

表 1 染色体分布%

名 称	代 数	亚二倍体	二 倍 体	亚三倍体	超三倍体	超四倍体
SHG-44	67			13	83	4
NHG-1	1	9	1	36	46	8
	22	4		70	18	8
	35	88		1	11	
	40	84		9	7	
	45	94	2	3	1	
	50	87	2	8	3	

低温贮存移植瘤组织, 复苏培养再移植成功率 100%, 是一种简便、可靠的保存方法。

参 考 文 献

- [1] Giovannella B, et al., 1972, *J Natl Cancer Inst.*, 48: 1541.
- [2] Fogh J, et al., In "The nude mouse in experimental and clinical research" (J Fogh and BC Giovanella eds) Vol 1 New York: Academic press 1978: 215.
- [3] 杜子威等, 1984, 中华肿瘤杂志, 6 (4): 241.
- [4] 黄 强等, 1987, 中华肿瘤杂志, 9 (4): 269.
- [5] 徐庚达等, 1990, 肿瘤, 10 (4): 163.
- [6] 徐庚达等, 1991, 癌症, 10 (6): 473.
- [7] 马文雄等, 1991, 苏州医学院学报, 11(3): 179.
- [8] 马文雄等, 1992, 江苏医药, 18 (8): 4.
- [9] Sharkey F E, et al., *Cancer Res.*, 1979, 39: 833.

用 EndoV 和碱电泳法检测哺乳动物细胞 嘧啶二聚体的切除修复

严 涛 孙丽亚 崔立斌 魏 康

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

紫外线(UV)辐射是自然环境中重要的DNA致伤因子。UV辐射在DNA造成的最主要一类损伤产物是环丁烷嘧啶二聚体(pyrimidine dimer, PD), 它是由DNA中一条多核苷酸链上两相邻嘧啶碱基各自的C5和C6共价连接形成的环丁烷结构。哺乳动物细胞主要通过切除修复途径移除PD, 恢复DNA的正常结构。一种从噬菌体T4感染的E. coli中提取的T4核酸内切酶V(EndoV)能特异识别PD, 并在该损伤位点切断磷酸二酯键, 造成单链断裂^[1]。本文即以EndoV为探针, 以其敏感位点(endonuclease-sensitive-site, ESS)

的产生和消失作为PD生成及被切除修复的指征。EndoV作用引起的单链断裂用碱电泳定量测定。借此方法, 我们观察了三种人细胞(人宫颈癌细胞HeLa-S3, 正常人胚肺成纤维细胞HEL-9102, 人前髓白血病细胞HL-60)和两种啮齿动物细胞(小鼠乳癌细胞SR-1, 中国仓鼠卵巢细胞CHO-Y1)对嘧啶二聚体的切除修复过程, 其中三株细胞(SR-1, HEL-9102, HL-60)尚未见有这方面的工作报道。

材 料 与 方 法

1. 细胞培养、UV照射及保温修复 HeLa-S3

和CHO-Y 1 细胞均以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 接种于 75 mm 培养皿内培养(DMEM 培养液, 10%胎牛血清, 37°C , CO_2 培养箱, 5% CO_2)。SR-1 细胞(日本放射线医学总研究所佐藤毅博士惠赠)以 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 接种于 75 mm 培养皿内培养(RPMI 1640 培养液, 10%小牛血清, 5% CO_2)。细胞生长 2 天后, 弃培养液, 用 PBS 洗一遍, 紫外灯下照射(254 nm , $1.7 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$)。HEL-9102 细胞(本所刘国廉教授建系)以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 接种于 75 mm 培养皿培养(DMEM 培养液, 15%胎牛血清, 5% CO_2)。细胞生长 4—5 天后, 照射同上。HL-60 细胞以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 50 ml 培养瓶培养(RPMI 1640 培养液, 10%小牛血清, 5% CO_2)。生长 2 天后, 离心收集细胞, 以 PBS 悬浮细胞, 铺于 60 mm 平皿, 照射同上。照射后的细胞或在暗处和冰浴下立即离心收集, 或加入培养液继续 37°C 保温修复 4、8、24 小时, 然后离心收集细胞(1000 r/min , 8 min), -20°C 保存。

2. 提取细胞 DNA 参照 Komura 方法^[3], 在 eppendorf 管内进行, 每管 $0.5-2 \times 10^6$ 个细胞。

3. EndoV 作用及碱电泳 将每个 DNA 样品分取 2 管, 各含 $1.5 \mu\text{g}$ DNA, 其中一管加入 $10 \mu\text{l}$ EndoV(本室制备^[6], $0.06 \mu\text{g}$ 蛋白/ μl), 另一管加入酶反应缓冲液作为对照, 37°C 保温 2 小时, 然后加入 $1/10$ 体积碱性载样缓冲液 (0.5 mol/L NaOH , $5 \text{ mmol/L EDTANa}_2$, 12.5% Ficoll 400, 0.25% 溴甲酚绿)。上样至以碱性电极液 (30 mmol/L NaOH , $2 \text{ mmol/L EDTANa}_2$) 预平衡 1 小时的 0.4% 琼脂糖凝胶, 室温下电泳, 40 V , 2.5 小时, 电泳后将凝胶在 0.1 mol/L Tris (pH 8.0) 中浸泡中和 30 min, 移至溴乙锭溶液 ($1 \mu\text{g/ml}$) 中浸泡染色 1 小时, 长波紫外灯下照相。

4. ESS 计算 将激光光密度扫描仪 (LKB 2202) 与 IBM-PC 计算机联机, 由扫描仪对 DNA 电泳图谱负片进行密度扫描, 计算机进行数据处理。计算依据 Freeman 公式^[4]

$$L(x) = \frac{C}{x - x_0} - \frac{C}{x_\infty - x_0}$$

式中 C 为凝胶常数, x_∞ 和 x_0 分别为无穷长和零长度的 DNA 迁移距离。通过测量一组 DNA 分子量标准物的迁移距离, 按最小二乘法求解公式中各参数, 进而积分算出数均分子长度 (L_n), 最后根据下式算出每 kb DNA 中的 ESS

$$\text{ESS}/\text{kb} = 1/L_n(+\text{endo}) - 1/L_n(-\text{endo})$$

式中 $L_n(+\text{endo})$ 和 $L_n(-\text{endo})$ 分别为加酶组与不加

酶对照组的数均分子长度。

结 果

1. UV 照射引起的 ESS 我们在 HeLa-S 3 和 SR-1 细胞进行了 UV 辐射量效关系的测定。以 $5-80 \text{ Jm}^{-2}$ UV 照射细胞, DNA 上的 ESS 数量随照射剂量增加而逐渐增加。经 EndoV 作用后, 单链断裂增加, 碱电泳时表现迁移率增加(图 1)。在照射剂量与 ESS/kb 之间具有良好的线性关系, 回归方程分别为 $Y_{\text{HeLa-S}_3} = 0.561 X - 1.325$, $Y_{\text{SR-1}} = 0.485 X - 0.961$, 相关系数分别为 $r_{\text{HeLa-S}_3} = 0.993$, $r_{\text{SR-1}} = 0.996$ 。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

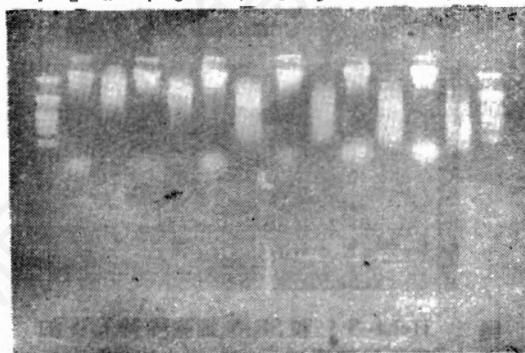


图 1 不同 UV 剂量所致 ESS 的碱电泳图谱 (SR-1)

UV 剂量分别为 5 (孔 2, 3), 10 (孔 4, 5), 20 (孔 6, 7), 40 (孔 8, 9), 60 (孔 10, 11), 80 (孔 12, 13) Jm^{-2} 。其中孔 3, 5, 7, 9, 11, 13 加 EndoV 处理, 余为不加酶对照。孔 1, 14 为分子量标准物, 从上到下依次为 T4DNA (160 kb), λ DNA (48.5 kb), λ DNA/Hind III 片段 (23.13, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03 kb)

2. 人细胞株 (HeLa-S 3 和 HEL-9102) 对 ESS 的切除修复

HeLa-S 3 和 HEL-9102 细胞经 10 Jm^{-2} 照射, 初始损伤位点相同, 为 $0.0547 \pm 0.0087 \text{ ESS}/\text{kb}$ 。照后分别给予 4、8、24 小时保温修复, HeLa-S 3 细胞表现出良好的切除修复能力(图 2-A)。照后 4、8、24 小时的修复率分别为 31.9%、61.8%、79.5%。其中以照后 8 h 内的修复最快, 占 24 小时总修复量的 77.7%, 在以后的 16 小时内修复速率逐渐减弱, 呈明显的快慢两相修复过程。

修复时间(h)	0	8	24
Endo V	- +	- +	- +

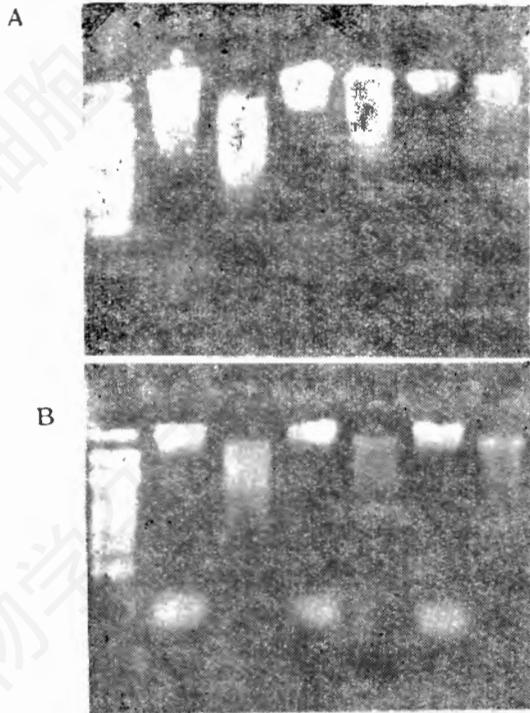


图 2 HeLa-S3 和 SR-1 细胞移除 ESS 的碱电泳图谱
A, HeLa-S3, B, SR-1

HEL-9102 细胞的修复能力略低于 HeLa-S3 细胞, 10 Jm^{-2} 照后 4、8、24 小时的修复率分别为 20.9%、46.7%、72%。t 测验各修复组 P 值均大于 0.05, 表明两株细胞的修复水平

修复时间(h)	- 0 +	- 4 +	- 8 +	- 24 +
Endo V				

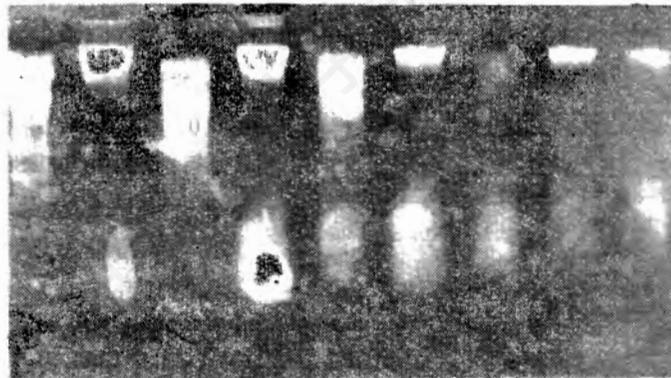


图 3 HL-60 细胞移除 ESS 的碱电泳图谱
(修复时间为 0、4、8、24 小时)

差别不显著。

3. 啮齿动物细胞株(SR-1, CHO-Y1)对 ESS 的切除修复: $10 \text{ Jm}^{-2}\text{UV}$ 照射在啮齿动物细胞引起 $0.0417 \pm 0.0068 \text{ ESS/kb}$ 。给予相同的保温修复条件, SR-1 细胞 4、8、24 小时的修复率分别为 18.5%、29.2%、51.7%。修复过程亦表现快慢两相, 照后 8 小时内修复量占 24 小时总修复量的 56.5%(图 2 B)。CHO-Y1 细胞的 8 和 24 小时修复率分别为 31.6% 和 48.9%, 与 SR-1 细胞近似。可以看出, 两株啮齿动物细胞的修复水平均低于人细胞, 24 小时总修复量约为入细胞同期修复量的三分之二。t 测验人细胞与啮齿动物细胞各修复组 P 值均小于 0.05, 表明两个种属修复水平差别显著。

4. HL-60 细胞对 ESS 的切除修复 HL-60 细胞具有独特的修复特征。由于 HL-60 细胞是悬浮在 PBS 中接受照射, 因此给予 $20 \text{ Jm}^{-2}\text{UV}$ 照射产生的 ESS 数 (0.057 ESS/kb) 与上述三株人细胞接受 $10 \text{ Jm}^{-2}\text{UV}$ 所产生的 ESS 数近似。照后经 4、8、24 小时保温修复, 细胞的 DNA 修复率分别为 11.8%、36.5%、55.9%(图 3), 明显低于前述两株人细胞, 而与啮齿动物细胞的修复率近似。同时在电泳图谱上还可以观察到 HL-60 细胞在修复过程中有明显的 DNA 降解, 此降解现象在 UV 照后 2 小时即已出现, 随保温时间延长,

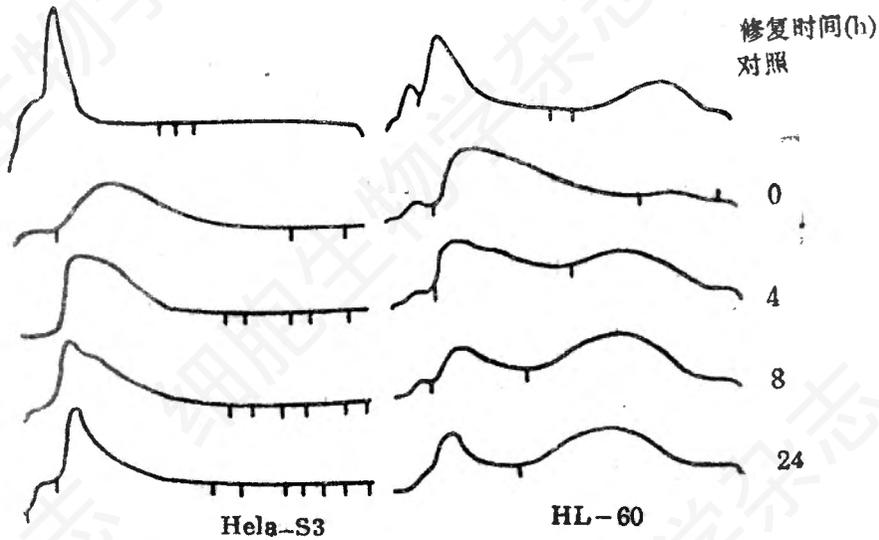


图4 HeLa-S3和HL-60细胞移除ESS的激光扫描图谱

降解程度加重,从电泳图谱上可见降解的DNA小于9 kb,在激光扫描图谱上,这一区域呈现一个相当大的峰(图4)。此降解现象在上述四种细胞株中均未见到,但同一现象曾见于人外周血淋巴细胞。

上述结果总结于表1和图5。

表1 五株哺乳动物细胞对ESS的切除修复

细胞株	修复率(%)		
	4 h	8 h	24 h
HeLa-S3	31.9	61.8	79.5
HEL-9102	20.9	46.7	72
HL-60	11.8	36.5	55.9
SR-1	18.5	29.2	61.7
CHO-Y1	-	31.6	48.9

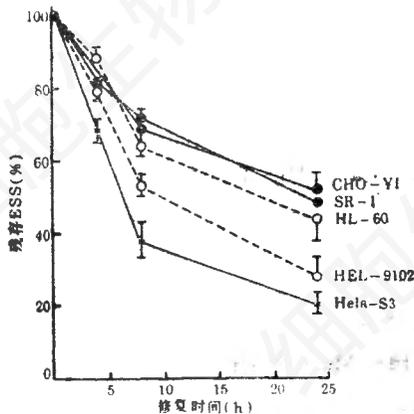


图5 ESS移除的动力学曲线

讨论

本文应用 EndoV 和碱电泳法观察了五株哺乳动物细胞对嘧啶二聚体的切除修复。在同等照射剂量下,啮齿动物细胞的初始损伤位点少于人细胞。由于嘧啶二聚体是在同一条DNA链上两相邻嘧啶碱基之间形成的,故此初始损伤位点的差异反映了种属间DNA碱基排列顺序的差异,尽管啮齿动物细胞的初始损伤轻于人细胞,但其修复水平亦低于人细胞,表明啮齿动物细胞在进化中获得的对PD的切除修复能力低于人细胞。

本文首次观察到HL-60细胞特殊的UV辐射反应,发现其对PD的切除修复水平低于其他两株人细胞而与啮齿动物细胞的修复水平近似,同时由于碱电泳的直观性,我们还观察到HL-60细胞具有外周血淋巴细胞样对UV的降解反应。对HL-60细胞的上述特性,目前还难以解释。

文献报告的CHO细胞在 4.6 Jm^{-2} 照射剂量下24小时修复率不到20%^[6],此结果是用碱性蔗糖密度梯度离心测定单链断裂获得的。由于本实验所测定的原初损伤位点与国外文献相近,表明方法本身的系统误差不大,同时本

实验有直观的电泳图谱及扫描图谱,可看出修复率明显大于25%。因此两个实验室测定的修复率的差异,可能反映了不同细胞亚株间修复能力的差异。

在电泳图谱及扫描图谱中,可看到未加 EndoV 的对照组在凝胶前沿约 1 kb 处有一个明显的 EB 染色区,如果在电泳前先用 RNAase 短暂处理样品,该峰即消失,表明此染色区为残存 RNA。经 EndoV 处理后的样品中该峰亦消失,说明在我们的 EndoV 制品中含有 RNA 酶活力。

本文应用碱电泳法测定 EndoV 引起的单链断裂,与经典的碱性蔗糖密度梯度离心和碱洗脱方法比较,其特点在于(1)不需同位素标记细胞 DNA,从而可用于测定直接取自人体

的细胞标本;(2)直观性好,损伤及修复程度在电泳图谱上清晰可见,加以激光扫描更可直接看到 DNA 分子分布的改变;(3)可定量测定,从而能获得有关损伤程度的最直接参数。因此本法值得推广应用。

参 考 文 献

- [1] Friedberg EC. DNA Repair. W. H. Freeman & co., New York, 1985; 175—184.
- [2] Komura J, et al., 1989, *Photochem Photobiol.*, 49: 149.
- [3] 严涛等, 1990, *生物化学杂志*, 6 (4): 382.
- [4] Freeman SE, et al., 1988, *Photochem Photobiol.*, 47: 159.
- [5] Vijg J, et al., 1984, *Mutation Res.*, 132: 129.

实验技术

肥大细胞与肺成纤维细胞共育方法*

郑 晖 钱仲棠

(湖南医科大学病理学教研室 长沙 410078)

近年来,肥大细胞(mast cell, MC)对成纤维细胞生长的影响受到人们的关注^[1]。MC与成纤维细胞共育方法为研究其影响的重要手段。我们取腹腔MC与同源动物肺成纤维细胞(lung fibroblast, LFB)共育,观察MC对LFB生长的影响,方法基本稳定,国内尚未见报道。现介绍如下。

材 料 与 方 法

一、动物

成年 Wistar 大鼠和出生不超过 1 天的 Wistar 乳鼠(本校动物中心提供)。

二、试剂及配制

1. RPMI-1640 细胞培养液: RPMI-1640(日本日水制药株式会社)含 15% 小牛血清, 1×10^5 U/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 用 7.4% NaHCO_3 调 pH 至 7.4 ± 0.1 。

2. 胰蛋白酶(上海进口分装), 用 D-Hank's 液配成 0.25% (原代培养用) 和 0.05% (传代用) 溶液。

3. 无 Ca^{2+} , Mg^{2+} Tyrode's 液。

4. 肥大细胞分离液, 取比重 1.120 的 40% Ficoll 液; 用比重为 1.077 的淋巴细胞分离液(均为上海试剂二厂产品)调整其比重至 1.080。

三、方法

1. 腹腔 MC 分离纯化 参照吴谦介绍的方法^[2]。

* 国家自然科学基金资助课题。