员的受体之间有较高的同源性,因而在各种滋养层细胞中,激活素 A 可能通过不同的受体亚型,经特异的信号途径而发挥不同的作用.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39170382)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Qu J. Inhibin and activin production in human placenta. *Endocrine Rev*, 1995, 16: 485~ 507
- 2 Petraglia F, Garuti G C, Calza L, et al. Inhibin subunits in human placenta: Localization and messenger ribonucleic acid levels during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1991, 165: 750~ 758
- 3 Petraglia F, Vaughau J, Vale W. Inhibin and activin modulate the release of gonadotrophin_releasing hormone, human chorionic gonadotrophin, and progesterone from cultured human placental cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 5 114~ 5 117
- 4 Song Y, Keelan J, France J T. Activin A stimulates, while transforming growth factor β 1 inhibits, chorionic gonadotrophin production and aromatase activity in cultured human placental trophoblasts. *Placenta*, 1996, 17: 603~ 610
- 5 Li R H, Zhuang L Z. Study on reproductive endocrinology of human placenta. iv. Culture of highly purified cytotrophoblast cell in serum_free hormone supplemented medium. *Sci China Series B*, 1991, 34(8): 938
- 6 Li R H, Luo S Y, Zhuang L Z. Establishment and characterization of a cytotrophoblast cell line from normal placenta of human origin. *Human Reprod*, 1996, 11: 1 328~ 1 333
- 7 Camichael J, DeGratt W G, Gazdar A F, et al. Evaluation of a tetrazolium_based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 1987, 47: 936~ 942
- 8 杨新林, 罗淑宜, 庄临之. 激活素 A 和抑制素 A 对人绒毛膜上皮癌细胞系增殖及分泌孕酮的影响. *解剖学报*, 1997, 28(2): 193~ 196
- 9 Peng C, Huang T H J, Leung P C K, et al. Expression of the type E activin receptor gene in human placenta. *Endocrinology*, 1993, 133: 3 046~ 3 049
- 10 Segal S J. *Chorionic Gonadotropin*. New York and London: Plenum Press, 1980. 147~ 175

(1998-04-14 收稿, 1998-07-23 收修改稿)

低能重离子对 DNA 单链断裂的定量测定 及注量效应曲线的分析

杜严华 黄晟海 谭 铮 林营志 丘冠英

(武汉大学生命科学院生化及生物物理学系, 武汉 430072)

摘要 比较了低能 N^+ 离子注入和 ^{60}Co γ 射线所致小牛胸腺 DNA 单链断裂(ssb)的差异,并用辐射生物学多种数学模型拟合分析了它们的量效关系;从 DNAssb 的角度得到了“马鞍型”曲线的实验证据. 结果表明: N^+ 离子注入的量效曲线,明显不同于常规电离辐射; γ 辐照的量效关系呈指数型,其单位剂量的 DNAssb 在不同剂量下基本保持在一定水平,而单位注量 N^+ 离子的 DNAssb 在低注量区存在一个明显的峰值,然后迅速下降并维持一个较低水平. 对上述作用差异的原因进行了讨论.

关键词 离子注入 γ 射线 马鞍型曲线 DNA 单链断裂(ssb) 曲线拟合

过去用于材料改性(如离子掺杂)的离子注入技术(ion implantation technique)产生的低能重

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-1-56>

离子(一般 $Z > 4$), 能量($10^4 \sim 10^5$ eV 水平) 远比高/中能重离子小, 对生物组织穿透性很小(一般为 μm 水平), 因而物理学家和生物学家一直都认为在生物学上不具有研究和开发应用的价值而未受到重视. 然而, 这种观念现在已经开始改变. 由我国学者余增亮等人开创并由不同实验室近 10 年的研究表明, 能量仅为 15~30 keV 的离子束(例如 N^+ 离子、 C^+ 离子等), 不但能引起从病毒粒子到高等动植物机体或细胞的广泛效应, 而且能诱发生物的遗传变异^[1~6]. 现在, 离子注入被认为是诱变育种的一种新技术和潜在的细胞加工手段^[1,2,4,5,7], 正日益受到人们的关注.

由于注入的低能离子与生物系统的相互作用, 不但涉及能量交换, 而且涉及质量沉积、动量及电荷交换过程, 因而具有比 γ 射线等低 LET 辐射更为复杂的作用机制^[1~6]. 不同实验室在多种生物材料上所得到的实验结果表明^[6], 离子注入量效曲线常呈现特有的“马鞍型”, 用辐射生物学一般理论难以解释. 这无疑是一个很有趣的新现象. 然而一些研究者对此尚存异议和怀疑. 我们对 PxGV 病毒感染性所做的多次试验进一步表明^[6]: N^+ 离子的注量效应曲线的形状与所用注量范围有关, 在高注量区, 曲线呈指数型, 而在更宽的注量段内曲线呈“马鞍型”. 为了在 DNA 分子水平上进一步验证这种曲线的真实性, 本文以小牛胸腺 DNA 为材料, 测定了能量为 30 keV 的 N^+ 离子引起的 DNA 单链断裂(ssb), 首次从 DNA_{ssb} 的角度, 得到了“马鞍型”曲线的实验证据, 并对其量效关系进行了分析.

1 材料与方 法

() 材料. 小牛胸腺 DNA(CT DNA) 购于华美生物工程公司, 羟基磷灰石(HA) 进口分装.

() DNA 样品制备. 称取 10 mg CT DNA, 加入 5 mL 0.01 mol/L KPB, 置 4℃冰箱中静置 24 h, 溶解后点样于铝箔上(每样点 0.2 mL), 37℃干燥, 置 -20℃备用.

() N^+ 离子注入. 在中国科学院等离子体物理研究所进行. 基本按文献[6]方法进行. N^+ 离子能量 30 keV, 束流密度 25 mA/cm², 脉冲宽度及间隔时间 5 s/25 s, 每次脉冲注量 $1 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$, 注量范围 $10^{14} \sim 10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$, 对照组样品同样置于靶室中但不进行离子注入.

() γ 射线照射. 方法同文献[6]. 剂量范围 0~1 000 Gy, 剂量率 4 Gy/min.

() 碱解旋法处理. 用 0.5 mL 0.01 mol/L KPB 洗脱照射后的样点, 置于 5 mL 离心管中; 在暗室内向各管迅速滴加 1 mL 碱解液(含 0.03 mol/L NaOH, 0.01 mol/L Na₂HPO₄, 0.9 mol/L NaCl, pH > 12.5), 混匀, 置 20℃水浴中, 遮光静置 30 min; 滴加酚红指示剂后迅速加入中和液至颜色变黄, 随即用 JC-2 型超声波发生器 100 W 处理 2×10 s; 4℃保存待测.

() 分离 ssDNA 和 dsDNA. 称取 0.8 g HA 干粉加入 20 mL 0.01 mmol/L KPB (pH = 6.8), 煮沸 5 min 后移入柱床(10 mm(ID) $\times$ 20 mm 层析柱), 用 20 mL 0.01 mol/L KPB 平衡. 层析柱保持恒温(60 ± 1)℃. 加样后按 Rydberg^[8,9]的方法分别用 0.125 mol/L 及 0.25 mol/L KPB 分离收集单链 DNA(ssDNA) 和双链 DNA(dsDNA). 所有 KPB 加压流过柱床, 控制流速为 0.2~0.3 mL/min. 洗脱液置 4℃保存待测.

() DNA 链断裂测定与计算. 用 752_C 型紫外光栅分光光度计测各管 A_{260} 值. 双链百分率 $F = (0.25 \text{ mol/L 的 } A_{260} \times 0.5) / (0.125 \text{ mol/L 的 } A_{260} \times 0.4 + 0.25 \text{ mol/L 的 } A_{260} \times 0.5)$, 按文献[10]的计算方法: $n = \ln F_x / \ln F_0 - 1$ (其中 F_x 为某一剂量的双链百分率, F_0 为对照组的双链百分率), 求得单位 DNA 分子断裂数 n 的值.

2 结果与讨论

2.1 N^+ 离子注入对测定 DNA 紫外吸收的影响

为排除注入 N^+ 离子对测定 DNA 紫外吸收的影响, 我们测定了 1 组 N^+ 离子注入的 CT DNA 样品的 A_{260} 和 A_{280} 值, 结果表明: 在 4 个对照样品和 14 个注入样品中, 对照的 A_{260}/A_{280} 平均值 = 1.801 ± 0.032 , 注入样品的 A_{260}/A_{280} 平均值 = 1.813 ± 0.022 (各样品比值见表 1)。

表 1 不同注量 N^+ 离子照射 CT DNA 样品后 A_{260}/A_{280} 值

DNA 类型	对照组		注入组						
	CK1	CK2	5×10^{13} a)	1×10^{14}	2×10^{14}	8×10^{14}	1×10^{15}	1.5×10^{15}	2×10^{15}
ssDNA	1.771	1.835	1.836	1.798	1.818	1.802	1.845	1.782	1.799
dsDNA	1.821	1.728	1.839	1.823	1.802	1.765	1.781	1.798	1.820

a) 注量单位为 N^+ / cm^2

由于纯品 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值为 1.8, 若样品中含有蛋白质或其他杂质, 则比值将有明显改变^[11]。表中实验结果显示不同注量样品之间, N^+ 离子注入组与对照组之间 A_{260}/A_{280} 值都接近 1.8, 表明就 DNA 测样的纯度而言, 它们没有可检测的差异。由于羟基磷灰石分离单、双链 DNA 方法是基于核苷酸主链上的磷酸基团与羟基磷灰石上的钙离子的特异性结合^[11], 在样品上柱平衡时, 样品中的一切杂质(其中也包括 N^+ 离子质量沉积可能产生的元素氮或简单含氮无机物)都被洗脱除去, 所以 N^+ 离子注入不会对 DNA 定量测定产生显著的影响。

2.2 γ 射线辐照所致 DNAssb

γ 辐照组 DNA 的双链百分率(即 $1 - \text{ssDNA}\%$)的剂量关系曲线如图 1 所示, 曲线基本呈指数型, 与前人所得结果一致^[10, 12, 13]。

2.3 离子注入所致 DNAssb

N^+ 离子注入后 dsDNA % 的量效曲线见图 2。显然, 图中的曲线呈“马鞍型”, 即随着注量

图 1 ^{60}Co γ 辐照小牛胸腺 DNA 的量效曲线
图中数据及标准误差为 4 次独立实验平均值, 残差平方和 = 0.03229, 相关系数 = 0.9752

图 2 N^+ 离子注入小牛胸腺 DNA 的量效曲线
图中数据及标准误差为 3 次独立实验平均值, 图中曲线为 EMC 模型拟合曲线, 残差平方和 = 0.005106, 相关系数 = 0.9866

的升高, 剩余 dsDNA% 先降低, 但过凹点 $D_c(2 \times 10^{14} \text{N}^+ / \text{cm}^2)$ 后曲线不但不继续下降, 反而有所回升, 当注量达到 $3 \times 10^{15} \text{N}^+ / \text{cm}^2$ 后曲线则持续快速下降. 这显然不同于大量文献所见的常规低 LET 辐射和高能重离子辐照的结果. 有趣的是, 本文在 DNA 水平上得到的这种马鞍型曲线, 与一些研究者在多种植物种子和微生物, 以及本文作者用病毒所做的同类实验得到的曲线形状十分相似^[2, 3, 6]. 这进一步说明离子注入可能具有明显不同于常规电离辐射的量效关系^[1~6]. 从图 3 和图 4 的比较中进一步看出这种差异. 由图 3 可见 γ 射线的单位剂量断裂值大多数在 2~3 之间, 也就是说随着剂量增高, 单位剂量所贡献的 DNA 断裂损伤维持在一定范围内, 这与多数前人文献所得的结果相一致^[10, 12, 13]. 而图 4 则显示, 单位注量的注入离子所产生的 DNAssb 在低注量区有一个显著的峰, 对应于图 2 的凹点注量的 D_c , 但过 D_c 后迅速下降, 并一直维持在一个低的断裂水平.

图3 ^{60}Co γ 射线剂量与单位剂量 DNA 链断裂数的关系

图中数据及标准误差为 4 次独立实验的平均值

图4 N^+ 离子注量与单位注量 DNA 链断裂数的关系

图中数据及标准误差为 3 次独立实验平均值

2.4 离子束注量效应曲线的计算机拟合与分析

对于上述马鞍型曲线, 特别是对过凹点后曲线的回升所反映的损伤的减弱(保护)效应, 用辐射生物学一般理论难以解释. 试图用靶理论的多种数学模型拟合这类曲线亦不成功^[2, 4, 6]. 本文应用一种基于离子注入的能量沉积和质量沉积效应而提出的数学模型(EMC 方程)^{[2]1)}

$$Y = \exp[-p(\alpha D + \beta D^2 - \gamma D^3 e^{-kD})] \quad (1)$$

和辐射生物学中常用的 3 个数学模型:

单击多靶模型

$$Y = 1 - (1 - e^{-MD})^N, \quad (2)$$

带初斜率的单击多靶模型

$$Y = \exp(-D/D_1) \times [1 - (1 - e^{-D/D_2})^N], \quad (3)$$

1) 邵春林. 中国科学院等离子体物理研究所博士论文, 1996

及线性平方模型

$$Y = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad (4)$$

对实验数据进行了拟合. 结果表明, 只有方程(1)较好拟合了这一特殊的量效曲线(残差平方和最小), 拟合曲线与实验数据吻合也最好, 其他3个方程不但拟合精度较小, 且拟合曲线明显偏离大多数实验数据点. 上述方程中, S 代表已定量化的生物效应, D 为剂量或注量, 其他均为辐射生物学上通用的常数, 但方程(1)中的 γ 系数反映单位分子质量沉积产物能引起 DNA 断裂减少的数目. 根据离子注入质量沉积效应的推论, 方程(1)中的 $- \gamma D^3 e^{(-\beta D)}$ 项对前2项的修饰反映了质量沉积对生物学终点的贡献.

针对“马鞍型”量效曲线, 研究者尝试提出不同的解释和推测^{[2, 6, 14] 1)}. 如前所述, 离子注入与生物系统的相互作用, 包含能量和质量沉积, 动量和电荷交换这样4个方面. 因此, 可以设想, 上述马鞍型曲线所反映的在 D_c 注量区对损伤的保护(减弱)作用可能提出的解释也离不开这4个方面及其相互关系. 上面提到的 EMC 方程主要从质量沉积效应的角度进行解释^{[2] 1)}. 关于质量沉积可能产生的保护作用, 由于低能离子的射程很短, 而通常注量较高($10^{14} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 以上), 它在样品浅表处发生的沉积离子数是可观的, 非均匀的和局部化的^[6]. 已有实验测定证明, N^+ 注入的麦胚和固态胸腺嘧啶样品中, N 元素含量增加 $30\% \sim 33\%$ ¹⁾. 这些质量沉积产物既可能与靶分子竞争自由基或以其他能量转移方式对损伤起一定保护作用, 亦可引起物理屏蔽作用. 由于质量沉积的多少与注量有关, 在低注量区质量沉积较少, 其效应亦不明显, 随着注量升高, 质量沉积效应逐渐明显, 在 D_c 处达到最大, 而当注量继续增大后质量沉积的保护(减弱)作用所占份额逐渐减小. 此时的损伤以离子的能量吸收对 DNA 分子的损伤和离子的动量传递对细胞膜的损伤占支配地位, 因而曲线呈线性下降.

另外, 有人证明, N^+ 注入后, 分子内确有新基团的形成, 但它所占比重很小, 不足以产生显著保护效应, 况且产生基团种类不同, 作用亦不同, 因此认为质量沉积效应不是“马鞍型”曲线形成的主要原因^[14]. 最近又有研究者提出“碎片重组修复模型”²⁾. 在此不一一详述. 总之, 由于低能离子与物质相互作用的复杂以及生物组织的复杂性, 上述种种解释或假说还是很初步的, 基本上是推论性的, 尚需进一步的深入研究.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 19975038)资助项目.

参 考 文 献

- 1 余增亮, 霍裕平. 离子注入生物学研究述评. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 221~ 225
- 2 Yu Z L, Shao C L. Dose effect for the tyrosine sample radiated by a low energy N^+ ion beam. Radiat Phys Chem, 1994, 43(3): 349 ~ 351
- 3 Shao C L, Yu Z L. Research into releasing inorganic phosphate and base from 5'-dTMP irradiated by a low energy ion beam. Radiat Phys Chem 1994, 44(6): 651~ 654
- 4 宋国军, 余增亮. 离子注入生物学. 科学, 1996(11): 49~ 52
- 5 丘冠英. 低能重离子的生物学作用机理研究及应用. 武汉大学学报(生物物理专刊), 1993, 增刊, 9~ 12

1) 同 59 页脚注 1)

2) 韩建伟. 中国科学院等离子体物理研究所博士论文, 1998

- 6 杜严华, 丘冠英, 李国红, 等. 低能离子束及 γ 辐照对小菜蛾颗粒体病毒的影响及剂量效应关系的拟合分析. 生物物理学报, 1997, 13(2): 267~ 272
- 7 杨剑波, 吴跃进, 吴李君, 等. 低能离子束介导外源基因进入水稻细胞的研究. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 330~ 335
- 8 Rydberg B. The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells. Radiat Res, 1975, 61: 274~ 287
- 9 Rydberg B. Radiation-induced DNA strand breaks and rejoining in crypt and villous cells of the small intestine of the mouse. Radiat Res, 1975, 64: 281~ 292
- 10 Kanter P M, Schwartz H S. A hydroxylapatite batch assay for quantitation of cellular DNA damage. Anal Biochem, 1989, 97: 77~ 84
- 11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. A Laboratory Manual of Molecular Cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 12 Rydberg B. Detection of induced DNA strand breaks with improved sensitivity in human cells. Radiat Res, 1980, 81: 492~ 495
- 13 Singh N P, Graham M M, Singh V, et al. Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of γ -rays. Int J Radiat Biol, 1995, 68(5): 563~ 569
- 14 黄卫东, 余增亮. 低能离子辐照苏氨酸的初步研究. 生物物理学报, 1997, 13(2): 250~ 254

(1998-04-29 收稿, 1998-07-21 收修改稿)

一种新的植物细胞凋亡原位检测方法

宁顺斌 宋运淳* 王玲 刘立华

(武汉大学发育生物学研究中心, 武汉 430072. * 联系人)

摘要 介绍一种由动物细胞凋亡 ISEL 技术衍生的, 并与原生质体染色体制片技术相结合的植物细胞凋亡原位检测方法, 此方法简单、直观、灵敏度高, 避免了假阳性和非特异性信号的出现; 可同时从染色体、核以及 DNA 不同层次对植物细胞凋亡的特征进行原位检测, 并可观察它们在凋亡过程中各个时期的特征及动态变化. 用此方法检测了盐胁迫诱导的玉米根尖细胞凋亡, 结果表明盐胁迫下的植物细胞确实具有动物细胞凋亡的典型特征.

关键词 染色体制片 ISEL 细胞凋亡 盐胁迫

细胞凋亡(apoptosis)或细胞程序性死亡(programmed cell death)在动物中被公认为是细胞的一种由基因调控的主动死亡方式. 其主要形态特征为细胞核和细胞质凝缩、变形并片段化, 染色体断裂、边缘化, 凋亡小体形成等. 典型标志是 DNA 降解成以一定大小为单位的片段, 在 Klenow 酶的催化下, 这些片段的 3'-粘末端可被核苷酸补平. 如果掺入了标记的核苷酸如 Bio-11-dUTP, 便可利用相应的检测系统检测出来. 这就是原位末端标记法(*in situ* end labeling, ISEL). 在现代分子生物学的推动下, 参与动物细胞凋亡的基因及其调控规律逐渐被揭晓, 细胞凋亡正在取代细胞增殖而成为生命科学最活跃的研究领域之一. 而植物的细胞凋亡研究目前尚处于起步阶段, 对其表面上的形态变化特征还没有弄清楚. 虽然有证据初步表明, 植物在某些生理、病理或逆境条件下可出现类似动物细胞凋亡的典型特征^[1~ 8], 但有无细胞皱缩以及凋亡小体的形成目前尚无定论^[1, 4, 6, 7]. 因此, 植物细胞这种类似动物细胞凋亡的现象还没有被正式定义为“细胞凋亡”, Katsuhara 等人^[1]称之为“类细胞凋亡(apoptosis-like cell