

马蔺子甲素对 γ 线照射的S-180 V肿瘤 细胞DNA单链断裂重接的抑制作用

章扬培 范国才 夏寿萱

(军事医学科学院放射医学研究所)

摘要 本文应用碱洗脱法观察了中草药马蔺子甲素对S-180 V细胞DNA损伤与修复的影响,观察到马蔺子甲素能作用于辐射敏感的靶分子DNA,抑制DNA的正常合成和链断裂后的重接修复,从而表现出放射增敏作用。在本实验条件下,马蔺子甲素在有氧和乏氧时的作用无差别。

关键词 DNA损伤与修复、DNA链断裂、辐射增敏剂、肿瘤细胞。

引 言

马蔺子甲素是我国从中草药马蔺(*Iris Pallasii* Fischer)种子中提取的一种醌类化合物(*Iris quinone*),据报道在细胞水平、整体水平及临床上都发现它有一定的放射增敏作用^[1]。我们应用改良的膜过滤碱洗脱法^[2-3]观察了它对体外培养的小鼠肿瘤细胞DNA损伤与修复的影响。

实 验 方 法

1. 细胞

小鼠腹水瘤S-180 V细胞在含10%小牛血清的Eagle培养液中生长。照射前22小时将处于指数生长期的细胞用终浓度为0.3 μ ci/ml的 ^{3} H-TdR进行放射性同位素标记。

2. 药物

5 mg马蔺子甲素用0.5 ml吐温-80或二甲基亚砷溶解,然后用Eagle培养液稀释到实验所需浓度。如有必要,通99.9%氮气5分钟以造成乏氧。药物与细胞于37℃保温2小时使其透入。

3. 照射

含药物的细胞悬液在冰浴中放置半小时后,于0~4℃用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射,剂量率为635.7 r/min。

4. 培养液中氧含量的测定

(1) 硫代硫酸钠滴定法 于通氮不同时间后,在培养液中加入硫酸锰,碱性碘化钾和浓硫酸,以淀粉为指示剂,用经重铬酸钾标定过浓度的硫代硫酸钠溶液滴定。根据硫代硫酸钠用量计算出培养液中的氧含量。

(2) 氧化还原电位测定法 以铂电极为指示电极,饱和氯化钾甘汞电极为参比电极,在高阻毫伏计或pH S-2型酸度计上测定通氮不同时间后培养液中的氧化还原电位。

5. DNA单链断裂的检测^[3]

将细胞转移至醋酸纤维素微孔滤膜上溶胞,然后用pH 12.1的四丁基氢氧化铵溶液进行变性洗脱,液闪法分别测定洗脱液中和滤膜上的 ^3H 放射性,以膜上DNA百分数作为衡量链断裂与重

接的尺度。检测链断裂后的重接修复时,先将受照射的细胞置于37℃保温30分钟后,再用膜过滤碱洗脱法检测。

6. DNA合成的检测

S-180 V细胞用0.3 μ ci/ml ^3H -TdR于37℃标记5小时。将 1×10^5 个细胞铺放在微孔滤膜上,经溶胞,EDTA Na_2 淋洗后,取出滤膜,加0.3 ml 0.44 N HCl,于70℃水解30分钟,四丁基氢氧化铵中和,然后加入闪烁液计 ^3H 放射性,以c.p.m数表示DNA的合成。

实 验 结 果

1. 通氮时间对培养液中氧含量的影响

用硫代硫酸钠滴定法及氧化还原电位测定法均测得:以0.5~0.7 kgf/cm²的压力向Eagle培养液中通99.9%的氮气5分钟后,培养液中的氧含量急剧下降到原来的2%以下,每升培养液中氧含量少于0.10 mg(即少于100 ppm),尔后随通氮时间继续延长,培养液中氧含量变化不大。可以认为通氮5分钟已造成乏氧条件。

2. 通氮对细胞活存的影响

用1%Trypan Blue或0.0015% Janus Green B染色及用1.8%(w/v)琼脂-Eagle固体培养基培养等方法均证明通氮5分钟不会引起细胞的死亡,见表1。但通氮时间过长(大于1小时)或通氮压力过大(大于1.0 kgf/cm²)都会造成细胞的死亡,带来实验误差。

表1 几种不同方法观察通氮对细胞活存的影响
Table 1. The effect of nitrogen on cell survival examined by different methods

方 法 (method)	活细胞数, % (Percentage of living cells)	
	通 N_2 前 (Before passing N_2)	通 N_2 后 (after passing N_2)
1%台盼蓝 (1% Trypan Blue)	99	100
0.0015%詹纳斯绿 (0.0015% Janus Green)	100	100
固体培养基培养 (Solid medium)	95	95

表中数字为3次实验的平均值,每次计数250个细胞

4. S-180 V细胞DNA单链断裂与重接修复

实验观察到随着照射剂量的增加,S-180 V细胞DNA单链断裂逐渐增加。照射剂量与膜上DNA残留百分数的对数之间呈线性关系,图1。

在正常情况下(空气组),S-180 V细胞经10 Gy γ 线照射后,膜上DNA残留百分数为 $34.85 \pm 1.35\%$;通氮乏氧下经10 Gy照射为 $35.56 \pm 1.64\%$,说明空气中照射和乏氧下照射,DNA单链断裂的程度基本相似。照后于37℃保温30分钟,空气组膜上DNA残留百分数上升到 $83.40 \pm 2.63\%$,乏氧组上升到 $55.91 \pm 2.54\%$,说明受相同剂量照射后S-180 V细胞空气组DNA单链断裂重接修复的速度大于乏氧组,见表3。

3. 马蔺子甲素对 ^3H -TdR掺入DNA的影响

实验观察到随着马蔺子甲素浓度的增加, ^3H -TdR掺入DNA的量逐渐降低。药物浓度为2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 $\mu\text{g/ml}$ 时,掺入率分别是对照组的50.62、18.06、4.39、2.59、2.10%,提示马蔺子甲素可以抑制细胞正常的DNA合成,见表2。

表2 马蔺子甲素对 ^3H -TdR掺入DNA的影响
Table 2. The effect of Irisquinone on ^3H -TdR incorporation into DNA

浓度($\mu\text{g/ml}$) (concentration)	计数/分 (C.P.M)
0	12948
2.5	6554
5.0	2338
10.0	569
15.0	335
20.0	272

细胞数 1×10^5 , ^3H -TdR 0.3 $\mu\text{ci/ml}$, 37℃
标记5小时3次实验平均值

5. 马蔺子甲素对 S-180V 细胞 DNA 单链断裂与重接修复的影响

实验观察到当马蔺子甲素浓度为 5 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 药物本身在不照射情况下, 可以造成部分 DNA 的单链断裂。在有氧和乏氧条件下经 10 Gy 照射, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加药组膜上 DNA 残留百分数分别为 $35.34 \pm 2.29\%$ (空气), $34.52 \pm 3.59\%$ (乏氧); 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组分别为 $35.47 \pm 2.06\%$ (空气), $33.02 \pm 1.31\%$ (乏氧), 均与不含药物的照射对照组无统计意义上的差别, 说明马蔺子甲素没有增加 γ 线造成的 DNA 单链断裂的产量 (见表 3)。

照后 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 分钟, 马蔺子甲素 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 照后保温组的膜上 DNA 残留百分数为 $51.99 \pm 3.33\%$ (空气) 和 $42.22 \pm 2.98\%$ (乏氧); 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 照后保温组为 $31.49 \pm 2.36\%$ (空气) 和 $32.50 \pm 1.64\%$ (乏氧), 均比相应对照组的 $83.40 \pm 2.63\%$ (空气) 和 $55.91 \pm 2.54\%$ (乏氧) 明显降低, 提示马蔺子甲素在有氧和乏氧条件下都能抑制 DNA 单链断裂的重接修复。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 马蔺子甲素的抑制作用要比 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 明显。(见表 3)

表 3 马蔺子甲素对 S-180V 细胞 DNA 单链断裂及重接修复的影响

Table 3 The effect of Irisquinone on DNA Single Strand Breaks and Their Rejoining of S-180V cells

浓 度 (concentration) ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	单 加 药 (Irisquinone only)		药物 + 10 Gy (Irisquinone + 10 Gy)		药物 + 10 Gy + 照后保温 (Irisquinone + 10Gy + Incubation)	
	空 气 (air)	乏 氧 (Hypoxia)	空 气 (air)	乏 氧 (Hypoxia)	空 气 (air)	乏 氧 (Hypoxia)
0	90.51 $\pm 1.81(7)$	84.30 $\pm 1.59(6)$	34.85 $\pm 1.35(14)$	35.56 $\pm 1.64(6)$	83.40 $\pm 2.63(11)$	55.91 $\pm 2.54(8)$
5	73.22*** $\pm 4.15(6)$	75.84** $\pm 2.28(6)$	35.34* $\pm 2.29(6)$	34.52* $\pm 3.59(6)$	51.99*** $\pm 3.33(7)$	42.22*** $\pm 2.98(6)$
10	55.29*** $\pm 2.13(6)$	48.09*** $\pm 2.85(6)$	35.47* $\pm 2.06(7)$	33.02* $\pm 1.31(11)$	31.49*** $\pm 2.36(7)$	32.50*** $\pm 1.64(11)$
20	2.54*** $\pm 0.76(6)$	3.86*** (3)	3.92(3)	5.94(3)	3.99(3)	3.74(3)

*** $P \leq 0.001$ ** $0.05 \geq P > 0.01$

由表 3 可见当马蔺子甲素的浓度增加 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 药物造成大量细胞死亡。膜上 DNA 残留百分数骤减, 在此浓度条件下已无法判断马蔺子甲素的放射增敏作用。

讨 论

(1) 在射线或酶的作用下, 醌可被还原成半醌自由基, 半醌自由基与氧反应, 又可形成超氧化物阴离子自由基^[4]:

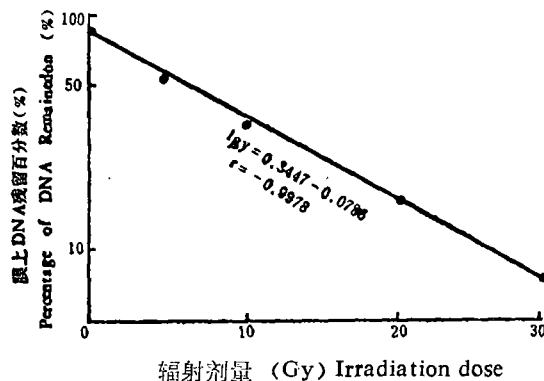
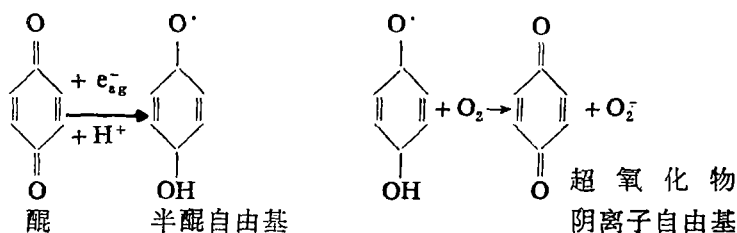
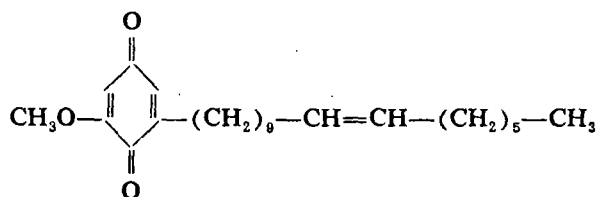


图 1 S-180V 细胞 DNA 单链断裂剂量曲线
Fig.1 The Dose Curve of DNA Single Strand Breaks of S-180V Cells

半醌自由基在有氧和乏氧状态下都能形成, 而超氧化物自由基则必须在有氧下形成。这两种自由基通过破坏 DNA 大分子或细胞内的酶系统而使细胞损伤。马蔺子甲素含有醌式结构^[5]



它在射线的作用下有可能同样生成半醌自由基和超氧化物阴离子自由基, 它们可能抑制了 DNA 合成的酶系统, 从而抑制了 DNA 合成和 DNA 链断裂后的酶促修复作用。

(2) 使用辐射增敏剂要特别注意其毒付作用, 实验表明当马蔺子甲素的浓度超过 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 药物的细胞毒作用已非常明显。而 misonidazole 在 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时则不然^[6]。因此临床上使用马蔺子甲素时应考虑其毒性影响。

参 考 文 献

- [1] 王士贤、刘若庸、李德华、李维廉, 天津医药, 5, 300(1981).
- [2] K. W. Kohn, L. C. Erickson, R. A. G. Enig, C. A. Friedman, Biochem., 15, 4629(1976).
- [3] 章扬培、徐惠英、夏寿萱, 中华放射医学与防护杂志, 3, 3(1983).
- [4] N. R. Bachur, M. V. Gee, R. O. Frvedman, Cancer. Res., 42, 1078(1982).
- [5] 吴寿全、杨企铮, 化学学报, 38, 156 (1980)
- [6] 章扬培、范国才、夏寿萱, 中华放射医学与防护杂志, 4, 9(1984).

(1984 年 11 月 19 日收到)

THE INHIBITION OF γ -RAY INDUCED DNA SINGLE STRAND BREAK REJOINING IN S-180V TUMOR CELLS BY RADIO- SENSITIZER IRISQUINONE

Zhang Yangpei Fan Guocai Xia Shouxuan

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT It is reported that Irisquinone, an active component from Chinese herb *Iris pallasii* Fischer, could modify the radiosensitivity of the tumor cells in cancer radiotherapy. By means of alkaline elution method modified in our laboratory, the effect of Irisquinone on γ -ray induced DNA single strand breaks and their rejoining in S-180V cells was studied. The results showed that this compound could inhibit both the processes of normal DNA synthesis and the rejoining of DNA single strand breaks. There was no significant difference between the effects under aerobic and hypoxic conditions.

KEY WORDS DNA damage; DNA repair; DNA strand break; radiosensitizer; tumor cells.