

参 考 文 献

- 1 解用虹,王克勤. 生理科学进展, 1985; 16: 136
- 2 Utermann G. *Am Heart J*, 1987; 113: 433
- 3 解用虹,郭善一,吴茹莲等,中华医学杂志, 1989;69: 585
- 4 Gabelli C, Gregg R E, Zech L A *et al. J Lipid Res*, 1986; 27: 326
- 5 解用虹,何锦林,王克勤,生物化学与生物物理学报, 1987; 19: 272
- 6 Scanu A M, Edelstein C. *Anal Biochem*, 1971; 44: 576
- 7 Shelburne F A, Quarfordt S H. *J Clin Invest*, 1977; 60: 944
- 8 Weber K, Osborn M. *J Biol Chem*, 1969; 244: 4406
- 9 Havel R J, Eder H A, Bregdon J H. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345
- 10 Rall Jr S C, Weisgraber K H, Mahley R W. *Methods in Enzymology*, 1986; 128: 273
- 11 Weisgreber K H, Stanley Jr C R, Mahley R W *et al. J Biol Chem*, 1986; 261: 2068
- 12 Rall Jr S C, Weisgraber K H, Mahley R W. *J Biol Chem*, 1982; 257: 4171

三标记参入法及其在硒对淋巴细胞代谢影响研究中的应用

原 瑜*

(新乡医学院核医学教研室)

贾鹏翔 王德全

(西安医科大学核医学研究室,西安 710061)

提 要

分别以 ^3H -UR, ^{14}C -Leu, ^{125}I -UdR 为前体,采用三标记参入方法,更严格地在同一样品中同时观察了淋巴细胞染硒前后 DNA, RNA, 蛋白质的合成及变化。结果表明该方法可行,且显著提高了实验效率;三种受试硒化合物在 10^{-8} — 10^{-4} mol/L 浓度范围内对 DNA, RNA, 蛋白质合成均具有双相性影响,在中毒浓度时,三种硒化合物的毒性顺序为:亚硒酸钠>硒酸钠>硒蛋氨酸。

关键词 ^3H , ^{14}C , ^{125}I 三标记参入法,硒淋巴细胞, DNA, RNA, 蛋白质

以往多采用单标记或双标记的方法研究观察细胞的 DNA, RNA, 蛋白质的合成及其变化^[1-3]。本实验在原瑜等^[4]建立的 ^3H , ^{14}C , ^{125}I 三标记测量及淬灭校正方法的基础上,分别用 ^3H , ^{14}C , ^{125}I 标记参入 DNA, RNA, 蛋白质的前体,采用三标记参入方法,更严格地同时在同一份标本中观察研究了细胞染硒前后三种生物大分子的合成及影响规律。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂 亚硒酸钠 ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 硒酸钠 ($\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), 化学纯, 北京化工厂产品; 硒蛋氨酸, 分析纯, Sigma 公司产品; PHA, 重庆医学检验研究所产品; 淋巴细胞分离液, 上海试剂二厂生产。

1.2 放射性核素标记物 ^3H -尿苷 (^3H -UR), 比强度 18 Ci/mmol, 放化纯度 > 95%; ^{125}I -脱氧尿嘧啶核苷 (^{125}I -UdR), 放化纯度 > 95%, 放射性浓度 669 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 以上产品均由中国科学院原子能研究院生产。 ^{14}C -亮氨酸 (^{14}C -Leu), 放射性浓度为 140 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 中国医科院放射医学研究所生产。

1.3 培养基 1.1% RPMI 1640 (日本), 内含 20% 灭活小牛血清。

1.4 闪烁液 PPO-POPOP-二甲苯闪烁液, 加助溶剂乙二醇乙醚, 每瓶用量 5 ml。

1.5 主要仪器 LS-9000 型液闪谱仪 (Beckman), Gamma 5500 γ 闪烁计数器 (Be-

* 现通讯地址: 北京协和医院核医学部, 北京 100730

收稿日期: 1991-01-07 修回日期 1991-07-31

ckman), CO₂ 恒温培养箱 (SHELDON 国际有限公司, 美国)。

1.6 淋巴细胞的分离^[5-7] 取健康成人肝素抗凝全血, Hank's 液稀释 1 倍, 在盛有 3ml 淋巴细胞分离液的 15 ml 具塞刻度试管 (离心管) 中缓慢加入 6 ml 血液稀释样, 水平离心机 2500 r/min 离心 30 min, 将白膜层移入另一试管, 加入 5 倍于此体积的 Hank's 液, 1600 r/min 离心 10 min, 倾去上清液, 再用不完全 1640 培养液同法洗涤两次, 1640 完全培养基调节细胞密度至 1.5×10^6 细胞/ml, 分装 3ml/瓶, 其中有很少量红细胞。

1.7 淋巴细胞的培养^[8]及 DNA, RNA, 蛋白质前体的三标记参入法 分装好的淋巴细胞悬液, 加入青霉素、链霉素工作液各 200 μ l, 使其终浓度分别为 100 U/ml、100 μ g/ml, 置 CO₂ 孵箱内 37℃, 5% CO₂ 培养 24h, 然后分别加入配制好的亚硒酸钠、硒酸钠、硒蛋氨酸工作液 (Hank's 液配制) 200 μ l, 三种硒化合物的终浓度分别为 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-4} mol/L, 继续培养 42h 后, 每瓶加入 ³H-UR、¹⁴C-Leu、¹²⁵I-UdR 工作液各 200 μ l, 使其放射性终浓度分别为 37 kBq/ml, 18kBq/ml, 24kBq/ml, 培

养 6h 后结束培养, 每瓶加入冰冷生理盐水 4ml 2000 r/min 离心 10 min, 抽去上清液, 同法洗涤两次, 加入甲酸 0.5 ml、双氧水 0.1 ml, 置 37℃ 水浴箱内消化脱色 6h, 取 200 μ l 进行并型测量, 200 μ l 进行液闪测量, 然后借助计算机进行三标记数据处理, 分别求得 ¹²⁵I-UdR、³H-UR 和 ¹⁴C-亮氨酸参入 DNA, RNA, 蛋白质的 DPM 值, 并用对照组 DPM 值计算出细胞染硒后的相对百分抑制率:

$$\text{相对百分抑制率} = \frac{\text{对照组 DPM} - \text{处理组 DPM}}{\text{处理组 DPM}} \times 100\%$$

2 实验结果

2.1 三标记参入试验的放射毒性 (radio-toxicity) 问题 标记前体中的放射性核素 ³H, ¹⁴C, ¹²⁵I 在衰变过程中, 发射低能的 γ 射线和 β 射线, 对培养的淋巴细胞均有一定的辐射效应, 与单标记, 双标记相比, 三标记参入法加入培养基中的放射性标记前体较多, 单位细胞接受的辐射剂量将相应增加。表 1 是在相同的培养条件下, 观察单标记、双标记、三标记时对放射性标记前体参入 DNA, RNA, 蛋白质的影

表 1 双标记、三标记对前体参入 DNA, RNA, 蛋白质的影响

	单标记	双 标 记		三 标 记	
	DPM	DPM	Er%	DPM	Er%
¹²⁵ I-UdR 参入 DNA	23890±1976	23090±4054	3.3	23140±3977	3.1
³ H-UR 参入 RNA	37779±3031	36804±4141	2.6	38105±3500	-0.9
¹⁴ C-亮氨酸参入蛋白质	22944±1794	23036±2332	-0.4	22954±3423	-0.04

表内数据来源于 5 批实验, 每批内各浓度点为 2 个平行样本

表 2 不同硒化合物对 ¹²⁵I-UdR 参入淋巴细胞 DNA 的影响

分组	相 对 抑 制 率 (%)			
	10^{-4}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
亚硒酸钠	90.33±9.9 ¹⁾	43.29±8.78 ²⁾	1.94±5.4 ³⁾	-63.8±7.9 ³⁾
硒酸钠	60.23±6 ¹⁾	21.1±1.2	-24.97±2.6	-31.5±9.8
硒蛋氨酸	56.25±10.6	-5.92±4.6	-69.7±5.7	-42.5±5.9
蛋氨酸	-13.43±5.3	-10.16±6.4	-3.79±7.9	3.77±5.7

表内数值以平均值±标准差表示, 来源于 5 批实验, 每批内各浓度点均为 2 个平行样本

1) $P < 0.001$, 2) $P < 0.01$; 3) $P > 0.05$

表 3 不同硒化合物对 ^3H -UR 参入淋巴细胞 RNA 的影响

分组	相 对 抑 制 率 (%)			
	10^{-4}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
亚硒酸钠	$94.18 \pm 3.19^{1)}$	$56.43 \pm 8.16^{1)}$	$9.11 \pm 3.52^{2)}$	$-19.71 \pm 3.37^{1)}$
硒酸钠	$61.32 \pm 7.23^{1)}$	$23.78 \pm 2.89^{1)}$	$-0.49 \pm 0.82^{2)}$	$-23.76 \pm 7.88^{2)}$
硒蛋氨酸	$42.9 \pm 6.53^{1)}$	$12.21 \pm 2.94^{1)}$	$-8.55 \pm 2.2^{2)}$	$-24.5 \pm 9.4^{2)}$
蛋氨酸	$-10.05 \pm 10.59^{1)}$	$-10.48 \pm 3.3^{1)}$	$-2.33 \pm 8.5^{2)}$	$7.98 \pm 4^{2)}$

表内数值是平均值士标准差,来源于 5 批实验,每批各浓度点为 2 个平行样本

1) $P < 0.001$; 2) $P < 0.01$; 3) $P > 0.05$

表 4 不同硒化合物对 ^{14}C -亮氨酸参入淋巴细胞蛋白质的影响

分组	相 对 抑 制 率 (%)			
	10^{-4}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
亚硒酸钠	$89.39 \pm 10.7^{1)}$	$54.34 \pm 3.4^{1)}$	$10.17 \pm 7.89^{2)}$	$-39.27 \pm 10^{1)}$
硒酸钠	$49.14 \pm 3.5^{1)}$	$24.95 \pm 8.4^{1)}$	$-5.98 \pm 0.7^{2)}$	$-22.58 \pm 2.5^{2)}$
硒蛋氨酸	$38.97 \pm 5.3^{1)}$	$-15.03 \pm 10.57^{1)}$	$-69.5 \pm 7.3^{2)}$	$-59.89 \pm 6.5^{2)}$
蛋氨酸	$-38.7 \pm 9.6^{1)}$	$-19.9 \pm 10.1^{1)}$	$-6.37 \pm 1.5^{2)}$	$12.48 \pm 3.8^{2)}$

表内数据来源于 5 批实验,每批内各浓度点为 2 个平行样本。以平均值士标准差表示

1) $P < 0.001$; 2) $P < 0.01$; 3) $P > 0.05$

响。结果在单一标记前体存在(单标记)时,培养基中同时加入任意两种标记前体(双标记)和培养基中同时加入三种标记前体(三标记)三种情况下, ^3H -UR, ^{14}C -Leu, ^{125}I -UdR 对 RNA, 蛋白质、DNA 的参入无明显差异,误差(Er%)均在 5% 以内

Er% =

$\frac{\text{双标记或三标记时DPM} - \text{单标记 DPM}}{\text{单标记 DPM}}$

2.2 三种硒化合物对淋巴细胞 DNA 合成的影响 如表 2 所示,三种受试硒化合物在低浓度时均能促进 ^{125}I -UdR 对 DNA 的参入(抑制率为负值),高浓度时则可显著抑制其参入,亚硒酸钠的抑制作用最大, 10^{-4} mol/L 浓度时,相对抑制率达 90%,明显大于硒酸钠(60%)和硒蛋氨酸(56%),差异显著($P < 0.01$)。蛋氨酸对参入有促进作用。

2.3 硒化合物对淋巴细胞 RNA 参入的影响 三种受试硒化合物在受试浓度范围内,对 ^3H -UR 参入 RNA 具有明显的双相性影响,即低浓度促进前体参入,高浓度时则具有明显的抑制作用,如表 3 所示, 10^{-4} mol/L 浓度

时,亚硒酸钠的相对抑制率远大于硒酸钠和硒蛋氨酸,达 94%。三种受试硒化合物对 RNA 参入的毒性顺序为:亚硒酸钠>硒酸钠>硒蛋氨酸。蛋氨酸对前体参入 RNA 具有促进作用。

2.4 硒化合物对淋巴细胞蛋白质参入的影响 三种受试硒化合物在低浓度时均可促进 ^{14}C -亮氨酸参入蛋白质,尤以硒蛋氨酸的作用明显, 10^{-6} mol/L 浓度时即具有明显的促进参入作用, 10^{-7} mol/L 浓度时,其促进参入的百分率为对照组的 169.5%;在高浓度时,三种受试硒化合物则明显抑制前体参入蛋白质,亚硒酸钠的抑制作用最大, 10^{-4} mol/L 浓度时,其抑制率分别为 89% (亚硒酸钠),49% (硒酸钠),39% (硒蛋氨酸),差异显著。蛋氨酸对 ^{14}C -亮氨酸参入蛋白质具有明显的促进作用。

3 讨 论

在完整的细胞实验中,通常用放射性核素标记前体对大分子的参入来表示相应大分子的合成^[9],本实验分别采用 ^3H -UR、 ^{125}I -UdR、 ^{14}C -Leu 为参入淋巴细胞 RNA, DNA, 蛋白

质的前体,采用三标记参入法,能更严格地在同一份样品中同时观察细胞染硒前后 DNA, RNA, 蛋白质的合成及影响,以单标记时前体参入相应大分子的 DPM 值为对照,计算三标记时相应的前体参入生物大分子的 DPM 值之百分误差,结果均小于 5%,证明在三标记参入时,核素衰变所发射的核射线对细胞的辐射损伤及前体的同位素效应等对淋巴细胞的代谢尚未造成明显的影响,故该方法可行,与以往观察细胞 DNA, RNA, 蛋白质合成状况所采用的单标记参入法和双标记参入法相比,明显提高了实验效率,降低了实验成本,缩短了实验周期,在研究药物、毒物等对细胞 DNA, RNA, 蛋白质合成影响规律时,三标记参入试验的结果可比性更强、更具有说服力,且该方法简单易行,实用性强。

三种受试硒化合物对 DNA, RNA, 蛋白质的前体参入均具有明显的双相性影响,即在低浓度时可明显促进前体对相应生物大分子的参入,在高浓度时,则对其参入具有显著的抑制作用,且在同一浓度时,三种不同硒化合物的抑制作用存在着明显的差异,以亚硒酸钠的作用

最大其毒性顺序为:亚硒酸钠>硒酸钠>硒氨酸,与文献报道基本一致^[10-12]。

蛋氨酸在受试浓度范围内,均能促进前体参入相应生物大分子,硒蛋氨酸具有蛋氨酸的基本分子结构,这可能是硒蛋氨酸具有明显促进进行蛋白质合成、对淋巴细胞 DNA, RNA, 参入抑制作用较小的原因之一。

参 考 文 献

- 1 贾鹏翔等. 西安医学院学报, 1984; 5(4): 373
- 2 宋秀峰等. 西安医科大学学报, 1989; 10(3): 237
- 3 苏燎原等. 中华医学检验杂志, 1981; 4(2): 79
- 4 原 瑜等. 新乡医学院学报, 1990; 1: 39
- 5 刘学英等. 军事医学科学院院刊, 1981; 1: 235
- 6 朱炳法. 国外医学免疫学分册, 1980; 3(6): 287
- 7 Boyum A. *Scand J Clin Invest*, 1968; 21 (suppl): 99
- 8 郭 征主编. 组织培养技术. 第二版(修订本), 北京: 人民卫生出版社, 1988; 31
- 9 Hodgson E, Guthrie E E. *Introduction to Biochemical toxicology*. Elsevier North Holland: Inc. Elsevier 1984: 241
- 10 Mekechan W L et al. *Biol Trace Element Res*, 1985; 8: 19
- 11 Medina D, Oborn C J. *Can Res*, 1984; 44: 4361
- 12 Ostadalove I, Babicky. *Arch Toxicol*, 1980; 45: 207

植物瞬时生长速率测定仪的研制

张振瀛 李天玉 荆家海

(西北农业大学基础课部, 陕西杨陵 712100)

提 要

用差动变压器 (LVDT) 作为传感元件, 制成植物延伸生长瞬时生长速率测定仪, 具有线性好、测量快速准确、使用方便等优点, 是测定植物瞬时生长速率的一种新的仪器和方法。文中介绍了这种测定仪的基本原理和结构, 以及作者研制的 ZS-II 型植物瞬时生长速率测定仪的主要性能和实测结果。

关键词 瞬时生长速率, 位移传感器, 差动变压器

测定植物生长速率, 过去常用“水平显微镜”、“自记生长计”或者直接量度等方法^[1]。这些都是利用机械方法来量度一定时间间隔内植

物延伸生长的长度, 然后求其平均生长速率。这