

$^{16}\text{O}^{6+}$ 辐照诱导的人肝癌细胞 DNA 双链断裂及其修复 *

周光明 卫增泉 李文建 王菊芳 何 静
李 强 党秉荣 颀红梅

(中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

高清祥 **

(兰州大学生物系 兰州 730000)

摘要 用倒转脉冲场凝胶电泳 (PIGE) 研究了 $3.17\text{MeV/u } ^{16}\text{O}^{6+}$ 诱导的肝癌细胞 DNA 双链断裂 (DSB) 及其修复效应。结果表明: DSB 的诱导与辐照剂量呈正相关, 其产额为 $0.43\text{DSBs}/100\text{Mbp:Gy}$, 与 $^{60}\text{Co } \gamma$ 射线相比相对生物学效应为 1.69。DSB 片段重接一半所需要的时间 ($t_{1/2}$) 与剂量有关, 剂量越大, $t_{1/2}$ 越长。重接的方式主要表现为小片段连接为较大的片段。

关键词 $^{16}\text{O}^{6+}$, DNA 双链断裂, 脉冲场凝胶电泳, 人肝癌细胞

中图分类号 Q691

DNA 双链断裂 (DSB) 被认为是电离辐射诱导的生物学效应中最重要的原发事件^[1]。未修复的 DSB 是一种潜在致死损伤, 必将导致细胞的增殖死亡^[2]。对辐射生物学来说, 为了给临床应用提供可靠的辐照剂量, 研究 DSB 的诱导和修复十分重要^[3]。研究 DSB 的方法主要有: 粘弹性测量法、速度沉降法、中性滤膜洗脱法、彗星分析、荧光解链等。由于脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 的分离范围高达 $5 \times 10^9\text{Da}$, 并有望达到近染色体大小^[4], 而受到广泛重视。

本工作以 SMMC - 7721 肝癌细胞为材料, 用倒转脉冲场凝胶电泳 (PIGE) 定量研究了氧离子诱导的 DSB 及其修复效应。

1 材料和方 法

1.1 细胞培养

SMMC-7721 肝癌细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基 (Gibco 产品) 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下培养。每 2 天换一次培养基, 每 3 天传代一次, 并于辐照前两天接种到 $\phi 35\text{mm}$ 的培养皿中, 接种密度约为 $6 \times 10^3/\text{cm}^2$ 。辐照前吸出培养基后, 用 D-Hank's 液清洗 2 次, 然后用 Mylar 膜代替培养皿盖封口。用于观察修复效应的样品在辐照后, 加入 2mL 培养基, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下继续培养不同时间后分别取样。

*“西部之光”资助 (XB980604)

** 通讯联系人

收稿日期: 初稿 1999-09-29, 修回 1999-12-09

1.2 辐照

兰州重离子研究装置(HIRFL)引出的 $^{16}\text{O}^{6+}$ 初始能量为8.25MeV/u,经过镍窗、电离室、Mylar膜后,辐照到细胞上的实际能量为3.17MeV/u。样品预辐照在室温下进行,每实验点五皿细胞作为重复。 ^{60}Co γ 射线的处理在兰州医学院第一附属医院放疗科进行,剂量率为0.47Gy/min。

1.3 样品制备与电泳

样品制备与电泳按照文献[5]的报道,于36V、12℃左右,用PIGE仪电泳60h。正反方向交替时间为:5:1。

1.4 数据处理

某分子量区间DNA含量的校正^[6]。 $f_{\text{irrad}} = f_{\text{irrad,gel}} - \frac{f_{\text{control,gel}}}{f_{\text{control,well}}} \times f_{\text{irrad,well}}$ 。式中, $f_{\text{irrad,gel}}$ 为该区间辐照样品的DNA含量; $f_{\text{control,gel}}$ 为该区间对照样品的DNA含量; $f_{\text{control,well}}$ 为样品孔中对照的DNA含量; $f_{\text{irrad,well}}$ 为样品孔中辐照样品的DNA含量。

DNA断裂水平(L)由式 $L = \frac{PR}{T}$ 得到^[5]。式中, PR 为DNA片段释放百分比, T 为DNA片段的平均分子量。

辐照样品 L 由式 $L = L_{\text{irrad}} - L_{\text{control}}$ 进行校正。式中, L_{irrad} 为辐照样品的断裂水平; L_{control} 为对照样品的断裂水平。

2 结果和分析

2.1 剂量效应

图1为63.35keV/ μm 的 $^{16}\text{O}^{6+}$ 辐照SMMC-7721细胞的剂量响应,从图1A可见, PR 随剂量的增加而上升,这与文献[6]报道一致。 PR 直观地反应DNA断裂的情况,根据文献[6]可知,随着剂量进一步增加, PR 最终将达到准阈值。本实验中没有出现这一现象,可能与剂量有关。由DNA断裂水平与剂量之间的线性关系得出DSB产额为0.43DSBs/100Mbp·Gy(见图1B)。另外以 ^{60}Co γ 射线为参照,在相同条件下得到 γ 射线诱导的DSB产额为0.25DSBs/100Mbp·Gy,因此,3.17MeV/u $^{16}\text{O}^{6+}$ 诱导DSB的相对生物学效应(RBE)为1.69。文献[7]报道,仅Kampf认为当重离子的LET在200keV/ μm 时,RBE为5;对不同LET的重离子,大多数研究者得到的RBE都在1左右。

2.2 修复效应

从图2A可见,修复90min以内,DSB发生了较明显的重接,而且, PR 与培养时间之间存在指数关系。DNA片段重接一半所需时间($t_{1/2}$)随辐照剂量的不同而不同, $t_{1/2,60\text{Gy}}$ 为31.9min, $t_{1/2,120\text{Gy}}$ 为91.8min。DNA断裂水平与培养时间之间为线性关系(见图2B), $t_{1/2}$ 也与辐照剂量有关, $t_{1/2,60\text{Gy}}$ 为45.2min, $t_{1/2,120\text{Gy}}$ 为52.3min。但是,培养时间超过60min后, PR 值突然回升,然后呈现极其缓慢的下降趋势;断裂水平也有所回升,其原因不明。Nevaldine^[8]在研究X射线辐照EMT-6细胞诱导的DSB及其修复效应时,以较丰富的数据点证实DSB的重接包含快慢两相,其快相与本实验的报道一致,发生在45min以内,其 $t_{1/2}$ 为16min。可见,氧离子诱导的DSB的重接比X射线要慢得多。其慢相的数据点存在较大的波动,因而可以推断,本实验中重接90min后DNA片段含量的回升应属于修复的慢相,只是由于数据点较少,无以确定慢相的 $t_{1/2}$,但可以肯定的是,氧离子诱导的DSB的修复很不彻

底, 这与文献 [7] 报道的一致。

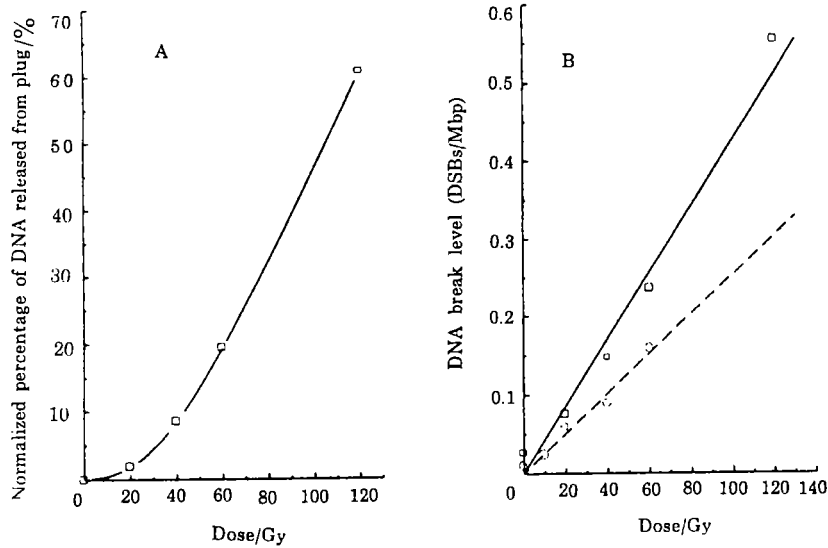


Fig.1 Dose-response of SMMC-7721 cells irradiated with 3.17MeV/u $^{16}\text{O}^{6+}$
 \square $^{16}\text{O}^{6+}$, \circ γ -rays

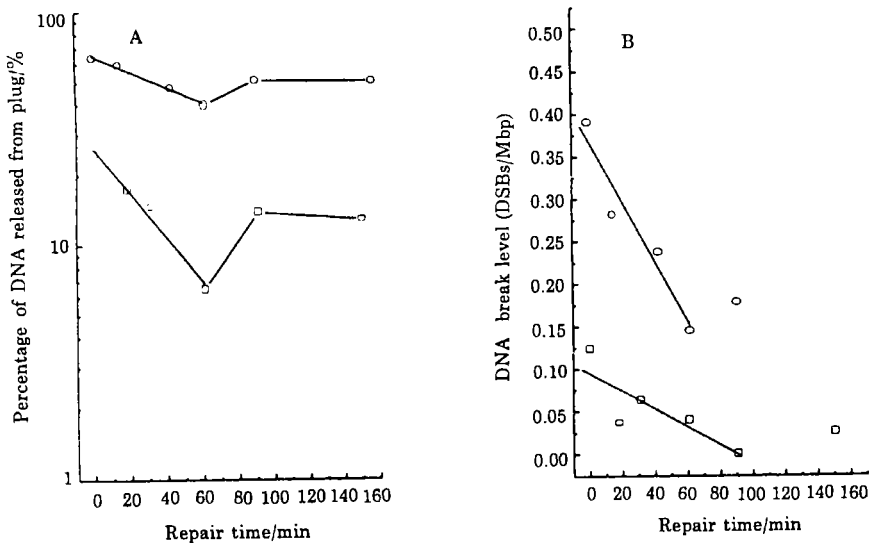


Fig.2 Repair-response of SMMC-7721 cells irradiated with 3.17MeV/u $^{16}\text{O}^{6+}$
 \square 60Gy, \circ 120Gy

表 1 是 120Gy $^{16}\text{O}^{6+}$ 诱导的 DSB 片段经过不同修复时间后的分布情况。从表 1 可以看出, 在 90min 以内, 3 个分子量区域内片段的含量与修复时间有一定的相关性。随着修复时

间的延长, 225-500 kbp 的片段含量很快下降, 直到无法检测; 500-1000kbp 的片断含量先下降, 随后基本保持不变; 而 1500-2250 kbp 的片段含量显著增加。这种现象说明, DSB 片段的重接主要是小片段连接成大的片段。

Tab.1 Distribution of DSB fragments induced with 120Gy of $^{16}\text{O}^{6+}$ (%)

Repair time /min	1500~2250 kbp		500~1000kbp		225~500kbp	
	Content	N.C ⁽¹⁾	Content	N.C	Content	N.C
Control	1.08	0	3.46	0	4.01	0
0	13.37	12.42	17.71	14.76	13.38	9.76
43.0	17.56	16.65	12.66	9.53	7.15	3.27
61.8	25.28	24.46	12.31	9.13	2.56	0
90.6	35.65	34.94	12.24	9.10	1.28	0
157.1	4.79	3.75	14.90	11.85	10.43	6.69

⁽¹⁾Normalized content

3 讨 论

用速度沉降法、中性滤膜洗脱法研究 DSB 修复效应, 两者得到的结果存在很大分歧, 前者认为, 存活曲线的肩区为酶促修复等细胞依赖性过程, 细胞仅有慢修复机制; 后者则认为, 肩区为放射化学过程, 细胞有快慢两种修复机制^[4]。Stamato 等^[9]用脉冲场凝胶电泳研究了 DSB 的修复, 得到了与中性滤膜洗脱法较一致的结果, 即细胞有快慢两种修复机制, 而且对于 γ 射线辐照单层贴壁细胞诱导的 DSB 来说, 即使剂量不同, 其快修复和慢修复的 $t_{1/2}$ 都近似为常数, 分别为十几分钟和四十几分钟。氧离子诱导的 DSB, 其快修复 $t_{1/2}$ 与剂量有关: 剂量越大, 其值越高。这与 Iliakis 的报道一致^[10]。39Gy X 射线诱导的 DSB 在 1h 以内仅剩 8%^[7], 而氧离子诱导的 DSB 修复 3h 后残余的 DNA 片段的含量仍高于 10%。随着原子系数和 LET 的升高, DSB 重接变慢, 残余 DNA 片段增加; 铅、铀诱导的 DSB 几乎不发生重接, LET > 10^4 keV/ μm 时没有修复效应^[7]。尽管对于重离子诱导的 DSB 产额来说, RBE 只有 1 左右; 但对于残余的 DSB 来说, RBE 与重离子生物效应的 RBE 很接近^[1]。重离子诱导的不可修复的 DSB 可能是重离子具有较高的生物学效应的主要原因。

致谢 感谢 HIRFL 运行组的工作人员在样品辐照过程中给予的大力支持, 感谢兰州大学生物系李海燕老师在凝胶扫描时给予的帮助和指导。

参 考 文 献

- 1 Rydberg B, Lobrich M, Cooper P K. Radiat Res, 1994, 139:133-141
- 2 Frankenberg D, Frankenberg-Schwager M, Blocher D *et al.* Radiat Res, 1981, 88:524-532
- 3 Iliakis G. Bioessays, 1991, 13:641-648
- 4 Radford I R. Int J Radiat Biol, 1988, 54(1):1-11
- 5 Zhou G M, Wei Z Q, Li W J *et al.* Acta Biophy Sinica, 1998, 14(1):145-149
- 6 Cedervall B, Wong R, Albright N *et al.* Radiat Res, 1995, 143:8-16
- 7 Heilmann J, Rink H, Taucher-Scholz G *et al.* Radiat Res. 1993, 135:46-55

- 8 Nevaldine B, Longo J A, King G A *et al.* Radiat Res, 1993, 133:370-374
9 Stamato T, Guerriero S, Denko N. Radiat Res, 1993, 133:60-66
10 Iliakis G, Blocher D, Metzger L *et al.* Int J Radiat Biol, 1991, 59(4):927-939

INDUCTION AND REPAIR OF DNA DOUBLE-STRAND BREAKS IN HUMAN HEPATOMA CELLS IRRADIATED WITH $^{16}\text{O}^{6+}$

ZHOU Guangming WEI Zengquan LI Wenjian WANG Jufang

HE Jing LI Qiang DANG Bingrong XIE Hongmei

(*Institution of Modern Physics, the Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000*)

GAO Qingxiang**

(*Biology Department of Lanzhou University, Lanzhou 730000*)

ABSTRACT Pulsed-field gel electrophoresis has been applied to analyse the induction and repair of DNA double-strand breaks (DSB) in human hepatoma SMMC-7721 cells exposed to $3.17\text{MeV/u }^{16}\text{O}^{6+}$. It shows that the DSB yields are $0.43\text{DSBs}/100\text{Mbp}/\text{Gy}$ and compared with $^{60}\text{Co } \gamma$ -rays, the relative biological effectiveness (RBE) of $^{16}\text{O}^{6+}$ is 1.69. The half time of DSB fragments being repaired ($t_{1/2}$) is relevant to the dose; the higher the dose is, the longer the time is. The main way for DSB repair is the rejoining of smaller fragments into larger ones.

KEYWORDS $^{16}\text{O}^{6+}$, DNA double-strand breaks, Pulsed field gel electrophoresis,

Human hepatoma cells

CLC Q691