

大鼠细胞转化过程中 DNA 聚合酶的活性变化

杨素霞 樊飞跃 李 煜 曹珍山 刘国廉

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

中图分类号: Q345⁺.23 文献标识码: B 文章编号: 1004-714X(2000)04-0224-01

摘要:目的 在辐射诱发 Wistar 大鼠肺细胞转化过程中, 检测了 DNA-P 的活性变化, 以探讨细胞转化与 DNA-P 的关系。方法 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线一次照射 4 Gy, 利用 DNA-P 检测盒制备 DNA-P, FT-625 ^{125}I 放免测量仪测定沉淀物放射性, 同时半固体琼脂培养。结果 Wistar 大鼠肺细胞在照后第 20 代 DNA-P 活性增加, 而肿瘤细胞 DNA-P 相对活性基本保持不变; 在半固体琼脂培养中也观察到 Wistar 大鼠肺成纤维细胞在照后第 30 代获得非锚着依赖性生长能力, 发生了恶性转化。结论 DNA-P 活性测定可用于良、恶性细胞的对比分析以及用于细胞转化的早期观察指标。

关键词: 辐射; 细胞转化; DNA 聚合酶

DNA 聚合酶(polymerase, 简称 DNA-P)是 DNA 合成中的关键酶, 它与细胞的生长、繁殖及分化密切相关^[1]。我们用 γ 射线诱发 Wistar 大鼠肺细胞转化过程中, 检测了 DNA-P 的活性变化, 以研究 DNA-P 与细胞转化的关系。

1 材料与方法

1.1 ^{125}I 标记检测 DNA-P 药盒(上海海军医学研究所提供)。

1.2 实验分组

1.2.1 对照组: 正常 Wistar 大鼠肺成纤维细胞

1.2.2 照射组: Wistar 大鼠肺成纤维细胞经 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线照射, 剂量为 4.0 Gy(剂量率为 1.819 Gy/min)

1.2.3 肿瘤细胞组: Wistar 大鼠肝癌细胞(HTC), 作为阳性对照组。

1.3 方法

1.3.1 选用原代 Wistar 大鼠肺细胞, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线一次照射 4 Gy, 细胞常规传代培养至 10、20、30 代时, 按 DNA-P 药盒检测程序制备 DNA-P 粗酶(DNA-P 的混合物), 用 FT-625 ^{125}I 放免测量仪测定沉淀物放射性(检测条件的控制按药盒说明)。

1.3.2 各组细胞 DNA-P 活性以沉淀物中 ^{125}I 放射性测量计数(CPM)表示。DNA-P 相对活性等于各组沉淀物中 ^{125}I 放射性测量结果(CPM)除以 0.1 μl 工作液中 ^{125}I 放射性测量结果(CPM)。

1.3.3 半固体琼脂培养: 底层琼脂浓度为 0.5%, 顶层琼脂浓度为 0.3%, 每皿 5 皿, 每皿接种细胞 1 000 个。37 $^{\circ}\text{C}$, 0.5% CO_2 恒温培养 20d 观察结果, 计数集落形成率。

2 结果

2.1 DNA-P 活性的变化

从表 1 的结果可以看到, 照后第 10 代, 照射组细胞 DNA-P 活性与对照组比较没有明显的增加; 而肿瘤细胞组 DNA-P 活性明显高于对照组和照射组, 经 t 检验差异有非常显著性($P < 0.01$); 照后第 20 代, 照射组细胞 DNA-P 活性增高, 与对照组比较差异有非常显著性($P < 0.01$), 但仍明显低于肿瘤细胞阳性对照组, 为肿瘤细胞组的 30.4%; 照后第 30 代, 照射组细胞 DNA-P 活性进一步增高($P < 0.01$), 为肿瘤细胞组的 64.8%。

表 1 照后不同时间各组细胞 DNA-P 活性($\bar{x} \pm s$)

分组	DNA-P 活性(CPM)		
	10 代	20 代	30 代
对照组	289.00 \pm 31.76	218.80 \pm 32.86	147.20 \pm 27.78
照射组	293.20 \pm 35.00	393.00 \pm 59.72 *	598.00 \pm 68.33 *
肿瘤细胞组	1 850.80 \pm 195.72 *	1 291.20 \pm 267.06 *	922.40 \pm 97.54 *

*与对照组比较 $P < 0.01$, $n = 5$ 本底 92.8 \pm 9.04

分析照射后不同时间各组细胞 DNA-P 的相对活性计算结果可以看到, 照射后的第 10、20 和 30 代的 Wistar 大鼠对照组

细胞和肿瘤细胞组 DNA-P 相对活性没有明显改变, 而照射组细胞 DNA-P 相对活性则随着照后时间的延长呈现逐渐增加的变化趋势^[2]。

2.2 集落形成率

半固体琼脂培养是当前检测转化细胞最为常用和较可靠的方法, 我们在此与 DNA-P 量的变化进行了比较, 结果见表 2。在照后第 20 代, 照射组细胞集落形成率与对照组相似, 缺乏形成集落能力, 而肿瘤细胞阳性对照组则高达 181%; 照后第 30 代, 照射组细胞集落形成率为 1.5%, 与对照组比较差异有非常显著性($P < 0.01$); 照后第 40 代, 照射组细胞集落形成率进一步增高为 18.3%($P < 0.01$), 表明照射组细胞具有恶性转化特征。

表 2 Wistar 大鼠肺成纤维细胞半固体琼脂集落形成率(%)

分组	20 代	30 代	40 代
对照组	0	0	0
照射组	0	1.50 \pm 0.83 *	18.30 \pm 4.88 *
肿瘤细胞组	181.47 \pm 8.55	182.75 \pm 12.38 *	191.80 \pm 14.23 *

*与对照组比较 $P < 0.01$, $n = 5$

3 讨论

DNA-P 是 DNA 合成的关键酶^[3], DNA-P 的活性变化反映细胞的增殖能力, 其活性随着细胞生长速度的增加而升高。本实验观察到, 接受 4 Gy γ 射线照射的 Wistar 大鼠肺细胞, 随着照射后时间的延长, DNA-P 活性不断增加, 表明细胞的增殖能力不断增加, 而肿瘤细胞组 DNA-P 活性明显高于正常 Wistar 大鼠肺细胞, 且经过一定时间传代处置后, HTC 细胞 DNA-P 相对活性基本保持不变, 说明 DNA-P 活性测定可以用于良、恶性细胞的对比分析, 且本实验方法稳定性较好。

我们在实验中观察了受 4 Gy γ 射线照射后的 Wistar 大鼠肺成纤维细胞形态学转化和非锚着依赖性生长能力的获得结果表明, 4 Gy γ 射线照射后的第 10 代和 20 代, Wistar 大鼠肺细胞形态无明显改变, 半固体琼脂集落形成能力没有明显增高; 照后第 30 代细胞形态发生改变, 细胞排列紊乱, 复层生长, 形成克隆; 照后第 40 代克隆形成率进一步增高, 表明细胞获得非锚着依赖性生长能力, 说明正常细胞发生了向恶性细胞的转化。而 DNA-P 活性在细胞发生形态学转化和获得非锚着依赖性生长能力之前的第 20 代即已出现升高, 这一实验说明, 细胞转化与 DNA-P 活性密切相关, 提示 DNA-P 活性的测定可被用于细胞转化的早期观察指标。

参考文献:

- [1] 李汉西. 以 DNA 多聚酶为靶点筛选抗癌药的新方法的初步探讨[J]. 癌症, 1993, 12(6): 473-475.
- [2] 杨素霞, 樊飞跃, 李煜, 等. 辐射诱发细胞 DNA 聚合酶变化[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2000, 20(3): 189-190.
- [3] 高毅. DNA 聚合酶与肿瘤[J]. 肿瘤, 1992, 12(2): 90-92.

收稿日期: 2000-03-09

修回日期: 2000-08-28

作者简介: 杨素霞(1962~), 女, 山东省人, 实验师, 主要从事放射毒理学研究。