

哺乳动物细胞 DNA 辐射损伤与修复的研究 II

羟磷灰石离心-荧光法检测 γ -线

所致鼠血淋巴细胞 DNA 链

断裂与重接*

郑秀龙 赵 芳 丁振英 高建国

(上海第二军医大学)

摘要 我们改进了能用于检测不分裂细胞 DNA 链断裂与重接的羟磷灰石离心-荧光法。证明了鼠血淋巴细胞能将 γ -线引起的 DNA 断链重接。但受 30 Gy 损伤的细胞修复不完全, 继续保温至 8 小时又发生断裂, 同时细胞活力下降, 再次肯定我们以前提出的观点: 即重接 DNA 分子的再断裂是一种不可逆的生化变化, 它可能是细胞死亡的预兆。

关键词 羟磷灰石离心-荧光法, 大白鼠血淋巴细胞, DNA 链断裂, DNA 修复, 重接 DNA 再断裂。

引 言

前文我们报道了用碱性蔗糖梯度离心法, 观察了 H^3 -TdR 标记人血转化淋巴细胞受照后 DNA 损伤与修复的规律^[1]。本文介绍我们采用 Rydberg^[2]及 Kanter^[3]碱解旋速度法, 改进了羟磷灰石离心分离 DNA 单、双链和荧光检测法, 使之更简便、灵敏、快速。经与羟磷灰石柱层析法比较, 分离效果相同。它无需先用放射性核素标记可直接检测细胞 DNA 链损伤与修复。

以往大多利用体外培养来研究分裂细胞 DNA 断链的重接, 而对不分裂细胞 DNA 能否重接研究较少, 我们采用本法对 γ 线所致大白鼠外周血淋巴细胞 DNA 链断裂及其重接规律进行了探讨。

材 料 与 方 法

1. 淋巴细胞悬液

Wistar 纯种大白鼠经乙醚麻醉后, 由颈动脉无菌放血, 肝素抗凝, 按 Böyum 法^[4]分离收集淋巴细胞, 再用冰冷生理盐水或 RPMI 1640 (pH 7.2) 培养液(下简称 1640 液)洗二次。镜下检查淋巴细胞纯度大于 90%, 回收在 87% 以上, 用台盼蓝染色法检查拒染细胞(又称细胞活力)大于 95%, 然后视实验需要, 将细胞悬于生理盐水或 1640 液内使成 1×10^6 个细胞/ml。

* 本工作在 1983 年 1 月全军防原会议上及同年 10 月在中国生物物理学会四届全国学术会议上报告过。

2. 照射

用 ^{60}Co γ 线照射, 距离 80 cm, 剂量率 0.93~0.99 Gy/min, 细胞悬液分装在试管内, 为降低酶的修复作用, 于冰冷水浴中照射 1~30 Gy 后, 即刻于 0℃ 离心, 弃去上清液, 细胞再悬于冰冷盐水中。

3. 修复试验

将经受 10 或 30 Gy 照射的 1640 细胞悬液于 0℃ 离心后, 轻轻移去上清液, 注意防止细胞丢失, 在 1640 液内加 20%(v/v) 未灭活无菌马血清(内含青、链霉素各 100 单位/ml)混合, 于 37℃ 保温不同时间后, 分别离心收集细胞, 再以冰冷生理盐水洗二次后, 悬于生理盐水中, 贮冰箱备用。以上各步均需无菌条件下操作。

4. 羟磷灰石离心-荧光法检测

(1) 样品的制备 取 0.1 ml 细胞悬液(含 $2\sim4\times10^5$ 个细胞)置平底塑料管内, 沿管壁加碱性溶胞液(含 0.03 M NaOH、0.001 M Na_2HPO_4 及 0.15 M NaCl, pH>12.0)在暗处于 20℃ 水浴中保温 30 min, 使细胞溶破, DNA 解旋, 取出后立即置冰浴中, 加 1 ml 0.034 M HCl(含酚红指示剂), 使之中和。随即于冰水中用超声波清洗机以 300 mA 超声处理 1 min, 使 DNA 分子量降至 4×10^5 dal 左右^[5], 加 2 ml 0.5% 十二烷基磺酸钠(SDS), 使蛋白质变性后与 DNA 解离。混匀, 置冰箱内保存。

(2) 羟磷灰石离心分离 DNA 单、双链 ① 羟磷灰石(下简称 HA), 0.5 g HA 置试管内, 先用 0.01 M 磷酸钾缓冲液(下简称 KPB, pH 7.0)浸泡 2 小时以上, 用滴管吸搅洗涤 2 次, 自然沉降后, 吸去上清液, 再加 0.01 M KPB 吸搅后放置, 用前在水浴中煮沸 2 min, 离心弃去上清液, 这样处理对陈旧的 HA 分离效果较好。② 吸附 DNA 将上述制备好的样品加入含有已处理好的 HA 试管内, 用滴管轻轻吸冲搅匀后, 先在室温再在 60℃ 水浴内吸附 15 min, 3000 rpm 离心 1 min 弃上清液。③ 洗涤 加 0.01 M KPB 洗涤 HA 沉淀, 以除去酚红, NaCl 及 SDS 等杂质。离心弃上清液。④ 洗脱 在 60℃ 水浴中, 以 0.125 M KPB 洗脱单链 DNA, 离心, 再重复 2 次, 收集上清洗脱液备用, 最后在 80℃ 水浴中, 以 0.25 M KPB 洗脱双链 DNA 三次, 方法同上。

上述操作均需在弱光下进行, 以避免可见光对洗脱结果的影响。

(3) 荧光法检测 DNA 单、双链 为避免 SDS 等不溶物对以后的荧光反应的影响, 将上述收集的洗脱液于 0℃ 离心除去沉淀, 吸取上清液 3 ml $\times$ 3, 分别置于磨口离心管内, 各加 0.15 ml 0.2% 小牛血清白蛋白(电泳纯)作载体, 摇匀, 加 3 ml 20% TCA 摇匀, 置冰箱过夜。0℃ 离心沉淀 DNA, 弃上清液, 再依次用 5% TCA、乙醇等洗涤沉淀, 以除去 SDS 及脂类等杂质, 然后置 60℃ 烘干, 加 25 μ l 2 M 3,5-二氨基苯甲酸盐(下简称 DABA)使沉淀润湿, 盖好磨口塞, 置 60℃ 水浴中反应 45 分钟后, 取出加 1 ml 0.6 N HClO_4 , 终止反应。摇匀后, 按前法^[6]于 λ_{ex} 408 nm, λ_{em} 498 nm 处, 以硫酸喹啉(1 μ g/ml 的 0.1 N H_2SO_4 液)为参考值, 用荧光分光光度计测量样品的相对荧光强度。按双链 DNA%(ds DNA%) = DNA 双链荧光强度/(DNA 单、双链荧光强度之和)%, 计算 ds DNA%。其量的下降或上升可用来衡量 DNA 损伤与重接的程度。

实验中所用的试剂均用去离子水(电导率: $0.2\sim0.4\times10^9\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$)配制。

结果与讨论

1. HA 离心法与 HA 柱层析法分离检测 DNA 单、双链效果的比较

为了验证 HA 离心法分离 DNA 单、双链的效果, 除按上述方法对纯 DNA 和细胞 DNA 进行

离心回收实验外,我们还采用了 Rydberg 的 HA 柱层析法^[2],在相同操作条件下作了分离效果比较。

(1) 天然 DNA 与热变性 DNA 的分离 取小牛胸腺 DNA (主要为双链,西德 Serva 产品)和热变性 DNA (主要为单链)分别按离心法参见材料与方法一节中的 4.(2) 或用 HA 柱进行吸附和洗脱,然后用紫外分光光度计测定光密度(O.D.),结果见表 1。

表 1 HA 离心法与柱层析法分离小牛胸腺 DNA 效果的比较
(各部分洗脱液的 O. D. 值占总 O. D. 值的%)^{*}

Table 1 Comparison of separation DNA efficiency of hydroxylapatite centrifugation with column chromatography in beef thymus. (percentage optical density (O. D.) of every elution in the total O.D.)^{*}

	天然 DNA Natural DNA		热变性 DNA Thermal-denaturated DNA	
	离 心 法 Centrifugation	柱层析法 Column chromatography	离 心 法 Centrifugation	柱层析法 Column chromatography
未被吸附 unadsorbed	5.6±0.6(6)	2.6(3)	2.6±0.9(6)	3.0(2)
KPB 0.01 M 洗涤 Wash with 0.01 M KPB	1.3±0.8(8)	1.5(3)	1.1±0.8(6)	1.6(2)
KPB 0.125 M 洗脱 Eluted with 0.125 M KPB	4.6±0.9(6)	8.3(3)	77.8±2.0(6)	81.2(2)
KPB 0.25 M 洗脱 Eluted with 0.25 M KPB	88.7±1.0(6)	87.6(3)	18.5±1.1(6)	14.3(2)
回 收 Recovery	94.0±3.9	97.3	101.8±2.4	87.5

^{*} 表中数据为 $\bar{x} \pm SE$, 括号内为实验次数

由表 1 可见, HA 离心法与柱层析法对天然和热变性 DNA 的分离效果基本相似, 未被吸附的 DNA 在 5% 左右, 说明 HA 吸附 DNA 较完全, 用 0.01 M KPB 洗涤时, 单、双链 DNA 均未被洗下。当 KPB 浓度由 0.125 M 增加至 0.25 M 时, 天然 ds DNA 方能被洗脱下来, 这是由于 ds DNA 被 HA 吸附力较强的缘故。用两种方法洗脱的 ds DNA 分别达 88.7% 和 87.6%, 结果相同; 热变性后的单链 DNA, 因 HA 对其吸附力较弱, 故用 0.125 M KPB 就可洗脱。两法洗脱单链 DNA 分别为 77.9% 和 81.2%, 结果相似。符合天然与热变性后 DNA 物理变化的规律。因此单、双链 DNA 在两种方法上的洗脱效果只依赖于洗脱液中的磷酸盐浓度, 而不受样品混悬及离心操作等的影响。结果证明 HA 离心法与柱层析法一样能有效地分离 DNA 单、双链, 平均回收均在 87% 以上。(实验重复性较好)。

(2) 淋巴细胞 DNA 的分离 将淋巴细胞 DNA 按上述方法分别经 HA 离心法和柱层析法进行吸附, 洗脱分离, 荧光检测, 结果如表 2。

表 2 HA 离心法与柱层析法分离淋巴细胞 DNA 效果的比较

(各部分洗脱液的荧光量占总荧光量的%)^{*}

Table 2 Comparison of separation DNA efficiency in lymphocyte of HA centrifugation with column chromatography

(Percentage fluorescence of every elution in total fluorescence)^{*}

名 称 Name	未被吸附 Unadsorbed	KPB 0.01 M 洗涤 Washed with 0.01 M KPB	KPB 0.125 M 洗脱 Eluted with 0.125 M KPB	KPB 0.25 M 洗脱 Eluted with 0.25 M KPB	回 收 Recovery
离 心 法 Centrifugation	1.6±0.7	5.2±0.9	10.0±1.9	88.8±1.6	96.9±2.6
柱层析法 Column chroma -tography	3.5±0.7	1.5±0.3	11.7±1.3	86.9±1.5	96.4±4.9

^{*} 表中数据为 5 个样品, 每个样品 3 个复管的平均值($\bar{x} \pm SE$)

由表 2 可见, 两种方法在分离检测细胞 DNA 的效果上也基本一致, ds DNA 分别为 $88.6 \pm 1.6\%$ 和 $86.9 \pm 1.8\%$; 洗脱单链 DNA 在 10% 左右, 这部份单链 DNA 的产生可能与碱溶胞、中和过程中的剪切力及 DNA 对碱不稳定性有关, 与文献报道一致^[2-3]。结果再次证明本法与柱层析法一样, 亦能有效地分离细胞 DNA。用两种方法从 HA 上洗脱纯 DNA 的动力学表明(未列出), 以 0.125 M 或 0.25 M 分别洗脱单或双链 DNA 各 3 次, 均可洗脱完全, 单、双链分离度较好, 平均回收都在 96% 以上。实验中所用的 HA 需选用晶体失, 完整的新近制品, 最好是同批号的, 分离效果好且较稳定; 使用去离子水可降低空白荧光量, 以提高检测灵敏度。

2. DNA 的荧光检测

分离后的单、双链 DNA 或不同数量的细胞 DNA 与 DABA 反应后的荧光强度是否与 DNA 量有相应关系, 这对应用本法检测 DNA 的灵敏度与可信性有关, 我们用不同量的小牛胸腺 DNA (48~1280 ng) 或者不同量的淋巴细胞 ($1 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$) 与 DABA 反应后进行荧光检测, 其结果是 DNA 量或细胞数与相应荧光强度均有很好的线性关系, 前者直线方程为 $\hat{Y} = 20.2905 + 60.7765 X$, 相关系数 $r = 0.9953$, 分离后的 DNA 与 DABA 反应的荧光量均落在此直线范围内; 后者直线方程为 $\hat{Y} = 24.7678 + 17.8407 X$, $r = 0.9949$, 我们所取细胞量均限制在线性范围内, 以选用 $2 \sim 4 \times 10^5$ 个细胞为宜, 这说明在严格控制条件下所使用的荧光检测 DNA 的方法是切实可行的。也可用于人类保健的各个领域, 如检测化学制剂对体内外反应敏感的组织或细胞, 亦可用于检测环境因素对 DNA 损伤的短期测试系统。

3. 大鼠外周血淋巴细胞经 γ 线不同剂量照射后, DNA 链断裂的变化

(1) 未照射淋巴细胞 DNA 经 HA 离心法吸附, 洗脱后各部分回收如下, 未被吸附的 DNA 小于 5.9%; 被 0.01 M KPB 洗下的小于 5.9%; ds DNA 大于 81.8%; 总回收大于 88.3%。与上述分离淋巴细胞结果相似, 证明 HA 离心-荧光法分离效果稳定, 重复性较好。

(2) 细胞悬液经 1~30 Gy 照射后, ds DNA% 的对数 ($\lg Y$) 随照射剂量 (X) 增加而呈线性降低, 显示 DNA 单链断裂损伤随剂量增加而呈线性增加, 有非常明显的负线性关系(图 1), 其直线方程为 $\lg Y = -0.0963 - 0.0118 X$, 相关系数 $r = 0.9891$, $p < 0.01$, 符合哺乳动物细胞 DNA

辐射损伤的规律。从图 1 还可以看到本法对不分裂细胞 DNA 单链断裂检测的灵敏度可达 1 Gy。而我们原先使用碱性蔗糖梯度离心法只能检测到 10 Gy 的损伤, 因此本法较超速离心法灵敏, 但不如后者能检测出 DNA 断裂分子的大小, 而前者操作简便, 灵敏度高, 检测样品量小, 一次能进行批量分析。

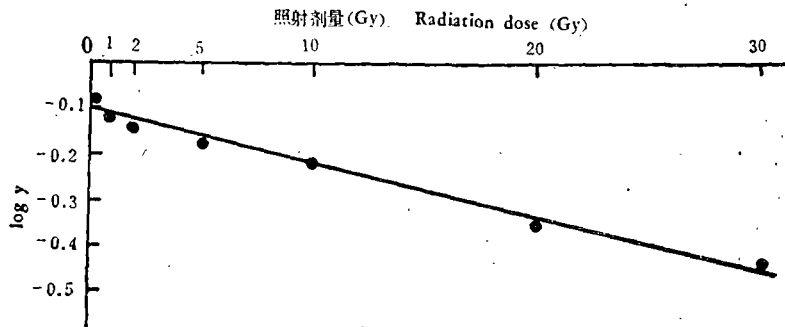


图 1 γ 线照射后鼠外周血淋巴细胞 DNA 链断裂的剂量效应曲线

Fig. 1 The dose effect curve of DNA strand breaks in peripheral blood lymphocytes of rat.

$y = \text{DNA 双链荧光强度} / \text{DNA 单、双链荧光强度之和}$

$y = \text{fluorometric intensity of DNA double-strand} / \text{the total fluorometric intensity of DNA single- and double strand}$

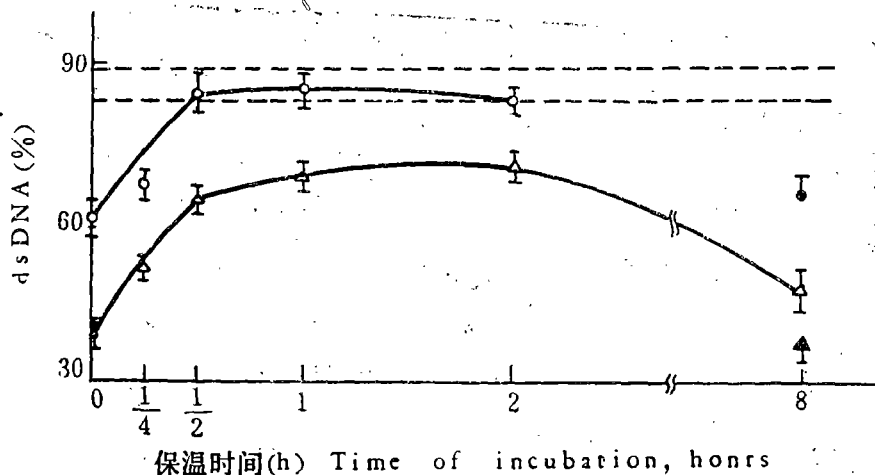


图 2 受照淋巴细胞在 37°C 保温不同时间后 ds DNA % 的变化

Fig. 2 The changes of ds DNA % in the irradiated lymphocytes after different times of incubation at 37°C.

==== 正常值 Normal value, $\triangle$ — $\triangle$ 30 Gy, $\circ$ — $\circ$ 10 Gy, $\blacktriangle$ — $\bullet$ 分别代表受照 30 Gy 和 10 Gy 细胞于 0°C 放置, 各点为 $\bar{x} \pm \text{SE}$

$\bullet$ — $\blacktriangle$ represent 10 and 30 Gy irradiated cells at 0°C respectively, every point represents $\bar{x} \pm \text{SE}$

4. 受照射细胞 DNA 损伤的修复

细胞的“1640”悬液于 0°C 经 10 或 30 Gy 照射后, 加 20% 马血清置 37°C 保温不同时间后,

ds DNA %随保温时间的延长逐渐增加(图 2), 表明 DNA 断裂链又重接起来, 而受照细胞于冰水中放置 8 小时, 仍未见有断链的重接, 说明 DNA 断链重接过程中有酶参与。由图 2 还可以看到, 受 30 Gy 照射的细胞在保温开始 30 min 前重接速度较快, 约有 76% 的断链得到重接, 其后速度变慢, 出现快慢修复的两个过程, 而 10 Gy 组照后慢修复过程不明显, 保温开始后 DNA 断链就迅速重接, 15 min 已重接 78% 左右, 至 30 min 已恢复到照前水平, 而 30 Gy 组虽保温至 2 小时仍未见完全修复, 这是由于剂量大, DNA 断裂损伤严重不易修复所致, 但实验结果明显地证明代谢活性低, 不分裂的淋巴细胞与转化淋巴细胞一样^[1], 亦能将 DNA 断链重接起来。这跟 Mcw-eilliams 等^[7]关于受照人血淋巴细胞 DNA 断链也能进行重接的报道相一致。若将 30 Gy 组继续延长保温至 8 小时, ds DNA 反而下降, 提示重接好的 DNA 链又发生断裂, 同时细胞活力亦下降, 与我们前文^[1]、Ueno^[8]及 Kanter^[9]的结果类似, 但我们将淋巴细胞在 37℃ 或 0℃ 放置 1~8 小时, 未见有细胞活力下降, 这就间接证明我们在前文^[1]提出的观点: 即重接 DNA 分子的再断裂是一种不可逆的生化变化, 它是细胞死亡的预兆。

至于何以发生 DNA 重接分子的再断裂, 这是否由于受照细胞溶酶体被破坏, DNase 释放, 活力增高所引起的, 是个值得深入探讨的问题。

参 考 文 献

- [1] 郑秀龙, 赵芳, 刘巧年, 高建国, 生物化学与生物物理学报, 15, 17 (1983).
- [2] B. Rydberg and K. J. Johanson, *Radiat. Res.*, 64, 281 (1975).
- [3] P. M. Kanter, and H. S. Schwartz, *Anal. Bioch.* 97, 77 (1979).
- [4] A. Böyum, *Scand. J. Clin and Lab. Invest.*, 21 (Suppl. 97), 77 (1968).
- [5] 郑秀龙, 丁振英, 高建国, 第二军医大学学报, 4, 131 (1983).
- [6] 郑秀龙, 赵芳, 高建国, 生物化学与生物物理进展 3, 58 (1983).
- [7] R. S. McWilliams, M. G. Cross, J. G. Kaplan and H. C. Birnboim, *Radiat. Res.*, 94, 499 (1983).
- [8] A. M. Ueno, E. M. Goldin, A. B. Cox, and J. T. Lett, *Radiat. Res.* 79, 377 (1979).
- [9] P. E. Kanter, *Int. J. Radiat. Biol.*, 38, 4 (1980).

(1984 年 3 月 19 日收到)

**STUDIES ON RADIATION- DNA DAMAGE AND ITS
REPAIR IN MAMMALIAN CELLS II.
HYDROXYAPATITE CENTRIFUGATION-FLUOROMETRIC
METHOD FOR DETECTION OF DNA STRAND BREAK AND
ITS REJOINING IN RAT BLOOD LYMPHOCYTES AFTER
 γ -RAYS IRRADIATION**

Zheng Xiulong Zhao Fang Ding Zhenying Gao Jiangguo

(The Second Military Medical College, Shanghai)

ABSTRACT A sensitive, simple and rapid hydroxyapatite centrifugation-fluorometric method for detection of DNA strand breaks and its rejoining in nondividing cells was used and modified. The circulating blood lymphocytes of rat were proved to be proficient in their ability to rejoin γ induced strand breaks at 37°C. However, incomplete repairing was observed after irradiation with dosage of 30 Gy. If incubation was continued up to 8 hours, the rejoined DNA molecules were broken again and cell-death also increased at the same time. It was confirmed that the break of rejoined DNA molecules is an irreversible biochemical change which predicts the cell-death. This suggestion has been proposed in our foregoing paper.

KEY WORDS Hydroxyapatite centrifugation-fluorometric method; Rat blood lymphocytes; DNA strand break; DNA repair; Rejoined DNA break again.