

ADP-核糖化对大鼠脾细胞核转录活性的影响及其辐射效应

徐 惠 易禄康

(第三军医大学, 重庆)

摘要 本实验采用 8 Gy γ 线全身照射成年雄性 Wistar 大鼠, 观察 ADP-核糖化对大鼠脾细胞核转录活性的影响。结果表明核糖化对 RNA pol(I + III)、pol II 的活性均有抑制作用, 并且对 pol(I + III) 的抑制率高于 pol II, 提示 ADP-核糖化是脾细胞核 RNA 聚合酶, 特别是 pol I 活性的影响因素; 当核糖化液中加入 ADPRT 的特异性抑制剂 3-AB, 核糖化对转录活性的抑制作用消失, 这进一步证实了 RNA 聚合酶活性的减少是由于核糖化所致。结果还表明照后 4 h 内, ADPRT 活性降低, 然后逐渐恢复, 到 18 h 已完全恢复, 表明 8 Gy γ 线照射可抑制 ADPRT 的活性, 并且其辐射效应修复快。

关键词 ADP-核糖化, 转录, 辐射, RNA 聚合酶

多聚 ADP-核糖化是染色质蛋白质翻译后的一种共价修饰作用, 催化酶为 ADP-ribose 转移酶, 简称 ADPRT, 在真核细胞核内均发现有此酶存在, NAD^+ 是其反应的必需底物。

核糖化反应可调节细胞的许多代谢过程。据文献报道, ADP-核糖化可抑制内源性 RNA 聚合酶的活性, 从而影响基因的表达, 而对外源性 RNA pol 的活性无影响^[1-3]。对此, 目前国内尚未见文献报道。本实验探讨 8 Gy γ 线全身照射大鼠后, ADP-核糖化对脾细胞核转录活性的影响及其辐射效应。

材 料 与 方 法

1. 实验动物

健康 Wistar 雄性大鼠, 体重 170—220 g。

2. 实验方法

(1) 大鼠脾细胞核的制备 参照周建新等^[4]的方法。

(2) RNA 聚合酶转录活性的测定 参照 Marzluff 等^[5]的方法。

(3) ADP-核糖化^[3] 于每含 10 μg DNA 的核贮存液中, 加入 500 μl 核糖化液(0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 4 mmol/L NAD^+), 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下振荡 15 min, 置冰浴中 10 min, 离心, 用缓冲液(25%甘油, 1 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5)洗核 3 次, 用核贮存液介质(25%甘油, 1.0 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L EDTA, 5.0 mmol/L DTT, 50.0 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)将核调成 1 mg DNA/ml。

(4) 动物分组及照射条件 ① 动物分组: 实验动物分五组: 对照组(未照射组), 照后 1 h 组, 照后 4 h 组, 照后 18 h 组, 照后 24 h 组。每组五只大鼠。

② 照射条件: ^{60}Co γ 线全身照射, 剂量为 8 Gy, 剂量率为 2.048 Gy/min。

实 验 结 果

1. 细胞核体外转录系统和核糖化系统最适条件

实验发现, 细胞核 DNA 加入量为 30 μg 时, ^3H -UTP 掺入率达最大。酶促反应在 30 min 以内时, 细胞核转录活性呈线性增长。核糖化酶促反应在 15 min 以内时, 核糖化对细胞核转录抑制作用迅速增强, 以后随时间延长抑制作用趋于稳定。

2. ADP-核糖化对 RNA 聚合酶转录活性的影响

如表 1 所示, 核糖化后, $\text{pol}(\text{I} + \text{III})$ 和 pol II 活性均显著降低 ($P < 0.0001$), 活性抑制率分别为 32.6% 和 28.7%。当核糖化液中加入 5 mmol/L 3-氨基苯甲酰胺 (3-AB), pol 的转录活性恢复到核糖化前的水平 ($P > 0.05$)。

Tab 1. The effect of ADP-ribosylation on RNA polymerases activities in spleen nuclei (cpm/ μg DNA)

	-R	+R	NAD + 3-AB	Ratio of inhibition (%)
$\text{pol}(\text{I} + \text{III})$	92.18 $\pm$ 10.81	62.08 $\pm$ 5.11	82.49 $\pm$ 9.02	32.65
pol II	130.69 $\pm$ 12.92	93.25 $\pm$ 11.25	118.44 $\pm$ 8.48	28.65

-R: no ADP-ribosylation +R: ADP-ribosylation NAD + 3-AB: adding 5 mmol/L 3-AB when ADP-ribosylation

Tab 2. The effect of ADP-ribosylation on the RNA $\text{pol}(\text{I} + \text{III})$ activities of spleen nuclei at various times after γ -irradiation (cpm/ μg DNA)

	Time after irradi. (h)					Sig.	
	Control	1	4	18	24	F	P
-R	92.18 $\pm$ 10.81 (6)*	65.27 $\pm$ 4.23 (6)*	56.21 $\pm$ 4.53 (6)*	59.48 $\pm$ 6.35 (6)*	70.37 $\pm$ 6.53 (6)*	205.77	<0.0001
+R	62.08 $\pm$ 5.11 (6)*	43.05 $\pm$ 5.07 (6)*	44.19 $\pm$ 4.06 (6)*	40.40 $\pm$ 3.24 (6)*	48.39 $\pm$ 2.61 (6)*	47.07	<0.0001
NAD + 3-AB	82.49 $\pm$ 9.02 (3)*	59.96 $\pm$ 7.15 (3)*	49.46 $\pm$ 5.51 (3)*	54.45 $\pm$ 4.70 (3)*	62.35 $\pm$ 5.50 (3)*	31.10	<0.0001
Ratio of inhibition (%)	32.65	34.01	21.38	32.05	31.23		

*The figures in parentheses represent the numbers of experiments carried out

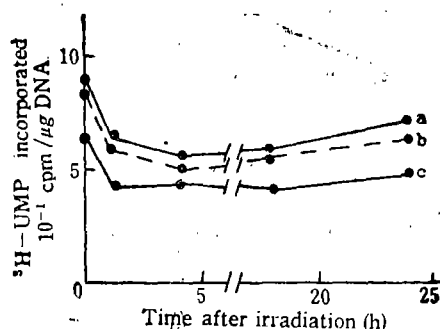


Fig 1. The effect of ADP-ribosylation on the RNA $\text{pol}(\text{I} + \text{III})$ activity in spleen nuclei at various times after γ -irradiation
(a) control, (b) control + 4 mmol/L NAD + 5 mmol/L 3-AB (c) control + 4 mmol/L NAD

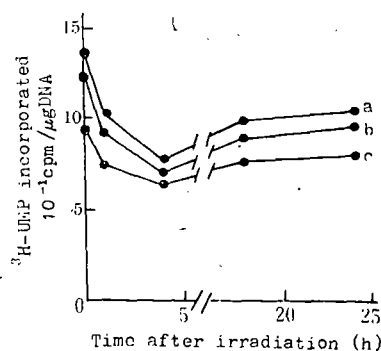


Fig 2. The effect of ADP-ribosylation on the RNA pol II activities in spleen nuclei at various times after γ -irradiation
(a) control (b) control + 4 mmol/L NAD + 5 mmol/L 3-AB (c) control + 4 mmol/L NAD

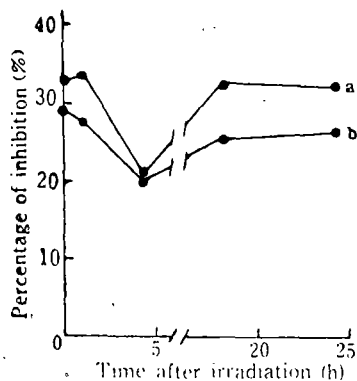


Fig 3. The relation between inhibition of RNA pol (I + III) (a), pol II (b) activities by ADP-ribosylation and various times after γ -irradiation

3. γ 线照射对 ADP-核糖化的影响

如表 2 及图 1、2、3 所示, 照射后各组 pol (I + III) 和 pol II 活性与对照组比较明显降低 ($P < 0.05$)。照后 4 h 抑制率最大, 分别为 39% 和 44%, 照后 18 h 和 24 h 转录活性较 4 h 组稍有回升。

除照后 4 h 组外, 照后其它各时间组与对照组相比, 核糖化对 RNA pol (I + III) 和 pol II 活性的抑制率接近, 分别为 31%—35% 和 25%—29%。核糖化对照后 4 h 组 RNA pol (I + III) 和 pol II 活性的抑制率最低, 分别为 21% 和 20%。当核糖化液中加入 5 mmol/L 3-AB, 核糖化对 pol (I + III) 和 pol II 活性的抑制作用消失 ($P > 0.05$)。

讨 论

1. ADP-核糖化对 RNA 聚合酶转录活性的影响

有众多的文献报道真核细胞的 ADP-核糖化对某些 DNA 代谢具有调节作用。染色质结合的酶核糖化后, 其酶活性将降低, 而关于核糖化对 RNA pol 活性影响的报道却很少。Das 等人发现核糖化可降低 RNA pol I 的活性, 对 pol II 活性影响的说法不一。本实验结果表明核糖化对脾细胞核 RNA pol (I + III) 和 pol II 的活性均有抑制作用, 对 pol (I + III) 活性的抑制率高于 pol II, 这与 Das 等报道的结果相符^[2,3], 提示多聚 ADP-核糖化是脾细胞核 RNA 聚合酶特别是 pol I 活性的调节因素。实验结果还表明, 当核糖化液中加入 5 mmol/L ADPRT 的特异性抑制剂 3-AB, 可解除核糖化对 RNA 聚合酶转录活性的抑制作用, 从而进一步证实 RNA 合成的减少是由于 ADP-核糖化作用的结果。Das^[3] 对核糖化可抑制 RNA 聚合酶活性的机制提出三种假设途径: 第一, 染色质结合的 RNA 聚合酶自身直接核糖化, 引起酶活性的降低; 第二, RNA 合成的调节蛋白核糖化, 抑制了 RNA 的合成; 第三, ADPRT 是核糖化的主要受体, 其自身核糖化可能对 RNA 合成也有抑制作用。第一种假设与 Werner^[1] 的观点一致。蛋白质 A₂₄ 是核糖体基因转录的阻遏物, 此蛋白质核糖化^[8] 可能对 pol I 的活性有调节作用。

2. γ 射线照射与 ADP-核糖化

近年来有许多关于大剂量 (100 Gy 以上) 电离辐射对核糖化影响的研究^[7,8], 而 10 Gy 左右剂量电离辐射对动物组织细胞核核糖化影响的报道却不多见。本实验采用 8 Gy ^{60}Co γ 线全身照射大鼠, 结果表明 8 Gy γ 线照射对照后 1 h 组脾细胞核 ADP-核糖化没有明显的影响; 照后 4 h 组脾细胞核的核糖化有明显的抑制作用, 照后 18 h 和 24 h 组, 这种抑制作用几乎完全消失, 这与 Zotova^[9] 和 Nelipovich^[10] 所报道的大鼠接受 10 Gy γ 线照射后, 2—3 h 内胸腺细胞核 ADPRT 活性急剧降低的结果近似, 可见一般剂量与高剂量电离辐射对 ADPRT 的影响相反。

对肝脏等辐射不敏感组织, 辐射对其 ADPRT 活性的影响尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] W. E. G. Muller and R. K. Zahn, Mol. Cell Biochem., 12, 147 (1976).
- [2] T. Taniguchi, S. Suzuki and Y. Shizuta, Biochem. Biophys. Res. Commun., 127, 526 (1985).
- [3] B. R. Das and M. S. Kanungo, Mol. Biol. Rep., 12, 43 (1987).

- [4] 周建新等, 第三军医大学学报, 6, 217(1984).
[5] W. F. Marzluff, *Methods in cell biology.*, 19, 317(1978).
[6] H. Okayama and O. Hayaishi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84, 755(1978).
[7] R. C. Benjamin and D. M. Gill, *J. Biol. Chem.*, 255, 10493(1980).
[8] R. C. Benjamin and D. M. Gill, *J. Biol. Chem.*, 255, 10502(1980).
[9] R. N. Zotova, S. R. Umanskii and V. I. Tokarskaia, *Radiobiologiya*, 23, 152(1988).
[10] P. A. Nelipovich, L. V. Nikonova and S. R. Umansky, *Int. J. Rad. Biol.*, 53, 749(1988).

(稿件收到日期: 1990年7月4日)

EFFECT OF ADP-RIBOSYLATION ON TRANSCRIPTION-AL ACTIVITY IN RAT SPLEET NUCLEI AND RESPONSE TO IRRADIATION

Xu Hui and Yi Lukang

(Third Military Medical University, Chongqin)

ABSTRACT The effect of ADP-ribosylation on transcriptional activity in isolated nuclei from spleen of adult male rats irradiated with 8 Gy gamma-rays was studied. The results showed the activities of RNA pol(I+III) were all inhibited by ADP-ribosylation and this inhibition was lost in the presence of 3-AB, a specific inhibitor of ADPRT. It confirmed the effect of ADP-ribosylation. The fact that ADP-RT activity decreased within 4 hours after irradiation and subsequently restored entirely after 18 hours showed irradiation of 8 Gy gamma ray inhibited the ADPRT activity and the effect of irradiation disappeared quickly.

KEYWORDS ADP-ribosylation, Transcription, Irradiation, RNA polymerases

上接第205页 (Continued from p 205)

THE OBSERVATION OF EFFECTS FOR FREQUENCY OF LYMPHOCYTE MICRONUCLEI ON AUTOHEMOTRANSFUSION AFTER UV RADIATION

Huang Jinzhong, Liu Jinwen, Wang Lianzhi

(Institute of Radiation-Hygiene of Hebei Province, Shijiazhuang)

Gao Yulin, Wang Weiping and Liu Ruichun

(Hebei Medical college 2nd Hospital, Shijiazhuang)

ABSTRACT This paper reports micronucleus test for studying cytogenetic effects. The patients were treated by autohemotransfusion, after UV radiation. The results showed that there is no significant increase in the frequencies of micronucleus in lymphocyte, whereas the lymphocytic ability of proliferation was inhibited.

KEYWORDS Autohemotransfusion, Frequency of micronucleus, UV radiation.