

重离子辐照诱导 DNA 双链断裂 的剂量率效应

周光明 李文建 王菊芳 李 强 温小琼
党秉荣 颜红梅 李兴林 卫增泉

(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 利用不同剂量率的 $50\text{MeV/u } ^{16}\text{O}^{+}$ 辐照 B16 黑色素瘤细胞的脱蛋白 DNA, 采用脉冲场凝胶电泳技术对 DNA 双链断裂(DSB)的诱导和片段的分布进行了研究。结果发现, 在剂量率分别为 3Gy/min 和 30Gy/min 的情况下, DNA 片段释放百分比(PR)都随着剂量的增加而增加, 并在超过一定剂量之后趋于相似的准阈值; 3Gy/min 辐照诱导 DSB 的产额为 $0.40\text{DSBs/(100Mbp}\cdot\text{Gy)}$, 30Gy/min 辐照诱导的 DSB 产额准确值无法得到; 30Gy/min 辐照诱导 DSB 的截面为 $2.14\mu\text{m}^2$, 是 3Gy/min 的 3.1 倍。所有结果都表明剂量率越高, 诱导 DSB 越有效。另外, 3Gy/min 辐照诱导 DSB 片段在 -860kbp 处有一个片段峰, 而 30Gy/min 没有, 说明剂量率可以影响 DSB 片段的分布。

关键词 DNA 双链断裂, 剂量率, 肿瘤细胞

中图分类号 Q691

DNA 双链断裂(DSB)是电离辐射诱导的生物学效应中最重要的一种损伤^[1,2], 系统研究 DSB 的诱导和修复, 有助于揭示辐射生物学效应的机理。目前, 电离辐射诱导哺乳动物细胞 DSB 的研究每年都有大量报道, 特别是对于重离子的研究日益增多。但是, 研究重离子辐照哺乳动物细胞诱导 DSB 的文献中极少注明剂量率, 而剂量率是电离辐射很重要的一个参数; 对于放疗来说, 更是不容忽视。到目前为止, 有关重离子诱导 DSB 的剂量率效应研究的报道很少。本工作利用不同剂量率的碳离子辐照黑色素瘤 B16 细胞的脱蛋白 DNA, 采用脉冲场凝胶电泳技术对 DSB 的产额和片段的分布进行了研究。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

小鼠 B16 黑色素瘤细胞购于中国医学科学院肿瘤研究所, 用含 10% 小牛血清的 RMPI-1640 培养基(Gibco 产品)在 37°C 条件下于培养瓶中培养, 接种密度约为 $5\times 10^4/\text{cm}^2$, 2d 换液一次, 3d 传代一次。

“西部之光”项目(XB980611)资助
第一作者:周光明,男,1970 年 7 月出生,1994 年毕业于兰州大学生物系生化专业本科,博士,辐射生物学专业,助研
通讯联系人:高清祥
收稿日期:初稿 2001-04-24, 修回 2001-07-10

1.2 样品制备

用胰蛋白酶把接种培养 48h 的细胞从培养瓶中消化下来,1000r/min 离心 5min,弃去上清液。细胞用 PBS 清洗 3 次并稀释至细胞浓度为 $1\times 10^7/\text{mL}$ 。加等体积低熔点琼脂糖,混匀,待其凝结后切成小块,每块 40 μL 。然后置于反应液(1mg/mL 蛋白酶 K (Sigma 产品),1%SDS,0.5mol/L EDTA, 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0)中,50 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 48h,再用 TE(1mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0)洗涤 3 次,每次不少于 6h。这样,细胞其它组分(蛋白质、脂类)被完全去除,而 DNA 分子也避免受到人为的机械损伤。最后,置样品块于 PBS 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 辐照

从兰州重离子研究装置(HIRFL)引出的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 的初始能量为 50MeV/u,经过能量调制器将 Bragg 展宽后,用平均 LET 为 125.5keV/ μm 的峰区于室温下辐照样品块,剂量率分别为 3Gy/min 和 30Gy/min。每个剂量 3 个样品块作为重复。辐照完毕,加保存液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 电泳

按参考文献[3]进行,电泳完毕用双波长扫描仪进行荧光扫描。

1.5 数据处理

样品块中释放的 DNA 百分比 PR 为

$$\text{PR} = 1 - \text{FAR}$$

式中,FAR 为电泳后滞留在样品孔中的 DNA 百分比。

DNA 断裂水平 L 为

$$L = \frac{\text{PR}}{T}$$

式中, T 为 DNA 片段的平均分子量(Mbp)。DSB 诱导截面 $\sigma(\text{cm}^2)$ 为

$$\sigma = -\frac{\ln(1 - \text{PR})}{F} = \frac{1.6 \times 10^{-9} \text{LET} \ln(1 - \text{PR})}{D}$$

式中, F 为离子通量($/\text{cm}^2$);LET 为线性能量转移(keV/ μm); D 为剂量(Gy)。

2 结果和讨论

2.1 剂量率对 PR 值的影响

图 1 是 DNA 电泳后的荧光扫描结果。由图 1 可以看出,对照样品也有一些片段进入胶板,为了便于比较,按照文献[4]的报道进行了背景校正,结果见图 2。

如图 2 所示,不同剂量率辐照诱导的 PR 值都先随剂量的增加而增加,然后趋于一个近似相同的准阈值—69%。类似的结果有报道^[4,5],准阈值的出现可能与辐照引起的 DNA 交联有关^[6,7]。在剂量同为 20Gy 时,30Gy/min 辐照诱导的 PR 值比 3Gy/min 辐照诱导的 PR 值大得多,表明剂量率越大,发生断裂的 DNA 越多。

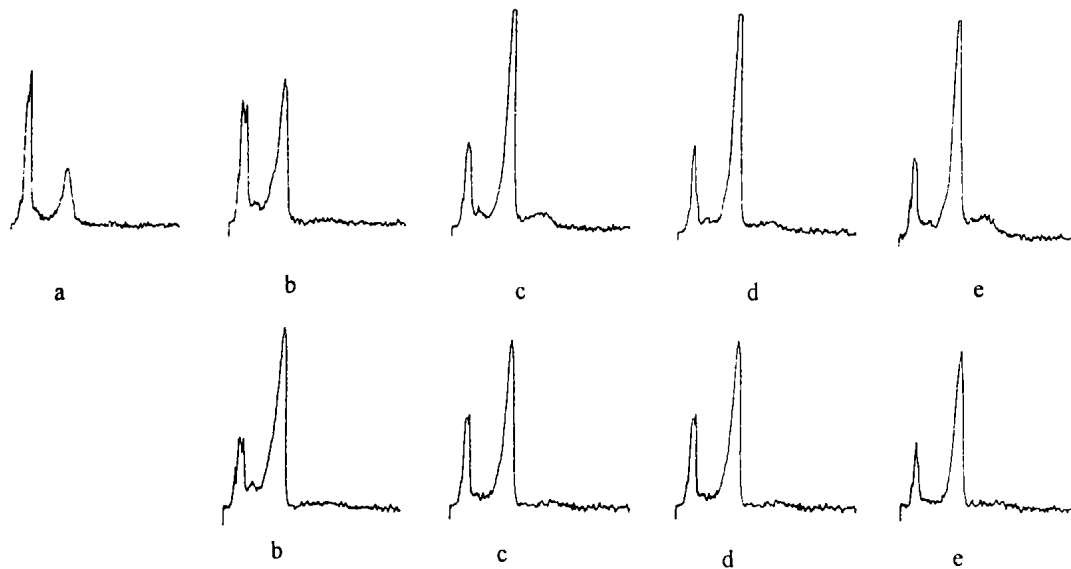


Fig.1 Traces of fluorescent densitometric scanning
a, control. b—e, irradiated with 20Gy, 40Gy, 60Gy, 80Gy of 3Gy/min respectively;
b'—e', irradiated with 20Gy, 40Gy, 60Gy, 80Gy of 30Gy/min respectively

2.2 剂量率对 DSB 产额的影响

PR 值只表示产生的 DNA 片段总量,而不能反映出 DNA 片段的分布,故而不能得到准确的 DSB 产额。DNA 断裂水平能够全面地体现 DNA 片段的含量和 DNA 片段的分布,而且与剂量之间存在很好的线性关系。如图 3 所示,对于剂量率为 3Gy/min 进行的辐照,DSB 产额为 0.40DSBs/(100Mbp · Gy)。由于在相同条件下得到 γ 射线诱导的 DSB 产额为 0.55DSBs/(100Mbp · Gy),因此,以 ^{60}Co γ 射线为参照,125.5keV/ μm C^{126+} 在剂量率为 3Gy/min 时诱导 DSB 的相对生物效率(RBE)为 0.73。对于剂量率为 30Gy/min 进行的辐照,断裂水平与剂量之间的相关性不明显,难于得到 DSB 的准确产额。这可能与 DNA 交联有关。

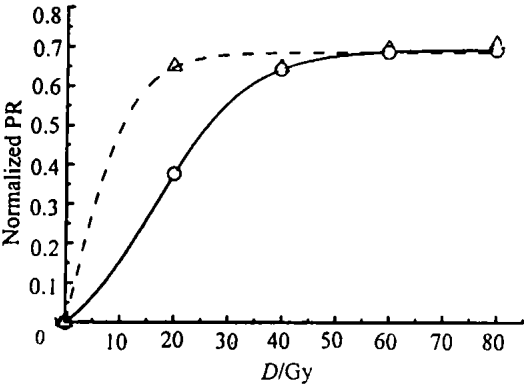


Fig.2 Normalized PR as a function of dose
○ 3Gy/min, △ 30Gy/min

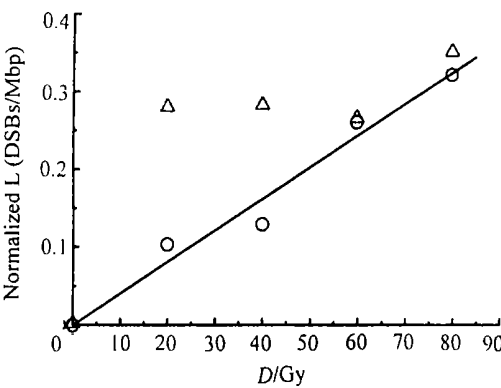


Fig.3 DNA break level (L) as a function of dose
○ 3Gy/min, △ 30Gy/min

2.3 剂量率对 DSB 诱导截面的影响

DSB 诱导截面反映的单个粒子产生 DSB 的几率。 $3\text{Gy}/\text{min}$ 辐照诱导 DSB 的截面为 $0.69\mu\text{m}^2$, 而 $30\text{Gy}/\text{min}$ 辐照为 $2.14\mu\text{m}^2$, 是前者的 3.1 倍, 说明剂量率越高, 诱导 DSB 越有效, 这与国外的报道相同^[8]。另外, 两者的截面都远大于直接辐照细胞诱导 DSB 的截面(见文献 9), 其原因可能有两个: (1) 直接辐照 DNA 分子, 没有细胞其它组分的保护作用; (2) 在制样时, 包埋在琼脂糖中的细胞经过蛋白酶和去垢剂处理, 琼脂糖中只剩 DNA, DNA 分子扩散而占据原来细胞占据的整个空间, 其几何截面自然比原来的细胞核大得多。

2.4 剂量率对 DSB 片段分布的影响

图 4 是 DSB 片段的分布图。由图 4 可以看出, $30\text{Gy}/\text{min}$ 辐照诱导的 DSB 片段近似为正态分布(虚线); 而 $3\text{Gy}/\text{min}$ 辐照诱导的 DSB 片段在 -860kbp 处比 $30\text{Gy}/\text{min}$ 辐照多一个片段峰(箭头所示), 即 DSB 片段非随机分布。说明 DSB 片段的分布受到了剂量率的影响, 低剂量率辐照可以导致 DSB 片段的非随机分布, 或者使 DSB 片段的非随机分布更明显。

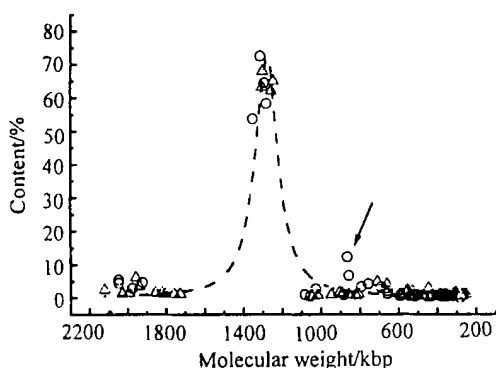


Fig. 4 Distribution of DSB fragments

长期以来人们一直将 DNA 看成是一个均匀的单位, 其损伤与修复也随机进行。最近的研究发现, 电离辐射诱导的 DSB 片段是非随机分布的, 而且这一分布规律与细胞中 DNA 所处的高度有序的染色体结构和入射粒子的电离特性有关^[10,11]。我们认为 DSB 片段的非随机分布还可能与 DNA 序列^[12]有关。其原因在于入射粒子沉积的能量可以直接或间接地沿着 DNA 链传递。传递的方式包括能量直接沿 DNA 链迁移^[13,14]和能量沉积后产生的水辐解产物^[13,15]热扩散或者沿 DNA 链迁移; 而且, 在低剂量率情况下, 能量传递的几率更大。能量传递的结果是导致 DNA 链上高亲电性、低电离能的

化学键优先发生反应, 致使 DNA 链断裂, 从而形成 DSB 片段的非随机分布。

参 考 文 献

- 1 Rydberg B, Lobrich M, Cooper P K. Radiat Res, 1994, **139**: 133—141
- 2 Ward J F. Int J Radiat Biol, 1990, **57**: 1141—1150
- 3 周光明, 何静, 李文建等. 生物物理学报, 1998, **14**(1): 145—149
ZHOU G M, HE J, LI W J *et al.* Acta Biophys, 1998, **14**(1): 145—149
- 4 Cedervall B, Wong R, Albright N *et al.* Radiat Res, 1995, **143**: 8—16
- 5 Ager D D, Dewey W C, Gardiner K *et al.* Radiat Res, 1990, **122**: 181—187
- 6 Schneider M, Taucher-Scholz G, Heilmann J *et al.* Radiat Environ Biophys, 1994, **33**(2): 111—124
- 7 Wlodek D, Banath J, Olive P. Int J Radiat Biol, 1991, **60**: 779—790
- 8 Foray N, Fertil B, Alsbeih M G A *et al.* Int J Radiat Biol, 1996, **69**(2): 241—249
- 9 Taucher-Scholz G, Heilmann J, Kraft G. Nucl Instr Meth (B), 1996, **107**: 318—322
- 10 Rydberg B. Radiat Res, 1996, **145**: 200—209
- 11 Newman H C, Prise K M, Folkard M *et al.* Int J Radiat Biol, 1997, **71**(4): 347—363
- 12 WELZ Q, ZHOU G M, WANG J F *et al.* GSI report 97-09, 1997, A7

- 13 Chatterjee A, Holley W R. *Int J Quantum Chem*, 1991, 709—727
- 14 Milligan J R, Ng J Y, Wu C C L *et al*. *Radiat Res*, 1995, **143**: 273—280
- 15 Fuciarelli A F, Sisk E C, Miller J H *et al*. *Int J Radiat Biol*, 1994, **66**(5): 505—509

DOSE—RATE EFFECTS ON THE INDUCTION OF DNA DOUBLE—STRAND BREAKS WITH HEAVY—ION IRRADIATION

ZHOU Guangming LI Wenjian WANG Jufang LI Qiang WEN Xiaoqiong

DANG Bingrong XIE Hongmei LI Xinglin WEI Zengquan

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

GAO Qingxiang

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

ABSTRACT The deproteinized DNA samples of melanoma cells (B16) were irradiated by $50\text{MeV/u } ^{12}\text{C}^{6+}$ of different dose rates. And the inverse pulsed—field gel electrophoresis was employed to measure the distribution of DSB fragments. The results show that both of the percentages of DNA released from plug (PR) induced by 3Gy/min and 30Gy/min increase with the rising dose and approach a similar quasi—threshold. The yields of DSB induced with 3Gy/min are $0.40\text{DSBs}/(100\text{Mbp}\cdot\text{Gy})$ while those induced with 30Gy/min are not obtained. The cross section of DSB induction with 30Gy/min is 2.14m^2 , which is more than three times of that with 3Gy/min . These show that the higher the dose rate is, the more efficiently DSBs are induced. There is a peak about 860kbp of DSB fragments induced with 3Gy/min , which does not exist in the samples treated with 30Gy/min . It is implied that the dose rate has influence on the distribution of DSB fragments.

KEYWORDS DNA double—strand break, Dose rate, Tumor cells

CLC Q691