

AT细胞特征及纠正细胞基因缺陷的研究

白晓彬 章扬培 金瑾珍 吴 英 徐惠英 夏寿萱

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

摘要 实验证明一株经SV 40病毒转化的毛细血管扩张性共济失调症病人的皮肤成纤维细胞AT 5 BIVA, 对电离辐射和博莱霉素高度敏感, 对 γ 射线诱发的DNA合成抑制呈抗性。本文尝试用DNA介导基因转移法向AT细胞导入人基因组DNA或其酶切片段, 未能获得稳定的对 γ 射线抗性的转化细胞。染色体核型分析证实AT 5 BIVA细胞的第11号染色体中的一条缺失或异常。本文对外源目的基因未能稳定植入AT细胞的原因进行了讨论。

关键词 AT细胞, 辐射敏感性, 基因转移, 染色体

人毛细血管扩张性共济失调症(Ataxia telangiectasia, 简称AT)是一种常染色体隐性遗传病。已知AT患者皮肤的成纤维细胞是对电离辐射敏感的DNA修复缺陷的细胞, 它是研究人细胞辐射敏感性和分离人辐射损伤修复基因的理想材料。本文对AT细胞特性进行了研究, 并对纠正其修复基因的缺陷做了尝试。

材料与 方法

1. 细胞培养

经SV 40病毒转化的AT 5 BIVA(属互补组D, 以下简称AT细胞)和HeLaS 3细胞(均由日本京都大学池永满生教授赠送)在含10%小牛血清和各50 U/ml的青、链霉素DMEM(GIBCO)培养液中, 于37℃ 5% CO₂中培养。

2. γ 射线照射后的细胞活存率测定

第1 d分别种下处于指数生长期的AT和HeLaS 3细胞, 培养24 h。第2 d照射前移去培养液, ⁶⁰Co γ 射线照射剂量为1.0、2.0、3.0、4.0和5.0 Gy, 剂量率1.54—1.776 Gy/min, 距离4 m。照射后细胞用PBS洗一遍, 加新鲜培养液继续培养。10 d左右细胞长成克隆。用乙醇固定克隆15 min和结晶紫染色15 min, 计算形成的克隆数, 并绘制活存曲线。

3. 博莱霉素(Bleomycin)处理后的细胞活存率测定

第1 d种细胞, 第2 d将博莱霉素(天津河北制药厂产)用无血清DMEM配成1.0 mg/ml浓度, 再依次稀释成设计的药物浓度。移去培养液加药液, AT细胞分0、2.5、5.0、10.0、20.0和30.0 μ g/ml 6个浓度的药物处理组, HeLaS 3细胞也分0、5.0、10.0、20.0、30.0和50.0 μ g/ml 6个浓度的处理组, 温度为37℃时药物处理1 h, 移去药液后用PBS洗一遍。加新鲜培养液培养10 d左右。计算细胞活存率并绘制活存曲线。

4. DNA合成抑制测定

采用放射性同位素双标记方法^[1]。第1 d种下指数生长期的AT和HeLaS 3细胞, 每 ϕ 60 mm培养皿种 8.0×10^5 细胞, 每剂量点种两皿。培养24 h后加入终浓度为 18.5×10^2 Bq/ml的¹⁴C-

国家自然科学基金资助项目, 题目号 38970281

TdR 做内标准, 标记 16 h。移去培养液后用 PBS 洗一遍。保留两皿细胞做未照射对照, 其余细胞用 ^{60}Co γ 射线分别照射 1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 Gy。立即用 PBS 将被照射细胞与对照细胞洗一净, 加入含有 10% 小牛血清的 DMEM, 同时加入终浓度为 $185 \times 10^2 \text{ Bq/ml}$ 的 ^3H -TdR, 在 37°C 下标记 3 h。用 PBS 洗一遍, 放入 7 ml 细胞溶破液 ($\text{NaCl } 2.0 \text{ mol/L}$, $\text{EDTA-Na}_2 \text{ } 0.02 \text{ mol/L}$, 1% Triton-X 100, pH 8.8)。参考文献[2]中 DNA 洗脱方法, 稍加改动。选用 $1.2 \mu\text{m}$ 孔径混合纤维膜(上海医药工业研究院产)截留 DNA 大分子, 而后将滤膜移入计数瓶中, 分别经酸、碱处理后, 加入闪烁液暗化过夜。次日用 LKB 1215 RACKBETA II 液闪仪分别计量 ^{14}C 和 ^3H 放射性, 计算 DNA 合成比值。

$\text{DNA 合成比值} = \frac{\text{受照细胞的 } ^3\text{H}(\text{cpm}) : ^{14}\text{C}(\text{cpm})}{\text{未照细胞的 } ^3\text{H}(\text{cpm}) : ^{14}\text{C}(\text{cpm})} \times 100\%$ 。

5. 染色体分析方法^[3]

选用指数生长期的 AT 细胞, 用秋水仙碱处理 6—8 h 收集细胞, 在低渗液中处理 20 min, 固定、染色、观察、拍照。

6. DNA 介导基因转移和转化细胞的筛选

DNA——磷酸钙共沉淀和电脉冲基因转移方法参见[4]。用共转染法把 $20 \mu\text{g}$ HeLaS 3 基因组 DNA 或经限制性内切酶消化后的 HeLaS 3 DNA 片段与 $5.0 \mu\text{g}$ pSV 2 neoDNA 共同导入 AT 5 BIVA 细胞。依次用 G 418(终浓度 $400 \mu\text{g/ml}$)及 3.0、4.0 和 5.0 Gy γ 射线筛选转化的 AT 细胞。扩增转化细胞的克隆。提取转化细胞的 DNA 与 ^{32}P -dATP 标记的 pSV 2 neoDNA 探针做点杂交, 检测外源 DNA 的导入。进一步将转化的 AT 细胞进行 γ 射线和博莱霉素处理后的活存率分析。

结 果

1. AT 和 HeLaS 3 细胞受 γ 射线照射后的活存曲线

比较 AT 和 HeLaS 3 细胞 γ 射线照射剂量与活存率的关系, 可以看出 AT 细胞对 γ 射线高度敏感。HeLaS 3 细胞受 1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 Gy γ 射线照射后, 克隆形成率分别为 80.0%、46.3%、25.6%、10.2% 和 4.77%; 而 AT 细胞仅为 44.5%、10.9%、3.21%、0.94% 和 0.29%。

2. AT 和 HeLaS 3 细胞经博莱霉素处理后的剂量效应曲线

比较 AT 和 HeLaS 3 细胞受不同剂量博莱霉素作用后的活存率, 可以看出 AT 细胞对拟辐射药物博莱霉素也很敏感(见图 1)。

3. 照射后 AT 和 HeLaS 3 细胞 DNA 合成的抑制

由图 2 可以看出受照的 HeLaS 3 细胞相对于未受照射细胞的 DNA 合成率随照射剂量增加呈明显下降趋势。而 AT 细胞则不同, 受照射 1.0—5.0 Gy 的 AT 细胞, 其 DNA 合成率与未受照射的细胞相近, 对 γ 射线诱发的 DNA 合成抑制呈抗性。

4. AT 细胞核型分析

本文分析了 14 个 AT 5 BIVA 细胞的染色体核型, 结果见表 1。实验证明, 所有被分析细胞的染色体数均呈现异常, 为 56—67 条, 并且一对第 11 号染色体中仅一条完整, 另一条缺失或与其它染色体发生交换重组, 如图 3 所示。此外 AT 5 BIVA 细胞的第 13、14、15、21 和 22 号染色体亦有不同程度的缺失或重组现象。

5. 导入 HeLaS 3 DNA 提高 AT 细胞 γ 射线抗性的尝试

用 DNA——磷酸钙共沉淀和电脉冲介导法分别向 AT 5 BIVA 细胞导入 HeLaS 3 细胞基因组

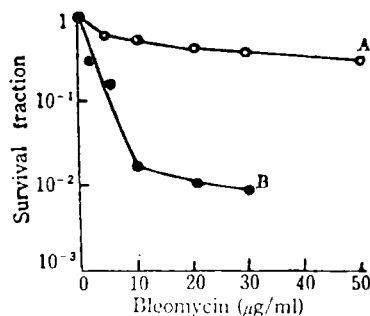


Fig 1. The survival curves of AT 5 BIVA and HeLaS 3 cells after treatment with bleomycin ($n=3$)
($\circ$) HeLaS 3, ($\bullet$) AT 5 BIVA

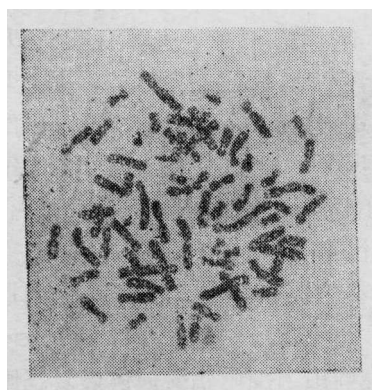


Fig 3. Metaphase chromosome of one AT5 BIVA cell. Upper arrow; chromosome 11, lower arrow; a rearranged chromosome 11

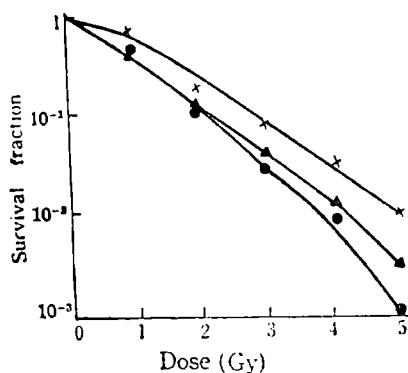


Fig 4. The survival curves of AT 5 BIVA and transformed cell clone 2-1 after γ -irradiation
($\times$) Clone 2-1, (Δ) Clone 2-1 after 2 months, of passage, ($\bullet$) AT 5 BIVA

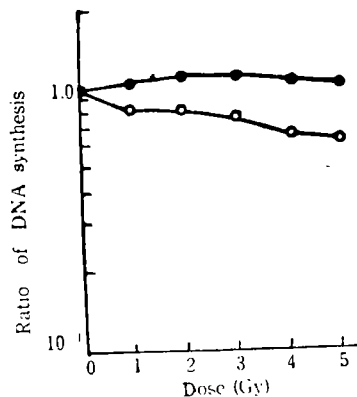


Fig 2. Dose response curves for inhibition of DNA synthesis in AT 5 BIVA and HeLaS 3 cells by γ -irradiation ($n=2$)
($\bullet$) AT 5 BIVA, ($\circ$) HeLaS 3

Tab 1. Karyotype analysis of 14 AT 5 BIVA cells

number, of cell	number of chromosome	Abnormality of chr. 11
1	59	R
2	63	R
3	60	R
4	63	L
5	63	R
6	58	L
7	53	L
8	67	R
9	57	L
10	61	R
11	59	R
12	56	R
13	61	R
14	62	R

R = Rearrangement L = Loss of single chromosome

DNA 和 6 种限制性内切酶 (BamHI、BglI、SalI、EcoRI、Xba 和 Xho) 酶切的 DNA 片段, 同时导入选择标志基因 pSV 2 neo DNA。经 G 418 和 γ 射线两轮筛选后, 选择转化的 AT 细胞。从大约 10^8 细胞中得到 100 多个转化细胞克隆。用 ^{32}P -pSV 2 neoDNA 做探针, 与其中九株转化的 AT 细胞 DNA 点杂交结果均为

阳性, 未经转化的 AT 细胞为阴性。说明共转染中至少 pSV 2 neoDNA 质粒的转移是成功的。对转化的 AT 细胞作 γ 射线和博来霉素作用后的活存曲线分析, 实验结果证明转化的 AT 细胞对 γ 射线和博来霉素处理的活存率均未能获得稳定的提高, 其中 Clone 2-1 (HeLaS 3 基因组 DNA 为供体) 对 γ 射线的活存率曾有一过性的部分提高, 经 2 个月传代后再测时, 其对 γ 射线的敏感性恢复至与未转化的 AT 细胞相近(见图 4)。此外, 导入 Xho 酶切片段的转化细胞在经 γ 射线筛选时, 显示出比其它转化细胞有更高的克隆形成率(结果未显示), 说明对 γ 射线抗性有所增加, 但这些结果都提示 AT 5 BIVA 细胞的基因缺陷未能通过 DNA 介导的基因转移而得到持久的纠正。

讨 论

实验证明, AT 5 BIVA 细胞对 γ 射线和博来霉素高度敏感, 对 γ 射线诱发的 DNA 合成抑制呈抗性。这些特征与文献报道的相一致^[5-7]。此外分析了 14 个 AT 5 BIVA 细胞的染色体核型, 发现所有被分析的细胞除染色体数异常外均有第 11 号染色体中的一条缺失或重组。AT 细胞的电离辐射损伤修复功能的缺陷被认为是引起 AT 细胞对电离辐射敏感的原因^[8], 而 AT 细胞的抗电离辐射诱发 DNA 合成抑制的现象与其电离辐射敏感性无关, 而是由不同基因的缺陷所致^[9,10]。AT 5 BIVA 细胞是一株经 SV 40 病毒转化, 来源于 AT 病人皮肤成纤维的细胞系。SV 40 病毒转化细胞是为了让细胞获得在体外永久性传代的能力, 同时 SV 40 病毒的转化也可使细胞染色体核型异常^[11,12]。上述实验证明经 SV 40 病毒转化的 AT 5 BIVA 细胞没有改变对电离辐射的敏感性和某些其它特性(如对 DNA 合成抑制的抗性), 它是研究电离辐射敏感问题和克隆电离辐射损伤修复基因的良好材料。

利用辐射损伤修复缺陷的细胞研究辐射敏感性问题 and 克隆出人细胞辐射损伤修复基因, 是当前国际热点课题。国外几个领先的实验室正注重对 UV 敏感的切除修复基因缺陷的 XP (Xeroderma pigmentosum, 着色性干皮病) 细胞和对电离辐射敏感的 AT 细胞, 其中 XP 细胞的基因缺陷的纠正在日本大坂大学和我军事医学科学院放医所的实验室已获得成功^[4,13]。但对 AT 细胞, 仅有两篇关于修复缺陷成功的报道^[5,6], 且对其结果尚有争议。

本工作先以 HeLaS 3 基因组 DNA 为供体, 为了避免外源大片段 DNA 导入及整合困难, 以后又用六种限制性内切酶的酶切 DNA 片段为供体, 用 DNA-磷酸钙共沉淀和电脉冲两种基因转移方法, 向 AT 细胞导入供体 DNA, 同时导入 pSV 2 neo DNA, 经 G 418 和 3、4、5 Gy γ 射线辐照筛选未获得稳定的抗 γ 射线的转化细胞克隆。分析外源目的基因未能稳定植入 AT 5 BIVA 细胞的原因有三: (1) AT 细胞的遗传缺陷复杂, 据报道 AT 细胞有多种基因缺陷, 这些基因与细胞辐射敏感性分子机制的关系尚有待阐明^[14], (2) AT 细胞的染色体缺失或重组, Gatti 等人将 AT 基因定位在染色体 11 q 22-23 位置上^[15], Komatus 等人发现 AT 5 BIVA 细胞的第 11 号染色体缺失一条^[16]; (3) 也有报道以 SV 40 病毒转化的人细胞为受体时, 导入的外源 DNA 在该细胞内整合的长度和稳定性受到限制^[17,18]。也有报道导入的外源基因在不同受体细胞中暂时性表达的先例^[19,20]。最近有关提高 AT 细胞电离辐射敏感抗性的研究有较大的进展, Komatus 等^[16], 应用微细胞介导的染色体转移方法 (Microcell mediated chromosome transfer) 向 AT 细胞导入正常人成纤维细胞的第 11 号染色体, 获得的杂交细胞具有同正常人相似的剂量活存曲线, 提示电离辐射损伤修复基因位于人第 11 号染色体上。鉴于 AT 细胞染色体缺失或重组的事实和 DNA 介导基因转移法修复 AT 细胞遗传缺陷的困难, 应用微细胞介导的染色体转移技术导入完整的人染

色体以修复 AT 细胞的遗传缺陷值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Painter R B; Friedberg E C, Hanawalt P C. DNA Repair, a laboratory manual of research procedures, Vol. 1, Part B, New York: Marcel Dekker, 1981:596
- 2 章扬培, 徐惠英, 夏寿萱. 中华放射医学与防护杂志, 1983, 3(5), 34
- 3 Seabright M. Lancet, 1971, 2:971
- 4 章扬培, 白晓彬, 陈月能等. 生物化学杂志 1989, 5(3), 240
- 5 Green M H L, Lowe J E, Arlett C F et al.. J. Cell Sci. Suppl., 1987, 6, 127
- 6 Kapp LN, Painter R B. Int. J. Radiat. Biol., 1989, 56(5): 667
- 7 Lehmann A R, Stevens S. Nucleic Acids Res., 1979, 6:1953
- 8 Friedberg E C. DNA Repair, New York: Freeman W H, 1985:525
- 9 Anita C H. Radiat. Res., 1989, 118:375
- 10 Komatsu K, Okumura Y, Kodama S et al.. Int. J. Radiat. Biol., 1989, 56(6):863
- 11 Takano T, Noda M, Tamura T. Nature, 1982, 296:269
- 12 Thacker J, Debenham, P G; Friedberg E C, Hanawalt P C. Mechanisms and consequences of DNA damage processing, New York: Alan R. Liss, Inc, 1988: 361
- 13 Gatti R A, Berbel I, Boder E et al.. Nature, 1988, 336:577
- 14 Komatsu K, Kodama S, Okumura Y et al.. Matat. Res., 1990, 235:59
- 15 Hoeijmakers J H J, Odijk H, Westerveld A. Exp Cell Res., 1987, 169:111
- 16 One H, Iwasaki M, Sakamoto N et al.. Gene, 1988, 66:77
- 17 Nicolau C, Le Pape A, Soriano P et al.. Proc. Nalt. Acad. Sci. USA, 1983, 80:1068
- 18 Williams D A, Orkin S H, Mulligan R C. Proc. Nalt. Acad. Sci. USA, 1986, 83:2566

(稿件收到日期: 1991 年 5 月 7 日)

STUDIES ON THE CHARACTERISTICS OF AT CELLS AND CORRECTION IN THEIR GENE DEFICIENCY

Bai Xiaobin Zhang Yangpei Jin Cuizhen Wu Ying Xu Huiying Xia Shouxuan

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

ABSTRACT Ataxia telangiectasia (AT) is an autosomal recessive genetic disease. It was proved that a SV 40-transformed AT cells line, AT 5 BIVA, from the skin fibroblasts of an AT patient, was hypersensitive to ionizing radiation as well as to bleomycin and was radioresistant to DNA synthesis inhibition. Chromosome analysis had shown all fourteen AT 5 BIVA cells analysed had one of the number 11 chromosomes lost or rearranged. enhancement of transient radioresistance by DNA mediated gene transfer was found, either with HeLaS3 genomic DNA or with its restriction endonuclease digested fragments. The reason for this phenomenon was discussed.

KEYWORDS AT cells, Radiosensitivity, Gene transfer, Chromosome