

照射后小鼠胸腺中生成可溶性染色质的剂量关系

魏 康 刘学英 朱雪芬

摘要 小鼠照射后, 胸腺可溶性染色质明显增加, 在照后2、4及6小时, 50~800 rad 范围内, 可溶性染色质的量与照射剂量呈线性关系, 因此是一项反映损伤程度的早期敏感指标。观察了800 rad 照射后的动态过程, 可溶性染色质自2小时起增加, 15小时达高峰, 24小时后渐降, 此过程与胸腺中细胞的死亡及清除过程相符。还分析了照射后可溶性染色质的DNA电泳图谱, 显示为7~8条核小体间降解的典型区带, 但未见不同剂量间的差别。

关键词 可溶性染色质, 多聚脱氧核苷酸, 小鼠胸腺, 剂量关系, DNA电泳。

前 言

胸腺等淋巴系细胞在照射后早期细胞核结构遭到严重损伤, 其重要特征之一就是染色质降解。这可用多种方法测知, 其中的一个表现是在照射后的脾脏、胸腺等组织中产生一种可被0.14 M 氯化钠提取的可溶性染色质^[1,2]。近年来又发现这种可溶性染色质是由于照射后细胞核内染色质发生核小体间的降解而形成的, 其DNA部分在聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示出规律性的多条区带^[3,4], 因此说明这种降解与染色质结构特点有着内在的联系, 既然可溶性染色质的生成反映了染色质结构的破坏, 它的生成量就可能与细胞或生物受损伤的程度直接相关。本文探讨了可溶性染色质的生成量与照射剂量的依赖关系, 以及它在照射后早期的动态变化规律, 进而探讨它的生物学意义。为了了解在不同剂量和不同时间点所生成的可溶性染色质, 除了量的变化外是否还有质的变化, 我们对各观察点的样品也同时进行DNA的电泳分析。

材 料 与 方 法

动物: 本所饲养场繁殖的LACA雄性小鼠, 日龄50~60天。照射条件: ^{60}Co γ 源, 距离1 m, 剂量率约70 rad/min。

可溶性染色质的分离与测定^[3]: 小鼠全身照射后按预定时间断头活杀, 取出胸腺, 在4℃冷却条件下剪碎, 制匀浆, 分离细胞核。以0.2 mM EDTA (pH 7.0) 冻融, 使染色质破出, 7000 rpm (5500 $\times g$) 离心10 min, 染色质进入沉淀, 上清为可溶性染色质, 分别收集上清及沉淀, 经过氯酸沉淀及提取后用乙醛二苯胺法测定DNA含量, 可溶性染色质含量以其DNA量占总染色质DNA量的百分比表示。

降解 DNA 的电泳分析^[4],将可溶性染色质以 1% SDS, 1 M NaCl 及氯仿—异戊醇除蛋白后再经酒精沉淀, 分离得到 DNA。聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Loening^[5]法, 凝胶浓度 3.0%, 含尿素 4 M, 电泳用 Tris—醋酸钠—EDTANa 缓冲液, pH 7.8, 样品加样量为 0.07 O. D. (λ 260nm), 电泳完毕后凝胶条以 0.2% 亚甲兰染色, 岛津薄层扫描仪扫描。

实 验 结 果

1. 照后早期胸腺可溶性染色质生成量与照射剂量的关系

正常小鼠胸腺按本方法测得可溶性染色质的含量为 $0.95 \pm 0.24\%$, 不同剂量照射后可溶性染色质的生成量均比正常对照有明显增加, 2 小时已可看出变化, 4 小时、6 小时则进一步加剧。而在每一个时间点内, 生成量随剂量增加而增加(表 1)。表中各点与正常对照组相比, 差异均非常显著。

表 1 不同剂量照射后胸腺可溶性染色质的生成量%(均值 $\pm$ 标准差)

照后时间(h)	n	50 rad	100 rad	200 rad	400 rad	800 rad
2	4		1.9 ± 0.4	3.2 ± 0.7	4.2 ± 1.4	6.9 ± 1.5
4	5	1.8 ± 0.3	4.2 ± 0.5	8.8 ± 2.3	11.6 ± 4.7	16.4 ± 4.6
6	5	1.7 ± 0.5	5.1 ± 0.8	11.7 ± 1.0	21.0 ± 5.4	34.2 ± 2.9

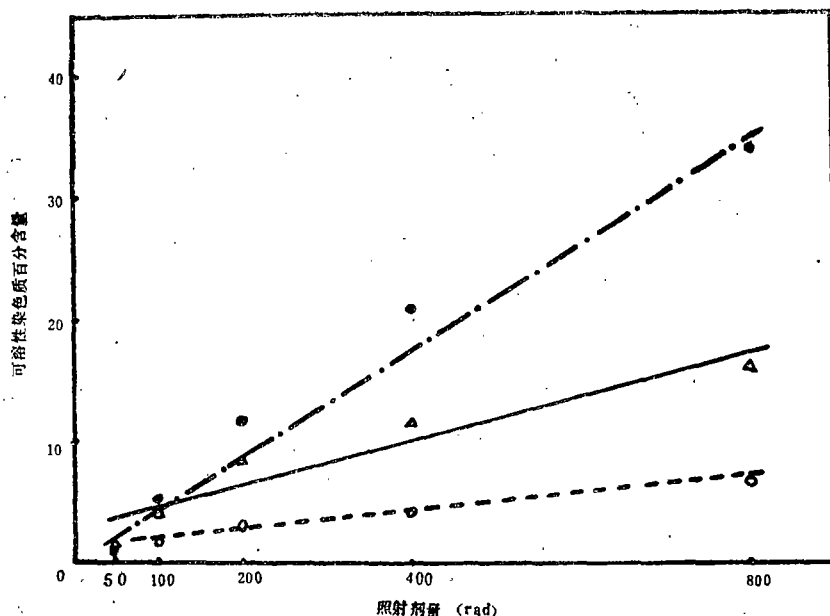


图 1 小鼠照射不同剂量后胸腺可溶性染色质的含量变化
照后 2 小时○—○—○, 4 小时△—△—△, 6 小时●—●—●。

将照射剂量对可溶性染色质含量作图, 看出在 50 rad 至 800 rad 范围内剂量与效应间存在线性关系(图 1), 三个时间的三条直线相关系数在 0.95 至 0.99 间, 回归方程式分别为: 2 小时 $Y = 1.50 + 0.0068 X$, 4 小时 $Y = 2.93 + 0.018 X$, 6 小时 $Y = 1.53 + 0.043 X$, 即随着照后时间的延长, 斜率逐渐加大。

2. 800 rad 照射后可溶性染色质生成的动态过程

为观察可溶性染色质变化的动态过程，选择 800 rad 剂量照射，观察了 48 小时内的变化。发现在照射后早期可溶性染色质的生成随时间而增加，15 小时达到高峰，24 小时有所下降，48 小时的含量已降到很低(图 2)。

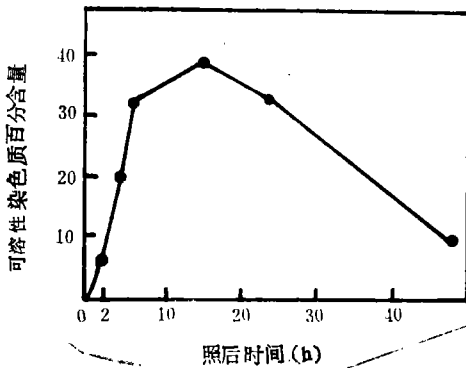


图 2 小鼠照射 800 rad 后不同时间可溶性染色质生成的动态过程

泳动最快的一条 f_1 来自一个核小体，其余的是它不同倍数的多聚体，此种图谱在表上以 (+) 号表示。可以看出虽然所有的观察点的样品都能分离得到可溶性染色质，但必须在一定剂量以上才得到典型的多种分子量的降解 DNA。产生上述典型变化所需要的剂量在照后 2 小时为 400 rad，4 小时 200 rad，6 小时只需 100 rad。另外，还对 800 rad 组观察了典型电泳图谱的持续时间，发现持续到 24 小时，48 小时后消失。

表 2 照射后出现典型核小体降解图谱的剂量时间关系

照射时间 (小时)	50 rad	100 rad	200 rad	400 rad	800 rad
2		-	±	+	+
4	-	-	+	+	+
6	-	+	+	+	+

(+ 表示出现典型降解区带)

比较不同剂量照射后所形成的 DNA 区带的相对迁移率，从图 3 可以看出 100 rad 以上各剂量组的图谱是完全相同的，不同剂量照射并不产生特殊位置的区带，计算各种样品中各区带的百分组成没有发现有规则的差别， f_1 的百分含量并无随剂量加大而升高的趋势。

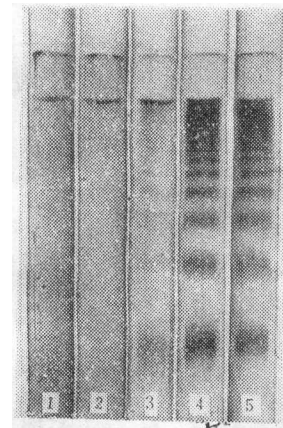


图 3 不同剂量照射后 6 小时，可溶性染色质 DNA 电泳图谱
1. 正常对照，2. 50 rad，
3. 100 rad，4. 400 rad，
5. 800 rad。

讨 论

关于照射后某些组织中生成可溶性染色质是由 Cole 和 Ellis 于 1957 年发现的，以后又有一些学者^[6-7]研究过在不同剂量照射后含量变化的规律，但结果不全一致。起初曾将这种降解产物称作游离 DNA，或多聚脱氧核苷酸，但后来发现它并不是游离的，而是与蛋白质结合的^[8]。故宜称作可溶性染色质或染色质降解产物。我们在实验中以在 0.2 mM EDTA 中能否溶解来划分这一组分，故采用可溶性染色质的名词。

根据目前对染色质结构的了解,正常细胞核中并没有可溶性染色质的存在。我们从正常组织中测得的少量可溶性染色质可能是在活杀小鼠后的操作过程中形成的,可将它视为实验对照。与此相比,照射后各时间点的可溶性染色质含量均明显升高。可以看出,此种变化对射线极为敏感,在照后4-6小时,50 rad已可引起。而且呈线性效应关系的剂量范围甚宽,从50 rad直至800 rad。国外有的作者^[7,9]报告线性关系仅到300 rad或更低,可能与采用的方法及实验条件不同有关。作为一项辐射敏感的生化改变,所需剂量较低、出现时间较早,且又有一定的时间幅度,是值得重视的。

关于可溶性染色质的生成机理,我们在另文已作过分析,可能属于一种酶学过程,因此其生成需要一定时间。从它在照射2小时后逐渐增加的时间过程来看,与细胞早期死亡过程的关系十分密切,照后4-8小时可溶性染色质剧增的时间正是胸腺细胞出现明显形态学变化的时间^[10]。48小时后可溶性染色质的减少,也可能与胸腺组织中死亡细胞的清除有关。

分析不同时期可溶性染色质的DNA电泳图谱还可看出引起染色质的核小体间降解需要一定的照射剂量及时间过程,但达到此范围后剂量的大小只影响可溶性染色质的生成量而不影响其降解程度,即染色质降解到一定程度后就不再继续降解使产物中蓄积更多的小分子量片段。这种现象只能解释为:剂量的加大或时间的延长可能使更多的细胞受累、直至死亡,以致引起可溶性染色质量的增加,但对每个受损伤的细胞来说,降解只达到一定程度。但体内的染色质降解为何与离体条件下的降解不同,为何只表现一种有限的降解,是否与染色质的结构有关,是一个值得进一步探索的问题。

小 结

1. 测定了小鼠全身照射后胸腺可溶性染色质的含量。观察到800 rad照射后可溶性染色质的含量在照后2小时开始增加,15小时达最高,24小时后逐步下降。此动态过程可能反映了照射后胸腺细胞的损伤、死亡与清除过程。

2. 照射后2、4、6小时,在50~800 rad范围内可溶性染色质的含量随照射剂量增加而增加,二者呈直线关系。

3. 分析了照射后不同时间可溶性染色质的DNA电泳图谱。发现在照后2小时400 rad以上,4小时200 rad以上,6小时100 rad以上,电泳显示典型的核小体间降解的DNA多条区带。但加大剂量并不使其降解程度加剧。说明较大剂量下可溶性染色质量的增加可能与累及的细胞数增加有关。

参 考 文 献

- [1] L. J. Cole, M. E. Ellis, *Rad Res.*, 7, 508 (1957).
- [2] M. Skalka, J. Matyasova, *Folia Biologica.*, 11, 378 (1965).
- [3] M. Skalka, J. Matyasova, M. Cejkova, *FEBS Letter.*, 72, 271 (1976).
- [4] 魏康, 刘学英, 朱雪芬, 夏寿萱, 辐射所致小鼠胸腺细胞染色质DNA的规律性降解, *中华放射医学与防护*, 4(4), 17(1984).
- [5] U. E. Loening, *Biochem J.* 102, 251 (1967).
- [6] M. Skalka, M. Cejkova and J. Matyasova, *Folia Biologica.*, 22, 335 (1976).
- [7] П. А. Нелипович Б. А., Король Г. В., Рыбалко С. Р., *Уманский Радиобиология* 22(1), 19(1980).
- [8] K. Kator, *Int J Radiat Biol.*, 28 (2), 199 (1975).

- [9] D. K. Myers, D. E. Dewolfe, K. Araki, W. W. Arkininstall, *Can J Biochem Physiol.*, 41, 1181(1963).
[10] J. Maisin, A. Dunjic, J. R. Maisin, in Berjis C. C. ed. "Pathology of irradiation" Baltimore Williams and Wikins, P. 496-508 (1971).

(1983年7月12日收到)

THE DOSE RELATIONSHIP OF THE AMOUNT OF SOLUBLE CHROMATIN IN MOUSE THYMUS AFTER WHOLE BODY IRRADIATION

Wei Kang Liu Xueying Zhu Xuefen

ABSTRACT The soluble chromatin in mouse thymus after irradiation with different doses has been studied in detail. The amount of soluble chromatin increases at 2 hrs after a dose of 800 rads, reaches maximum at 15 hrs, and after 24 hrs goes down gradually. These changes are consistent well with the dying and scavenging process of cells in thymus.

At 2, 4 and 6 hrs after irradiation, a linear relationship between the amount of soluble chromatin and the doses has been found within the range of 50~800 rads.

The electrophoretic pattern of the polydeoxyribonucleotide(PDN) of soluble chromatin shows typical bands of internucleosome degradation when the irradiation dose reaches a definite level, but further increase of the dose does not cause further degradation of PDN. It seems that the increment of soluble chromatin at higher doses may be related to the higher mortality of cells.

KEY WORDS Soluble Chromatin; Polydeoxynucleotides; mouse thymus; dose relationship; DNA electrophoresis.