

研究简报

稀土元素灯辐照对 CHO 细胞集落形成率和 DNA 合成的影响

刘楠 郑秀龙 成鹏* 杨红* 谢企良*

(第二军医大学放射医学研究室, 上海 200433)

关键词 光辐照, CHO 细胞, 集落形成, DNA 合成, 过热温度, 细胞形态学

稀土元素具有独特的磁性、光子、化学和热力学等性能。利用其特性制成的稀土元素灯(以 620—635nm 波长为主), 在临床上用以治疗顽固性慢性溃疡疾患, 有效率达 80% 以上。一些动物实验表明, 一定能量的红光区(630nm)光波辐照能促进伤口的愈合过程^[1,2]。由于使用的能量范围不足以引起细胞环境温度的明显改变^[3,4], 故可认为系非温度效应所引起。这种生物刺激作用(Biostimulation)发生在细胞内什么生物学过程上(如 DNA 合成、蛋白质合成、细胞内膜系统、细胞增殖或神经功能调节等), 是一个值得探讨的有兴趣的课题。目前许多报告结果很不一致。本文从稀土元素灯辐照对 CHO 细胞集落形成率以及 DNA 合成的影响探讨了其作用机理。

一、材料与方 法

1. 细胞株及集落形成 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(从长海医院皮肤科引进)于含 10% 热灭活新生小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 在 37℃, 5% CO₂ 孵箱中贴壁传代培养。指数生长期细胞(传代后 3—4 天)经 0.25% 胰酶消化分散后, 接种于 60mm 玻璃皿中(200 个细胞/皿), 加入 4ml 上述培养液, 于 37℃、CO₂ 孵箱中培养 10 天。经甲醇固定及瑞氏染液染色后, 记录集落(>50 个细胞)数。

2. 稀土元素灯及辐照条件 稀土元素灯主要含有钇(Y), 铕(Eu), 钐(Sm)三种元素化合物。用 TF-1 自动光辐射仪测量, 光波长范围 400—700nm, 以 620—635nm 为主。光源距细胞样品约 20cm, 功率密度 0.2 mW/cm²。为避免培养液 pH 的改变, 光照均在 37℃, CO₂ 孵箱中进行。

3. ³H-TdR 掺入 采用了悬浮细胞和贴壁细胞两种方法。前者先将细胞制成 3 × 10⁵ 细胞/ml 悬液, 后者则于 30mm 培皿中接种 6 × 10⁴ 个细胞, 在 37℃, CO₂ 孵箱中培养 48h。两种方法在相同条件下进行光

辐照, 然后分别加入 ³H-TdR(0.2 μCi/μl, 20 Ci/mmol)至终浓度为 1 μCi/ml, 于 37℃, CO₂ 孵箱中保温 30 min。悬浮细胞按常规收集于玻纤滤膜上, 贴壁细胞则先用胰酶消化后收集于滤膜上。分别依次用生理盐水, 5% 三氯醋酸和无水乙醇洗涤。然后用 FJ-2107 液体闪烁谱仪测量放射性。

4. 过热温度处理和细胞形态学观察 细胞被接种于装有载玻片的培养瓶中贴壁生长 3 天, 然后将培养瓶置于 45℃ 水浴 20min。过热处理后立即用稀土元素灯辐照 1 或 2 h, 再继续孵育 17h。取出载玻片, 用 Nikon 相差显微镜观察摄像; 或者经瑞氏染液染色后, 用倒置显微镜摄像。

二、结 果

1. 对集落形成率的影响

如表 1 所示, 经稀土元素灯辐照 10 和 30min, CHO 细胞集落形成率显著高于未照光组 ($P < 0.01$), 10min 与 30min 光照结果也相差显著 ($P < 0.05$), 即在此光照范围内, 集落形成率随着光照时间的增加而增加。但是光照 60min 集落形成率与未照光组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 稀土元素灯辐照对 CHO 细胞集落形成率的影响

照射时间 (min)	能量密度 (J/cm ²)	集落数 ($\bar{x} \pm SD$) (n)	集落形成 率(%)	占对照百 分比
0	—	119.5 ± 7.7(4)	59.7	—
10	0.12	141.3 ± 5.5(3) ¹⁾	70.6	118.2
30	0.36	156.3 ± 11.7(3) ¹⁾	78.1	130.8
60	0.72	124.3 ± 28.9(3)	62.1	104.0

1) $P < 0.01$ 与对照组相差非常显著。

2. 对 DNA 合成的影响

* 长海医院理疗科

稀土元素灯辐照 15、30 或 60min 后,用悬浮细胞和贴壁细胞所得结果均显示,³H-TdR 掺入 CHO 细胞量与未照光组比较无显著差异 ($P>0.05$) (表 2)。经 48h 培养后贴壁细胞组各培养皿中细胞数由接种的 6×10^4 个细胞增至约 5×10^5 个细胞,其 ³H-TdR 掺入量显著高于悬浮细胞组。

表 2 稀土元素灯辐照对 ³H-TdR 掺入 CHO 细胞的影响

照射时间 (min)	能量密度 (J/cm ²)	cpm/ 1×10^6 细胞 ($\bar{x} \pm SD$)(n)	
		悬浮细胞	贴壁细胞
0	—	2346 $\pm$ 1033(4)	14144 $\pm$ 1568(4)
15	0.18	1466 $\pm$ 493(4)	13806 $\pm$ 5442(3)
30	0.36	1406 $\pm$ 540(4)	16092 $\pm$ 8892(4)
60	0.72	2473 $\pm$ 1393(3)	16396 $\pm$ 8438(4)

3. 稀土元素灯辐照对过热温度(45℃)处理细胞的影响 当正常贴壁生长的 CHO 细胞(图 1a 见封 3)于 45℃ 水浴中置 20min 后,镜下立即可见贴壁细胞轮廓增强,胞浆出现皱缩。经光照 1h 后继续孵育 17h,细胞生长良好,贴壁呈纤维状生长(图 1c 见封 3),而未照光的过热处理细胞则严重圆缩退化,可见许多膨大的死细胞(图 1b 见封 3)。照光 2h 的细胞(图 1d 见封 3)较之照光 1h 的细胞生长差,但较未照光组(图 1b 见封 3)略好。

在另一组实验中,将 CHO 细胞悬浮于培养液中于 45℃ 处理 15min,然后将细胞悬液置于培养瓶中进行照光。在最初 4h,观察到照光组细胞开始贴壁。而未照光细胞尚未贴壁。照光 12h 后,照光组细胞生长明显优于未照光组。但是当继续照光至 48h 后,照光组细胞开始圆缩老化,细胞数减少,细胞内颗粒增多(图 2a 见封 3),而未照光组细胞生长反而恢复正常(图 2b 见封 3)。结果提示,光照对细胞过热处理后形态学的恢复有促进作用,但长时间光照对细胞生长亦产生不利的影响。

三、讨 论

在生物刺激作用的研究中,光辐照对 DNA 合成和细胞增殖的影响显得特别重要。在本实验中,我们采用了悬浮细胞和贴壁细胞两种方法比较稀土元素灯辐照对 ³H-TdR 掺入量的影响。两种方法 ³H-TdR 掺入量有很大的差别。贴壁生长细胞由于更接近自然生长情况而获得较高的掺入量。但是这两种方法的结果均表明,稀土元素灯照 15、30 或 60min 后,均未有细胞 DNA 合成的明显改变。有报告表明,633nm 光波辐照后,经细胞化学方法检测,兔巨噬细胞核内 DNA 含量增加^[5];但 Meyer 等^[6]观察到光辐照对 ³H-TdR 掺入人外周血淋巴细胞 DNA 没有影响。Alberg 等^[7]

在观察到光照增加细胞内胶原蛋白合成的同时,并未观察到 DNA 合成的增加。此外还有实验表明,光辐照对细胞增殖率也没有明显的影响^[8,9]。由此推测光辐照生物刺激作用可能不涉及细胞内 DNA 合成的改变。

CHO 细胞集落形成率在稀土元素灯辐照 10 和 30 min 后显著增加,且有明显的剂量依赖性。这与 Dasdia 等^[10]的结果是一致的。他们对四种人肿瘤细胞受激光照射前后集落形成率比较表明,低能量激光辐照可以增加集落形成率。细胞集落形成率取决于细胞本身的增殖状况以及细胞的微环境。光辐照对细胞膜系统微环境的影响已得到证实^[11,12],某些结合位点减少,表面负电荷增加。这种作用可能利于改变细胞间的联系,促进胰酶处理后细胞膜微环境的恢复,促进细胞贴壁和集落形成。

稀土灯光辐照对细胞微环境以及对细胞膜系统的影响可能用于解释灯照一定剂量对过热细胞形态恢复的促进作用。在高温对细胞作用后早期进行光辐照,可能促进某些损伤细胞的恢复或者减缓继发损伤。值得注意的是,增加辐照能量对细胞集落形成率和细胞生长均有明显的抑制作用。Castro 等^[13]曾报道当激光能量密度为 860—990J/cm² 时,可观察到细胞增殖和 DNA 合成随着光照能量的增加而显著地延迟或减少。在本实验条件下,稀土元素灯照射 35J/cm²,细胞即显示严重的生长抑制现象。由此可以推测,稀土元素灯辐照除了具有红光区光波的光生物学作用外,还可能因稀土元素的特性产生特殊的生物物理效应。

综上所述,稀土元素灯辐照一定时间可以增加 CHO 细胞的集落形成率,促进过热温度损伤的恢复。但这些效应并非通过增加细胞内 DNA 合成所致。长时间灯照可能抑制细胞生长。

细胞照片承蒙吕发度高级实验师帮助拍摄,深表谢意!

参 考 文 献

- 1 Haina D, Brunner R, Landthaler M *et al.* *Laser Basic Biomed Res*, 1982; 22: 1
- 2 Mester E, Toth N, Mester A. *Laser Basic Biomed Res*, 1982; 22: 4
- 3 Fork R L. *Science*, 1971; 171: 907
- 4 Lam T S, Abergel R P, Meeker C A *et al.* *Laser Life Sci*, 1986; 1: 61
- 5 徐国祥, 邓卓桑, 骆秀英等. 中国生物医学工程学报, 1983; 2: 199
- 6 Meyers A D, Joyce J, Cohen J J. *Laser Surg Med*, 1987; 6: 540
- 7 Alberg R P. *J Am Acad Dermatol*, 1984; 11: 1142
- 8 Hallman H O, Basford J R, O'Brein J F *et al.* *Laser Surg Med*, 1988; 8: 125
- 9 Kao M C, Tsai J C, Jou T C *et al.* *Laser Surg Med*,

利用生物超弱发光鉴定抗旱性的小麦品种初探*

汪沛洪 吕金印

(西北农业大学植物生化研究室, 陕西杨陵 712100)

关键词 生物超弱发光, 抗旱性, 小麦

早期 L. Coli (1954) 等人探测了许多植物自身发出的超弱发光, 随后又发表了许多这方面的研究。近年来生物超弱发光作为一种重要研究手段在植物学领域展示了广阔的应用前景^[1-3]。其依据是植物在代谢活动中, 任何生成或消耗利用 ATP、NAD(H₂)、NADP(H₂) 和 FMNH₂ 的反应均可导致一部分代谢能以光子形式释放出来^[4]。因此, 可将生物超弱发光值作为植物体内物质代谢和能量转化活动的一项指标。

植物的超弱发光与环境关系极为密切, 不同胁迫条件下, 对不同作物品种可能产生差异, 它可能为作物抗逆性育种提供一种新的鉴定方法。旱作农业研究已列入国家重点攻关项目^[5], 解决这个问题的诸多方面, 最重要是选育抗旱性的作物品种。迄今, 在鉴定农作物抗旱性方面已做了大量工作, 大多侧重直观的形态方面的或生理方面的指标, 而从生物物理研究抗旱性机理引伸出来的指标较少。因此, 我们根据上述原理, 利用 LS-9800 液体闪烁计数器的单光子监测装置, 对不同抗旱性小麦品种的种籽进行其发光值的测定。期望求得一种简便、快速鉴定作物抗旱性的方法, 应用于小麦抗旱育种工作, 并为抗旱指标的筛选工作开辟一个新的领域。

一、材料与方 法

1. 材料: 抗旱性强的小麦品种: 旱选 10 号、晋农 3 号、陕合 6 号、丰抗 13 号和秦麦 3 号。抗旱性弱的品种: 咸阳 683、运 782、7859-18、秦洛 104、秦麦 9 号、7730 和郑引 1 号。以上小麦品种来源于西北农业大学育种教研组及山西省小麦研究所。

2. 方法:

(1) 仪器: LS-9800 液体闪烁计数器的单光子监测装置 (Backman 公司产品)。

(2) 测量方法: 随机取参试小麦品种 30 粒, 分别以 10 粒小麦种籽 (称其重量) 作为一次样品测定, 每个样品重复三次。每批平行测定 12 个品种, 重复三次共 36 个样品。并且每相隔一天后, 用同样参试的 12 个品种及同样办法再重复测定二次, 观察其发光值的变化及规律性。

每个样品发光值跟踪测定时间和次数都相同, 每 1min, 4min, 7min, 10min 和 13min 测定一次, 共五次。选用最后两次发光值的平均值作为计算结果的依据; 以 cpm/g 为单位。

测定样品发光值时, 在暗室及定温 ($18 \pm 1^\circ\text{C}$) 条件下进行, 避免光及温度的影响。

二、结果和讨论

1. 确定测量发光值的时间

用陕合 6 号和郑引 1 号两个小麦品种预测其发光值的适宜时间, 结果如表 1 所示。

从表 1 看出, 发光值开始都较高, 10min 以后的发光值基本趋于稳定。10min 和 13min 发光值的平均值与 1min 至 13min 的平均值比较接近, 误差不超过 1%。故以此数值作为计算的依据。处理 I、II 和 III 之间的发光值有变化, 这与 10 粒小麦种籽重量以及闪烁杯发光值不同有关。

2. 不同抗旱性小麦籽粒的发光值比较

12 个不同抗旱性小麦品种籽粒, 三次测量的发光值的平均值数据列于表 2。经方差分析, 品种间差异达

* 国家自然科学基金资助课题

- 1988; 8: 176
10 Dasdia T, Melloni E, Marchesini R *et al.* *Laser Surg Med*, 1988; 8: 177
11 Kubasava T, Kovacs L, Somosy Z *et al.* *Laser Surg Med*, 1984; 4: 381

- 12 Bostra M. *Dermatologica*, 1984; 168: 157
13 Castro D J, Saxton R E, Fetterman H R *et al.* *Laser Surg Med*, 1987; 7: 77

[本文于 1989 年 8 月 3 日收到]

“稀土元素灯辐照对 CHO 细胞集落形成率和 DNA 合成的影响”一文的图1及图 2

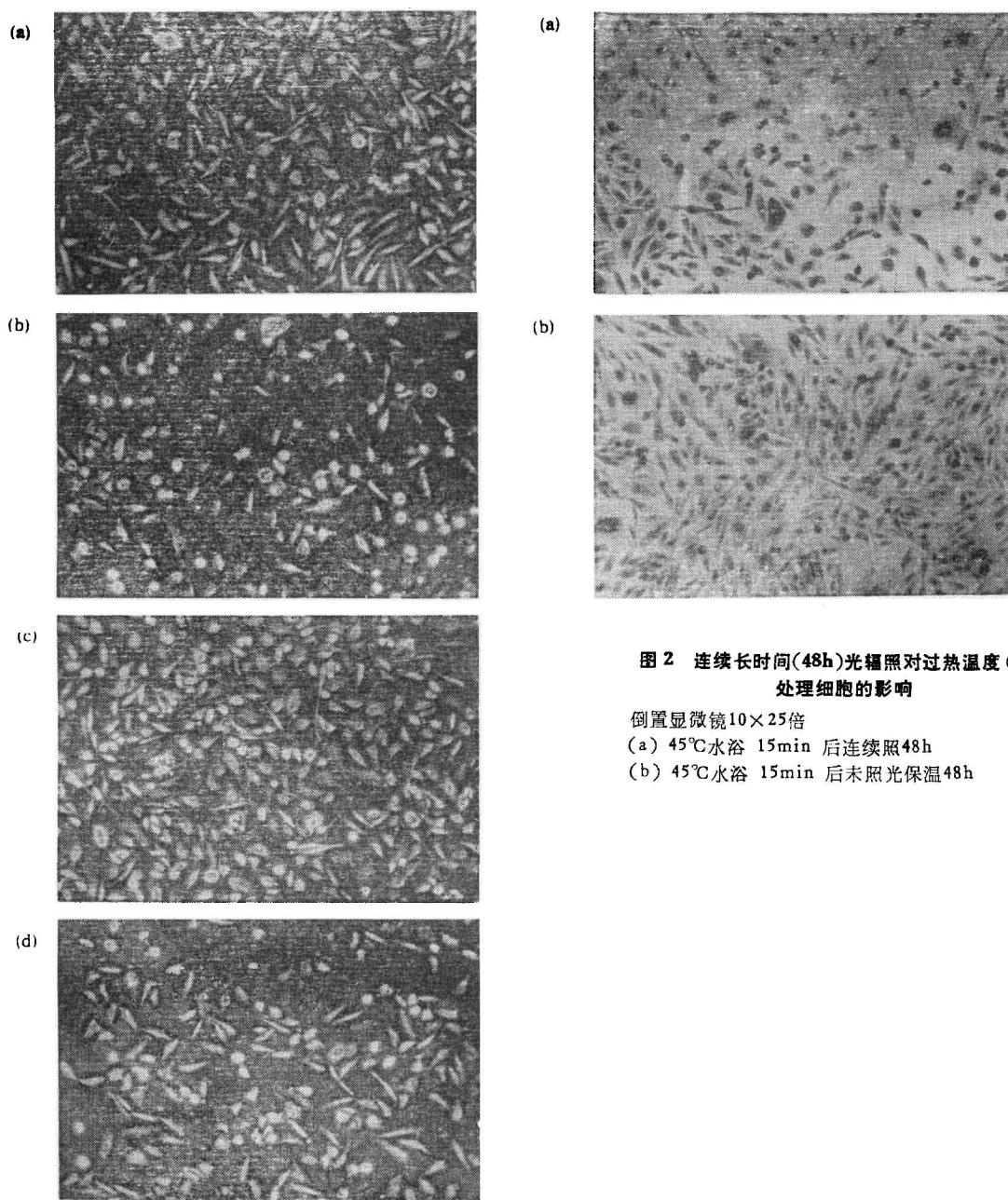


图 2 连续长时间(48h)光辐照对过热温度(45℃)处理细胞的影响

倒置显微镜10×25倍

(a) 45℃水浴 15min 后连续照48h

(b) 45℃水浴 15min 后未照光保温48h

图1 稀土元素灯辐照对过热温度处理 CHO 细胞形态学恢复的影响

Nikon 相差显微镜 6.7×10 倍

(a) 正常贴壁生长的 CHO 细胞,对照组

(b) 45℃水浴 20min 后未经照光

(c) 45℃水浴 20min 后光照1h

(d) 45℃水浴 20min 后光照 2h