

小鼠受 γ 射线腹部照射后 DNA 对肠腺再生的促进作用*

刘爱平 曾桂英 周元恺

(第四军医大学放射医学教研室, 西安 710032)

关键词 电离辐射, DNA, 肠腺, 再生

我们以前的实验证实, 小肠匀浆内含有能提高受照射小鼠肠腺存活率的因子^[1-3]。对小鼠小肠匀浆的生化分离和鉴定证实, 此因子为核酸类物质 (DNA, RNA) (曾桂英, 陈镛镛等, 待发表)。本文报道, 小鼠接受 γ 射线照射后 DNA 对肠腺再生的促进作用。

1 材料和方法

1.1 小肠 DNA 的提取 将正常小鼠全小肠洗净后用液氮冷冻, 制成匀浆, 以苯酚-氯仿-醋酸钾抽提及乙醇沉淀提取 DNA, 并用蛋白酶 K 及 RNase A 除去蛋白质和 RNA, 溶于 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 1 mmol/L EDTA-Na₂), 置 4°C 冰箱保存。DNA 制剂经紫外分光光度计分析, 其 A_{260} 与 A_{280} 的比值为 1.89—1.92。经琼脂糖凝胶电泳检测无 RNA 电泳区带。DNA 的浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 用紫外法测定。

1.2 小肠 DNA 的热变性 将提纯的小肠 DNA 于 100°C 水浴中加热 15 min, 置盐冰浴中速冷。

1.3 商品 DNA 小牛胸腺 DNA, λ DNA/EcoRI 及 pGEM-3zf(+)/DNA/Hae III 均为华美生物工程公司产品。

1.4 DNA 分子大小的测定 以 λ DNA 的 Hind III 酶切片段作为标准, 在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳上测定小肠 DNA 和胸腺 DNA 的分子大小。

1.5 动物条件 BALB/c 雄性小鼠, 10—12 周龄, 体重 18—22g。

1.6 照射条件 小鼠以 1% 戊巴比妥钠麻醉后, 用 ⁶⁰Co γ 射线进行腹部照射, 剂量率为 0.839—0.777 Gy/min。除腹部外, 躯体的其余部分被 5 cm 厚的铅块屏蔽。照射源至动物中心的距离为 1.7 m。

1.7 DNA 的注入方式 采用局部肠腔扩张注入法^[1]。简言之, 即小鼠于接受照射后 3h 内, 麻醉固定于手术板上, 腹正中切口, 找出距 Treitz 韧带远端 3—4 cm 处的一段长约 3 cm 的空肠, 以小动脉夹夹紧近端, 远端用手指固定, 在此肠段内注入 0.4 ml DNA

溶液, 使肠腔中度扩张约 10 s 后松夹, 其目的是让 DNA 制剂随肠腔内压力增加得以通过扩大的肠腺开口进入肠腺腔内。然后用丝线穿过肠系膜打结作为注入处肠段的标记, 最后缝合腹壁。照射对照组不作手术处理, 因为预实验已经证明, 照射后施行手术并注入空白对照液组同单纯照射组的肠腺存活率无显著差别。在本实验中, 注入局部肠腔内的 DNA 剂量均以 0.4 ml 内所含的 μg 数表示。

1.8 肠腺存活率测定 按实验设计需要, 于照射后第 4d, 或 8d, 12d 活杀小鼠, 取实验组小鼠的注入肠段和照射对照组小鼠的相应肠段, 用单位面积法测定肠腺存活率^[4]。

$$\text{肠腺存活率} = \frac{\text{照射肠片上的肠腺绒毛比}}{\text{正常肠片上的肠腺绒毛比}} \times 100\%$$

2 结果

照射后在小鼠局部肠腔内注入 DNA, 研究下列因素对肠腺存活率的影响。

2.1 DNA 的不同来源及不同注入剂量

小鼠接受 9.8 Gy 的腹部照射, 照射后第 4d 活杀小鼠, 测定肠腺存活率。每实验点的小鼠数为 5—6 只。实验结果见图 1。小鼠小肠 DNA 与小牛胸腺 DNA 两组的结果无统计差别。当剂量大于 0.2 μg 时, 随注入剂量的增加, 肠腺存活率也增加, 在 20—30 μg 时有一峰值。剂量再增加, 肠腺存活率随之下降; 但在剂量为 50—100 μg 时, 实验组同对照组的肠腺存活率仍相差显著 ($P < 0.05$)。注入 5 μg λ DNA/EcoRI 组同注入相同剂量小肠 DNA 和小牛胸腺 DNA 组的肠腺存活率无显著差别; 而注入 2.5 μg pGEM-3zf (+) DNA/Hae III 组则较注入 5 μg 或 10 μg 的小肠 DNA 或胸腺 DNA 组的肠腺存活率显著增高 ($P < 0.01$)。

2.2 照射剂量

小鼠接受腹部照射, 剂量为 9.0, 9.5, 10.0 及 10.5

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-09-17 修回日期: 1991-11-25

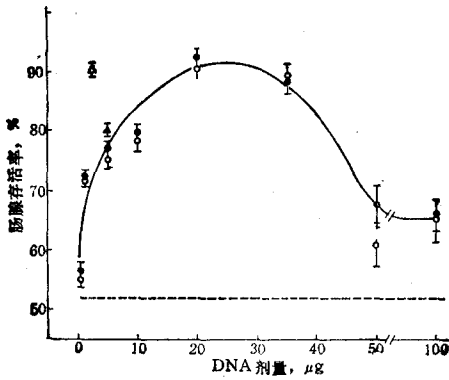


图1 照射后注入不同来源及不同剂量的DNA对受照小鼠肠腺存活率的影响
9.8Gy 腹部照射

- 小肠 DNA (小鼠)
- ▲ λDNA/EcoRI
- 照射对照
- 胸腺 DNA (小牛)
- △ pGEM-3zf (+) DNA/HaeIII

实验数据以 $\bar{x} \pm SE$ 表示,下同

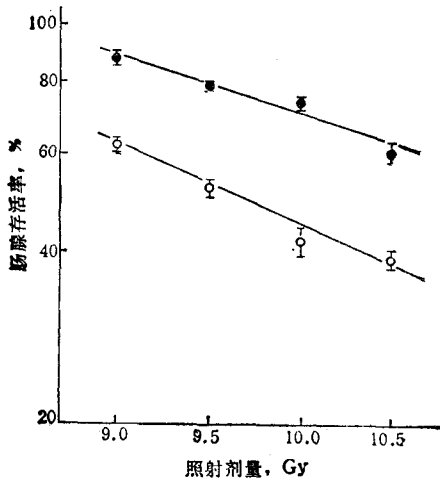


图2 照射后注入DNA受照小鼠肠腺存活率同不同照射剂量的关系
● 小肠DNA 20μg ○ 照射对照

Gy, 给实验组注入小肠 DNA 20 μg, 于照射后第4d 活杀小鼠, 测定肠腺存活率。每实验点的小鼠数为6 只。结果见图2。在半对数坐标上, 实验组和对照组的肠腺存活率均随照射剂量的增加呈直线下降。可以算出, 两组的 D_{50} 分别为 4.12Gy 和 3.12Gy; LD_{50} (降低肠腺存活率至50%) 分别为 11.32Gy 和 9.62Gy, 剂量减低系数(两者 LD_{50} 之比)为 1.18。

2.3 照射后不同时间

小鼠接受 9.8Gy 腹部照射, 分别于照后第4d, 8d 及 12d 活杀小鼠, 测定肠腺存活率。每实验点的小鼠数为4—6 只。结果见图3。照射后4—12d 内, 注入 10 μg 小肠 DNA 组及 10 μg 小肠 DNA 热变性组的肠腺存活率均维持在 85—90% 之间, 两者无显著差

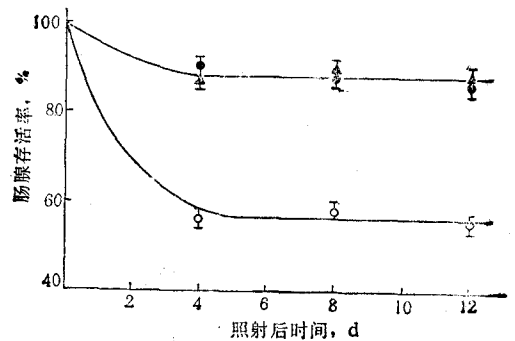


图3 照射后注入DNA, 受照小鼠肠腺存活率随照射后时间的变化
9.8Gy 腹部照射

- 小肠 DNA 10μg
- ▲ 热变性小肠 DNA 10μg
- 照射对照

别。照射对照组的肠腺存活率则维持在 55—60% 之间, 这同我们在小肠匀浆粗提液中所得到的实验结果相符^[1-3]。

2.4 DNA 分子大小

小鼠接受 9.8Gy 腹部照射。每实验点的小鼠数为5—6 只。结果见表1。

表1 DNA 分子大小同照射后小鼠肠腺存活率的关系 (9.8Gy 腹部照射)

DNA 来源	小鼠小肠 DNA	小牛胸腺 DNA	λDNA/EcoRI	pGEM-3zf (+) DNA/Hae III	照射对照
DNA 大小 (bp)	23 000—4 900	<23 000	21 226—3 530	587—11	—
DNA 剂量 (μg)	5	5	5	2.5	—
肠腺存活(%)	76.8±1.0	75.0±1.5	79.7±1.5	90.5±1.4	52.1±1.3

3 讨 论

以低等生物直至哺乳动物或细胞为实验对象, 核酸对辐射损伤具有预防和治疗作用, 已有很多报

道^[3-6]。在造血型剂量范围内, 核酸能明显提高存活率, 但影响疗效的一些因素及其作用机制仍无定论^[3-6]。至于核酸对肠道辐射损伤的作用, 特别是对肠腺的作用则研究甚少^[7]。我们采用局部腹腔扩张注

入法,通过肠腺开口使核酸进入肠腺腔内作用于肠腺细胞,此实验模型可在活体内较为直接地研究核酸(或其它药物)对受照射肠腺的存活率的影响,且用量甚微。而肠腺的存活实质上反映了小肠干细胞的存活。

图1和表1表明,小鼠小肠DNA,小牛胸腺DNA,λ噬菌体DNA/EcoRI及pGEM-3zf(+)质粒DNA/HaeIII都能提高受照射小鼠的肠腺存活率,说明不同来源的DNA都有疗效,这同文献上在其它实验对象所得到的结果一致。

由图1可知,随着小肠DNA和胸腺DNA注入剂量的增加,肠腺存活率也随之增高,达到峰值后,则随注入剂量的进一步增加而降低,呈钟形曲线。此结果表明,DNA对照射后肠腺细胞的有益作用有一最佳的剂量值。

一般认为,DNA的分子量越大,对急性放射损伤的疗效越好,但也有不同的意见^[4,9]。从图3可知,小肠DNA经热变性双链解链后,其活性并未降低。另一方面,表1和图1说明:小肠DNA,其分子大小在23000—4900bp之间,注入剂量为5μg;λDNA经EcoRI酶切成6个片段(21226,7421,5804,5643,4878及3530bp),注入剂量为5μg;pGEM-3zf(+)DNA经HaeIII酶切成13个片段(587,458,434,323,314,289,267,174,142,102,80,18及11bp),注入剂量为2.5μg,而后的肠腺存活率较前两者为高(P<0.01)。由于此实验并不是在等分子数目水平上所做的比较,因此还不能得出DNA的分子大小与其生物活性之间

具有依赖性的判断。但从中可以看出,小至数百个碱基对的DNA片段仍保持着提高肠腺存活率的活性。因此,我们在肠腺细胞所得到的实验结果,似并不支持DNA分子量越大效果越好的观点。至于最适的分子大小究竟是多少,当降解至单核苷酸或甚至更小组分时是否仍保持其活性,这是一个有兴趣的涉及核酸作用机制的问题,我们正在肠腺细胞上对此问题继续加以研究。

承智刚博士对原稿提出宝贵意见,陈萍同志在技术上予以协助,特此致谢

参 考 文 献

- 1 周元恺,韩士臣,曾桂英. 军事医学科学院院刊, 1987; (2):88
- 2 曾桂英,韩士臣,刘健. 辐射研究与辐射工艺学报, 1990;8(4):228
- 3 王 娇,周元恺. 军事医学科学院院刊,1990;14(3):174
- 4 周元恺,沈世仁. 生物化学与生物物理进展, 1979;(2):70
- 5 Petrovic D.In: Ebert M *et al.* eds, *Current topics in radiation research*, Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1968: 251
- 6 陈家佩. 国外军事医学资料第2分册 1973;(2):26
- 7 Кудрячев В Д. Гумвнюк Л И, Цыганков А П. *Радиобиология*, 1978; 18(1):92
- 8 Petrovic D, Ferle-Vidovic A, Habazin V *et al.* *Int J Radiat Biol*, 1970; 18(3):243

真核RNA聚合酶II无细胞体外转录体系的构建及其应用

王永俊* 琦祖和 沈翊珩

(中国医学科学院基础医学研究所,北京 100005)

关键词 全细胞提取物(WCE),无细胞转录体系,IL-2Rα基因

近年来,研究真核基因的转录调控已成为分子生物学的热点之一。为了研究DNA元件或蛋白质因子在转录过程中的作用,建立无细胞体外转录体系是十分必要的。到目前为止,发现至少有六种必需的蛋白质因子参与RNA聚合酶II的起始转录^[1]。绝大部分RNA聚合酶II的无细胞转录体系来自哺乳动物^[2]或果蝇^[3]的组织培养细胞的提取物。本文研究了人的白介素-2受体α链基因(IL-2Rα)在HeLa细胞提取物中的转录,所建立的体系也是研究其它真核基因的

表达调控之重要手段。

1 材料与方 法

质粒pJSG5,pD16均为本组构建。HeLa细胞系由本所生物物理室惠赠。限制性内切酶为本所内切

* 现工作单位: 中国人民解放军空军总医院分子生物学研究室,北京100036。

收稿日期: 1991-10-09 修回日期: 1992-03-02