

参 考 文 献

- [1] Asegawa Y, Fujitani M, Hata K, et al. Promotion of axon regeneration by myelin-associated glycoprotein and Nogo through divergent signals downstream of Gi/G. *J Neurosci*, 2004, 24:6826-6832.
- [2] Hata K, Kubo T, Yamaguchi A, et al. Signaling mechanisms of axon growth inhibition. *Drug News Perspect*, 2006, 19:541-547.
- [3] Yamashita T, Fujitani M, Yamagishi S, et al. Multiple signals regulate axon regeneration through the nogo receptor complex. *Mol Neurobiol*, 2005, 32:105-111.
- [4] Wu KY, Hengst U, Cox LJ, et al. Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature*, 2005, 436:1020-1024.
- [5] 彭慧平, 卢晓欣, 汤永建, 等. 高压氧对脑缺血再灌注小鼠脑源性神经营养因子及神经细胞结构的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:263-265.
- [6] 徐江, 黄晓琳. 高压氧对脑缺血再灌注大鼠核因子- κ B 及细胞粘附分子-1 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:259-262.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- [8] Bederson JB, Pitts LH, Tsujim M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of rat model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17:472-476.
- [9] Arevalo MA, Rodriguez-Tebar A. Activation of casein kinase II and inhibition of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75NTR inhibit glycogen synthase kinase-3 β and stimulate axonal growth. *Mol Biol Cell*, 2006, 17:3369-3377.
- [10] Bryan B, Kumar V, Stafford LJ, et al. GEFT, a Rho family guanine nucleotide exchange factor, regulates neurite outgrowth and dendritic spine formation. *J Biol Chem*, 2004, 29:45824-45832.
- [11] Hiraga A, Kuwabara S, Doya H, et al. Rho-kinase inhibition enhances axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Peripher Nerv Syst*, 2006, 1:217-224.
- [12] Brabeck C, Mittelbronn M, Bekure K, et al. Effect of focal cerebral infarctions on lesional RhoA and RhoB expression. *Arch Neurol*, 2003, 60:1245-1249.
- [13] Dergham P, Ellezam B, Essagian C, et al. Rho signaling way targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci*, 2002, 22:6570-6577.
- [14] Fournier A E, Takizawa B T, Strittmatter SM. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci*, 2003, 23:11416-1423.

(修回日期:2007-07-11)

(本文编辑:阮仕衡)

热休克预处理对过氧化氢诱导细胞次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因突变的保护效应

陆明康 洪承蛟 李明 张保国

【摘要】 目的 研究热休克预处理对过氧化氢诱导的细胞基因突变损伤是否具有保护效应。方法 将 V79 细胞分为热休克处理组(热处理组)、过氧化氢损伤组(损伤组)和热休克预处理后过氧化氢损伤组(保护组)。采用 6-巯基鸟嘌呤(6-TG)筛选次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPR)基因突变细胞并形成细胞克隆,应用 Giemsa 染色法计数突变细胞克隆数,计算各组细胞的相对克隆形成率及基因突变率。结果 (1)温度 $>42^{\circ}\text{C}$, 1 h 的热休克处理会诱导明显的 HPR 基因突变,细胞相对克隆形成率降低,基因突变率与 37°C 处理 1 h 组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$);温度 $\leq 42^{\circ}\text{C}$ 热休克处理 1 h,不会诱导明显的 HPR 基因突变,细胞相对克隆形成率高,基因突变率与 37°C 处理 1 h 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。(2)过氧化氢浓度 ≥ 0.5 mmol/L 时,各亚组 HPR 基因突变率与 0 mmol/L 亚组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。(3)细胞在接受热休克预处理后再行过氧化氢处理,过氧化氢浓度 ≤ 1 mmol/L 的细胞没有发生明显的 HPR 基因突变,与 0 mmol/L 亚组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而过氧化氢浓度超过 1 mmol/L 时,细胞发生明显的 HPR 基因突变,与 0 mmol/L 亚组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。(4)损伤组与保护组相应浓度的亚组(除 0, 4 mmol/L 组)比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 热休克预处理对过氧化氢诱导的 HPR 基因突变损伤细胞具有明显的保护作用。

【关键词】 热休克预处理; 过氧化氢; 基因突变

近年来,国内外针对热休克预处理对过氧化氢氧化损伤细胞的保护效应进行了大量的研究,发现其对过氧化氢氧化损伤

的心肌细胞^[1]、晶状体上皮细胞^[2]、肺内皮细胞^[3]、肺泡巨噬细胞^[4]等具有显著的保护效应,可以提高细胞的存活率。Spitz 等^[5]报道,经热休克预处理的中国仓鼠卵巢成纤维细胞,随后的过氧化氢损伤可减轻,细胞存活率提高。因此推测热休克预处理对过氧化氢氧化损伤的哺乳动物细胞具有保护效应。然而众所周知,过氧化氢不但能诱导细胞凋亡^[6],而且具有致突变效应^[7],而基因突变则可诱发机体细胞发生癌变。那么,热

基金项目:国家自然科学基金(10275083)

作者单位:215123 苏州,苏州大学放射医学与公共卫生学院,江苏省放射医学与防护重点实验室

通讯作者:张保国, Email: bgzhang@suda.edu.cn

热休克预处理本身是否会诱导细胞基因突变,热休克预处理是否能降低过氧化氢诱导的细胞基因突变率,目前还没有相关的研究报道。本研究以 V79 细胞为研究对象,以次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine phospho-ribosyl transferase, HPRT)基因突变率为观测指标,研究热休克预处理对细胞基因突变的影响,报道如下。

材料与方法

一、主要仪器和试剂

主要仪器:美国产 Thermo Forma Series II CO₂ 培养箱,日本产 Olympus CKX41 型倒置相差显微镜。主要试剂:RPMI 1640 培养液、胰酶均为美国 Gibco 公司产品,6-巯基鸟嘌呤(6-thioguanine, 6-TG)试剂购于上海舒伯伟化学试剂公司,小牛血清为杭州四季青公司产品,30% 过氧化氢购自上海国药集团。

二、细胞培养及预处理

V79 细胞购于上海细胞生物研究所细胞资源中心,接种于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置于条件为 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。为降低 HPRT 基因自发突变频率,细胞使用前用 1% HAT 培养液处理 7 d,分成若干小瓶于 -80℃ 低温冰箱中冻存备用,每次使用前复苏。

三、V79 细胞的冻存及复苏培养

细胞冻存于 1 ml 的 Eppendorf 管内,冻存液由 450 μl RPMI 1640 培养液和 50 μl 二甲亚砷配制而成,细胞冻存密度稍大,约 3 × 10⁷ 个/ml。解冻时间控制在 1 min 内,无需离心,每管直接接种于 1 个 25 ml 培养瓶内,隔夜换液培养。待细胞生长至几乎铺满瓶底时传代,接种密度约 5 × 10⁴ 个/ml。

四、细胞分组及处理

将细胞分为热休克处理组(热处理组)、过氧化氢损伤组(损伤组)和热休克预处理后过氧化氢损伤组(保护组)。热处理组根据热休克处理温度与时间不同分为 5 个亚组:37℃ 处理 1 h 组、40℃ 处理 1 h 组、42℃ 处理 1 h 组、43℃ 处理 1 h 组和 45℃ 处理 0.25 h 组;损伤组和保护组根据加入过氧化氢溶液浓度不同分别分为 6 个亚组:0 mmol/L 组、0.5 mmol/L 组、1 mmol/L 组、2 mmol/L 组、3 mmol/L 组和 4 mmol/L 组。

热处理组:复苏细胞传至 2 或 3 代后,以细胞密度为 5 × 10⁴ 个/ml 接种于 5 个 25 ml 培养瓶内,瓶上分别标注“37℃, 1 h(对照)”“40℃, 1 h”“42℃, 1 h”“43℃, 1 h”和“45℃, 0.25 h”。待细胞处于对数生长期时,分别置于预先调至相应温度的培养箱中,按照瓶身标注条件进行热处理。热处理完毕后取出各瓶细胞,置于条件为 37℃、5% CO₂ 的培养箱中继续培养。

损伤组:复苏细胞传至 2 或 3 代后,以细胞密度为 5 × 10⁴ 个/ml 接种于 6 个 25 ml 培养瓶内,瓶上分别标注“0 mmol/L(对照)”“0.5 mmol/L”“1 mmol/L”“2 mmol/L”“3 mmol/L”和“4 mmol/L”。待细胞处于对数生长期时,进行过氧化氢染毒处理:按照瓶身标注的浓度分别加入以无血清培养液稀释的过氧化氢溶液,置于条件为 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 1 h 后取出,弃去过氧化氢溶液,加入新鲜培养液,置于条件为 37℃、5% CO₂ 的培养箱中继续培养。

保护组:复苏细胞传至 2 或 3 代后,以细胞密度为 5 × 10⁴

个/ml 接种于 6 个 25 ml 培养瓶内,瓶上分别标注“0 mmol/L(对照)”“0.5 mmol/L”“1 mmol/L”“2 mmol/L”“3 mmol/L”和“4 mmol/L”。待细胞处于对数生长期时,均置于条件为 42℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 1 h,在条件为 37℃、5% CO₂ 的培养箱中恢复 6 h 后进行过氧化氢染毒处理,方法同损伤组。

五、细胞相对克隆形成率的检测

1. 热处理组:热处理组细胞恢复 6 h 后进行细胞消化,以 800 转/min 离心 7 min 后弃去上清,用培养液制备细胞悬液。每亚组接种于 3 个直径为 60 mm 的培养皿中,每皿加入 7 ml 细胞培养液,做好日期、热休克处理条件等标记,各处理温度做 3 个平行样。每皿接种 2000 个细胞,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 7 d。培养结束后,移除培养液,用 4% 的多聚甲醛固定, Giemsa 染色,计数细胞克隆数(N),计算克隆形成率(克隆形成率 = N/2000 × 100%)。以各亚组的克隆形成率相对于 37℃ 处理 1 h 组的克隆形成率的百分比表示细胞相对克隆形成率: A (%) = B/C × 100%, 式中, A 表示细胞相对克隆形成率, B 表示各处理温度的克隆形成率, C 表示 37℃ 处理 1 h 组的克隆形成率。

2. 损伤组:损伤组细胞恢复 2 h 后进行细胞消化,各亚组细胞相对克隆形成率的检测方法同热处理组。以各亚组的克隆形成率相对于 0 mmol/L 组克隆形成率的百分比表示细胞相对克隆形成率。

3. 保护组:保护组细胞先行热休克预处理,恢复 6 h 后进行过氧化氢染毒处理,恢复 2 h 后进行细胞消化,其后步骤同损伤组。

六、细胞 HPRT 基因突变的检测

采用细胞克隆法检测细胞 HPRT 基因突变。

热处理组、损伤组和保护组细胞在进行细胞相对克隆形成率检测的同时,每组取 25 ml 细胞培养瓶 1 个,接种细胞密度约为 5 × 10⁴ 个/10 ml 培养液。继续培养 10 d,每隔 3 d 加入胰酶消化,然后弃去约一半细胞继续培养,使突变体表达。培养至第 10 天时,进行细胞克隆形成率的检测。细胞经胰酶消化后,以 800 转/min 离心 7 min 后弃去上清,用培养液制备细胞悬液。取相应个数直径为 60 mm 的培养皿(每亚组 3 个平行样),每皿加入 7 ml 细胞培养液,做好标记。每皿接种 200 个细胞,置于条件为 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 7 d。培养结束后,移除培养液,用 4% 多聚甲醛固定, Giemsa 染色,计数细胞克隆数(E),计算克隆形成率(D): D = E/F, 式中 D 表示克隆形成率, E 表示细胞克隆数, F 表示接种细胞数(200 个)。

进行细胞克隆形成率的检测的同时,取直径为 90 mm 的细胞培养皿(每亚组 5 个平行样),每皿加入 15 ml 培养液,做好标记。每皿接种 2 × 10⁵ 个细胞,细胞贴壁之后加入二甲亚砷、无血清培养液稀释的 6-TG 10 mg/ml(终浓度),置于条件为 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养至少 10 d。培养结束后,移除细胞培养液,用 4% 多聚甲醛固定, Giemsa 染色,计数突变细胞克隆数(H),计算 HPRT 基因突变率(G): G = (H/I) × (1/D), 式中 G 表示 HPRT 基因突变率, H 表示突变细胞克隆数, I 表示接种细胞数(2 × 10⁵ 个)。

七、保护组细胞 HPRT 基因突变率保护效率的计算

基因突变率保护效率 = (损伤组 HPRT 基因突变率 - 保护组相应亚组 HPRT 基因突变率) / 损伤组 HPRT 基因突变率 ×

100%。

八、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 10.0 版统计软件。组内比较采用 Dunnett-*t* 检验进行方差分析;损伤组与保护组细胞 HPRT 基因突变率同一过氧化氢处理浓度下两两比较采用 Student-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、热处理组 V79 细胞的相对克隆形成率和 HPRT 基因突变率

温度 $>42^{\circ}\text{C}$ 热处理 1 h,会诱导明显的 HPRT 基因突变,细胞相对克隆形成率降低,基因突变率与 37°C 处理 1 h 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。温度 $\leq 42^{\circ}\text{C}$ 热处理 1 h,不会诱导明显的 HPRT 基因突变,细胞相对克隆形成率高,基因突变率与 37°C 处理 1 h 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。具体数据见表 1。

表 1 热处理组中各亚组 V79 细胞相对克隆形成率和 HPRT 基因突变率比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	相对克隆形成率 (%)	HPRT 基因突变率 ($\times 10^{-5}$)
37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h 组	100	0.84 \pm 0.27
40 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h 组	97.90 \pm 0.99	1.00 \pm 0.63 ^a
42 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h 组	95.77 \pm 0.45	1.28 \pm 0.49 ^a
43 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h 组	70.51 \pm 1.30	4.88 \pm 0.83 ^b
45 $^{\circ}\text{C}$ 处理 0.25 h 组	33.47 \pm 0.90	6.76 \pm 1.14 ^b

注:与 37°C 处理 1 h 组相比,^a $P > 0.05$,^b $P < 0.01$

二、损伤组 V79 细胞的相对克隆形成率和 HPRT 基因突变率

随着过氧化氢浓度的升高,细胞相对克隆形成率降低,细胞 HPRT 基因突变率升高。过氧化氢浓度 ≥ 0.5 mmol/L 时,各亚组 HPRT 基因突变率与 0 mmol/L 亚组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。具体数据见表 2。

表 2 损伤组和保护组中各亚组 V79 细胞相对克隆形成率和 HPRT 基因突变率比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	相对克隆形成率 (%)	HPRT 基因突变率 ($\times 10^{-5}$)	基因突变率保护效率 (%)
损伤组			
0 mmol/L 组	100	0.82 \pm 0.53	-
0.5 mmol/L 组	83.68 \pm 1.77	2.30 \pm 0.50 ^a	-
1 mmol/L 组	78.91 \pm 0.50	3.84 \pm 0.69 ^b	-
2 mmol/L 组	69.66 \pm 0.88	6.14 \pm 1.05 ^b	-
3 mmol/L 组	54.44 \pm 0.43	7.82 \pm 1.20 ^b	-
4 mmol/L 组	39.36 \pm 0.87	9.78 \pm 1.33 ^b	-
保护组			
0 mmol/L 组	95.77 \pm 0.45	0.54 \pm 0.30	-
0.5 mmol/L 组	93.86 \pm 1.12	0.64 \pm 0.40 ^c	72.17
1 mmol/L 组	87.88 \pm 0.73	0.80 \pm 0.44 ^c	79.17
2 mmol/L 组	84.38 \pm 1.12	1.84 \pm 0.72 ^{ac}	70.03
3 mmol/L 组	77.21 \pm 0.90	5.14 \pm 0.47 ^{bc}	34.27
4 mmol/L 组	54.29 \pm 0.97	9.54 \pm 1.06 ^b	2.45

注:与组内 0 mmol/L 亚组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与组间相应浓度亚组比较,^c $P < 0.01$

三、保护组细胞的 HPRT 基因突变率

细胞在接受热休克预处理后再行过氧化氢处理,过氧化氢浓度 ≤ 1 mmol/L 的细胞没有发生明显的 HPRT 基因突变,与 0 mmol/L 亚组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而过氧化氢浓度超过 1 mmol/L 时,细胞发生明显的 HPRT 基因突变,与 0 mmol/L 亚组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。具体数据见表 2。

四、热休克预处理对过氧化氢诱导细胞基因突变的保护作用

热休克预处理可以明显降低过氧化氢诱导产生的 HPRT 基因突变,起到基因保护效应,损伤组与保护组相应浓度的亚组比较(除 0,4 mmol/L 组),差异均有统计学意义($P < 0.01$)。具体数据见表 2。

讨 论

HPRT 基因位于细胞 X 染色体上,它是细胞存活的非必需基因,突变型与野生型细胞均可根据 HPRT 基因是否突变而被筛选出来。在含有可致正常细胞死亡量的碱基类似物(如 6-硫代鸟嘌呤、6-TG)的培养液中,只有 HPRT 基因突变体细胞能够继续生长,通过计算 HPRT 基因突变率即可反映细胞基因突变的情况,由此建立了 HPRT 基因突变试验^[8]。

热休克蛋白是细胞在物理(尤其是高温条件下)、化学及生物应激源作用下表达增多的一组蛋白质,它广泛存在,结构保守,参与细胞增殖、分化和凋亡的调节,在细胞保护中具有重要的作用^[9]。热休克预处理是诱导热休克蛋白表达最有效和最简单的物理方法,因此在研究热休克蛋白对细胞的保护效应时,一般都采用对细胞进行热休克预处理的方式。而在选择热休克处理条件时,保证较高的细胞存活率和较低的基因突变率是关键问题。实验结果表明,42 $^{\circ}\text{C}$ 以上的热休克预处理,会诱导明显的 HPRT 基因突变;42 $^{\circ}\text{C}$ 及以下的热休克预处理,不会诱导明显的 HPRT 基因突变,即热休克预处理本身引起的基因突变效应很小。因此,研究热休克预处理对细胞的保护作用时,热休克处理的温度应该选择 42 $^{\circ}\text{C}$ 或更低。结果显示:42 $^{\circ}\text{C}$ 热休克预处理 1 h,可以明显减少过氧化氢诱导的 HPRT 基因突变,起到明显的基因保护效应。并且在过氧化氢浓度为 0.5 ~ 3 mmol/L 范围内,细胞基因突变率保护效率均大于 30%,最大可达到 79%;过氧化氢浓度 ≤ 2 mmol/L 范围内(低浓度范围内),保护效应比高浓度范围更明显。

热休克预处理不仅可以抑制过氧化氢诱导的细胞死亡,还可以明显减少过氧化氢诱导的 HPRT 基因突变。过氧化氢、电离辐射等主要通过产生自由基而引起的细胞损伤中(不包括较大剂量下直接氧化细胞膜造成的损伤),DNA 损伤是最重要的,其中 DNA 单双链断裂与染色体畸变、细胞死亡有着十分密切的关系。DNA 损伤如不能得到修复,将引发基因突变,致使细胞癌变。Calini 等^[10]的研究表明,热休克蛋白 70 过表达能减少辐射诱导的细胞 DNA 单双链断裂量,虽然这种保护作用的具体机制尚不清楚,但是该结论提示我们,热休克蛋白可能降低因自由基损伤造成的细胞基因突变。同时,我们认为:如果受保护的细胞不发生凋亡,但发生了严重的基因突变,那么热休克保护效应就无从谈起,也就是说 DNA 严重损伤的细胞,死亡要比存活更好。因此,只有在保证细胞的存活率的同时,

控制其基因突变率,才是发挥真正意义上的保护效应。过去的大量研究已经证实,热休克预处理可以通过抑制细胞凋亡,提高细胞的存活率。我们的研究则证明:热休克预处理对过氧化氢所致成体细胞——V79 细胞 HPRT 基因突变具有显著的保护作用,这对于研究热休克预处理,即热休克蛋白对损伤细胞的保护效应有重要理论意义。热休克预处理降低 HPRT 基因突变的机制目前还不清楚,需要进一步的深入研究。但我们推测,这可能与热休克蛋白能稳定染色体结构、减轻 DNA 损伤有关。

参 考 文 献

- [1] 肖献忠,王燕如,刘梅东,等. 热休克预处理抗过氧化氢所致心肌细胞损伤保护作用的细胞分子机理. 中国病理生理杂志, 1997, 13:65-69.
- [2] 张雪岩,孔玮,贾琳琳,等. 热休克预处理对晶状体上皮细胞过氧化氢氧化损伤的保护作用. 眼科进展, 2005, 25:325-328.
- [3] 王燕如,黄生宁,罗正曜,等. 热休克基因表达对抗过氧化氢所致肺内皮细胞损伤的保护作用. 中国病理生理杂志, 1996, 12:566-568.
- [4] 王燕如,肖献忠,黄生宁,等. 热休克基因表达对抗过氧化氢所致肺泡巨噬细胞损伤的保护作用. 湖南医科大学学报, 1997, 22:1-4.
- [5] Spitz DR, Dewey WC, Li GC. Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. J Cell Physiol, 1987, 131:364-366.
- [6] 刘梅冬,肖卫民,蒋碧梅,等. 过氧化氢对 K562 细胞凋亡的影响. 湖南医科大学学报, 2003, 28:499-501.
- [7] Ziegler-Skylakakis K, Andrae U. Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells. Mutat Res, 1987, 192:65-67.
- [8] 徐洪兰,曹毅,吴启庆,等. ⁶⁰Co 射线诱发的 V79 细胞 HPRT 基因位点突变频率. 中国辐射卫生, 1995, 4:203-205.
- [9] 李征宇,赵霞. 热休克蛋白对细胞凋亡信号转导途径的调节. 中国科学 C 辑生命科学, 2004, 34:6-10.
- [10] Calini V, Urani C, Camatini M. Over expression HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. Toxicol In Vitro, 2003, 17:561-566.

(修回日期:2007-06-30)

(本文编辑:吴倩)

· 研究简报 ·

热休克处理对 NIH3T3 细胞 DNA 双链断裂的影响

李明 张保国 洪承皎 陆明康

热休克可以导致一系列的生物学效应,包括基因活化、细胞周期阻滞、存活和凋亡等^[1]。很多报道证实,热休克预处理可以减少随后高热或其它毒性因子对细胞的损伤,这些报道均假定热休克处理本身所诱发的 DNA 双链断裂(DNA double strand breaks, DSBs)很少^[2]。DNA 双链断裂与细胞的染色体畸变和细胞死亡都有非常密切的关系,是细胞毒理学中一种非常重要的损伤类型。热休克效应诱导的 DNA 双链断裂情况对于选择热休克预处理条件是非常重要的。Iliakis 等^[3]就用中性滤膜洗脱技术检测细胞的 DSBs,认为热休克效应不会产生明显的 DNA 双链断裂。Wong 等^[4]用了较为敏感的脉冲场电泳技术来检测 DNA 的双链断裂,但得到了与 Iliakis 相同的结论。另一方面, Miyakoda 等^[5]观察到热休克处理可以引起 ATM 蛋白激活,导致 P53 磷酸化(在 Ser-15),这一信号传导通路是由 DSB 损伤激活的。Nueda 等^[6]报道,缺乏 DSB 修复能力的细胞,热休克处理诱导的细胞凋亡比正常细胞高。这些研究结果又表明细胞热处理后,细胞 DNA 会产生双链断裂。因此,需要用更灵敏的方法来检测热休克处理诱导的 DNA 双链断裂,证实热休克处理对细胞 DNA 双链断裂的影响。

当 DNA 产生双链断裂时, H2AX 可以迅速地磷酸化,磷酸

化出现在 H2AX 保守的羧基端的尾部 Ser139 残基上。磷酸化的 H2AX,称为 γ -H2AX。由于 H2AX 的磷酸化可以快速诱导和放大,所以每个双链断裂诱发 γ -磷酸化的 H2AX 可以发生在 DSB 附近一个“很大”的区域,估计大约有染色质的两个巨碱基或数个核小体那么大^[7],用荧光标记的抗 γ -H2AX 抗体与 γ -H2AX 结合,就可以在激光共聚焦显微镜(或荧光显微镜)下观察到一个代表 H2AX 磷酸化的荧光斑点。而且由于 γ -H2AX 斑点数量与 DSBs 的数量是 1:1 对应的,因而检测 γ -H2AX 数量成为探测 DNA DSBs 数量的重要方法^[8]。

本研究拟通过用 γ -H2AX 免疫荧光染色的方法检测 DNA 双链断裂,研究热休克处理对 DNA 双链断裂的影响。

材料和方法

一、主要试剂和仪器

1. 试剂:DMEM 培养基购自 Gibco 公司,胰酶购自 Amresco 公司,小牛血清为杭州四季青产品,抗 γ -H2AX 小鼠单克隆抗体购自美国 Upstate 公司,二抗(羊-抗-鼠-FITC)购自华美生物工程公司,BSA 购自 Roche 公司, Triton X100 购自 Amersham 公司,乙醇、Tris 碱和氯化钠均购自国药集团。6 孔板购自 Corning 公司。

2. 仪器:培养箱为 THERMO FORMA 3111 CO₂ 培养箱,激光共聚焦显微镜(LSCM)和软件皆为 Leica 公司产品,倒置显微镜为日本 OLYMPUS 公司 CK41,恒温水箱为上海精宏实验

基金项目:国家自然科学基金(10275083)

作者单位:215123 苏州,苏州大学放射医学与公共卫生学院,江苏省放射医学与防护重点实验室

通讯作者:张保国, Email: bgzhang@suda.edu.cn