DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.01.010

γ-射线全身照射对大鼠肝、脾细胞核转录活性的影响

周度金 易禄康

(生化教研室)

提 要 本实验观察了800 rad γ-线全身照射后24小时内大鼠肝、脾细胞核转录活性的变化，结果表明：照射后24小时内脾细胞核转录活性明显受抑制，而肝细胞核转录活性呈双相变化：照后4小时内转录活性增高，照射后18小时和24小时转录活性受抑制。肝、脾细胞核中RNA聚合酶Ⅱ与RNA聚合酶Ⅰ+Ⅲ受射线的影响程度接近。

关键词：转录；RNA聚合酶；γ线照射；细胞核

真核基因表达最基本的调控过程是在转录水平上发生，了解急性放射损伤时转录活性的变化规律及其机理对于阐明放射病、遗传病的发病机制具有重要的意义。由于分离的细胞核转录系统接近于生理状态，适于研究电离辐射对转录的影响。本实验采用分离的大鼠肝、脾细胞核体外转录系统，观察了亚致死量γ-线全身照射后24小时内大鼠肝、脾细胞核转录活性的变化。

材料与方法

1. 材料

实验动物为健康雄性大白鼠，杂种，体重170～220g。

主要试剂：^{3}H-UTP (17 Ci/mMole) 中国科学院上海原子核研究所产品。α-鹅膏蕈碱（α-Amanitin）西德 Bochringer 公司产品。ATP、GTP、CTP、UTP上海东风试剂厂产品。

2，实验方法

（1）动物分组及照射条件：

动物分组：实验动物按照射后不同时间共分五组：①对照组（未照射组）；②照射后1小时组；③照射后4小时组；④照射后18小时组；⑤照射后24小时组。每组五只大白鼠，在照射后指定时间处死。

全身照射条件：^{60}Coγ-线照射，照射剂量800 rad，剂量率125.39 rad/min。

（2）大鼠肝细胞核的制备：参考Pflugfelder[1]等的方法稍加改进：①于原法匀浆介质中添加0.05%Triton X-100，以减少胞浆污染；②由原法中的100,000×g离心90分钟改为80,000×g离心60分钟。

（3）大鼠脾细胞核制备：参考本室周建新等[2]的方法稍作修改：①将原法中的PBS液改为Hank's液，以提高脾细胞的稳定性；②将原法中超速离心（29,000×g）1小时改为高速离心（17,000 rpm）45分钟。

（4）细胞核转录活性的测定[3]：

反应总体积100μl，内含：50μl细胞核悬液，50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1.5 mM Mg $(Ac)_2$、12.5%甘油(V/V)、2mM $MnCl_2$、10mM β-巯基乙醇、0.05 mM EDTA、200mM $(NH_4)_2SO_4$、ATP、GTP、CTP各1 mM、0.05 mM UTP、^{3}H-UTP 2μCi（为区别RNA聚合酶Ⅱ与酶Ⅰ+Ⅲ活性，加α-Amanitin至1 μg/ml后置0℃15分钟后升温反应）于30℃恒温水浴振荡保温5～30分钟后，加入2 ml 10%TCA（三氯醋酸）—20mM $Na_4P_2O_7$终止反应，冰浴放置15分钟后，酸不溶性物质经玻璃纤维滤膜过滤，相继用10% TCA、5%TCA、95%乙醇各5 ml抽洗三次，滤膜在80℃干燥30分钟，浸于5 ml 0.4%PPO-POPOP-甲苯闪烁液内，于FJ-2101G液闪计数器计数。

（5）实验资料处理：

①RNA聚合酶总活性指不加α-Amanitin所测得的活性；酶Ⅰ+Ⅲ活性指加α-Amanitin为1μg/ml浓度时所测得的活性；酶Ⅱ活性=总活性－酶Ⅰ+Ⅲ活性。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(2)所有实验数据采用北京医学教研室用电子计算机采用单因素或双因素方差分析程序处理。

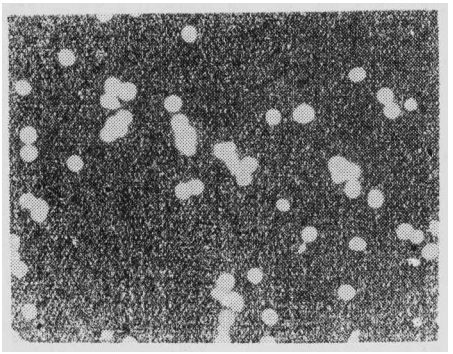
结果与讨论

一、大鼠肝、脾细胞核的分离及其体外转录活性

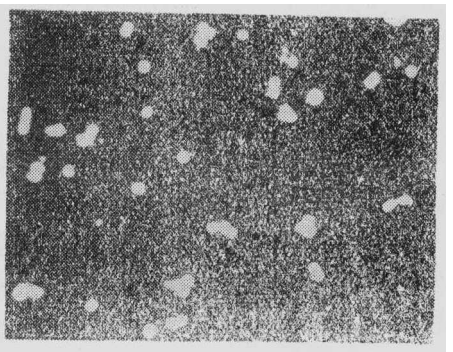
本实验采用稍加修改的 Pflugfelder 法和周建新法制备的大鼠肝、脾细胞核经荧光染色后[1]在荧光显微镜下观察，均形态正常，极少胞浆和完整细胞污染（图1），且具很高的转录活性（图2、3）。

二、γ线全身照射对大鼠肝、脾细胞核转录活性的影响

(一) γ线全身照射对肝细胞核转录活性的影响。



A．肝细胞核



B．脾细胞核

图1　大鼠肝、脾细胞核荧光染色照片

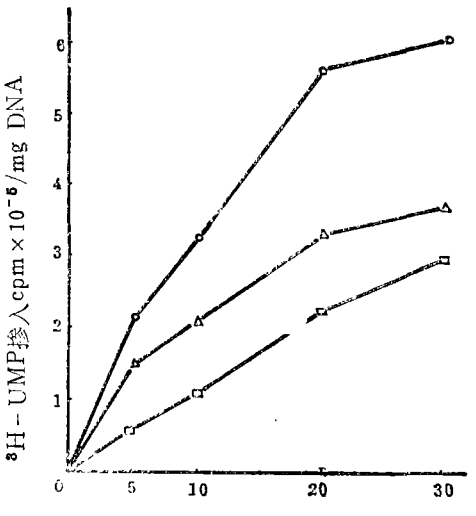


图2　大鼠肝细胞核内RNA聚合酶活性
0—0 RNA 聚合酶总活性；△—△ RNA聚合酶Ⅱ活性；□—□ RNA聚合酶Ⅰ＋Ⅲ活性

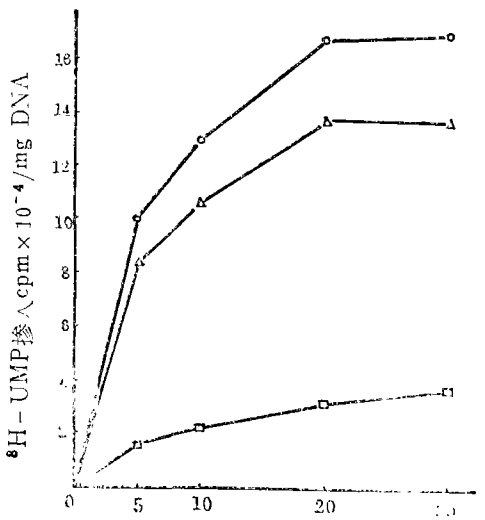


图3　大鼠脾细胞核内RNA聚合酶活性
0—0 RNA聚合酶总活性；△—△ RNA聚合酶Ⅱ活性；□—□ RNA聚合酶Ⅰ＋Ⅲ活性

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

照射后不同时间肝细胞核体外转录活性如表1、图4。实验结果表明，除照射1小时组与对照组比较转录活性差异不显著外，其余照射后各时间组的转录活性与对照组比较均差异非常显著。照射后1小时肝细胞核内总转录活性有轻度增高，至照后4小时活性增高了27%，此与Yatvin[5]报导的小鼠接受10,000rad γ-线全身照射后3小时和6小时肝细胞核转录活性增高的结果相符。照射后18小时转录活性明显下降，至照后24小时降低至对照组的70%。此与Лихолед[6]的结果接近。

肝RNA合成的辐射效应文献报告的结果不尽相同[5][6]，而且对于照射后转录活性的改变是否为射线直接作用于肝脏所致尚有争论[5][7]。一些动物实验(多数为大白鼠)表明，在受致死剂量照射后肾上腺皮质功能发生时相性变化。照后数分钟至数小时，出现肾上腺皮质功能增强的第一个高峰，这个高峰一般认为是机体对照射作用的应激反应，其持续时间和增高幅度与照射剂量呈正比关系。第二个皮质功能增强的高峰发生于照后第2～4天，即在死前数天出现，而活存动物一般不出现这一现象[8]。Yatvin[5]曾证明辐射使小鼠肝细胞核转录活性增高在很大程度上是通过肾上腺起作用。Flemming[9]亦报导过大鼠接受750或1000rad全身照射后2.5小时和72小时，肾上腺和血中皮质类固醇浓度出现双相性增加。本文照射后4小时内肝细胞核转录活性的增高是否与此有关，尚有待进一步的研究。而照射后18小时和24小时肝细胞核转录活性的抑制可能是射线对肝脏直接作用的结果。

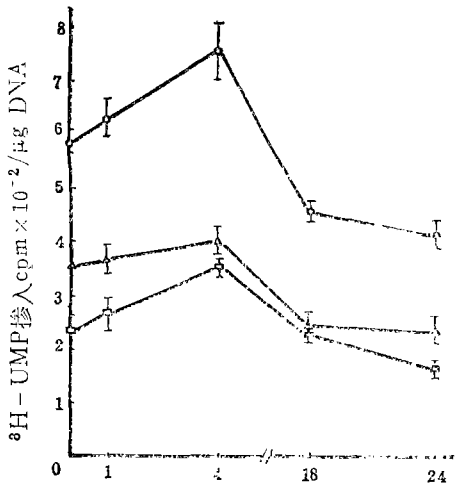


图4　全身照射后不同时间大鼠肝细胞核RNA聚合酶活性

0—0 RNA聚合酶总活性；Δ—Δ RNA聚合酶Ⅱ活性；□—□ NRA聚合酶Ⅰ＋Ⅲ活性

表1　照射后不同时间大鼠肝细胞核的体外转录活性 (cpm/μg DNA) $\bar{X}\pm SE$

	照射后时间（小时）				显著性	
	对照组	1	4	18	24	F	P
RNA聚合酶总活性	589.56 ±49.34(8)*	637.64 ±57.91(8)	762.30 ±84.22(6)	460.12 ±20.91(6)	421.72 ±23.80(6)	41.65	<0.0001
RNA聚合酶Ⅱ活性	354.05 ±37.99(8)	369.83 ±46.59(8)	401.99 ±62.19(6)	240.98 ±40.42(6)	245.96 ±23.99(6)	20.84	<0.0001
RNA聚合酶Ⅰ＋Ⅲ性活	235.65 ±65.80(8)	268.58 ±76.63(8)	364.83 ±65.59(6)	220.23 ±53.11(6)	175.99 ± 8.32(6)	7.81	<0.0001

*括号内数字为实验次数

（二）γ线全身照射对脾细胞核体外转录活性的影响

照射后不同时间分离的脾细胞核体外转录活性见表2、图5。照射后不同时间组脾细胞核的总转录活性、酶Ⅱ和酶Ⅰ＋Ⅲ所催

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 照射后不同时间大鼠脾细胞核的体外转录活性（cpm/μg DNA）$\bar{X}\pm SE$

	照射后时间(小时)				显著性	
	对照组	1	4	18	24	F	P
RNA聚合酶总活酶	174.30 ±11.76(6)*	122.75 ±12.70(6)	94.30 ± 6.23(6)	115.15 ± 4.96(6)	128.00 ±16.30(4)	15.96	<0.0001
RNA聚合酶Ⅱ活性	130.60 ±18.75(6)	91.22 ±12.85(6)	71.53 ± 7.32(6)	92.07 ± 2.22(6)	101.50 ±13.19(4)	18.77	<0.0001
RNA聚合酶Ⅰ+Ⅲ活性	43.70 ± 9.29(6)	32.47 ± 2.81(6)	22.77 ± 2.73(6)	22.25 ± 5.77(6)	26.50 ± 3.39(4)	15.21	<0.0001

*括号内数字为实验次数

化的转录活性与对照组比较均有非常显著的变化。照后24小时内，照射对脾细胞核转录均表现强烈的抑制作用。照后1小时大鼠脾细胞核内RNA合成速率降低近30%，至照后4小时表现最大抑制效应，被抑制45.9%。照后18小时和24小时转录活性虽较照射后4小时略有回升，但较对照组仍降低显著，抑制率分别为33.9%和26.6%。

脾脏属于淋巴组织，对电离辐射十分敏感。Cole等[10]报导过小鼠全身照射后脾脏中的DNA被严重破坏，含量剧减。Nikonova等[11]证明照射后胸腺细胞中的DNase活性剧增，导致DNA的解聚。DNA是转录的模板，辐射对DNA的损伤无疑是辐射诱导的核转录活性抑制的重要原因之一。

表3为RNA聚合酶Ⅱ在总活性中的比值。可见照射没有明显改变RNA聚合酶Ⅱ在肝、脾细胞核的总转录活性中的比值。说明RNA聚合酶Ⅱ及酶Ⅰ+Ⅲ受射线抑制的程度接近。已知真核细胞中RNA聚合酶Ⅱ催化mRNA前体的转录，而RNA聚合酶Ⅰ的反应产物为rRNA。表3的结果亦表明，辐射对肝、脾细胞核内mRNA和rRNA合成的影响程度接近。

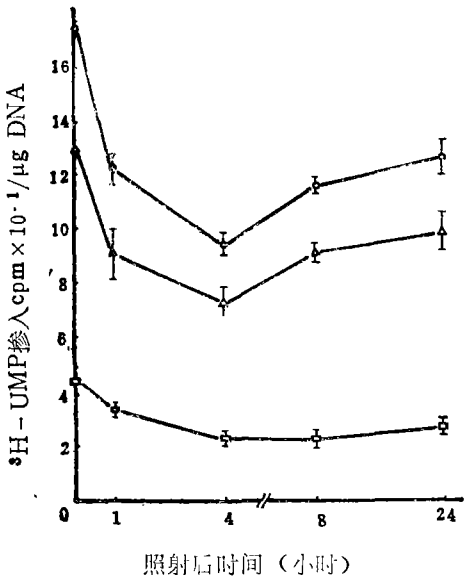


图5 全身照射后不同时间大鼠脾细胞核RNA聚合酶活性

0--0 RNA聚合酶总活性；Δ—Δ RNA聚合酶Ⅱ活性；□—□ RNA聚合酶Ⅰ+Ⅲ活性

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表3 照射后不同时间大鼠肝、脾细胞核内RNA聚合酶Ⅱ占总活性的比例(%) X±SE

	对照组	照射后时间(小时) 1	4	18	24	显著性 F	P
肝细胞核内酶Ⅱ活性比例	55.74 ±9.69(6)*	63.70 ±8.84(6)	49.95 ±1.15(6)	58.02 ±9.98(6)	58.25 ±2.78(6)	3.05	>0.05
脾细胞核内酶Ⅱ活性比例	76.30 ±5.80(6)	73.40 ±3.80(6)	75.70 ±3.70(6)	80.80 ±4.40(6)	79.90 ±3.60(4)	2.85	>0.05

*括号内数字为实验次数

参 考 文 献

1. Pflugfelder GO, et al: Oligonucleosomes as a model system for chromatin transcription. Tranrcription with E Coli. DNA-dependent RNA polymerase. J Mol Biol 1982; 158: 365～389

2. 周建新、易禄康：大鼠脾细胞核体外转录模型。第三军医大学学报1984; 6 (3):217～223

3. Marzluff WF: Transcription of RNA in isolated nuclei, in Methods in cell Biology. 1978; 19:317, Ed by Stein G and Stein J, Academic Press, New York, San Francisco and London.

4. 许屏主编：荧光和免疫荧光染色技术及应用。人民卫生出版社，1983年，P 36

5. Yatvin MB: RNA polymerase activity in liver nuclei of intact and adrenalectomized γ-irradiation mice. Experimentia 1970; 26:190

6. Лиходед ВС, Савенко ЛН, Паскевич ИФ: ДНК-зависимая РНК-полимераза органов, облученных животных. сообщение 2. нуклеоплазматическая РНК-полимераза (форма в) из ядер печени и селезенке белых крыс. Радиобиология 1974; 14:576～579

7. Cammarano P, et al: Effects of X-irradiation on polyribosome organization and RNA labeling in the liver of normal and adrenalectomized rats. Radiat Res 1969; 34:289～304

8. 第三军医大学《核武器损伤的防治》编写组：《核武器损伤的防治》，1977; P 199

9. Flemming K: Radiation effects and adrenal cortex III. Inhibition of corticosteroid ncreases by cysteamine after whole-body irradiation, Int J Radiation Biol 1967; 13:13～19

10. Cole LJ, et al: Spleen dexyribonuclei acid content as an index of recovery in X-radiation mice treated with spleen homogenate. Cancer Res 1954; 14:738～744

11. Nikonova LV, et al: The involvement of nucleases in rat thymocyte DNA degradation after γ-irradiation. Biochem Biophys Acta 1982; 609:281～289

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Effects of Whole Body Gamma Ray Irradiation on Transcriptional Activities of Nuclei of Rat Liver and Spleen

Zhou Dujin, Yi Lukong

(Department of Biochemistry, Third Military Medical College)

The transcriptional activities of the nuclei of the liver and spleen cells of rats were studied at the 1st, 4th, 18th, and 24th hour after whole-body irradiation with gamma rays. It was found that the transcriptional activity of the nuclei of rat spleen was invariably markedly suppresed in all the periods after irradiation while that of the rat liver demonstrated a diphasic change, that is, an exaggeration of the activity at the 4th hour but a reduction at the 18th and 24th hour after irradiaiton. The change of the activity of RNA polymerase II showed no difference from that of RNA polymerases I + III. The mechanism of these changes was briefely discussed.

Key words: Transcription; RNA polymerases; γ-Irradiation; Nuclei

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net