

狗及大鼠精巢细胞的DNA切除修复能力 与其核内非组蛋白含量的关系

陈去恶 邢国仁 柳青梅

(中国科学院生物物理研究所)

摘要 在狗和大鼠精巢细胞中,以初级精母细胞的核内非组蛋白(NHP)含量最多,经UV照射后,其DNA切除修复能力也最高;精原细胞核内NHP含量次之,在大鼠中见到其切除修复能力明显比初级精母细胞低,而在狗中只见其平均修复能力略低于初级精母细胞,尚未得统计学显著性;圆形精子细胞核内NHP含量更少,它们与精子一样都没有切除修复能力。还发现狗和大鼠精巢精子可据碱性甲苯胺兰O染色情况分为两类:一类核可被染色,表明还残留少量NHP;另一类不被染色,表明已无NHP。狗射出精子的核不含NHP。

关键词 雄性生殖细胞;UV照射;DNA切除修复;核内非组蛋白;非预定DNA合成。

引 言

原核及真核细胞普遍具有修复损伤DNA的能力,提示着这是一种保持生物信息相对稳定的基本生命机能。生殖细胞DNA是后代遗传信息的携带者,其损伤后的修复情况如何,引起了人们的关注。DNA切除修复已见于UV^[1~3],电离辐射^[3]及诱变化合物^[4]作用后的哺乳类雄性生殖细胞中。1971年Chandley和Kofman-Alfaro^[1]报道,受UV照射的人类初级精母细胞有DNA切除修复能力,精巢中的精子无此能力。还报道^[3],受UV或X射线照射的小鼠精原细胞、初级精母细胞及圆形精子细胞有不同程度的切除修复能力,其中初级精母细胞的切除修复能力最强,精巢中的精子则无此能力。1973年Gledhill和Darzynkiewicz^[2]在受UV照射的兔及大鼠精巢细胞中也见到类似的结果,只是圆形精子细胞与精子一样均无修复能力。但以上工作都未曾研究过修复能力与核内非组蛋白含量有何关系的问题。

细胞核内的蛋白中除已了解清楚的5~6种组蛋白^[5]外,还有种类繁多的非组蛋白(nonhistone nuclear Proteins; NHP),也叫做酸性蛋白,近年来已受到广泛重视,但迄今还未了解它们在各种组织细胞中的确切种类数目和全部机能;据已有结果推测,其中应包括多种酶和结构蛋白,在核酸合成及修饰、DNA修复、核内蛋白的加工及修饰和基因表达的调控中起重要的作用^[6~7]。

本研究的目的在于探讨:(1)狗及大鼠精子生成过程中,各主要阶段细胞核内的NHP相对量的变化;(2)各阶段细胞核内NHP含量与DNA的切除修复能力间的关系。

材 料 和 方 法

1. 细胞制备

取成年狗或大鼠的精巢组织,在无菌的Dulbecco等渗PBS^[8](pH 7.2)中清理和洗净,然后在约10倍于组织体积的PBS中剪碎,用吸管轻轻吹打,用网眼为 $60 \times 60 \mu^2$ 的单层尼龙筛绢过滤,得到分散的单细胞悬液,离心(1000 rpm, 7 min)收集,悬浮在约40倍于沉淀物体积的PBS中。

狗射出精子用按摩法采得,经 PBS 洗涤和离心收集。正式实验共用狗 4 条,大鼠 5 只。

2. UV 照射及修复试验

取细胞悬液 3~4 ml,放在 55 mm 的无盖培养皿中,液体厚度不超过 2 mm,受垂距为 45 cm 的 20 瓦紫外灭菌灯(波长 2537 Å)照射 45 秒*(先照 25 秒后暂停,将悬液摇匀后再照 20 秒)。离心收集,弃 PBS,把细胞悬于 5 ml 含 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H -TdR (32 Ci/m mole)的 TC 199 培养基(含小牛血清 20%)中,移入培养瓶,在 37℃温箱中保温 3 小时。自照射时起至保温完毕,均为避光操作,对照组也按同样操作。

3. 制片及染色 (制片主要参照 Schwarzacher^[9]介绍的方法)

(1) 保温后样品经离心,用经 37℃预热的 PBS 洗涤和离心两次。

(2) 用 5 ml 1/4 浓度的 PBS(PBS 与 3 倍体积的蒸馏水混合)作低渗处理 5 分钟(此步一般可略去),离心收集。

(3) 加入 5 ml 1:3 的冰乙酸——甲醇固定液,用吸管吸吹均匀后,在 4℃冰箱中固定 1.5 小时,换一次固定液后再离心,去掉上清液,重新加入 0.5~1.0 ml 固定液,用吸管吸吹匀沉淀细胞,滴布在经 4℃预冷的湿载片上,晾干。

(4) 以 10%中性福尔马林再固定 1.5 小时,水洗 40 min,干后经 1 N HCl 60℃水解 8 min,进行 Feulgen 染色。由于细胞已经过上述反复清洗、固定和 HCl 水解,未掺入的 ^3H -TdR 已去除干净,实验表明无需用冷的 5%TCA 清洗。

4. 放射自显影及观察

染过的片子干后,用稀释一倍的“核 4”乳胶涂布,在 4℃于暗盒中曝光 14 天;在 18℃用 D-19 显影 2 min,水洗, F-5 定影 15 min,水洗 30 min;干后,用丹玛胶封片。在大型 Leitz 万能显微镜的油浸物镜下观察和计数完整细胞核中银粒数,每次实验随机观察各类细胞各 200 个。

5. 核内非组蛋白相对定量测定

取未经照射和保温的正常精巢细胞悬液,用 0.5 mm 厚的载片依上述方法制片,再经 10%中性福尔马林固定,水洗;依 Smetana 和 Busch^[10]的非组蛋白细胞化学方法染色(固定过的片子晾干后,在室温中放置数月则染色效果更好)。基本过程如下。

(1) 用约 90℃水浴的 5%TCA 处理 15 min,以去掉 RNA 和 DNA,水洗。

(2) 用 60℃水浴的 1 N HCl 处理 10 min,以去掉组蛋白(但经 Desai 和 Foley^[11]证明,染色前不必用 HCl 去除组蛋白,对非组蛋白的定量测定结果没有影响,所以我们在正式实验中已省略掉去组蛋白步骤),水洗。

(3) 用经 0.1 N NaOH 调至 pH 9.0 的 0.5%甲苯胺蓝 O 水溶液染色 40 min,以 pH 9.0 的 tris 缓冲液分色,水洗,晾干。

(4) 用本所研制的 XFG-01 型显微分光光度计作单个细胞核内 NHP 相对定量测定,采用 Gacia^[12]的一波双区法,比色波长为 630 nm,每次实验对各类细胞分别随机测定 20 个。

结 果

UV 照射组和对照组细胞在含 ^3H -TdR 的培养基中保温 3 小时后,都可见到少量因 S 期 DNA 复制而被标记的精原细胞和初级精母细胞,特点是银粒密集成团,难于计数;在切除修复的非预定 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis; UDS)时掺入的 ^3H -TdR 则表现为银粒较稀疏,随机

* 据粗略计算,剂量约为 30 J/m²

分布。两者一般容易区别。所以 Cleaver 和 Thomas^[13]最近主张在检查 UDS 的放射自显术中,不必加羟脲来抑制 S 期的 ^3H -TdR 掺入。经过一些初步观察后,我们选择每核含 6-50 颗银粒的标记细胞作为切除修复的细胞,以其在总观察细胞中所占的百分数作为衡量切除修复能力的尺度,而每核 0~5 颗银粒者视为本底,含 51 颗以上银粒者为 S 期掺入的细胞。S 期掺入细胞,在 UV 照射组狗的精原细胞及初级精母细胞中分别占 1.58% 及 1.56%,大鼠分别占 6.13% 及 0.58%;在对照组狗的精原细胞及初级精母细胞中分别占 4.31% 及 1.25%,大鼠分别占 9.15% 及 0.71%。

由于载片上的细胞已失去原来的组织学位置,为了准确起见,我们除采用 Feulgen 染色法外,还只选出其中易于明确辨认的精原细胞、初级精母细胞、圆形精子细胞和精巢精子四种类型进行比较。

1. 狗精巢细胞实验结果

(1) 非组蛋白相对定量测定 从图 1 可以见到,正常的精巢细胞中以初级精母细胞核的 NHP 含量最高,精原细胞次之,圆形精子细胞又次之。根据显微观察和比色测定,我们发现精巢中的精子有两种不同的情况(见图 2):一种可不同程度地被甲苯胺蓝 O 染色,比色测定表明核内还有 NHP,且可能是随着渐趋成熟而 NHP 含量在逐步减少,暂称之为“未熟”精子;另一种则完全不

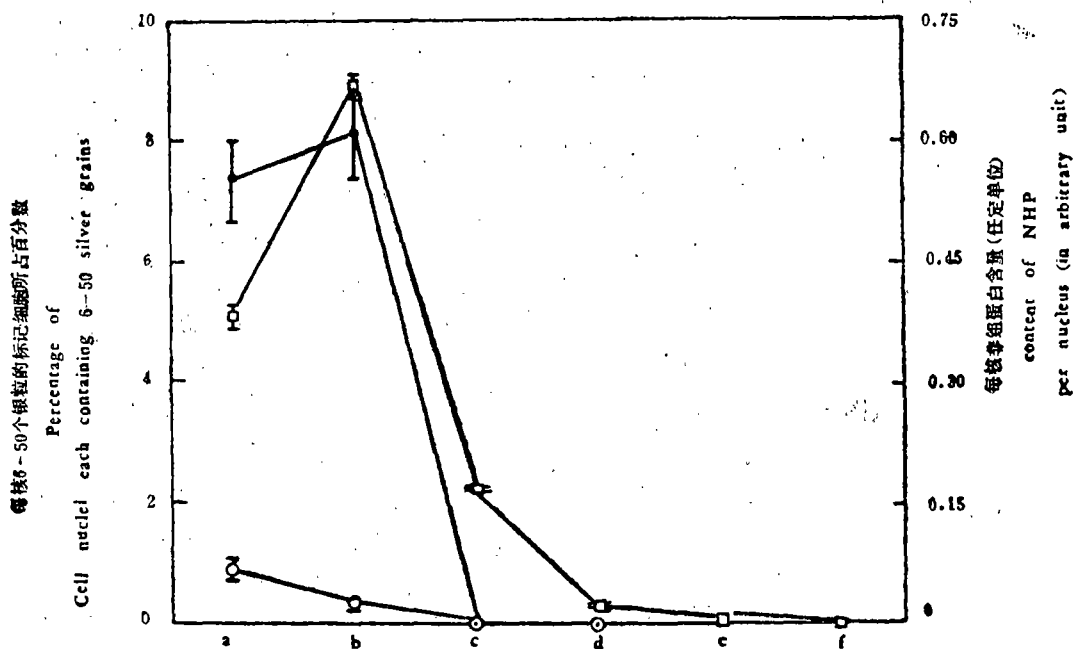


图 1 紫外线照射后狗精巢细胞核 ^3H -TdR 标记情况与各正常细胞核内 NHP 含量的对比
Fig. 1 The ^3H -TdR labeling of male dog germ cells after UV-irradiation (ca. 30 J/m²) and the nonhistone nuclear protein content of the un-irradiated cells ($\bar{x} \pm S. E.$).

□ NHP 相对含量, NHP Content

○ 对照组标记细胞 Labeled Cells in un-irradiated Controls

● 照射组标记细胞 Labeled Cells in irradiated groups

$r = 0.926, p < 0.05$

a 精原细胞 spermatogonia, b 初级精母细胞 Primary spermatocytes.

c 圆形精子细胞 round spermatids, d 未熟精子 "immature" spermatozoa,

e 成熟精子 "mature" spermatozoa in testis,

f 射出精子 spermatozoa taken from ejaculated semen.

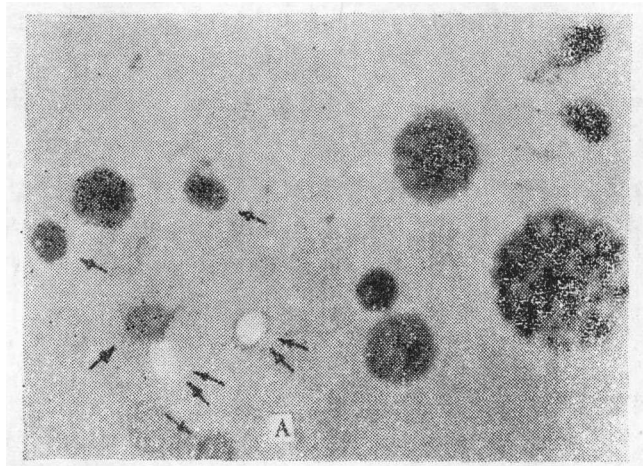


图 2 狗精巢内甲苯胺蓝 O 染色性不同的两种精子

核内含少量 NHP 的“未熟”精子(单箭头所示);不含 NHP 的“成熟”精子(双箭头所示);右上角有两个未被染色的正在形成中的精子(相差显微镜照相,放大约 1100 倍)

Fig. 2 Two groups of spermatozoa in dog testis, identified by their stainability to alkaline-toluidine blue O; “immature” spermatozoa, pointed by single arrows, containing a little amount of non-histone nuclear proteins(NHP); “mature” spermatozoa, pointed by double arrows, containing no NHP. Two stained spermatozoa during spermiogenesis are seen at the upper-right corner. (phase contrast microphotograph, magnified about 1100 ×)

被染色, 比色测定表明核内已无 NHP, 暂称为“成熟”精子。正在形成中的精子的核也明显着色, 但因片上不多见, 形状及大小不规则, 不宜作比色测定。射出精子的核内都测不出 NHP。

(2) 放射自显影结果 从图 1 可以见到, 在受 UV 照射的狗精巢细胞中, 切除修复的标记细胞百分数, 以初级精母细胞最高, 表明其切除修复能力最强; 精原细胞的平均值略低于初级精母细胞(未得统计学显著性); 圆形精子细胞和“未熟”及“成熟”的精巢精子都不被标记, 表明它们已没有 DNA 切除修复能力。

(3) 相关性 从图 1 可以看到, 表示切除修复能力的曲线和核内 NHP 含量曲线的趋势一致, 经数理统计处理, 二者间相关显著($r=0.926$, $p<0.05$)。

2. 大鼠精巢细胞实验结果

(1) 非组蛋白相对定量测定 图 3 表明, 正常大鼠精巢细胞中, 初级精母细胞核内 NHP 含量最高, 精原细胞次之, 圆形精子细胞又次之。由于大鼠精巢中已成形精子的核为刀状, 窄而长, 无法用 XFG-01 显微分光光度计比色, 故缺少精子核内 NHP 含量的实测数据, 但在显微镜下所观察到的情况和狗的精巢精子近似, 也有两种不同的染色表现: 一种核可被甲苯胺蓝 O 染色, 另一种则完全不被染色, 可凭此而定性地判断核内 NHP 的有和无。

(2) 放射自显影结果 图 3 表明, 大鼠精巢细胞受 UV 照后, 在切除修复的标记细胞所占百分数中, 也以初级精母细胞最高, 亦即切除修复能力最强; 精原细胞次之; 圆形精子细胞及成形的精子几乎都不被标记, 表明它们已几乎没有切除修复能力。

(3) 相关性 从图 3 可以见到, 表示切除修复能力的曲线和核内 NHP 含量的曲线两者的起伏趋势是一致的, 情况与狗精巢细胞中相同。仅由于缺少精子核内 NHP 含量的实测数据而自由度太小, 未能得到显著相关。若以完全不被染色精子核的 NHP 含量作为零来参加统计处理, 也可得到修复能力与核内 NHP 含量之间的显著相关($r=0.959$, $p<0.05$)。

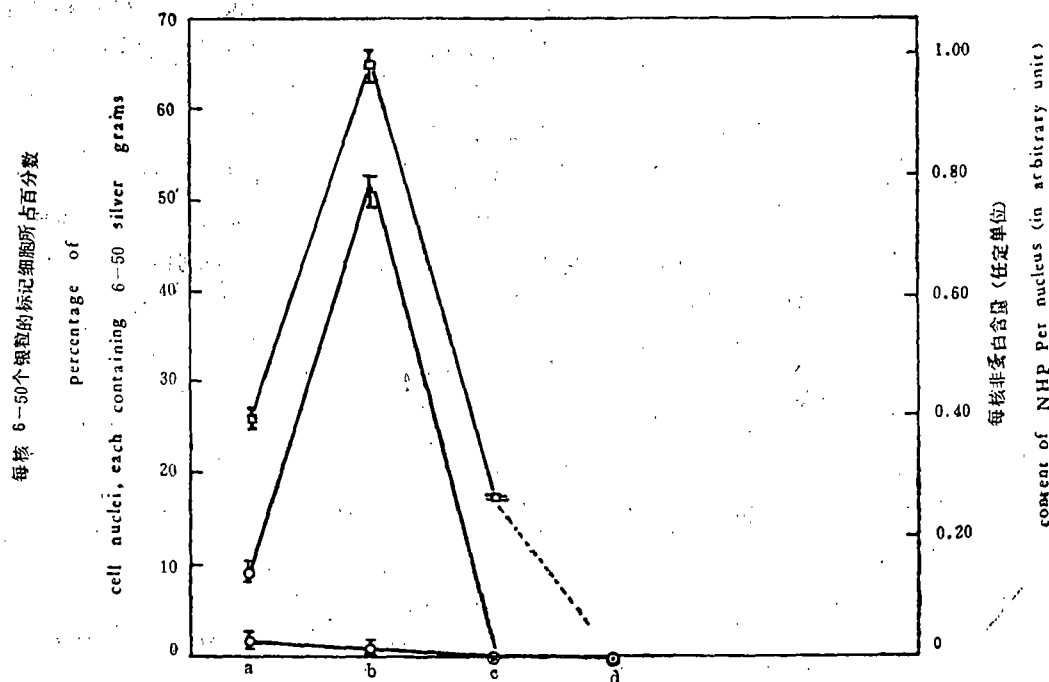


图3 紫外线照射后大鼠精巢细胞核 ^3H -TdR标记情况与各正常细胞核内NHP含量的对比(每点上下垂线表示标准误差)。

Fig. 3 The ^3H -TdR labeling of male rat germ cells after UV-irradiation (ca. 30 J/m^2) and the non-histone nuclear protein content of the un-irradiated cells ($\bar{x} \pm \text{S. E.}$).

□ NHP 相对含量, NHP Content

○ 对照组标记细胞 Labeled cells in un-irradiated controls

● 照射组标记细胞 Labeled cells in irradiated groups

a 精原细胞 spermatogonia, b 初级精母细胞 primary spermatocytes,

c 圆形精子细胞 round spermatids,

d spermatozoa in testis.

讨 论

本研究在狗及大鼠精巢细胞中所得到的结果是: 初级精母细胞的DNA切除修复能力最高, 精原细胞次之(但在狗中未得到显著性), 圆形精子细胞及精子几乎都没有修复能力。这与过去一些作者^[1~3]在人、小鼠、兔及大鼠精巢细胞中所得的结果在趋势上是一致的。

狗精巢中主要四类细胞的DNA切除修复能力与其核内NHP含量之间已得到显著相关(图1)。在大鼠中虽因缺少精子核内NHP含量的实测数据而未得到数理统计上的显著相关, 但从图3中两条曲线起伏的一致性, 和大鼠精巢精子的甲苯胺蓝O着色性的观察结果来估计, 一旦能测出所缺数据, 就能得到显著相关。以上总的结果表明: 切除修复能力较高的精巢细胞, 其核内NHP含量也较多。如果在这两种动物之间进行比较, 也可以见到这样的情况: 大鼠的初级精母细胞修复能力比狗的高(图1及图3的左边纵座标), 所测得的核内NHP含量也比狗的多(图1及图3的右边纵座标, 单位相同); 大鼠精原细胞的修复能力与狗的近似, 两者的核内NHP含量也相近。

核内 NHP 包括修复 DNA 所需的酶^[6~7], 所以 NHP 含量的减少应该是切除修复能力下降的一种原因。但由于 NHP 还包括许多具有其它功能的蛋白^[6~7], 因而不能将核内 NHP 总量的增减看作修复能力升降的唯一原因, 所以对于圆形精子细胞核内虽然还有相当量的 NHP, 却已几乎完全不能进行切除修复的结果(图 1 及图 3)是不难理解的。

成熟精子不仅核内测不出 NHP, 且其 DNA 已被组蛋白所高度“装紧”(Packed), 显然已无法进行转录^[14], 因此它完全不能修复损伤 DNA。但还不知道精子核内基因损伤后的遗传危险性是否绝对无法挽救, 有人曾建议研究损伤的精子 DNA 能否被受精卵修复的问题^[14]。由于已见到哺乳类(小鼠)卵母细胞对自身的损伤(UV 及化学损伤)DNA 有修复能力^[15], 估计精子的损伤 DNA 不是完全没有希望在受精卵中被修复的。

本工作承蒙胡匡祐、李子孝、周启玲、郑德存同志的大力协助, 特此致谢!

参 考 文 献

- [1] A. C. Chandley and S. Kofman-Alfaro, *Exp. Cell Res.*, 69, 45~48 (1971)
- [2] B. L. Gledhill and Z. Darzynkiewicz, *J. Exp. zool.*, 183, 375~382 (1973)
- [3] S. Kofman-Alfaro and A. C. Chandley, *Exp. Cell Res.*, 69, 33~44 (1971)
- [4] G. A. Sega, *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, 71, 4955~4959 (1974)
- [5] E. W. Johns et al., in G. H. Goodwin et al. ed. *"The organization and expression of the eukaryotic genome"* pp. 3~19, London Academic press, (1977)
- [6] J. F. Chiu and L. S. Hnilica, in H. J. Li and R. Eckhardt, ed. *"Chromatin and chromosome structure"* pp. 193~254, Academic Press, New York (1977)
- [7] H. Busch, in B. W. O'Malley and L. Birnbaumer, ed. *"Receptors and hormone action"*, Vol. 1 pp. 31~102, Academic Press, New York (1977)
- [8] G. Penso and D. Balducci, *"Tissue culture in biological research"*, p. 72, Elsevier Publishing Co., Amsterdam (1963)
- [9] H. G. Schwarzscher, in H. G. Schwarzscher and U. Wolf, ed. *"Methods in human cytogenetics"* pp. 71~81, Springer-Verlag, Heidelberg (1974)
- [10] K. Smetana and H. Busch, *Cancer Res.*, 26, 331~337 (1966)
- [11] L. S. Desai and G. E. Foley, *J. Histochem. Cytochem.*, 22, 40~45 (1974)
- [12] A. M. Garcia, *J. Histochem. Cytochem.*, 13, 161~167 (1965)
- [13] J. E. Cleaver and G. H. Thomas, in E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt, ed. *"DNA repair, a laboratory manual of research procedure"*, vol. 1 pt. B, pp 277~287, Marcel Dekker, Inc., New York, (1981)
- [14] R. L. Gledhill, in J. G. Duckett and P. A. Racey, ed. *"The biology of the male gamete"* pp. 215~226, London Academic Press (1975)
- [15] J. L. Brazill and Y. Masui, *Exp. Cell Res.*, 112, 121~125 (1978)

(1984年5月25日收到)

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE DNA EXCISION REPAIR ABILITY AND THE CONTENT OF NON-HISTONE NUCLEAR PROTEINS OF MALE GERM CELLS OF DOG AND RAT

Chen Que* , Xing Guoren , Liu Qingmei

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing, China)

ABSTRACT The DNA excision repair ability of UV-irradiated male germ cells of dog and rat was determined by silver grain counting after ^3H -TdR incorporation and autoradiography. The relative content of alkaline-toluidine blue O-stained non-histone nuclear proteins (NHP) *in situ* of the normal germ cells was measured by microspectrophotometry. Among the germ cells the primary spermatocytes contain the most NHP, they have revealed the highest repair ability; the spermatogonia contain less NHP, a lower repair ability (but that of dog spermatogonia was only a slightly lower average value); the round spermatids contain even less NHP, they, as well as the spermatozoa, no repair ability. A significant statistical correlation coefficient between the repair ability and the nuclear NHP content had been obtained in dog germ cells; while that in the rat germ cells has not yet been obtained, merely owing to the technical difficulty in measuring the NHP content in the irregular-shaped spermatozoan nuclei. By the microscopical observation or together with the microspectrophotometry, two groups of spermatozoa had been identified in dog and rat testes: the one's nuclei contain a little amount of NHP and the other's don't. No NHP was found in the nuclei of dog spermatozoa taken from ejaculated semen.

KEY WORDS Male germ cell; UV-irradiation; DNA excision repair; Non-histone nuclear protein; UDS.

* The previous spelling was Chen Chu-Woo.