

小鼠扁桃体免疫细胞受照射后 DNA 双链断裂损伤修复的忠实性

吴 玮 屈昌民 吴代民

(中国人民解放军第三〇六医院 北京 100101)

摘要 观察了受照射小鼠瓦尔代尔扁桃体环(WRE)在体细胞出现 DNA 双链断裂修复的忠实性,用 ^{60}Co γ 射线照射后观察 WRE 细胞凋亡的最高峰,在此时间点处死小鼠,取 WRE 细胞分别用脂质体和电穿孔方法介导的基因转染技术,将双标记基因质粒 pPMH16 导入细胞。研究 WRE 细胞 DNA 双链修复的忠实性。结果表明,未照射 WRE 细胞的抗 G418 转化克隆有 69.75% 的 gpt 基因表达,说明大部分断裂的 gpt 基因被忠实地修复;2Gy、4Gy 射线照射的 WRE 细胞的转化克隆只有 36.05% 和 21.50% 的克隆能正确表达 gpt 基因功能,说明 WRE 细胞照射后 DNA 双链断裂的修复显著低于正常细胞,且剂量越大,修复的忠实性越低。脂质体和电穿孔方法介导的基因转染技术可用于原代细胞基因转染的研究,照射后的 WRE 细胞易发生 DNA 双链断裂错误重接。

关键词 DNA 修复忠实性, 基因转染, WRE 细胞, 辐射损伤

中图分类号 Q782, R818.74

免疫细胞是辐射的高敏感细胞,我们观察到小鼠瓦尔代尔扁桃体环^[1](Waldayer's Ring Equivalent WRE)细胞受照射后,细胞 DNA 发生了断裂,这种断裂触发了一系列的凋亡事件。与此同时,DNA 又在进行自身修复,WRE 细胞凋亡率也在经历了凋亡高峰后逐渐减少,然而,这只是断裂的 DNA 和 WRE 细胞的一个量的恢复。照射后经历了凋亡高峰渐恢复的细胞 DNA 质的恢复如何,即基因序列的正确性如何? 这将直接影响细胞功能的正常发挥。修复的准确性或忠实性对机体免疫功能的恢复至关重要,本工作用双标记基因质粒 DNA 转染技术,对受照射 WRE 在体细胞 DNA 双链断裂的修复的忠实性进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠,雄性,体重 $20\text{g} \pm 2\text{g}$, 北京医科大学动物中心提供。

1.2 照射条件

采用 ^{60}Co γ 射线照射,剂量率为 $1.5\text{Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.3 主要试剂及质粒 DNA 的准备

质粒 pPMH16,北京放射医学研究所赠送,带有两个选择标记基因(neo 和 gpt)。A 液: DMEM+10%小牛血清,B 液:A 液+ $2(\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA+ $100\mu/\text{mL}$ IL-2,C 液 :B 液+ $0.75\text{mg}/\text{mL}$ G418,D 液:C 液+10%XHATM, XHATM 选择培养液含 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄嘌呤、 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 次黄嘌呤、 $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨基嘌呤、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 胸腺嘧啶、 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 霉酚酸。DNA 抽提试剂盒(Promega 公司产品)。pPMH16 质粒用 EcoRV 酶切,然后在紫外分光光度计上测 DNA 含量。

1.4 细胞凋亡率的检测及单个核细胞和滋养细胞的制备

采用碘化丙啶(PI)常规方法,根据凋亡测试结果小鼠 2Gy、4Gy 照射后 8h 取 WRE 组织,

总装备部医药卫生重点科研课题基金(299004)资助

第一作者:吴玮,女,1963 年 8 月出生,1998 年毕业于第二军医大学博士,临床免疫专业,副主任医师

收稿日期:初稿 2001-08-15, 修回 2001-11-28

研磨,过 200 目的尼龙网,常规制备单个核细胞,将单个核细胞种于 B 液中,5%CO₂37℃ 孵育 24h。150×g 离心收取细胞,加 PI,避光室温 30min,流式细胞仪(Coulter , EPICS-XL , 美国)检测细胞荧光,软件处理,计算细胞凋亡(PCD)细胞数。取未照射组 WRE 免疫细胞 1×10⁷ 共 5mL,经 60Gy 照射后即为滋养细胞。

1.5 脂质体基因转导

脂质体-质粒 DNA 复合物的制备:取脂质转染胺 Lipofectamine 5μL 加入 1640 无血清培养基 95μL 中混匀 30min;而后加入酶切的 pPMH16 质粒 DNA 2μg(100μL),两者轻轻混合,调整细胞浓度,照射组为 2×10⁶/mL,正常对照组为 1×10⁶个/mL,加入 60 mm 培养皿中,与脂质体-DNA 复合物轻轻混合,加入 700μL 1640 无血清培养基中 1mL, 37℃,放置 5h。更换 B 液培养 48h。

1.6 电穿孔法基因转导

参照 Davis^[2]电穿孔法转染细胞,200V,1080μF,1ms,3—5 次,培养 48h。

1.7 DNA 双链断裂修复忠实性检测

pPMH16 质粒中的 neo 基因表达氨基糖苷磷酸转移酶,使细胞抗新霉素(G418);gpt 基因表达黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶,使细胞能在 XHATM 选择培养基中生长,gpt 基因上有 EcoRV 酶单一切点,产生一个平齐末端 DNA 双链断裂,通过上述脂质体、电穿孔介导的基因转染法,将酶切损伤的 pPMH16 质粒 DNA 导入细胞中,细胞在 B 液中培养 48h,转 96 孔板,每个筛选孔接种数为:正常对照组 1×10⁴ 个/mL、照射组 2×10⁴ 个/mL,同时接种 1×10⁴ 个/mL 滋养细胞,更换 C 液进行选择培养 15—20d,计算 G418 克隆总数后加入筛选 gpt 基因的 D 液,继续培养 15d,其间 3—4d 换液一次,计算抗 XHATM 的克隆数(死亡克隆经台盼蓝染色鉴定),具有 G418 和 XHATM 两种抗性的细胞克隆数所占全部 G418 转化克隆的百分率,即为受损 gpt 基因具有的忠实性修复效率。

1.8 User、DNA 斑点印迹杂交

按常规方法点样,DNA 样品用前先用 95℃变性 5min,用³²P 标记 DNA 探针,预杂交 2h,再加入带探针的杂交液,杂交 12h,洗液后晾干、压片、显影,定影后洗片^[3]。

2 结果

2.1 各剂量组照射后不同时间小鼠 WRE 细胞凋亡(PCD)的变化

小鼠照射后 2h 各剂量组 WRE 细胞中 PCD 细胞数均较正常组明显增多,但各组达凋亡高峰值的时相不同,依次为:2Gy 组照射后 12h;4Gy 组照射后 8h。4Gy 达凋亡高峰值的百分数较高;两个剂量组在 36h 时凋亡百分数均接近正常,而后出现再次升高,在照射后 10d,4Gy 凋亡率再次达高峰,而 2Gy 组这时的凋亡率为 4Gy 组的 1/2,认为在此时相点上 4Gy 组 WRE 细胞再次出现了细胞凋亡。在细胞凋亡高峰时研究 DNA 双链断裂的修复忠实性可以客观地反映数据的真实性和可参照性。上述实验结果见表 1。

2.2 细胞 DNA 双链断裂的修复忠实性

酶切后 pPMH16 质粒 DNA 转染到未照射和照射小鼠的 WRE 细胞中进行表达可看出明显差别(见表 2),未照射 WRE 细胞的抗 G418 转化克隆 69.75%有 gpt 基因表达,说明大部分断裂的 gpt 基因被忠实性修复,2Gy、4Gy 射线照射的 WRE 细胞的转化克隆只有 36.05%和

Tab.1 Analysis of apoptotic WRE cells with FACS at the different time after irradiation

t/h	Apoptotic rate/%	
	2Gy	4Gy
2	16.32±0.33	22.37±0.58
4	25.26±0.23	42.33±0.61
8	30.60±1.13	48.22±0.76
12	40.70±0.29	33.61±1.04
24	27.35±0.36	16.14±1.27
36	14.13±0.15	3.40±0.36
72	10.23±0.09	32.32±0.45
168	15.45±0.87	40.65±0.17
240	3.87±0.09	49.30±0.57

n=6, Apoptotic rate for mean normal WRE cells is 3.50±0.67

21.50%的克隆能正确表达 gpt 基因功能,说明 WRE 细胞照射后 DNA 双链断裂的修复显著低于正常细胞,且剂量越大,重接修复的忠实性越低(正常对照组与两个照射组之间,2Gy、4Gy 组之间统计学处理差异非常显著, $p<0.001$)。表 3 显示的是电穿孔方法基因转导质粒 DNA 的正常 WRE 细胞的 DNA 重接率以及用脂质体方法的对比,两种方法的结果基本相同,统计学处理无差异。

2.3 pPMH16 质粒转染后表达的检测

利用 DNA 斑点杂交发现,转染 pPMH16 质粒细胞的 DNA 为阳性,而未转染细胞和空载体的对照细胞的 DNA 未显影,这不仅说明了 pPMH16 质粒在 WRE 细胞中转染的成功,同时也证实了收集的细胞克隆内被酶切的 gpt 基因得到了修复。

Tab.2 The rejoining efficiency of gpt gene in the linearised plasmid pPMH16 which was transfected into mouse cells with lipofceamine

Exp. No	0Gy		2Gy		4Gy	
	XHAT M ⁽¹⁾ /G418	% ⁽²⁾	XHAT M ⁽¹⁾ /G418	% ⁽²⁾	XHAT M ⁽¹⁾ /G418	% ⁽²⁾
1	8.1/11.4	71.1	6.3/16.5	38.1	2.4/10.4	23.1
2	8.7/13.8	63.1	7.3/17.2	42.4	1.3/7.2	18.1
3	9.1/12.0	75.8	4.2/14.7	28.6	1.2/6.8	17.6
4	7.8/11.3	69.0	5.9/16.8	35.1	2.2/8.1	27.2
$\bar{x}\pm s$	69.75±2.56		36.05±5.65 ⁽³⁾		21.50±4.49 ⁽¹⁾	

⁽¹⁾The number of colonies found to XHAT M (gpt⁺)among the total G418(neo⁺)colonies scored.

⁽²⁾Percentage meant the proportion of the correctly rejoined gpt gene, ⁽³⁾ $p<0.001$

Tab.3 Comparisin of the rejoining efficiency of the gpt gene obtained using electroporation with that using lipofectamine

Expt. No	Lipofectin		Electroporation	
	XHAT MR ⁽¹⁾ /G418R	% ⁽²⁾	XHAT MR ⁽¹⁾ /G418R	% ⁽²⁾
1	8.1/11.4	71.1	9.7/14.8	65.5
2	8.7/13.8	63.1	11.3/15.4	73.4
3	9.1/12.0	75.8	10.4/14.4	72.2
4	7.8/11.3	69.0	9.2/13.2	69.7
$\bar{x}\pm s$	69.75± 2.56		70.2±2.25	

^{(1)·(2)}See the legend in Tab.2

3 讨论

免疫细胞的基因转染是许多疾病基因治疗研究以及基因标志研究的前提,由于淋巴细胞的原代细胞培养较难持久,再加上淋巴细胞的体积较小,使淋巴细胞的基因转导较难进行^[4-6]。脂质体介导的基因转染方法简便、安全且适合于体内研究。本实验应用脂质体转导方法,通过调整各种影响细胞生长的因素,成功地将 pPMH16 质粒 DNA 导入小鼠 WRE 细胞,并获得高的基因转染率,为原代淋巴细胞的基因转染探索了一条途径。实验中发现,调整适量的细胞浓度和血清浓度,加用 IL-2、PHA 维持细胞生长增殖,并加用滋养细胞等措施都是维持较长时间淋巴细胞原代培养的必要条件;脂质体、质粒 DNA 的用量和转染时间的控制是获得较高基因转染率的关键。由于 WRE 细胞体积较小,为避免转染中的误差,我们采用脂质体和电穿孔两种转染法同时进行,结果表明,两种方法的转染率基本相同。

pPMH16 质粒是在单基因质粒 pSV2gpt 的 EcoRI 酶切位点,加入一个带有 neo 基因的 DNA 片断构建而成的^[7,8],它的应用使研究 DNA 双链断裂修复的正确性成为可能。以往研究 DNA 双链断裂重接修复,所检测的只是群体细胞中双链断裂 DNA 的重接率,是一种“量”的衡量,至于断裂 DNA 重接是否准确,能否恢复原来正常的结构和功能,仍不清楚,这些不能正确重接所导致的 DNA 错误修复,同样可以引起基因突变、染色体畸变和细胞死亡,影响细胞功能的发挥。因此,Debenham 等^[9]利用单标记基因质粒来研究细胞的 DNA 重接修复忠实性,使 DNA 修复的研究由“量”跨入“质”的过程,因为单标记基因质粒导入哺乳动物细胞中,只有一个供筛选转化克隆的选择标记,使 DNA 修复忠实性的研究受到限制,即细胞在选择性培养液中发生死亡是由于受损的标记基因未被忠实性修复,还是由于细胞根本没有接受外源基因,很难确定。双标记基因质粒载体的建立和应用,完全解决了上述问题,即用限制性内切酶损伤其中一个标记基因,转染细胞后先以未受损伤的标记基因筛选转化克隆,然后从中检测到受损的基因是否被忠实性修复。

凝胶电泳和流式细胞仪均显示 WRE 细胞在 4Gy 照射后 4-12h 达凋亡高峰,我们选择已经历了凋亡高峰的 WRE 细胞观察其修复的忠实性。结果表明,照射后的 WRE 细胞对内切酶 EcoRV 作用产生的平齐末端 DNA 双链断裂的重接修复忠实性显著低于正常细胞,WRE 细胞照后易发生 DNA 错误重组,且照射剂量越大,对 DNA 损伤越重,DNA 的双链重接修复率越低,错误修复的机率也就越大。这很可能是免疫细胞为高辐射敏感细胞的主要原因。此外,辐射伤者易患癌症可能与免疫系统低水平 DNA 修复的忠实性而致免疫机能下降有直接关系。

参 考 文 献

- 1 Koornstra P J, Dejong FICRS, Vlek LFM *et al*. *Acta Otolaryngol* (Stockh), 1991, **111**:591-599
- 2 Davis L G, Kuehl W M, Battey J F. Norwalk:Paramount Publishing, 1994, 636-641
- 3 J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 北京:科学出版社, 1989, 486-489
- J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual*, NG, A Laboratory Manual. Cold Spring harbor Laboratory Press Sambrook, 1989, 486-489
- 4 Brant M, Nachmansson N, Norrman K *et al*. *DNA Cell Biol*, 1991, **10**:75-82
- 5 Novak T J, Yoshimura F K, Rothenberg E V. *Cell Biol*, 1992, **12**:1515-1520
- 6 Rupprecht A P, Coleman D L. *J Immunol Methods*, 1991, **144**:157-163
- 7 周平坤, 项晓琼, 刘学英等. 生物化学杂志, 1995, **11**:412-415

ZHOU P K, XIANG X Q, LIU X Y *et al.* J Biochem, 1995, 11:412—415

8 Thacker J. Mutation Research, 1989, 220:187—193

9 Debenham P G, Jones N J, Webb M B T *et al.* Mutation Research, 1988, 199:1—10

THE EFFICIENCY AND FIDELITY OF REJOINING OF THE DNA DOUBLE STRAND BREAK IN THE IMMUNOCYTES OF TONSILS OF IRRADIATED MICE

WU Wei QU Changmin WU Daimin

(Chinese PLA 306 Hospital, Beijing 100101)

ABSTRACT To examine the efficiency and fidelity of rejoining of the double strand break (dsb) DNA of the irradiated mouse Waldeyer's Ring Equivalent (WRE) cells. With lipofectamine or electroporation, the linearized plasmid pPMH¹⁶ with two marker genes (neo and gpt) were transferred into the WRE cells from irradiated mice. Through ordinal G⁴¹⁸ screen and XHAYM screen, the rejoining efficiency of the broken gpt gene was evaluated. The rejoining efficiency of gpt gene was 69.75% for control WRE cells, and 36.05% for the WRE cells gotten from the irradiated mice 4h after exposure to 2Gy γ irradiated and 21.50% 4h after exposure to 4Gy γ irradiated. The results showed that the fidelity of the rejoining of dsb of DNA for the irradiated mouse WRE cells was lower than that for control, and as the radiation dose increased, the fidelity decreased. Both the lipofectamine or electroporation could be successfully used in gene transfection for primary culture of mouse WRE cells. And the wrong repair of dsb of DNA in irradiated mouse WRE cells might be caused frequently.

KEYWORDS Fidelity of DNA repair, Gene transferred, Waldeyer's — Ring Equivalent cells, Radiation injury

CLC Q782, R818.74