



图3 鸽肝 mtDNA 结构电镜照片

A. 鸽肝线粒体, 指针示一个完整的线粒体; B. 鸽肝 mtDNA 的展环结构; C. 鸽肝 mtDNA 的超螺旋结构; D. 鸽肝 mtDNA 的蝴蝶形结构。

为 1.86, A_{260nm}/A_{230nm} 的比值为 2.09。由此可见, mtDNA 纯化得比较纯净, 可以用于电镜检测。

(二) mtDNA 的电镜观察结果

图 3, B 为鸽肝 mtDNA 的展环结构的电镜照片, 图 3, C 为它的超螺旋结构的电镜照片, 图 3, D 亦为超螺旋结构, 但呈蝴蝶形。我们认为这些结构可能都是鸽肝 mtDNA 构象的拓扑异构型。至于它们出现的比例数, 没有进

行计算。关于 D-mtDNA, 用我们使用的制片方法难于观察到, 它需用甲酰胺法^[9]才能确切观察到。据文献报道, 在正常情况下, 鸟类 mtDNA 中的 D-mtDNA 也少于 2%^[2]。关于这些构象的功能意义有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 赵邦梯等: 1985. 生物化学杂志, 1: 49.
- [2] 赵邦梯等: 1983. 中国科学 (B 辑), (3): 213.
- [3] 赵邦梯等: 1983. 北京大学学报 (自然科学版), (1): 72.
- [4] 张龙翔等: 1981. 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, 219 页。
- [5] 吴鹤龄等: 1983. 遗传学实验方法和技术, 高等教育出版社, 115 页。
- [6] Agsteribbe, E. et al.: 1972. *Biochim. Biophys. Acta*, 269: 299.
- [7] Attardi, G. et al.: 1976. *Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria* (Bucher, T. et al. eds) North Holland Inc., p. 573.
- [8] Brown, W. M. et al.: 1974. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 4617.
- [9] Davis, R. W. et al.: 1971. *Methods in Enzymology*, Vol. 21D, Academic Press, p. 413.
- [10] Koike, K. et al.: 1976. *Biochim. Biophys. Acta*, 425: 18.
- [11] Morimoto, R. et al.: 1975. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 3868.
- [12] Sanders, J. P. M. et al.: 1975. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65: 699.
- [13] White, M. T. et al.: 1975. *Cancer Res.*, 35: 873.

细胞共养和 BrdU 对人和小鼠 NORs 活性的影响

颜永杉

(中国科学院遗传研究所, 北京)

不同种类细胞的共养可引起不同种细胞间的代谢协同现象, 即在细胞相互接触的地方进行细胞间分子交换。它可降低姐妹染色单体互换频率^[12]、促进细胞 DNA 合成^[7]、细胞代谢缺陷互补^[25, 26]和提高细胞对药物的敏感性^[9, 28]。

核仁组织者 (NORs) 是细胞 rDNA 进行转录的地方, 细胞银染 NORs (Ag-NORs) 数

可用来估计细胞 18S + 28S rDNA 的转录活性^[11]。对于每个物种来说, 细胞 Ag-NORs 数和它们在染色体上的位置都是相当稳定的^[13], 细胞 Ag-NORs 数或它们在染色体上位置的改

Yan Yongshan: Influence of both Coculture and BrdU on NORs Activity of Human and Mouse Cells

本文于 1985 年 7 月 17 日收到。

变意味着细胞代谢过程或遗传性状已发生了较大的改变。因此,探讨各种因素对 NORs 活性的影响很有必要,但至今有关的报道仍少。已见体细胞杂种^[2,6]、精子发生过程^[4]和细胞周期^[3] Ag-NORs 的变化; RNA 合成抑制剂^[4]和某些疾病^[40]引起的 Ag-NORs 改变等。我们曾首次报道 BrdU 可抑制中国仓鼠细胞 NORs 活性^[1],dC 可解除 BrdU 对 NORs 活动的抑制作用^[3,39]。我们还报道了 BrdU 抗性细胞的 NORs 活性也被 BrdU 所抑制^[4,30]。那么,是否 BrdU 也能抑制其他物种细胞的 NORs 活性? 由于在体细胞杂种中,某一亲本^[17]或 2 个亲本^[2]的 NORs 活性会受到抑制,是否细胞共养也能对细胞 rDNA 转录活性产生某些较大的影响呢?

本文报道细胞共养和 BrdU 对人及小鼠 NORs 活性的抑制作用。

材料与方 法

(一) 细胞的处理和染色体制片

1. 细胞的选择及其特征 PG19 细胞为小鼠细胞株,除了有 1 条中着丝粒(Rb12.12)和 1 条近中着丝粒染色体(Rb 5.15)外,其余的染色体(约 37 条)为端着丝粒染色体(图版 I, 6)^[5]。MGC 是人胃癌细胞株,细胞染色体众数为 65 条,绝大多数染色体是中着丝粒或近中着丝粒染色体(图版 I, 1)。HeLa 为人宫颈癌细胞株。上述细胞在含 15% 小牛血清的 MEM 培养基中生长良好。

2. 细胞的分组处理 (1)BrdU 组和对照组: 把上述细胞各分成 2 组, 1 组加入 BrdU, 最终浓度为 3—30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 另 1 组为对照组(即不加 BrdU)。(2)细胞共养组: 先将 PG19 和 MGC 细胞等量混合培养, 保证细胞之间能充分接触, 再按上述方法处理细胞。(3)dC 加 BrdU 组: 为了探讨 dC 能否消除 BrdU 对小鼠细胞和人细胞 NORs 活性的抑制作用, 我们把 dC 和 BrdU 同时加入到细胞共养组, 最终浓度都是 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。(4)洗去 BrdU 组: 为了探讨在洗去 BrdU 后, 被抑制的小鼠 NORs 活性能否得

到恢复, 当 PG19 在含 BrdU(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 MEM 中生长 48 小时后, 洗去细胞表面的 BrdU, 并让细胞在无 BrdU 的 MEM 中生长 50 小时。加入 BrdU 后, 各组细胞都在黑暗的条件下进行培养。

3. 染色体制片 见以前的报道^[1]。

(二) Ag-NORs 显色和分析

取片龄 3—6 天染色体制片, 按已报道的方法^[3]进行 Ag-NORs 显色。每组观察 53—228 个银染清晰、染色体形态良好的细胞, 记录每个细胞 Ag-NORs 数和携带 Ag-NORs 的染色体数。由于 PG 19 细胞有的染色体携带 4 个 Ag-NORs, 为了便于比较, 我们仍称为 A₄ 染色体^[2]。

结 果

(一) BrdU 对 PG19、MGC 和 HeLa 细胞的 NORs 活性的抑制

如表 1 所示, 若培养基中 BrdU 的浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BrdU 并没有使 MGC 细胞的 Ag-NORs 数和携带 Ag-NORs 的染色体数减少 ($P > 0.05$)。当 BrdU 浓度提高到 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 与对照组相比, BrdU 已分别使 PG19, MGC 和 HeLa 细胞的 Ag-NORs 数减少了 66.1%、17.6% 和 30.1%, 细胞携带 Ag-NORs 的染色体数也分别减少了 32.6%、18.1% 和 24.6%。BrdU 还使细胞 A₄ 染色体数由原来的 2.80 条减少到 0.18 条, 即减少了 93.6%。各实验组与它们相应的对照组的差异均极显著 ($P < 0.001$)。

PG19 细胞先在含 BrdU 培养基中生长 48 小时后, 再在无 BrdU 的培养基中继续生长 50 小时, 此时细胞 Ag-NORs 数和携带 Ag-NORs 的染色体数成倍地增加(表 1), 细胞 A₄ 染色体数也明显提高(即由 0.17 条增加到 0.93 条)。显然, 洗去 BrdU 组与 BrdU 处理组之间的差异极显著 ($P < 0.001$)。

总之, BrdU 可使上述 3 种细胞的 Ag-NORs 数明显地减少, 在洗去 BrdU 后, 细胞的 Ag-NORs 数以及携带 Ag-NORs 的染色体数会得到恢复。这表明 BrdU 对人和小鼠 NORs 活

表1 BrdU对PG19、MGC和HeLa细胞的NORs活性的抑制(平均值±标准误)

细胞类型	BrdU		dC		观察细胞数	Ag-NORs/细胞	带 Ag-NORs 染色体数/细胞	A ₄ 染色体数/细胞
	浓度 (μg/ml)	时间 (小时)	浓度 (μg/ml)	时间 (小时)				
PG19	0	0	0	0	68	20.78±0.78	6.69±0.17	2.80
	30	48	0	0	114	7.05±0.46	4.51±0.26	0.17
	30 ¹⁾	48	0	0	53	14.51±0.39	7.77±0.35	0.93
	30	48	30	48	60	14.10±0.49	6.85±0.20	0.98
MGC	0	0	0	0	100	8.97±0.21	4.69±0.15	0
	3	48	0	0	54	8.72±0.28	4.56±0.15	0
	30	48	0	0	228	7.39±0.29	3.84±0.11	0
HeLa	0	0	0	0	54	12.55±0.35	6.98±0.20	0
	30	48	0	0	53	8.77±0.33	5.26±0.20	0

1) PG19细胞在含 BrdU (30μg/ml) 的 MEM 中培养 48 小时后,在无 BrdU 的 MEM 中继续生长 50 小时。

性的抑制作用是可逆的。

(二) 细胞共养对细胞 NORs 活性的影响

由于 PG 19 细胞染色体形态及细胞 Ag-NORs 的大小和在染色体上的位置都与 MGC 细胞明显不同(图版 I, 4、5), 因此在混合制片中很容易把它们区别开。从表 2 可看出, 细胞共养明显地减少 PG 19 细胞的 Ag-NORs 数(由原来的 20.78 减为 9.53) 和携带 Ag-NORs 的染色体数(由 6.69 条减为 4.52 条), A₄ 染色

体数也由原来的 2.80 条减为 0.71 条。实验组与对照组差异极显著 ($P < 0.001$)。

细胞共养也降低了 MGC 细胞的 Ag-NORs 数和携带 Ag-NORs 的染色体数 ($P < 0.001$)。

共养细胞生长在含 BrdU 的培养基中达 48 小时后, PG19 细胞的 Ag-NORs 数和携带 Ag-NORs 染色体数(表 2) 与单用 BrdU 处理的 PG19 组(表 1) 相比, 都有明显的减少 ($P < 0.001$), 即分别由 7.05 和 4.51 下降到 4.04 和 2.23; 但

表2 细胞共养对 PG19 和 MGC 细胞 NORs 活性的影响(平均值±标准误)

细胞类型	BrdU		dC		观察细胞数	Ag-NORs/细胞	带 Ag-NORs 染色体数/细胞	A ₄ 染色体数/细胞
	浓度 (μg/ml)	时间 (小时)	浓度 (μg/ml)	时间 (小时)				
PG19	0	0	0	0	112	9.53±0.55	4.52±0.24	0.71
	30	48	0	0	186	4.04±0.42	2.23±0.24	0.17
	30	48	30	48	68	9.10±0.46	4.04±0.19	0.77
	30	24	0	0	53	6.70±0.67	3.21±0.39	0.25
MGC	0	0	0	0	53	8.15±0.21	4.06±0.10	0
	30	48	0	0	226	7.34±0.22	3.85±0.11	0
	30	48	30	48	58	7.07±0.21	3.63±0.11	0

对 MGC 细胞来说, 这种差异不显著 ($P < 0.05$)。

(三) dC 对 BrdU 抑制细胞 NORs 活性的影响

PG19 细胞在同时含有 BrdU 和 dC 的培养基中, 细胞 Ag-NORs 数以及携带 Ag-NORs 的染色体数都明显地比单用 BrdU 处理组高 ($P < 0.001$) (表 1), 这表明 dC 可有效地减轻

BrdU 对 PG 19 细胞 NORs 活性的抑制作用。此时 PG19 细胞的 Ag-NORs 数、携带 Ag-NORs 染色体数以及 A₄ 染色体数都与洗去 BrdU 组无显著差异 ($P > 0.05$), 这表明 dC 的加入可使 PG19 细胞的 NORs 活性提高到洗去 BrdU 组的水平; 但对 MGC 细胞来说, dC 的加入并没有明显地改变 BrdU 对其 NORs 活性的抑

制作用($P > 0.05$)。

讨 论

小鼠 PG19 细胞和人类 MGC 细胞共养会明显地抑制 PG19 和 MGC 细胞 NORs 活性。BrdU 不仅对中国仓鼠细胞的 NORs 活性^[1],而且也对他人类的 MGC、HeLa 细胞和小鼠的 PG19 细胞 NORs 活性都有明显的抑制作用。细胞 NORs 活性受抑制都表现在细胞 Ag-NORs 数的明显减少和细胞携带 Ag-NORs 染色体数的减少。细胞共养还明显地增强了 BrdU 对 PG19 细胞 NORs 活性的抑制作用,但对 BrdU 抑制 MGC 细胞 NORs 活性的能力没有明显的影响。在洗去 BrdU 后,PG19 细胞 NORs 活性能得到恢复。不论 PG19 细胞是单独培养还是与 MGC 细胞共养,dC 都可明显地减轻或消除 BrdU 对 PG19 细胞 NORs 活性的抑制作用,但对 MGC 细胞来说,dC 的这种作用不明显,这可能与细胞的核苷酸库大小不同有关。

细胞间的代谢协同现象能否发生,主要取决于所采用的细胞类型,例如,有些类型细胞尽管相互接触但也不能^[7]或很难^[18]产生代谢协同现象。本文报道的人类 MGC 细胞与小鼠 PG19 细胞共养会改变细胞 rDNA 转录活性,同时它们的染色体形态、Ag-NORs 大小及在染色体上的位置都不同,这可有效地减少观察中的人为误差。因此,PG19 与 MGC 是进一步研究细胞共养对 rDNA 转录活性的影响,rDNA 转录活性细胞间调控机制的较好实验组合。

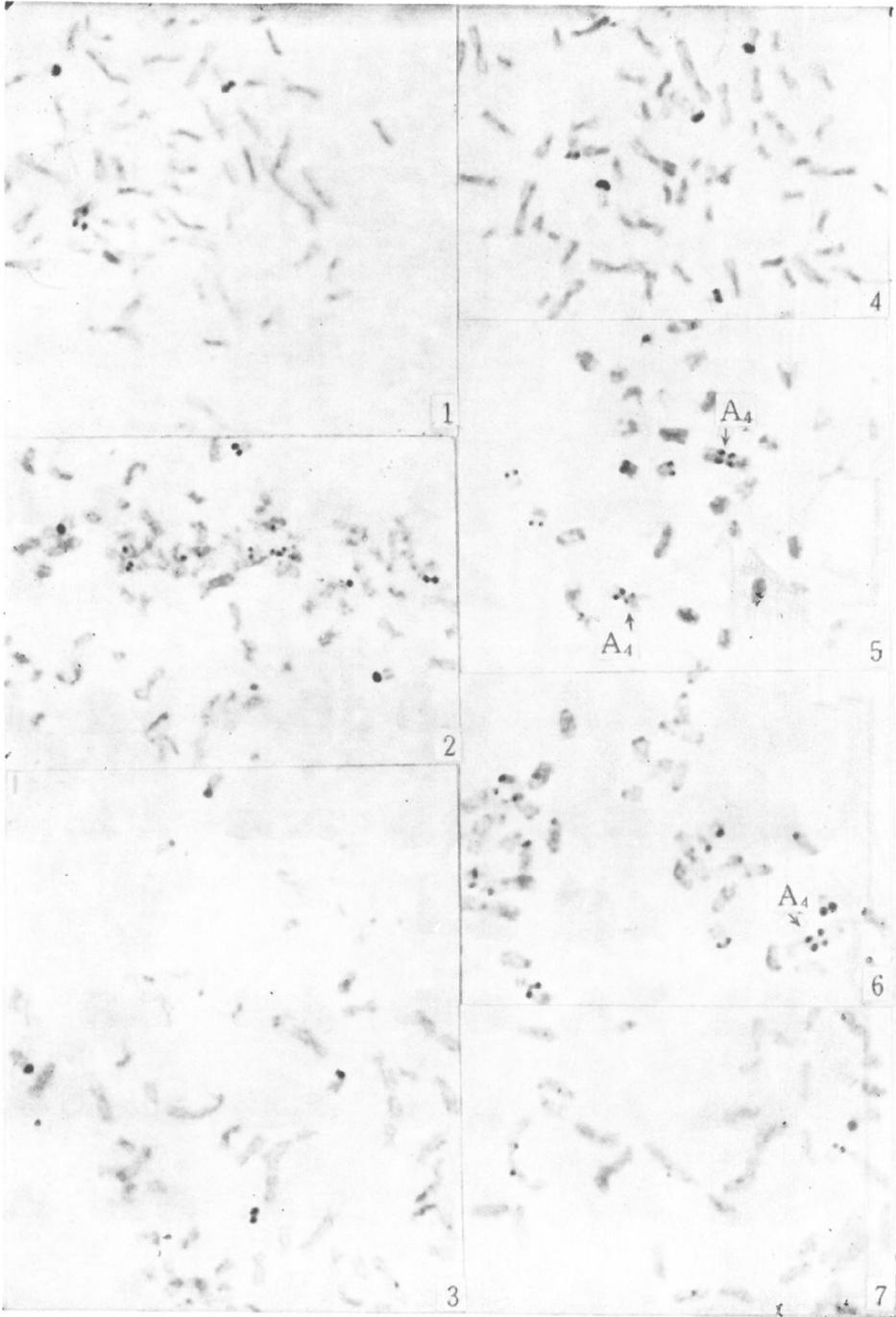
洗去 BrdU 后,人和小鼠 NORs 活性可以恢复,这再次表明 BrdU 抑制细胞 NORs 活性很可能是一种毒性效应。dC 消除 BrdU 对细胞 NORs 活性的抑制作用可能是由于 dC 能通过胸苷酸合成酶转变成胸苷,从而减少细胞 DNA 结合 BrdU 的量^[27];或者 dC 本身能解除由 BrdU 引起的 dC“饥饿”^[19]的结果。

Satoch^[24] 和 Zakharov^[31] 都证明了银染法可选择地显示出与新转录的 rRNA 密切结合的核

仁蛋白(酸性蛋白),其中包括 C₂₃ 蛋白^[16]。荧光免疫标记证明,C₂₃ 蛋白定位在中期染色体 NORs^[20]。由于 C₂₃ 蛋白的磷酸化水平与核仁 rRNA 合成活性密切相关^[15,21],所以这酸性蛋白的磷酸化很可能起了 rRNA 基因转录的调控作用^[22,23]。是否 BrdU 会妨碍 C₂₃ 蛋白的磷酸化或者 BrdU 使银染核仁蛋白基因不能表达或部分表达,从而引起 NORs 不能随这类蛋白质的结果,还有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] 颜永杉等: 1984. 遗传学报, 11(3): 211.
- [2] ———: 1983. 遗传学报, 10(6): 483.
- [3] ———: 1984. 科学通报, 12: 754.
- [4] ———: 1985. 遗传学报, 12(3): 213.
- [5] 颜永杉: 1983. 遗传学报, 10(3): 209.
- [6] Arrighi, F. E. et al.: 1980. *Cytogenet. Cell Genet.*, 26: 224.
- [7] Burke, J. M. et al.: 1983. *Exp. Cell Res.*, 146: 204.
- [8] Ballal, N. R. et al.: 1975. *J. Biol. Chem.*, 250: 5921.
- [9] Corsaro, C. M. et al.: 1977. *Nature*, 268: 737.
- [10] Cheng, D. M. et al.: 1981. *Clinical Genet.*, 19: 145.
- [11] Foresti, F. et al.: 1981. *Cytogenet. Cell Genet.*, 31: 137.
- [12] Giuseppe, R. et al.: 1982. *J. Cell Physiol.*, 112(2): 281.
- [13] Hsu, T. C. et al.: 1975. *Chromosoma*, 53: 25.
- [14] Hansman, D. et al.: 1978. *Exp. Cell Res.*, 101: 235.
- [15] Kang, Y. J.: 1975. *Cancer Res.*, 35: 1470.
- [16] Lischwe, M. A. et al.: 1978. *Life Sci.*, 25: 701.
- [17] Miller, D. A.: 1978. *Cytogenet. Cell Genet.*, 21: 33.
- [18] Marchase, R. B. et al.: 1976. *Biochem. Biophys. Acta*, 457: 385.
- [19] Meuth, M. et al.: 1974. *Cell*, 2: 109.
- [20] Michael, A. et al.: 1981. *Exp. Cell Res.*, 136: 101.
- [21] Olson, M. O. J. et al.: 1978. *Cancer Res.*, 38: 3421.
- [22] Raman, R. et al.: 1981. *Exp. Cell Res.*, 135: 373.
- [23] Rao, V. S. et al.: 1982. *J. Biol. Chem.*, 257(24): 15035.
- [24] Satoch, K. et al.: 1981. *Biol. Inver. Reports*, 5(9): 857.
- [25] Vitkauskas, G. et al.: 1983. *Exp. Cell Res.*, 145: 15.
- [26] Willecke, K. et al.: 1983. *Exp. Cell Res.*, 144: 95.
- [27] Wright, W. E. et al.: 1982. *Somatic Cell Genet.*, 8 (5): 547.
- [28] ———: 1983. *Exp. Cell Res.*, 103: 63.
- [29] Yan Yongshan et al.: 1984. *Theor. Appl. Genet.*, 68: 81.
- [30] ———: 1985. *Theor. Appl. Genet.*, 70: 529.
- [31] Zakharov, A. F. et al.: 1980. *Hum. Genet.*, 60: 334.



不同种细胞的 Ag-NORs 分布

1. MGC (加 BrdU); 2. HeLa; 3. HeLa (加 BrdU); 4. MGC; 5. PG19; 6. PG19 (与 MGC 共养);
7. PG19 (与 MGC 共养,加 BrdU)