于细胞凋亡动力学研究和不同年龄 SHR 与 WKY 心肌 $L_{\max}$ 的比较研究, 表明 TdT 法为分子生物学, 细胞生物学, 尤其是细胞凋亡动力学的研究, 定量评价 DNA 降解程度提供了灵敏、特异、准确和定量的新途径。

参 考 文 献

- Arends M J, Morris R G, Wyllie A H. Apoptosis: the role of endonuclease. *Am J Pathol*, 1990, **136** (3): 593~ 608
- 彭黎明. 细胞凋亡检测的研究进展. *中华医学检验杂志*, 1996, **19** (6): 336~ 338
Peng L M. *Chinese J Lab Med*, 1996, **19** (6): 336~ 338
- Sykes P J, Neoh P J, Brisco M J, *et al.* Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*, 1992, **13** (4): 444~ 449
- 彭黎明, Brisco M J, Sykes P J, 等. 用 α - 32 P dCTP 标记断裂 DNA 检测 DNA 降解程度. *中华核医学杂志*, 1997, **17** (1): 62~ 63
Peng L M, Brisco M J, Sykes P J, *et al.* *Chinese J Nuclear Med*, 1997, **17** (1): 62~ 63
- Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980, **284** (10): 555~ 556
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. Appendix E5~ 25
- Peng L M, Liu J J. A novel method for quantitative analysis of apoptosis. *Lab Investigation*, 1997, **77** (6): 547~ 555
- Ausule F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. Harvard CT: Harvard Medical School, 1994. 954~ 973
- Bennett J P, Yamamura H I. *Neurotransmitter. Hormone. or Drug Receptor Binding Methods*. 2nd. New York: Raven Press, 1985. 62~ 89
- Tilly J L, Hsueh A J. Microscale autoradiographic method for the qualitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. *J Cell Physiol*, 1993, **154** (3): 519~ 526

Quantitation of DNA Breaks and Application of the Assay. PENG Li-Ming, JIANG Hong (*Department of Laboratory Medicine, 1st University Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China*); J. J. LIU, C. J. BRADLEY (*Department of Pathology, University of Melbourne Austin Hospital, Heidelberg, VIC 3084, Australia*).

Abstract To quantitate DNA breaks, a method based on saturation labeling 3'-ends of DNA fragments with α - 32 P dCTP in the presence of 2', 3'-dideoxy-cytidine 5'-triphosphate (ddCTP) by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) was developed. The saturation labeling of 3'-ends of DNA fragments was performed by adding different concentrations of α - 32 P dCTP to a DNA sample, from which a maximal labeling ($L_{\max}$) and a kinetic parameter (K_m) of the TdT reaction were calculated. Results were confirmed by agarose gel electrophoresis, fluorescein-dUTP and exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase (TUNEL), flow cytometric analysis (FCA). The method mentioned above requires as little as 5 ng of DNA,

increases in the sensitivity of DNA fragments detection by at least 200-fold relative to the widely used agarose gel electrophoresis, and the linearity of the assay is about 5~ 5 000 ng DNA. The application of the method in the apoptosis study showed that (1) a time- and dose-dependent increase in the number of DNA strand breaks in apoptotic Raji lymphoma lymphocytes induced by dexamethasone, and (2) age-dependent increase in the number of DNA strand breaks occurred in the cardiac tissues of spontaneously hypertensive rats (SHR) compared with that of

normal control rats (WKY). Results of the assay were confirmed by the DNA ladder pattern exhibited after electrophoresis, fluorescein dUTP and exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase (TUNEL), flow cytometric analysis (FCA) ($r > 0.98$). It is a quantitative, simple, sensitive, specific and useful assay for assessing DNA degradation in molecular and cell biology especially in apoptosis research.

Key words DNA break, saturation label, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)

八肽胆囊收缩素对大鼠大脑皮质细胞 钙调素活性的影响

项 鹏 陈曼玲 吴兆锋

(华西医科大学生物化学教研室, 成都 610041)

摘要 为了探讨胆囊收缩素 (CCK) 受体在中枢神经系统中的信号传递机制, 观察了 CCK₈ 和 CCK_A 受体拮抗剂 L-364, 718、CCK_B 受体拮抗剂 L-365, 260 对大鼠大脑皮质钙调素 (CaM) 活性的影响. 结果表明: a. CCK₈ 对 CaM 活性的影响具有时间依赖性, 15 min 达到最高点后逐渐下降; b. CCK₈ 在 10^{-12} ~ 10^{-7} mol/L 范围内可刺激 CaM 活性的增加, 超过 10^{-7} mol/L 后, 逐渐趋于饱和. c. CCK_A 受体拮抗剂 L-364, 718、CCK_B 受体拮抗剂 L-365, 260 均可抑制 10^{-7} mol/L CCK₈ 引起的 CaM 活性的增加, 但两者 IC_{50} 相差 40 倍, L-365, 260 在较低浓度时即能明显拮抗 CCK₈ 引起的 CaM 活性变化. 研究结果提示 CCK₈ 可能通过 CCK_B 受体引起 CaM 活性变化, 而 CaM 可能是 CCK_B 受体的重要信号传递机制之一.

关键词 八肽胆囊收缩素 (CCK₈), CCK_B 受体, 钙调素

学科分类号 Q579.2⁺3

胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK) 是一种广泛分布在中枢神经及外周组织中的肽类物质, 通过其受体发挥多种生理功能. 它具有多种分子形式^[1], 其中 CCK₈ (八肽胆囊收缩素) 是中枢神经系统中含量最丰富的一种形式. CCK 受体分为两种亚型, 即 CCK_A 受体和 CCK_B/胃泌素受体, 两者在体内的分布和介导的功能各有不同, 可能是通过不同信号传递机制. 对于 CCK_A 受体信号传递机制的研究目前比较清楚, 但对于 CCK_B 受体信号传递目前尚无定论, 其主要原因是制备纯度较高能表达 CCK_B 受体的细胞比较困难. 有研究显示 CCK₈ 可引起中枢神经系统中 Ca^{2+} 浓度的变化, 但其是否引起大脑皮质神经细胞钙调素 (CaM) 活性的变化目前尚未见报道. 因此本研究以分离大鼠大脑皮

质神经细胞为材料, 观察 CCK₈、CCK_A 受体拮抗剂 L-364, 718、CCK_B 受体拮抗剂 L-365, 260 与受体结合后引起钙调素 (CaM) 活性的变化.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物: Wistar 大鼠, 由华西医科大学实验动物中心提供, 体重 200~250 g, 雌雄不限.

1.1.2 试剂与仪器: CCK₈ (Sigma 公司), L-364, 718、L-365, 260 (英国 Leslie Iversen 博士馈赠), Dowex 1×8 (Sigma 公司), 蛇毒 (Crotalus atrox, Sigma 公司), 标准 CaM、环核苷酸磷酸二酯酶

Tel: (028) 5501254

收稿日期: 1999-09-28, 修回日期: 2000-04-13