

1995, 142(3). -276- 280

实验研究比较了细胞同步化两种技术的效果,观察了同步化的 C3H10T1/2细胞经 $4.3\text{MeV } \alpha$ 粒子 ($\text{LET} = 101\text{keV } \mu\text{m}$)照射后的恶性转化率,目的在于检测细胞周期的敏感性。

第一种是在密集细胞群中利用接触抑制的现象分离出同步化细胞,故在 $t = 0$ 时刻, $70\% \sim 80\%$ 是 G_1 期细胞,在整个实验过程 G_1 期细胞大于 50% 。此方法虽细胞产额高,但不能满足本实验的需要。第二种是采用有丝分裂细胞分离法获得同步化细胞,其 70% 处于分裂相,第一代的倍增时间和细胞周期经历时间与不同步化的细胞相似,而且干扰细胞少,所以是较好的一种细胞同步化方法。此方法是用机械滚动培养瓶分离出接触差的有丝分裂细胞,同步化细胞要相当于 G_1 和早 S 期的 $2 \sim 10$ 小时期间内经 $0.30\text{Gy } \alpha$ 粒子照射,以平行照射不同步化的细胞作对照。计数 II 型与 III 型集落作为恶性转化集落, $10 \sim 12$ 天后计数大于 50 个细胞的克隆确定存活情况。通过测定分裂指数,标记细胞分数及相对细胞数来确定细胞周期。在收集有丝分裂细胞后 $4 \sim 6$ 小时(相当于 G_1 中期)恶性转化率最高,平均值为 $(18 \pm 4) \times 10^{-5}$, 比不同步化的细胞转化率 $(8 \pm 4) \times 10^{-5}$ 高 1 倍。以上结果提示:在 G_1 中期细胞的辐射敏感性有轻度增加趋势,但统计学差异不显著。在同步收集后 $2 \sim 8$ 小时有丝分裂细胞百分率为 $0.4\% \pm 0.1\%$, 而非同步细胞的为 $2.6\% \pm 0.4\%$, 表明 G_1 期较高恶性转化率并非由于仍存在于 G_1 期的有丝分裂细胞。

(周晓摘 叶常青校)

083 G_1/S 期转换的基因过度表达抑制电离辐射作用后引起的造血细胞 G_1 期滞留 [英] / Epperly M... // Radiat Res. -1995, 143(3). -245- 254

D 型周期蛋白和周期蛋白依赖性激酶 (cdk-4) 很可能在细胞通过 G_1 期的调节过程中起作用。 G_1 期在细胞周期中是辐射相对敏感期,处于 G_1 期细胞比例减少将增加对电离辐射的抵抗力。然而,对 X 射线诱导的 G_1 期滞留过度表达的效应尚未了解。实

验研究采用的依赖于 IL-3(白细胞介素 3)的造血祖细胞系 32Dcl3 能表达周期蛋白 D_1 、 D_2 或 D_3 或 cdk-4 的转基因,对该细胞系的亚克隆以 8cGy/min 或 1Gy/min 剂量率照射后,可以获得辐射存活曲线。将此结果与具有 Bcl-2 转基因过度表达的细胞结果进行比较,又行 Western Blot 分析。

结果:过度表达 Bcl-2 转基因细胞可以提高辐射存活率并延迟自然凋亡。与亲系 32Dcl3 相比,过度表达 D 型周期蛋白或 Bcl-2 转基因的细胞将增加 S 期细胞数。而 cdk-4 过度表达对细胞周期的分布无影响。由于缺乏 IL-3 而导致的细胞死亡不受周期蛋白 D_1 和 D_3 过度表达的影响,但周期蛋白 D_3 、cdk-4 或 Bcl-2 的过度表达可推迟细胞死亡。 5Gy 照射后 24 小时流式细胞计测定表明,每种 G_1 调节转基因过度表达将使处于 G_1/S 期细胞的比例变小。Western Blot 分析法揭示了照射对周期蛋白 D 水平的诱导作用,但 cdk-4 p53 或 p21 的水平没有变化。在 1Gy/min 剂量率照射下, D_0 值无意义,但周期蛋白 D 或 cdk-4 的转基因过度表达克隆的 π 值显著增大 ($P < 0.017$)。在 8cGy/min 较低剂量率时,周期蛋白 D 或 cdk-4 过度表达克隆的 π 值也增大 ($P < 0.07$)。周期蛋白 D 或 cdk-4 在造血细胞中的过度表达诱导了该细胞可检测的辐射生物学效应,包括存活曲线肩变宽和 G_1/S 期滞留的缩短。

(袁雄摘 叶常青校)

084 咖啡因、Okadaic 酸和染色木碱对因 X 射线照射而滞留在 G_2 期的小鼠单细胞胚胎的形态学效应 [英] / Jaquet P... // Int J Radiat Biol. -1995, 67(3). -347- 358

正常 Balb/c 系小鼠单细胞胚胎在受孕 18.5 小时后分裂,但在受孕 8 小时时用 2Gy X 射线对胚胎照射,胚胎就会长期滞留在 G_2 期。这可能是辐射对成熟促进因子 (MPF) 的亚单位 $p34^{cdc2}$ 的酪氨酸磷酸化的间接效应所致。 $p34^{cdc2}$ 的活化状态正常情况下出现在 G_2 末期,加 MPF 处于非活化状态,胚胎细胞就无法进入有丝分裂期。形态学研究旨在间接评价上述假设。

将受照和对照的胚胎暴露于已知能影响 $p34^{cdc}$ 活化状态的化合物中,咖啡因 (CAF, 2mmol/L) 从受孕 17 小时起就作用于胚胎,完全抑制了辐射诱导的 G_2 期滞留。用磷酸酶 I 和 II A 特异抑制剂的 Okadaic 酸 (OA) $3\mu\text{mol/L}$ 就能使前核膜破裂,使对照和受照胚胎均停滞在中期。胚胎受照后不同时间暴露于由 2 或 5mmol/L CAF 或 3 或 $10\mu\text{mol/L}$ OA 和蛋白合成强抑制剂 $3\mu\text{g/ml}$ 的放线菌酮 (CH) 组成的化合物中。从受孕 17 小时起就暴露于 CAF+ CH 的胚胎中仍可看到 G_2 期滞留的逆转,但最终分裂的受照胚胎的比例比仅暴露于 CAF 的低。在受孕后 17 小时前暴露于 CAF+ CH 的胚胎都不能进行卵裂。从受孕后 10 小时起即暴露于 $3\mu\text{mol/L}$ OA+ CH 或 8.5 小时后暴露于 $10\mu\text{mol/L}$ OA+ CH 的受照或对照胚胎中可看到核膜全部破裂。进入成熟前分裂的胚胎,在 S 期或在 G_2 期的前核中出现成熟前染色体浓缩,取决于它们暴露于 OA+ CH 的时间。 G_2 晚期暴露于染色木碱 (GEN) 的胚胎滞留机制,与 CAF 诱导的 G_2 期滞留全部逆转机制一样,待进一步解释。

因此,CAF 和 OA 通过不同途径抑制辐射诱导的 G_2 期滞留。虽然尚未达到这一程度要求的周期蛋白水平,但 OA 能通过磷酸酶 II A 诱导 $p34^{cdc}$ 直接脱磷酸化,而 CAF 可能通过影响调节此过程的上游蛋白,从而诱导 MPF 活化。在这一作用中 CAF 对周期蛋白和 或其它蛋白的依赖性也较清楚。但要阐明 CAF 和 OA 的确切作用机制仍需进行更详尽的生化研究。

(袁 雄摘 叶常青校)

085 FISH 彩涂结合差别染色用于控制人体淋巴细胞周期的染色体分析 [英] / Kulkarni U... // Int J Radiat Biol. -1995, 68(1). -25- 27

介绍一种简单的、仅计数第一周期人淋巴细胞的 FISH 彩涂染色体的方法。它是由染色体特有文库的 FISH 与用 BrdU (溴脱氧尿苷) 处理后的姐妹染色单体差别染色所组成的。这一方法用于人类生物剂量计能准确定量染色体损伤。

方法: 在常规的人淋巴细胞培养液中加入 Br-

dU, 终浓度为 $9.6 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 。收获前 3 小时加秋水仙素阻断中期。用 1:3 (v/v) 的 Hank's 液 蒸馏水 37°C 处理 15 分钟, 甲醇/冰醋酸固定, 然后加 5ml 固定液 4°C 过夜。滴片, 48°C 空气干燥后储存在 -20°C 液氮中。杂交前, 在暗处用二苯甲亚胺溶液 20°C 处理片子 15 分钟, 接着用紫外线照射带薄层溶液的片子 20 分钟, PBS 脱洗。再用 70%、90% 和 100% 的乙醇脱水, 55°C 干燥 1 小时。胃蛋白酶消化 10 分钟, $2\times$ SSC (氯化钠 柠檬酸钠) 洗脱, 多聚甲醛液固定 1 分钟, $2\times$ SSC 洗脱。然后彩涂 (1 4 12 号全染色体探针和地高辛标记的全着丝粒 DNA 探针) 检测。

结果: 用能同时观察 FITC (黄) 和 PI (红) 荧光的滤片组分析中期相, 由于二苯甲亚胺的处理, 所有的 M_2 期的染色体出现一个单体暗、一个单体亮, 彩涂的 1 4 12 号染色体能在亮的染色单体上呈现更强的荧光。用相同的荧光滤片, M_1 期的中期无论是 FITC 和 PI 染色均显示同源性。

(刘旭平摘 王知权校)

086 运用半定量逆转录多聚酶链反应研究正常人皮肤成纤维细胞低剂量率辐射后基因表达 [英] / de Toledo SM... // Int J Radiat Biol. -1995, 67(2). -135 ~ 143

用半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 对正常人成纤维细胞在高、低辐射剂量率照射后基因表达进行研究, 探究基因表达变化与辐射损伤的关系。

方法: AG1522 正常人皮肤成纤维细胞体外培养。高剂量率照射条件为: 室温下, $4 \times 10^{-2} \text{Gy}$ X 射线照射, 剂量率为 1.8Gy/min 。低剂量率照射条件为, 37°C , $3.6 \text{Gy } ^{60}\text{Co } \gamma$ 射线, 剂量率为 0.0024Gy/min 。从体外培养的细胞中按硫氰酸胍酚-氯仿方法抽提 RNA, 在逆转录酶的作用下, 对总 RNA 进行逆转录反应, 逆转录产物 cDNA 经过 PCR 反应扩增, 标记物为生物素标记的 dATP。扩增程序为, 95°C 加热 5 分钟, 在 80°C 时加入 Taq DNA 聚合酶, 之后 95°C 60 分钟, 55°C 60 分钟, 72°C 60 分钟。不同基因不同巡回次数。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, South-