

## THE ESTABLISHMENT OF HGPRT MUTANT FROM HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELL LINE (CCL187)

HE Wu SONG Jin Dan

(Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China)

### ABSTRACT

The wild type of human colorectal carcinoma CCL187 cells were treated firstly by a chemical carcinogen EMS for the induction of mutagenesis, then the mutant cells were selected in the medium containing 8-AG at the concentration of 20 $\mu$ g/ml. After six months' screening, the HGPRT mutant line MCL187 was established. It was found that the mutant cells could grow vigorously in the medium containing 8-AG (20 $\mu$ g/ $\mu$ l) but not in HAT medium. The HGPRT assay showed a significant quantitative difference between the HGPRT mutant cells and the wild type. Expression of tumor associated antigen LEA on the HGPRT mutant cells was similar to that on the wild type.

Key Words: Human cell line HGPRT mutant Colorectal carcinoma Tumor associated antigen

## 脉冲电场对真皮成纤维细胞生长和膜流动性的影响

张红锋 陈树德\* 王耀发 陈家森\*

(华东师范大学生物系\*物理系 上海 200062)

低频电磁场的生物效应是一个相当复杂的问题,已有报道表明,电刺激可以影响生物大分子(包括DNA, mRNA和蛋白质)的合成,酶活性, Ca<sup>2+</sup>运输,细胞增殖等<sup>[1]</sup>。Cadossi<sup>[2]</sup>研究了低频脉冲电场(E=4mV/cm和E=50mV/cm)对人淋巴细胞增殖的影响。Borgens等<sup>[3]</sup>发现脉冲电场对神经再生也起着重要作用。低频电磁场对大肠杆菌和肿瘤细胞的增殖也表现出相似的生物效应<sup>[1]</sup>。我们曾研究过脉冲电场对表皮细胞增殖能力的影响<sup>[4]</sup>,本文在真皮成纤维细胞上进一步进行实验,并对两组结果做了比较研究。

脉冲电场引起细胞膜电位的改变,引起细胞膜通透性的变化<sup>[5]</sup>,生物工程中外源基因的导入和细胞融合都采用脉冲电场。我们以荧光偏振方法,结合上述增殖实验的结果,选择了电场作用5分钟(即显著促进细胞增殖)和45分钟(即显著抑制细胞增殖)这两个条件,研究脉冲电场对细胞膜流动性的影响。生物膜的流动性是膜结构行使功能的基础,它与受体的运动

和信号传递,蛋白质通道的开闭和细胞内外物质运输等代谢活动密切相关。通过这方面的研究,将有助于在细胞水平上揭示低频电磁场的作用机理。

### 材料和方法

#### 一、真皮成纤维细胞的离体培养

皮肤组织取自包皮环切手术,于D-Hank's液中洗尽血迹,剪成2 $\times$ 2mm<sup>2</sup>的皮肤组织块,真皮面朝下贴于培养瓶底部,37 $^{\circ}$ C静置3-4小时,使组织块紧紧粘于瓶底,加入含20%小牛血清的MEM(GIBCO)培养基5ml/瓶,37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub>培养箱恒温培养。待组织块周围的细胞生长晕扩展以后,可进行传代培养,获得稳定生长的真皮成纤维细胞。

#### 二、脉冲电场作用实验

实验中所采用的f=50Hz, t=20 $\mu$ s, E<sub>pp</sub>=1V/m的脉冲电场来自我们自己研制的脉冲电场发生器。该脉冲电场加在二圆形平板电极上,实验组样品细胞培养板(或培养瓶)置于二圆形平板电极之间。对实验组细胞进行电场处理时,对照组和实验组细胞同时从培

养箱中取出,置于室温下相同的时间,即待各实验组样品电场处理完毕后,对照组和各实验组样品再同时放入37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱继续培养。在研究电场影响细胞生长的实验中,将真皮成纤维细胞传代于96孔培养板,对照组和各实验组样品均由48孔组成,以便对实验结果进行统计分析。电场处理时间分别为1,5,10,15,30和45分钟。电场处理后继续培养5天,进行MTT(噻唑蓝)比色分析。在研究电场影响膜流动性的实验中,将真皮成纤维细胞传代于培养瓶,每3瓶细胞为一组,分成对照组和实验组(电场处理5或45分钟),进行荧光偏振度测定。

### 三、MTT比色分析法检测细胞增殖<sup>[4]</sup>

用无血清MEM培养基配制浓度为5mg/ml的MTT溶液。在样品细胞培养5天以后,同时将每孔的培养液换成100 $\mu$ l的MTT溶液,37℃继续培养4小时以上。吸去上清液,用100 $\mu$ l/孔二甲亚砷充分溶解甲替结晶。用酶联免疫检测仪测定各孔在570nm处的光密度值。按公式:  $CP = \frac{\bar{X}_x - \bar{X}_y}{\bar{X}_y} \times 100\%$ , 计算细胞增殖变化百分率。式中 $\bar{X}_x$ 为实验组样品光密度值的平均值, $\bar{X}_y$ 为对照组样品光密度值的平均值。并用t检验确定实验组样品和对照组样品之间差异的显著性。

### 四、荧光偏振法检测膜流动性<sup>[7,8]</sup>

1. 配制DPH液: 将1,6-二苯基-1,3,5-乙三烯(DPH,SIGMA公司)配成 $2 \times 10^{-3}$ mol/L四氢吡啶贮存液,放于4℃冰箱中。使用时用pH7.0的D-Hank's液稀释成 $2 \times 10^{-6}$ mol/L DPH使用液。

2. 荧光偏振度P的测定 当传代的真皮成纤维细胞长满培养瓶底以后,经胰酶消化制成细胞悬液,每3瓶细胞为一组,分成对照组和实验组进行实验。实验组在电场处理5或45分钟以后,即刻或室温继续培养30分钟以后,分别离心(1500rpm,10min)收集细胞。每瓶细胞(约 $5 \times 10^5$ cells)加2ml  $2 \times 10^{-6}$ mol/L DPH,25℃温育30分钟,再用D-Hank's液洗涤一次,最后悬浮在3ml D-Hank's液中。用日立-850型荧光分光光度计测定荧光偏振度P。激发波长362nm,发射波长432nm,分别测得 $I_{11}, I_{1\perp}, I_v, I_H$ 四组荧光偏振光强度。计算校正系数 $G = I_v/I_H$ ,由公式  $P = \frac{(I_{11} - GI_{1\perp})}{(I_{11} + GI_{1\perp})}$ , 计算荧光偏振度P。

## 结果和讨论

### 一、表1为不同作用时间的脉冲电场影响

真皮成纤维细胞增殖能力的实验结果,从对照组和电场处理组的光密度值的平均值可以看出,脉冲电场对细胞的分裂能力起着增强或抑制的双向调节作用。这种调节作用与电场处理时间有关。脉冲电场作用1分钟和5分钟,均产生促进细胞增殖的效果,增加百分率分别为+6.28%和+12.04%。而较长时间 $t \geq 10$ 分钟的作用则显著抑制细胞的正常增殖,电场作用10,15,30和45分钟的抑制百分率分别为-16.33%, -24.37%, -48.29%和-54.21%。我们在成纤维细胞上重复了三次实验,所得结果完全一致。电场作用10分钟是一个转折点,当 $t < 10$ min,产生促分裂作用, $t \geq 10$ min,产生抑制分裂的效果。本结果与我们在脉冲电场影响表皮细胞生长能力的实验中所得出的结论基本一致<sup>[4]</sup>。在表皮细胞,受相同的脉冲电场作用1和5分钟,促使细胞增殖能力提高22.0%和12.0%,而较长时间( $t \geq 10$ 分钟)的作用则抑制细胞的分裂活动。并且随电场作用时间的延长,抑制百分率增大。

脉冲电场影响细胞增殖的作用机理,可能表现在直接作用和间接作用两个方面,一是电场直接作用于细胞结构和生化反应。沈海红等<sup>[9]</sup>发现脉冲电场影响鸡胚胎细胞cAMP含量和Ca<sup>2+</sup>通道的活动。说明电场刺激有可能通过影响细胞的信号系统,改变细胞的增殖能力。另一方面,脉冲电场有可能对细胞周围的环境产生了影响(如培养液的理化特性)进而再间接地影响那些促进或抑制细胞生长的效应。已有报道<sup>[10]</sup>提出脉冲电场可以改变水等基质的理化特性,如介电常数,导电率,渗透压,紫外、荧光光密度值等。因此电场对细胞的作用是诸多促进细胞生长的生物效应和抑制细胞生长的效应的综合表现,也是直接作用机制和间接作用机制的综合表现。在短时间的脉冲电场作用下,促进细胞增殖的生物效应起主导作用,而在长时间电场作用情况下,抑制细胞生长的效应大于促进细胞生长的效应,结果导致细胞增殖受抑制。

### 二、脉冲电场对膜动力学的影响的实验结

果表明(表2),在电场作用后即刻测得的荧光偏振度P说明,脉冲电场作用5分钟,使真皮成纤维细胞的膜流动性显著增加( $P < 0.05$ ),而电场作用45分钟对膜的流动性没有明显影响( $P > 0.25$ )。然而,电场作用以后继续培养细胞30分钟,发现电场作用5分钟引起的细胞膜流动性增加得到恢复( $P > 0.2$ ),而电场作用45分钟,则导致膜流动性的明显降低( $P < 0.02$ )。

结果表明,电场促使细胞膜流动性增大的效果表现得较快,而降低膜流动性的效果表现在处理后的30分钟。可见,电场引起膜流动性增加和减慢的机理是不相同的。短时间( $t = 5\text{min}$ )脉冲电场处理,可以增加细胞膜的流动性,而撤除电场以后,膜的流动性会逐渐恢复到对照组水平。在脉冲电场作用下,磷脂分子等生物大分子有可能发生极化和沿电场方向的重新排布等现象,从而导致膜脂分子的流动性增大。而较长时间( $t = 45\text{min}$ )的电场处理后,可能对细胞周围的环境产生了影响,如自由基的发生

等,导致膜脂分子中不饱和脂肪酸的过氧化,最终引起膜脂分子的固化,这是一种累积的变化过程,所以电场所引起的膜流动性减慢发生在电场处理之后的一段时间间隔(约30分钟)以后。

我们选择了脉冲电场处理5分钟和45分钟两种条件,观察其对膜流动性的影响,目的在于了解膜流动性的改变与细胞增殖能力的改变之间有无相关性。结果发现,电场作用5分钟,可以促进真皮成纤维细胞分裂,膜流动性也显著增加。而电场作用45分钟,可以抑制细胞分裂,膜流动性则明显降低。由于膜流动性的增加促进了细胞内外物质的运输和信号转换,从而使细胞的代谢活动变得旺盛<sup>[11]</sup>。膜脂分子的固化则会影响膜蛋白(包括受体、酶和载体蛋白)的功能表现,从而进一步影响那些调控细胞周期的重要环节。因此,我们认为膜流动性的改变可能对细胞增殖能力的变化有一定的影响。

表1 不同作用时间的脉冲电场对细胞增殖的影响

组号	1	2	3	4	5	6	7
电刺激时间 $t(\text{min})$	0	1	5	10	15	30	45
O.D 值( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )	0.140 $\pm 0.040$	0.149 $\pm 0.058$	0.157 $\pm 0.042$	0.117 $\pm 0.020$	0.106 $\pm 0.029$	0.073 $\pm 0.061$	0.064 $\pm 0.020$
CP(%)		+6.28	+12.04	-16.33	-24.37	-48.29	-54.21
P 值		$P < 0.05^*$	$P < 0.001^*$				

\* 差异显著,  $n=48$

表2 脉冲电场对细胞膜流动性的影响

电刺激时间 $t_1(\text{min})$	0	5	45	0	5	45
刺激后培养时间 $t_2(\text{min})$	0	0	0	30	30	30
荧光偏振度 P	0.243 $\pm$ 0.011	0.227 $\pm$ 0.012	0.249 $\pm$ 0.020	0.250 $\pm$ 0.008	0.243 $\pm$ 0.020	0.270 $\pm$ 0.070
P 值		$P < 0.05^*$	$P > 0.25$		$P > 0.2$	$P < 0.02^*$

\* 差异显著,  $n=6$

## 摘 要

采用 MTT 比色分析法检测脉冲电场( $f=50\text{Hz}$ ,  $t=20\mu\text{s}$ ,  $E_{pp}=1\text{V/m}$ ),对真皮成纤维细胞增殖的影响,结果表明,电场作用1分钟和5分钟,均产生促进细胞增殖的效果( $P < 0.05$ 和

$P < 0.001$ ),而较长时间( $t \geq 10$ 分钟)的电场作用则显著抑制细胞的正常增殖( $P < 0.001$ )。

采用荧光偏振法研究了脉冲电场对真皮成纤维细胞膜流动性的影响。结果表明,电场作用5分钟后即刻引起膜流动性的显著增加。而电场作用45分钟后,需经过一段时间的温育(30

分钟),才表现出膜流动性的降低。说明不同作用时间的电场可以造成膜流动性的增加或降低,而且对膜流动性的影响是可逆的。我们认为,脉冲电场所引起的膜流动性改变是细胞分裂能力发生变化的原因之一。

关键词:脉冲电场 MTT比色分析法 荧光偏振度 膜流动性

### 参 考 文 献

- [1] Berg, H. and Zhang, L., 1993, *Electro-and magnetotology*, 12(2):147.
- [2] Cadossi, R. et al., 1985, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 14:115.
- [3] Borgens, R. B., Tombs, J. P., Blight, A. R., 1993, *Restr. Neurol.*, 5:305.
- [4] 陈树德,张红锋,生物物理学报(待发表).
- [5] 马志章,蒋承竣,1996,细胞生物学杂志, 18(3):111.
- [6] Green, L. M., 1984, *J. Immunol Methods.*, 70:256.
- [7] Pritchard, K. A., Steven, J. R., 1991, *Am. J. Physiol.*, 260:43.
- [8] 林克椿,聂松青,1981,生物化学与生物物理进展, 6:32.
- [9] 沈海红等,1996,生物物理学报, 12(3):544.
- [10] Chiabrera, A., Nicolini, C. and Schwan. H. P., 1985, *Interactions between electromagnetic field and cells*, Plenum Press, New York.
- [11] 洪水根,汪德耀,1994,膜分子生物学,厦门大学出版社。

## THE EFFECTS OF PULSED ELECTRIC FIELD ON DERMAL FIBROBLAST PROLIFERATION AND MEMBRANE FLUIDITY

ZHANG Hong Feng CHEN Shu De\* WANG Yao Fa CHEN Jia Sen\*  
(Biology Department, \*Physics Department, East China Normal University)

### ABSTRACT

The effect of pulsed electric field ( $f=50\text{Hz}$ ,  $\tau=20\mu\text{s}$ ,  $E_{pp}=1\text{V/m}$ ) on dermal fibroblast proliferation was investigated by the MTT colorimetric assay. It was found that the cell proliferation can be improved in short exposure time ( $t<10\text{min}$ ), but inhibited in longer exposure time ( $t\geq 10\text{min}$ ). We also examined the membrane fluidity with fluorescence polarization. The results demonstrated that the low frequency pulsed field can affect the membrane fluidity, and the membrane fluidity is changed in correspondence with the alteration of cell proliferation.

Key words: Pulsed electric field MTT colorimetric assay Fluorescence polarigation, Membrane fluidity

## 紫外照射对 DNA 修复基因 RAD24 转录的影响\*

朱应葆 韩云 傅欣 贾廷珍 童坦君\*\*

(北京医科大学第三临床医学院 北京 100083)

到目前为止,人们对原核生物大肠杆菌 DNA 的修复已研究得相当清楚,但对真核细胞(包括人类细胞)DNA 修复机制的阐明仍受到极大的限制<sup>[1]</sup>。酿酒酵母(*S. cerevisiae*)是单细

胞真核生物,它的基因组比较简单,易于操作,

\* 本课题获国家自然科学基金(No. 39670235)资助。

\*\* 北京医科大学生化与分子生物学系。