

技术与方法

EB 荧光分析法测定肿瘤细胞
DNA 交联及增殖活性*黄建鸣 董玉宁 许峰¹⁾ 文浩¹⁾ 王瑾¹⁾ 郎锦义¹⁾

(四川省肿瘤研究所, 成都 610041)

摘要 应用 EB 荧光分析法测定体外培养人宫颈癌细胞株 (HeLa)、人白血病细胞株 (HL-60), 增殖性和非增殖性人外周血淋巴细胞 (PBL) 的 DNA 含量及其交联度 (DNA cross-link), 并据此研究不同增殖状态细胞与其 DNA 百分交联度 (ct%) 的相互关系. 结果显示, HeLa 细胞、HL-60 细胞、增殖性和非增殖性 PBL 的 DNA ct% 分别为 36.5、22.5、20.2 和 0, 表明不同增殖速度或周期的细胞具有不同的 DNA 交联反应, 而非增殖性细胞或 G₀ 期细胞不产生 DNA 交联反应.

关键词 恶性肿瘤, 细胞株, DNA 交联反应, 细胞增殖活性, EB 荧光分析法

恶性肿瘤细胞 DNA 含量和细胞群体的细胞增殖活性是判断肿瘤恶性程度、预后好坏的重要指标^[1,2], 肿瘤细胞在放射线或药物作用下细胞周期的移行变化对临床设计治疗方案和监测预后都具有重要意义^[3]. 目前对细胞群体的细胞增殖活性及增殖周期的移行特性的研究大多采用流式细胞分析术 (FCM). 但由于该分析术所使用仪器均系进口, 且价格昂贵, 尚不易推广. 作者利用溴化乙锭 (EB) 可与细胞双链 DNA (ds-DNA) 嵌合产生荧光反应^[4,5]以及交联 DNA (cross-link) 在 pH12 热变性后 ds-DNA 荧光回复的特性^[6,7], 测定细胞的 DNA 含量及其 ct%, 并据此研究了不同增殖速度或周期细胞与其 ds-DNA ct% 的相互关系.

1 材料与方法

1.1 试剂

牛胸腺 DNA, 系美国 Sigma 公司产品; RNase 购于华美生物工程公司; 溴化乙锭, 系瑞士 Fluka 产品; 肝素 (6250 IU/ml) 系成都制药三厂产品; 氯氨顺铂 (CDDP) 系中国齐鲁

制药厂产品; PHA 购于四川大学生物系; 人天然 IL-2 系本所研制产品.

1.2 细胞培养及实验方法

HeLa 和 HL-60 细胞株由本所分子药理室提供, 常规培养于含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中; 人 PBL 取自健康献血员外周血, 用 Ficoll 分离液 (比重 1.077) 常规分离制备 PBL; 增殖性 PBL, 先用 25 mg/L PHA 活化 PBL 使其表达 IL-2 受体, 再用 40 IU/ml IL-2 进行增殖培养至对数生长期. 细胞用含 0~200 μmol/L CDDP, 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 37℃, 5% CO₂ 培养 4 h 后, 收集细胞, 用预冷 PBS (0.15 mol/L NaCl, 0.71 mmol/L KH₂PO₄ 和 4.28 mmol/L K₂HPO₄) 离心洗二次备用.

1.3 EB 荧光测定

取 40 μl CDDP 处理后的细胞 (3×10⁵) 于 200 μl 细胞溶解液 (4 mol/L NaCl,

* 四川省卫生厅资助项目.

¹⁾ 四川省肿瘤医院放疗科, 成都 610041.

收稿日期: 1995-01-25, 修回日期: 1995-05-13

50 mmol/L KH_2PO_4 , 10 mmol/L 和 0.1% Sarkosyl 和 2 g/L RNase) 中, 37°C 水浴 16 h, 加入 25 μl 肝素 (500 IU/ml) 37°C 水浴 20 min, 而后加 3.0 ml EB 液 (EB 10 mg/L, 20 mmol/L K_2HPO_4 和 0.4 mmol/L EDTA, pH12), 100°C 水浴 5 min 后迅速冷却至室温, 用 RF-5000 型荧光分光光度计 (日本岛津) 于 λ_{ex} 为 525 nm 和 λ_{em} 为 580 nm 条件下测其荧光强度, 并按下式计算 DNA 的交联度 (ct%).

$$ct\% = \frac{f_t - f_n}{1 - f_n} \times 100\%$$

ct% 为 CDDP 处理过的细胞 ds-DNA 的百分交联度, f_t 和 f_n 分别为 CDDP 处理和未处理细胞热变性和未热变性的荧光比.

2 结 果

2.1 纯 DNA 和细胞 DNA 的荧光标准测定

未变性和变性纯 DNA 荧光标准测定显示, 当纯 DNA 浓度增加时, 其荧光强度随之增高, 二者呈线性正相关, 而变性 DNA 的荧光几乎消失 (图 1); HeLa、HL-60 细胞株、IL-2 诱导增殖的 PBL 及非增殖 PBL DNA 荧光标准测定显示, 细胞浓度均与其荧光强度呈线性正相关 (图 2).

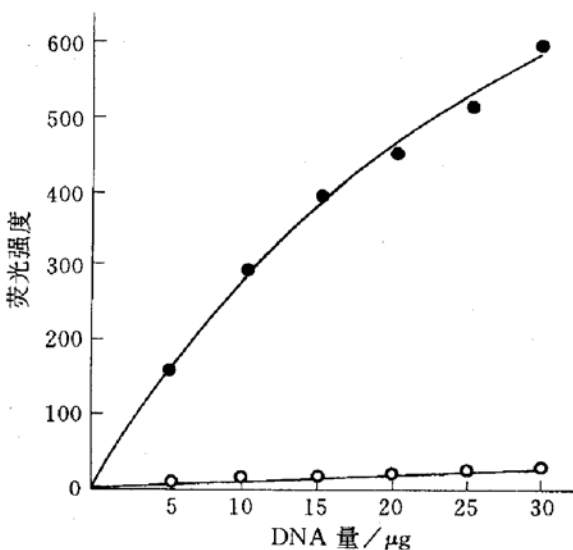


图 1 未变性和变性纯 DNA 与荧光强度的关系
●—●: 未变性 DNA; ○—○: 变性 DNA.

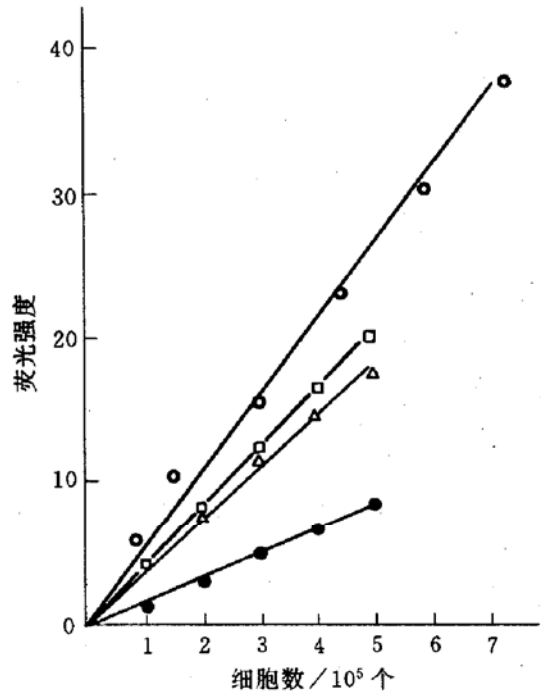


图 2 不同细胞的 DNA 含量与荧光强度的线性关系

○—○: HeLa 细胞株; □—□: HL-60 细胞株; △—△: 增殖的 T 细胞; ●—●: PBL.

2.2 细胞 DNA 交联度的测定

CDDP 作为作用于 G_1 期细胞的交联剂可与 HeLa, HL-60 和增殖性 PBL 形成 DNA 链内交联, 而不与非增殖性 PBL (G_0 期细胞) DNA

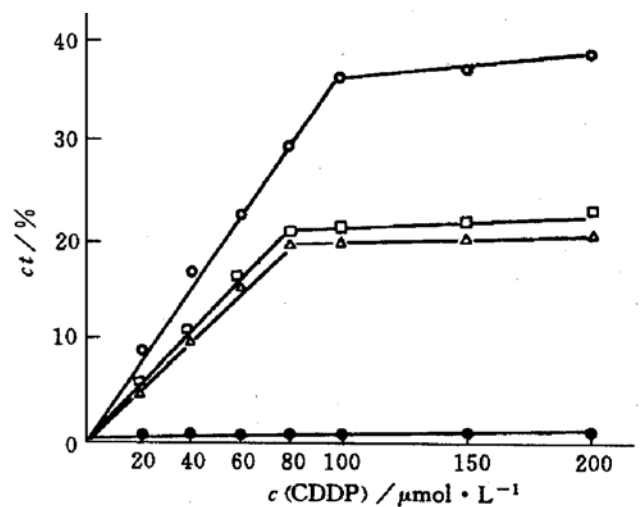


图 3 不同浓度 CDDP 与不同细胞 ds-DNA ct% 的相互关系

○—○: HeLa 细胞株; □—□: HL-60 细胞株; △—△: 增殖的 T 细胞; ●—●: PBL.

形成交联. 不同的增殖细胞形成不同的 *ct*% (图 3). HeLa、HL-60 细胞株和增殖性 PBL 的 *ct*% 与 CDDP 的浓度 (分别为 0~100 μmol/L、0~80 μmol/L 和 0~80 μmol/L) 呈线性相关, 大于最大线性 CDDP 浓度后, 其交联度不再增加而形成平台.

2.3 不同细胞 DNA 含量及其 *ct*% 的比较

在上述条件下, 作者测定了单位细胞数 (1×10^6 细胞) 的 DNA 荧光及其各细胞最大线性 CDDP 浓度时的 *ct*% (表 1). HeLa 细胞, HL-60 细胞及增殖性 PBL 的 DNA 荧光分别比非增殖性人 PBL 的 DNA 荧光高 3.1 倍、2.46 倍和 2.18 倍; 人 PBL 作为非增殖的 G_0 期细胞未表现出与 CDDP 产生 DNA 链内交联; HeLa 细胞的 *ct*% 比 HL-60 细胞和增殖性 PBL 分别高 1.62 倍和 1.8 倍, 这可能与细胞增殖周期不同有关.

表 1 不同细胞的 DNA 含量和 ds-DNA *ct*% 的比较

	HeLa	HL-60	增殖性 PBL	非增殖性 PBL
<i>FI</i> ¹⁾	51.62±1.6	40.8±1.0	36.2±2.05	16.6±0.45
DNA <i>ct</i> %	36	22.5	20.2	0

¹⁾单位细胞数 (1×10^6 细胞) 的 DNA 荧光.

3 讨 论

作者探讨了用 EB 荧光分析法测定不同细胞群体的 DNA 含量及其 DNA 链内交联并据此研究细胞增殖活性的可能性. 结果显示, 本文所测的 4 种细胞群体的平均 DNA 含量不同 (表 1), 这与细胞的来源, 增殖或非增殖以及增殖性细胞群体中各时相细胞的比例不同有关, 如非增殖性 PBL 转变成增殖性 PBL, 其 DNA 含量明显升高; 当增殖性细胞群体发生细胞周期移行使细胞群体各时相细胞比例变化, 其平均 DNA 含量也会相应升高或降低; CDDP 可与增殖性细胞群体中 G_1 期时相的细胞 DNA 产生共价结合形成 ds-DNA 链内交联^[8,9]. 增殖周期或速度不同的细胞群体中 G_1 期时相细胞

比例不同, 其 *ct*% 不同 (表 1), 而非增殖性细胞或 G_0 期细胞不产生 ds-DNA 链内交联, 非增殖性细胞一经转变成增殖性细胞, 其交联反应就会出现, 如非增殖性 PBL 转变成增殖性 PBL, 其交联度由 0% 升到 20.2%. 同理, 当增殖性细胞群体发生细胞周期移行使 G_1 期时相细胞比例发生变化, 其 *ct*% 也应随之变化. 如照射对细胞的影响主要阻滞在 G_2 期, 此时细胞大多处在高含量 DNA 时相, 其平均 DNA 含量就会升高, *ct*% 就会下降. 作者已对 HeLa 细胞照射后 DNA 含量及其 *ct*% 的变化进行了研究, 结果将另文介绍. 以上结果表明, 应用 EB 荧光分析法测定细胞群体的平均 DNA 含量, 及其 ds-DNA 的 *ct*% 来初步判断细胞增殖活性和增殖周期的移行变化是一种操作简便和行之有效的方法.

参 考 文 献

- 1 Barlogie B, Drewinko B, Schumann J *et al.* Am J Med, 1980; **69**: 195
- 2 Barlogie B, Gohde W, Johnston D A *et al.* Cancer Res, 1978; **38**: 3333
- 3 Atkin N B, Kay R. Br J Cancer, 1979; **40**: 210
- 4 Lepecq J B, Paoletti C. Anal Biochem, 1966; **17**: 100
- 5 Karsten U, Wollenberger A. Anal Biochem, 1977; **77**: 464
- 6 Morgan A R, Pulleyblank D E. Biochem Biophys Res Comm, 1974; **61**: 396
- 7 de Jong S, Zulstra J G, Timmer-Bosscha H *et al.* Int J Cancer, 1986; **37**: 557
- 8 Steel G G. Growth kinetics of tumours. Oxford: Clarendon Press, 1977: 268~306
- 9 Dethlefsen L A. Cell cycle effects of drugs. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Frankfurt: Pergamon Press, 1986: 44~333

Detection of DNA Cross-link and Proliferative Activity in Tumor Cell with EB-Fluorescence Assay. Huang Jianming, Dong Yuning (Department of Biochemistry, Sichuan Cancer Institute, Chengdu 610041, China); Xu Feng, Wen Hao, Wang Jin, Lang Jinyi (Sichuan Cancer Hospital, Chengdu 610041, China).

Abstract The detection of DNA contents and ds-DNA cross-link in HeLa line, HL-60 line, proliferative and non-proliferative T lymphocytes with EB-fluorescence assay was investigated, and study on the correlation of cell proliferative activity with its ds-DNA cross-link was carried out as well. The results show that the percentages of ds-DNA cross-link in HeLa, HL-60 line, proliferative and non-

proliferative T lymphocytes were 36.5, 22.2, 20.2 and 0 respectively, and that the proliferative activity of cells has a relationship with their ds-DNA cross-link, and nonproliferative or G₀ phase cells do not produce ds-DNA cross-link.

Key words malignant tumor, cell line, DNA cross-link, proliferative activity of cell, EB-fluorescence assay

用钴卟啉修饰电极催化测定多巴胺等神经递质*

钱江红 刘海鹰 邓家祺

(复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要 将 5, 10, 15, 20-四-(3-甲氧基-4-羟基苯基)卟啉钴 (CoTMHPP) 修饰在玻碳电极表面, 制备成对多巴胺等神经递质有高灵敏度响应的 CoTMHPP 修饰电极. 电极具有灵敏度高、响应快、稳定性好等特点. 电极响应时间小于 10 s, 儿茶酚类化合物的检测浓度为 10^{-6} mol/L.

关键词 钴卟啉, 修饰电极, 儿茶酚

近年来, 修饰电极作为生物传感器的基础电极及其应用越来越受到重视, 因为它可以提供快速电子转移的表面来催化底物反应^[1,2]. 许多新颖的具有特殊功能的电子传递体不断地被合成和应用^[3~5]. CoTMHPP 是一种新型的钴卟啉, 它对儿茶酚类具有良好的电催化氧化作用. 测定儿茶酚类化合物最主要的方法是高效液相色谱法^[6,7], 也有人曾利用组织电极法进行测定^[8,9], 而采用化学修饰电极法的不多^[10], 在玻碳电极上修饰钴卟啉并系统地研究儿茶酚类神经递质的电催化特性未见报道. 本文首次对 5 种儿茶酚类的电极性质进行了分别试验, 该修饰电极对 L-抗坏血酸也有较好的电催化作用, 但再在此修饰电极的表面上修饰一层 Nafion 膜, 就可以去除抗坏血酸的干扰, 而电极的灵敏度没有受到影响.

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

FDH-3204 型循环伏安仪 (复旦大学科教仪器厂), TYPE 3086 函数记录仪 (日本横河公司).

CoTMHPP 的制备方法参见文献 [11], 多巴胺 (瑞士进口分装)、肾上腺素、去甲肾上腺素、异丙肾上腺素 (上海天丰制药厂), 其余试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水.

1.2 电极制备

将玻碳电极在金相砂纸上打磨, 用氧化铝悬浊液把电极表面抛光成镜面, 然后依次用 1:1 HNO₃、丙酮、二次蒸馏水清洗, 在室温下

*国家自然科学基金和长春应用化学研究所电分析开放实验室资助课题.

收稿日期: 1995-01-25, 修回日期: 1995-09-11