

微细胞介导染色体转移法提高 AT 5 BIVA 细胞对电离辐射的抗性

白晓彬 章扬培 朱捷 刘秀林 夏寿萱

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 AT 5 BIVA 细胞是一株经 SV 40 病毒转化的 AT 病人皮肤成纤维细胞, 对 γ 射线高度敏感。实验用 FD 3 (含人第 11 号染色体的人鼠杂种细胞)、FD 8 (不含人第 11 号染色体的人鼠杂种细胞)、LM/TK (鼠细胞) 为供体, 通过微细胞介导染色体转移 (MMCT) 向 AT 5 BIVA 细胞导入人或鼠的完整染色体, 经两次 3 Gy γ 射线照射筛选后, 获得 AT 5 BIVA 与 FD 3 微细胞融合的杂合细胞 AT/FD 3-1, 对 γ 射线抗性有显著提高。而 FD 8 或 LM/TK 的微细胞与 AT 5 BIVA 细胞的杂合细胞, 对 γ 射线抗性未增加。核型分析表明 AT/FD 3-1 细胞中包含了来源于 FD 3 细胞的人第 11, 14 号染色体和数条鼠染色体。通过对照实验, 排除了人 14 号和鼠染色体提高 AT/FD 3-1 细胞对 γ 射线抗性的可能性, 确认人第 11 号染色体与 AT 细胞对电离辐射敏感性相关, 提示人第 11 号染色体上可能存在决定细胞对 γ 射线抗性的相关基因。

关键词 电离辐射, AT 细胞, 人第 11 号染色体, 微细胞介导染色体转移

人毛细血管扩张性运动共济失调症 (Ataxia telangiectasia, 简称 AT) 是一种常染色体隐性遗传疾病^[1]。其临床特征为: 对电离辐射高度敏感、神经功能异常、免疫功能部分缺陷、染色体畸变率高、易诱发肿瘤。已知 AT 患者皮肤的成纤维细胞对电离辐射高度敏感, 其 DNA 修复基因缺陷。目前对 AT 携带者家族遗传连锁分析已表明, 11 q 2 2-23 区段的缺失与 AT 发病有着直接的关系^[2~3], 从而提示修复基因可能所在的位置。有关研究已表明 AT 5 BIVA 细胞中第 11、13、14、15 和 22 号染色体异常^[4]。本文以 AT 5 BIVA 细胞为对象, 力图以微细胞介导染色体转移 (MMCT) 导入完整人染色体, 通过观察不同的染色体, 尤其是人第 11 号染色体对纠正 AT 5 BIVA 细胞电离辐射损伤修复基因缺陷的作用, 来揭示电离辐射损伤修复的机制, 并定位修复基因。

1 材料与 方法

1.1 细胞培养

AT 5 BIVA 细胞系人毛细血管扩张性运动共济失调症病人皮肤成纤维细胞, 经 SV 40 病毒转化, 属互补组 D; CHOK 1 细胞株系中国仓鼠卵巢细胞。上述细胞均为日本京都大学池永满生教授赠送。

LM/TK⁻ 细胞株系 LM 系小鼠细胞, 胸腺嘧啶激酶 (TK) 缺陷, (复旦大学赵寿元教授提供)。

FD 3 细胞株, LM/TK⁻ 细胞 × 人纤维肉瘤 HT 1080/HPRT (次黄嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷) 细

国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 初稿 1994-12-26, 修改稿 1995-06-08

胞杂种细胞, 含人第8、11、13、14、15、16、18、20和22号染色体。

FD 8 细胞株, CHO 细胞×人成纤维细胞杂种细胞, 含人第1、2、3、5、8、10、14、18、20和X染色体。FD 3 和 FD 8 细胞系由复旦大学遗传学研究所邱信芳教授等建株^[5]。

以上细胞, 均用含10%小牛血清(中国医学科学院血液研究所生化试剂厂)的DMEM培养基(GIBCO), 在5%CO₂, 37℃条件下贴壁培养。

1.2 γ 射线照射后的细胞活存率分析

第1 d 种植处于指数生长期的被测细胞, 第2 d 移去培养液, 用⁶⁰Co γ 射线照射细胞, 照射剂量分别为1.0、2.0、3.0、4.0和5.0 Gy, 剂量率为1.48 Gy/min。照射后细胞用PBS洗一遍, 加新鲜培养液继续培养, 7~10 d 活存细胞形成克隆。以95%乙醇固定细胞, 结晶紫染色, 计数形成的克隆。以细胞活存百分数的对数为纵坐标, 照射剂量为横坐标, 绘制活存曲线。

1.3 细胞核型分析^[6]

第1 d 种植处于指数生长期的被分析细胞。第2 d 加0.02 μ g/ml 的秋水仙胺(Colcemid)(Fl- \dot{u} ka)作用2 h, 收集细胞, 1000 rpm 离心10 min, 弃上清, 加0.075 mol/L KCl, 低渗作用10~30 min, 然后加固定液(甲醇:冰醋酸=3:1 V/V), 固定数次, 制片, 片子老化3~5 d, 胰酶消化, Giemsa 染色, 显微镜下观察, 拍照。

1.4 微细胞介导染色体转移^[7]

1.4.1 微细胞制备 第1 d 种植 FD 3, FD 8, LM/TK 细胞(4×10^4 /cm), 培养皿内放两片 8×2.5 cm 投影塑料膜片(无毒)。第2 d 加入含0.10 μ g/ml 秋水仙胺的培养液, 作用48 h 后取出膜片, 两片膜无细胞的一面相贴, 放入无菌离心管, 加满预热37℃的细胞松弛素 B(10 μ g/ml 配在 DMEM 中), 平衡后封住管口。放入离心机时, 膜面应与转子的切线平行。12000 rpm 和4℃下离心60 min。小心移去上清液, 细胞团块用37℃预热的4 ml 无血清 DMEM 小心打散, 分别通过8.0、5.0 μ m 聚碳酸酯(Polycarbonate)微孔滤膜(Nuclepore Corp), 制成微细胞悬液。

1.4.2 细胞融合 首先向微细胞悬液内加入40 μ l 植物血球凝集素(Phytohemagglutinin PHA)(中国医药公司北京分公司)(1.0 mg/ml), 然后将微细胞悬液加入 AT 5 BIVA 细胞(5×10^5)培养皿中, 15 min 后移去培养液, 加2 ml 预热的细胞融合液10 g polyethylene glycol 1000, 2 ml DMSO, 12 ml 无血清 DMEM, 处理60 s, 迅速移去 PEG, 用无血清 DMEM 洗3遍, 加培养液, 继续培养。

1.4.3 克隆筛选, γ 射线照后活存率分析及核型分析 细胞融合后第1 d 传代, 第2 d 照射3 Gy γ 射线, 2 d 后再照射3 Gy。10~14 d 获取单克隆细胞, 扩增。对细胞作 γ 射线照射后活存率分析及核型分析, 方法同1.2、1.3。

2 结果与讨论

2.1 γ 射线照射后 AT 5 BIVA、FD3、LM/TK⁻、FD 8、CHO 细胞的活存分析

AT 5 BIVA 细胞受1.0、2.0、3.0、4.0、和5.0 Gy 的 γ 射线照射后, 细胞的活存率分别为未照射 AT 5 BIVA 细胞的44.5%、10.9%、3.21%、0.94%和0.15%。

FD 3 细胞是 LM/TK⁻ 细胞×人纤维肉瘤 HT 1080/HPRT 细胞杂种细胞, 受1.0、2.0、3.0、4.0和5.0 Gy 的 γ 射线照射后, FD 3 细胞的活存率分别为未照射 FD 3 细胞的82.9%、68.2%、

52.4%、35.6% 和 25.0%；而相同剂量照射后 LM/TK⁻ 细胞的活存率分别为 76.1%、68.1%、37.9%、36.0% 和 32.7%。在相同剂量照射下，FD 3 细胞的活存率与 LM/TK⁻ 细胞的活存率无显著差异，见图 1。说明 FD 3 细胞中人的染色体对 FD 3 细胞的 γ 射线抗性或敏感性无贡献。

FD 8 细胞是 CHO 细胞 \times 人成纤维细胞杂种细胞，受 1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 Gy 的 γ 射线照射后，FD 8 细胞的活存率分别为未照射 FD 8 细胞的 73.2%、58.2%、38.6%、24.3% 和 15.2%；而相同剂量照射后，CHO 细胞的活存率分别是 77.6%、50.0%、36.8%、21.6% 和 13.4%。FD 8 与 CHO 两种细胞的活存率无显著差异，见图 2。说明 FD 8 细胞中人的染色体对该细胞的 γ 射线抗性或敏感性无贡献(见表 1)

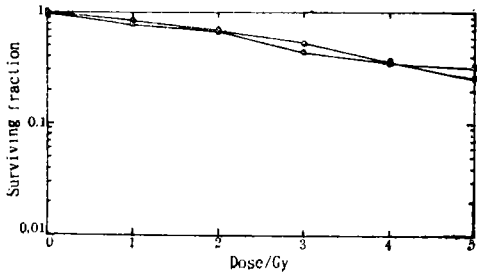


Fig 1. The survival curves of FD 3 and LM/TK⁻ cell after γ -irradiation
(●) FD 3 cell (○) LM/TK⁻ cell

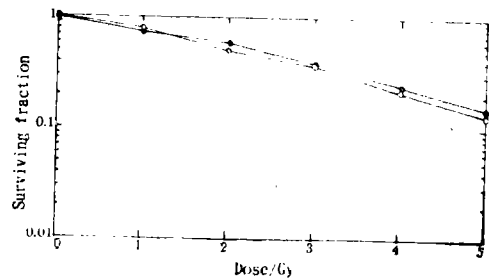


Fig 2. The survival curves of FD 8 and CHOK 1 cell after γ -irradiation
(●) FD 8 cell (○) CHOK 1 cell

Tab 1. Comparison of karyotype of 5 cell lines

Cell line	Number of human chromosome	Number of human chr. 11	Number of mouse chromosome	Total
TA 5 BIVA	56~65	1~2	0	56~65
FD 3	8~9	1	37~39	46~48
FD 8	10~12	0	20	30~32
AT/FD 3-1	43~44	3	10~13	54~56
LM/TK ⁻	0	0	40	40

2.2 AT 5 BIVA、FD 3、FD 8 细胞核型分析

AT 5 BIVA 细胞的染色体核型分析结果^[4]见表 2，其中第 11、13、14、15 和 22 号染色体异常。FD 3 细胞含人第 11 号染色体^[5]，FD 8 细胞不含人第 11 号染色体^[6](见图 3 和表 2)。

2.3 微细胞介导染色体转移提高 AT 5 BIVA 细胞对 γ 射线的抗性

将 FD 3、FD 8 和 LM/TK⁻ 制成微细胞(见图 4)与 AT 5 BIVA 细胞融合，用 3 Gy γ 射线两次筛选，获取活存的克隆。AT/FD 3-1 杂种细胞，经 γ 射线照射 1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 Gy，细胞活存率分别为 71.3%、50.1%、37.3%、19.5% 和 10.3%。活存率比 AT 5 BIVA 细胞有显著提高，其对 γ 射线的抗性介于 FD 3 细胞和 AT 5 BIVA 细胞之间(见图 5)。核型分析表明 AT/FD 3-1 杂种细胞染色体数 54~56，第 11 号人染色体比 AT 5 BIVA 细胞多出 1 条，原异常的第 14 号染色体恢复正常，而第 13、15 和 22 号染色体仍异常，并多出数条鼠染色体(见表 1、2)。提示 AT/FD 3-1 细胞包含了来源于 FD 3 细胞的人第 11、14 号和数条鼠的染色体。抗 γ 射线能力的提高可能是由于它们中的某一条或数条染色体的贡献。FD 8 和 LM/TK⁻ 的微细胞，与 AT 5 BIVA 细胞融合后并未获得 γ 射线抗性提高的杂种细胞。表明：(1) 小鼠细胞的染色体不能弥



Fig 3. Metaphase chromosome of a FD 3 cell
(→) chromosome 11

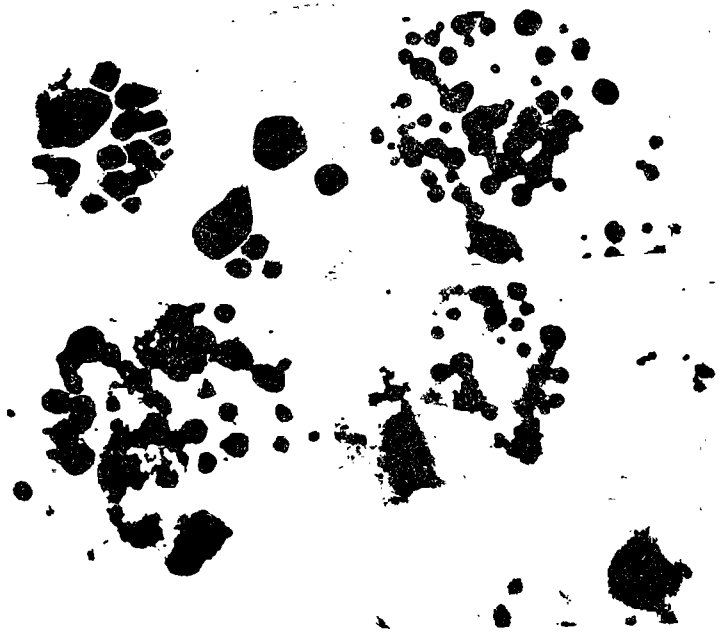


Fig 4. Microcell of FD 3 cell (Treated by 0.1 µg/ml colcemid for 48 h)

Tab 2. Comparison of normal and abnormal chromosome in AT 5 BIVA, AT/FD 3, FD 3 and FD 8 cells

Cell	Number of human chromosome																						X	Y
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
AT 5 BIVA											-		-	-	-								-	
AT/FD 3-1											+		-	+	-								-	
FD 3								✓			✓		✓	✓	✓			✓		✓		✓		
FD 8	✓	✓	✓		✓			✓		✓				✓				✓		✓		✓		

(+) normal (-) abnormality (✓)presence

补人细胞的染色体的缺失；(2)FD 8 细胞中人第 1、2、3、5、8、10、14、18、20 和 X 染色体上不含 AT 5 BIVA 细胞缺失的修复基因。

通过比较看出：

(1) 小鼠 LM/TK⁻ 微细胞与 AT 5 BIVA 细胞融合后，未改变 AT 细胞的辐射敏感性。提示鼠细胞染色体对人细胞的辐射敏感性无贡献。同时比较 FD 3 与 LM/TK⁻ 细胞，FD 8 与 CHO 细胞 γ 射线照射后活存率分析，亦说明人染色体对鼠细胞辐射敏感性无贡献。

(2) AT 5 BIVA 细胞核型分析提示，造成 AT 5 BIVA 细胞对 γ 射线敏感的原因可能是第 11、13、14、15、22 号染色体异常所致。

(3) FD 8 细胞含人第 1、2、3、5、8、10、14、18、20 和 X 染色体，AT 5 BIVA 细胞缺少其中的 14 号染色体，FD 8 微细胞与 AT 5 BIVA 细胞融合，未能改变 AT 细胞的辐射敏感性，提示 FD 8 细胞中所含人第 14 号染色体对 AT 5 BIVA 细胞辐射敏感性无贡献。

(4) FD 3 细胞含人第 8、11、13、14、15、16、18、20 和 22 号染色体，AT 5 BIVA 细胞缺

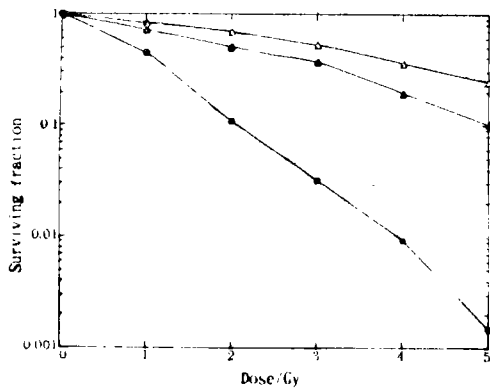


Fig 5. The survival curves of AT 5 BIVA, AT/FD3-1 and FD 3 cell after γ -irradiation
 (●) AT 5 BIVA cell
 (▲) AT/FD 3-1 cell
 (△) FD 3 cell

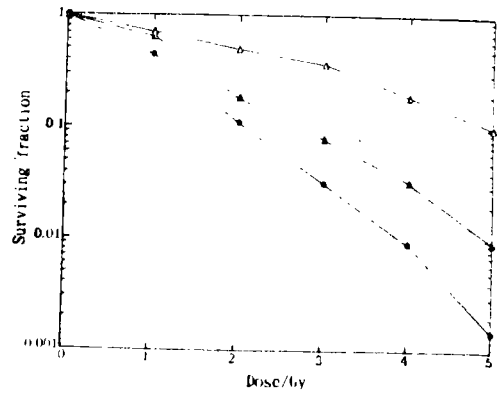


Fig 6. The survival curves of AT 5 BIVA, clone 2-1 and AT/FD 3-1 cell after γ -irradiation
 (●) AT 5 BIVA cell
 (▲) clone 2-1 cell
 (△) AT/FD 3-1 cell

少其中的 11、13、14、15 和 22 号染色体。融合细胞 AT/FD 3-1 与 AT 5 BIVA 细胞核型分析说明, 原在 AT 5 BIVA 细胞中有缺陷的第 13、15、22 号染色体, 在融合细胞 AT/FD 3-1 中仍保持原来的异常状态, 提示这些染色体与 AT 细胞对 γ 射线的辐射敏感性无关, 而原在 AT 细胞中呈现异常的第 11 和 14 号染色体, 在融合细胞 AT/FD 3-1 中已被纠正为正常, 而在上面实验分析中, 已排除了 14 号染色体的可能性, 从而可以认为, 第 11 号染色体是决定人细胞对 γ 射线辐射敏感性的原因。AT/FD 3-1 融合细胞中, 第 11 号染色体正常, 所以增加了对 γ 射线的抗性。

AT/FD 3-1 核型分析还表明, 细胞融合后有新的染色体的进入, 同时也存在染色体的丢失问题。融合细胞在培养过程中的稳定性, 仍需进一步观察。在以前的实验中^[4], 曾用 DNA 介导基因转移(DMGT)方法, 获得对 γ 射线抗性提高的转化 AT 细胞(clone 2-1)。比较 DMGT 和 MMCT 方法, 获得的 γ 射线抗性细胞活存率和照射剂量的关系(图 6)可以发现, 在相同剂量照射下, AT/FD 3-1 细胞的活存率显著高于 clone 2-1 细胞, 说明导入完整染色体基因的完整性, 修复基因所处的位置和与各基因间的协同, 均优于 DNA 片段在染色体上的整合, 修复基因更易表达。

本实验通过 MMCT 方法, 证明人第 11 号染色体上存在 DNA 修复基因, 此结论与国外文献报道一致。本实验用含多条人染色体的人鼠杂种细胞为供体细胞, 在排除了其它的人染色体后, 确认第 11 号的作用, 比国外的工作难度^[8]大, 更说明问题。

参 考 文 献

- 1 Friedberg E C et al. in DNA Repair W. H. Freeman and Company, New York; 1985, 505~542
- 2 Gatti R A et al. Nature, 1988, 336; 577
- 3 Foroud T et al. Am. J. Hum. Genet., 1991, 49; 1263
- 4 白晓彬等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1992, 10; 165
- 5 薛京伦, 邱信芳等. 复旦学报, 1989, 28; 367
- 6 杨景山, 医学细胞化学与细胞生物技术, 北京医科大学-中国协和医科大学联合出版社, 1990, 350~354
- 7 Fournier R E K et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74; 319
- 8 Komatsu K et al. Mutat. Res., 1990, 235; 59

INCREASE OF RESISTANCE TO IONIZING RADIATION IN AT 5 BIVA CELLS BY MICROCELL-MEDIATED CHROMOSOME TRANSFER

Bai Xiaobin Zhang Yangpei Zhu Jie Liu Xiulin Xia Shouxuan

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Sciences, Beijing 100850*)

ABSTRACT Ataxia-telangiectasia (AT) is a rare human autosomal recessive disease characterized by hypersensitivity to ionizing radiation, neurological disorders, immunodeficiency, chromosomal instability and a high incidence of cancers. It was thought that the cause for hypersensitivity was due to the putative DNA repair gene deficiency. Recently, studies on genetic linkage analysis of families with AT carriers had suggested that a genetic defect in a region of chromosome 11 q 22~23 was responsible for the AT disorder. The SV 40-transformed AT5BIVA cells (group D), from skin fibroblast of AT patients, was hypersensitive to Gamma-ray. The karyotype analysis had previously shown there were abnormalities of chromosome 11, 13, 14, 15 and 22 in AT5BIVA cells. In order to study the molecular mechanism of hyper-radiosensitivity in AT cells and to map DNA repair gene, a new strategy to introduce intact chromosomes into AT 5 BIVA cells by the technique of microcell-mediated chromosome transfer (MMCT) was used.

Two human × mouse hybrid cells (FD 3 and FD 8) and a mouse cell line (LM/TK⁻) were used. FD 3 cells contain human chromosome 11 while FD 8 does not. The microcells of these three cell lines were prepared and fused with AT 5 BIVA cells. After twice selection by 3 Gy γ -irradiation, the clones which were resistant to γ -irradiation were isolated. AT/FD 3-1 cells, the AT 5 BIVA × FD 3 microcell fused hybrid, showed enhancement of radioresistance. Karyotype analysis had also shown AT/FD 3-1 cells contained an additional copy of chromosome 11. The results indicated the genes responsible for cell resistance to ionizing irradiation existed in human chromosome 11.

KEYWORDS Ionizing radiation, AT cells, Human chromosome 11, Microcell mediated chromosome transfer