

DNA 解旋荧光分析法及其在细胞 DNA 辐射损伤和修复研究中的应用

张 鹏 郑秀龙

(第二军医大学, 上海)

摘要 本文改进和建立了能用于分析分裂和不分裂细胞 DNA 链断裂损伤的 DNA 解旋荧光分析法。对其中某些影响因素也作了一定的探讨。并观察了氧对辐射诱发哺乳动物细胞 DNA 链断裂损伤及重接修复的影响。结果表明: 细胞 DNA 链断裂损伤程度与剂量呈线性关系。小鼠腹水型淋巴性白血病 L₇₇₁₂ 细胞的氧增强比值为 3.0。3 T 3 细胞的氧增强比随照射条件不同为 1.01 和 1.37。乏氧条件受照的 3 T 3 细胞在有氧条件下 37℃ 保温, 比有氧受照细胞的 DNA 链断裂重接快且完全。照后持续乏氧保温可抑制乏氧受照细胞的 DNA 链断裂重接。再氧合可促进 DNA 链断裂重接过程。

关键词 DNA 解旋荧光分析法, DNA 链断裂, DNA 修复, 氧效应

引 言

近年发展起来的 DNA 解旋荧光分析(FADU 法^[1~3])具有操作简便、快速且灵敏度高优点, 无需放射性同位素标记及 DNA 单、双链分离等步骤, 能用于分析分裂或不分裂细胞 DNA 链断裂。其主要原理是根据 DNA 分子在碱性溶液内解旋速度与 DNA 链断裂数成正比, 残留的双链 DNA (dsDNA) 与溴化乙锭(EB)结合后经光激发可产生荧光, 通过测定相对荧光强度即可反映残留 dsDNA 的变化。我们根据 Birnboim^[1]及 Thierry^[3]等人报道的方法, 结合本实验室条件改进和建立了 FADU 法, 并应用于观察氧对辐射诱发细胞 DNA 链断裂及其重接的影响。

材料与 方法

(1) 试剂 溶液 I: 0.83% NH₄Cl 与 1.03% Tris-HCl 溶液用前按 9:1 混合(v/v)。溶液 II: 137 mmol·dm⁻³ NaCl, 5 mmol·dm⁻³ KCl, 0.8 mmol·dm⁻³ MgSO₄, 8.5 mmol·dm⁻³ Na₂HPO₄ 和 5 mmol·dm⁻³ 葡萄糖, pH 为 7.4。溶液 III: 4.5 mol·dm⁻³ 尿素, 10 mmol·dm⁻³ NaOH, 2.5 mmol·dm⁻³ 环己二胺四乙酸及 0.1% SDS。溶液 IV: 含 0.2 mol·dm⁻³ NaOH 的溶液 III。溶液 V: 1 mol·dm⁻³ 的葡萄糖及 14 mmol·dm⁻³ 的巯基乙醇。溶液 VI: 1.3 μg/ml 的 EB 及 13.3 mmol·dm⁻³ NaOH。

(2) 细胞 小鼠腹水型淋巴性白血病 L₇₇₁₂ 细胞由 615 纯种小鼠腹腔内接种传代。接种 5~7 d 后抽取腹水^[4]。0.5~2.0 ml 腹水加入 10 ml 溶液 I 在 4℃ 作用 10 min, 然后离心 1000 rpm, 倾去上清, 再用生理盐水洗涤离心后, 将细胞悬浮于溶液 II 内。细胞浓度为 1~2 × 10⁶/ml, 置冰水浴内备用。

3 T 3 细胞于 DMEM 培养液(含 20 小牛血清)中, 在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养贴壁生长, 2~3 天传代一次。将培养液倾去后, 以溶液 II 将细胞冲洗数次后再把细胞冲下, 制成 5~10 × 10⁵

个/ml 的细胞悬液, 置冰水浴中备用。

(3) 乏氧条件 将 2~3 ml 的细胞悬液置于 25 ml 的培养瓶内, 橡皮帽封口后经插入两枚 16° 注射针头通入纯度大于 99.99% 的氮气, 持续 45 min 以上。每次实验通氮气条件均保持一致。

(4) 照射条件 照射时, 3 T 3 细胞分别以细胞悬液或在含有 25 mmol·dm⁻³ Hepes 培养液内呈贴壁状态进行照射。

(5) DNA 链断裂损伤检测 根据 Birnboim^[1]和 Thierry^[3]等人发表的 FADU 方法, 结合本室条件进行了某些改进。

每一剂量点设 T、P 及 B 三组管, 每组 3~4 个平行管。根据以往工作^[6], 为了适合于使用 CSF-1 A 型超声波清洗机对细胞 DNA 的超声剪切, 我们选用了平底塑料试管。每管内加细胞悬液及溶液 III 各 0.2 ml, 在冰水浴内置 10 min, 使细胞溶破及染色质(体)解聚。然后将 T、P 和 B 三组分别按下列步骤操作。

P 组: 轻轻加入溶液 IV 0.2 ml, 在冰水浴内作用 30 min, 使 DNA 发生部分解旋。若检测小剂量范围(0.5—3.0 Gy)所产生的 DNA 链断裂时; 则将样品再置入 15℃ 水浴中继续作用 60 min。在此操作过程中需注意避光和尽量不摇动样品, 以免对 DNA 造成机械剪切损伤。加入溶液 V 终止解旋, 经超声(250 mA)15 s 混匀后, 再放入冰水浴内, 加溶液 VI 1.5 ml。4~10℃ 条件下于暗处保存。

T 组: 先加溶液 V, 再加溶液 IV, 余操作同 P 组, DNA 未发生解旋。

B 组: 加入溶液 IV 0.2 ml 后进行超声剪切(300 mA)1.5 min, 在室温下放置 45 min, 使 DNA 分子全部解旋。再依次加溶液 V 和 VI, 混匀, 然后用 HITACHI M 850 型荧光分光光度计, 以 525 nm 为激发光, 600 nm 为发射光, 测量相对荧光强度。

(6) 计算 由 T、P 和 B 管分别测得相对荧光强度 T、P 和 B 后, 按式(1)计算残留双链 DNA 百分比(dsDNA%)。

$$\text{残留 dsDNA \% (D)} = (P - B) / (T - B) \times 100\% \quad (1)$$

亦可按照 Birnboim 等提出的式(2)计算 Q_D 值:

$$Q_D = 100 \times (\lg D_0 - \lg D_i) \quad (2)$$

D₀ 和 D_i 分别代表细胞受照前后的残留 dsDNA %。

上述残留 dsDNA %(D) 或 Q_D 值均可表示 DNA 损伤程度, 由于 Q_D 值与受照剂量之间具有较好的线性关系, 故我们以 Q_D 值作为衡量 DNA 损伤与修复的指标。

结果与讨论

1. ⁶⁰Co γ 线照后 L₇₇₁₂ 细胞与 3 T 3 细胞 DNA 链断裂的剂量效应关系

由图 1 可见细胞悬液受 γ 线照射后, 残留 dsDNA 均随剂量的增加而减少。Q_D 值与剂量之间有良好的线性关系。L₇₇₁₂ 细胞及 3 T 3 细胞的剂量效应曲线的相关系数(r) 分别为 0.9957 和 0.9920, 相关显著。

在一定范围内, 细胞浓度(L₇₇₁₂ 细胞 1~2×10⁶/ml, 3 T 3 细胞 5~10×10⁵/ml) 对实试结果无明显影响(图 2)。

样品的相对荧光强度是比较稳定的, 隔天及一周后测定结果基本相同。

通过延长 DNA 解旋时间及提高水浴温度(加溶液 IV 后先置冰水浴 30 min, 再置 15℃ 水浴 60 min), 可较敏感地检测到 0.5 Gy 照射所致 DNA 链断裂损伤(图 3), 相关系数为 0.9998。

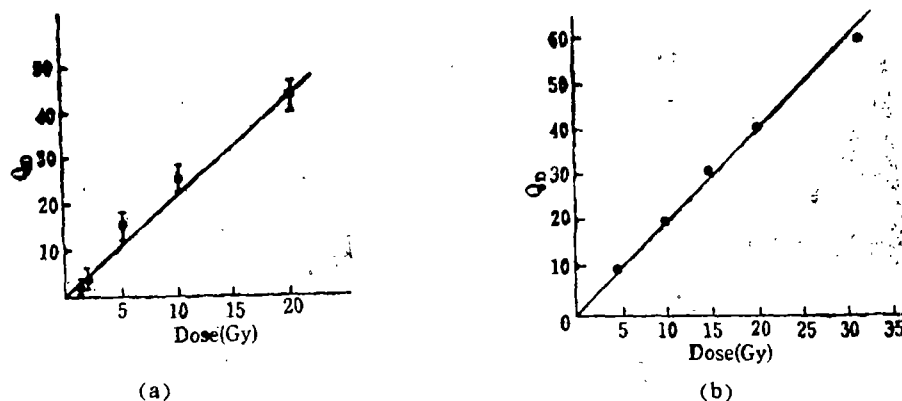


Fig 1. Dose-response curve of DNA strand breaks in γ -irradiated 3T3 cells (a) and L7712 cells suspensions.*

* Each point represents the mean $\pm$ SD of quadruplicate determination in 2-3 experiments.

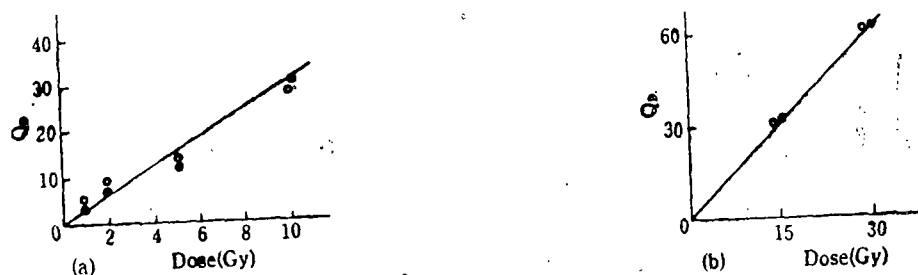


Fig 2. Effects of cell concentrations on the Q_D values related to irradiation doses.

(a) 3T3 cells: $\circ$ 5×10^5 cells/ml, $\bullet$ 10^6 cells/ml.

(b) L7712 cells: $\bullet$ 10^6 cells/ml, $\circ$ 2×10^6 cells/ml.

Each point represents the mean $\pm$ SD of quadruplicate determinations in 2-3 experiments.

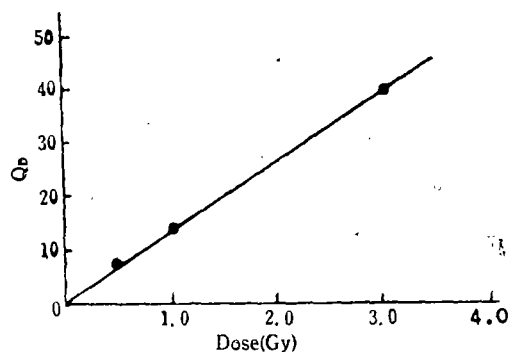


Fig 3. Dose-response curves of DNA strand breaks in γ -irradiated 3T3 cells suspension. Each point represents the mean $\pm$ SD of quadruplicate determinations in 2-3 experiments.

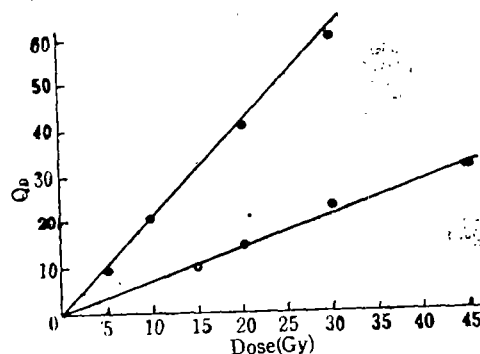


Fig 4. Effect of γ -irradiation on the Q_D values of L7712 cells in air ($\bullet$) or N_2 ($\circ$). Each point represents the mean $\pm$ SD of quadruplicate determinations in 2-3 experiments.

2. 氧对辐射诱发细胞 DNA 链断裂的影响

(1) L7712 细胞 DNA 链断裂的氧增强比(OER) 将 L7712 细胞 悬浮于 等张 溶液 II 内, 予通纯氮造成乏氧条件。在空气及氮气中, DNA 链断裂程度均与剂量成正比。在空气中剂量 效应曲

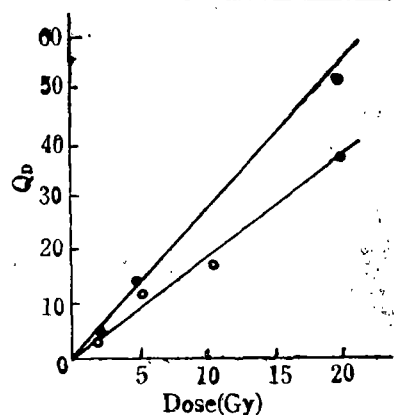


Fig 5. Effect of oxygen on the induction of DNA strand breaks in irradiated 3T3 cells suspension.

● in air, ○ in N₂.

Each point represents the mean $\pm$ SD of quadruplicate determinations in 2-3 experiments.

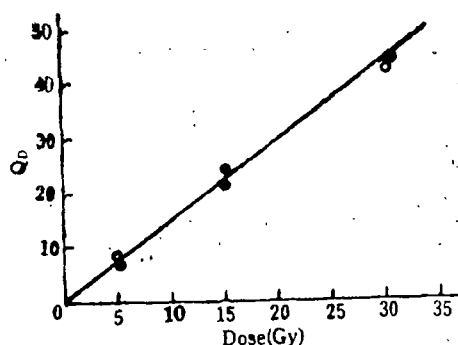


Fig 6. Effect of γ -irradiation on the Q_D values of cultured 3T3 cells in air

(●) or N₂ (○).

Each point represents the mean $\pm$ SD of quadruplicate determinations in 2-3 experiments.

线回归方程是: $Q_D = 2.0429X + 1.4286$, X 代表剂量, $r = 0.9957$ 。在氮气中, $Q_D = 0.6779X + 0.4867$, $r = 0.9962$ 。由两条曲线斜率相比得 L_{7712} 细胞 OER 值为 3.0 (见图 4), 说明氧可增加电离辐射对细胞 DNA 的损伤作用, 这与大多数学者的报道相符。刘楠等^[6]曾应用羟磷灰石离心法得出 L_{7712} 细胞的 OER 值为 3.09, 这与本文结果基本一致, 说明 FADU 法所得出的结果基本上是可信的。

(2) 3T3 细胞 DNA 链断裂的 OER 值 将 3T3 细胞悬浮于溶液 II 内通氮乏氧或空气中照射所得剂量效应曲线的回归方程为 $Q_D = 2.536X + 0.632$, $r = 0.9988$ 。氮气中照射为 $Q_D = 1.848X + 0.9067$, $r = 0.9970$ 。其 OER 值为 1.37 (图 5)。这与上述 L_{7712} 细胞及文献报道的多数细胞 OER 值为 3.0 左右不同。

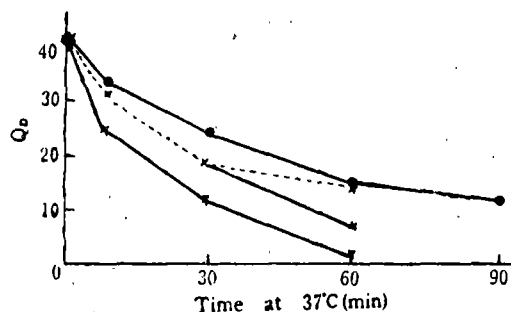


Fig 7. Rejoining of DNA strand breaks in cultured 3T3 cells incubated at 37°C under oxia (—) or hypoxic (---) condition, after 30 Gy irradiation in air (●) or in N₂ (×).

Each point represents the mean $\pm$ SD of quadruplicate determinations in 2-3 experiments.

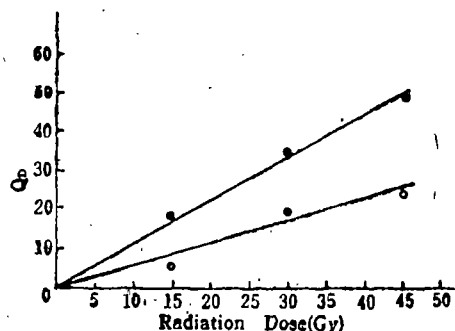


Fig 8. DNA strand breaks induced in 3T3 cells treated with 1m mol·dm⁻³ DTT by γ -irradiation in air (●) or in N₂ (○).

Each point represents the mean $\pm$ SD of quadruplicate determinations in 2-3 experiments.

若将 3T3 细胞在含 20% 新生小牛血清及 25 mmol·dm⁻³ Hepes 的 DMEM 培养基内呈贴壁生长状态受照后, 再制备成细胞悬液, DNA 链断裂检测结果表明两条曲线基本重合 (见图 6)。空

气中, $Q_D = 1.386X + 0.7619$, $r = 0.9997$; 氮气中, $Q_D = 1.371X + 1.357$, $r = 0.9932$, 所得 OER 值 1.01 则与 L_{7712} 细胞不同。

上述结果表明 3T3 细胞与 L_{7712} 细胞之间 DNA 链断裂的 OER 值相差很大, 其原因目前尚不清楚, 有待于进一步探讨, 这也许将有助于对氧效应机理的了解。同时可以看出细胞悬液和贴壁细胞辐射剂量效应曲线的斜率在空气中分别为 2.576 和 1.386; 在氮气中分别为 1.848 和 1.371。因此, 在相同条件下, 两种状态的剂量效应曲线的斜率相差 1.3~1.9 倍, 结果提示细胞悬液状态受照产生的 DNA 链断裂较贴壁状态时为多, 这可能与后者培养液中某些成份有保护作用有关。

3. 氧对 3T3 细胞 DNA 断链重接修复的影响

细胞在含 $25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Hepes 的 DMEM 培养液内贴壁生长, 于对数期在冰水浴中照射 30 Gy, 于 37℃ 保温不同时间后, 测定残留 dsDNA%。结果表明 30 Gy 照后, DNA 断链随保温时间延长而减少, 说明断裂发生了重接, 大致经过快、慢两个过程(图 7)。3T3 细胞与其它细胞不同: 于 0℃ 在有氧和乏氧条件下照射所产生的初始 DNA 断裂数相同, 但在有氧条件下, 乏氧受照射所产生的 DNA 断链重接快且较完全, 若以照前细胞残留 dsDNA% 为 100%, 分别计算保温不同时间后, DNA 的相对残留百分数, 则于 60 min 后仅有 3% 左右的 DNA 断链尚未重接。空气中受照细胞在有氧保温 60 min 后, 则有 30% 左右的断链未重接; 乏氧受照后继续乏氧保温 60 min 的细胞 DNA 断链重接率与空气中受照后并在空气中保温条件下的重接率相近, 即也为 30% 左右; 乏氧保温 30 min 后再于空气中保温 30 min, 仅有 15% 左右的断链未重接。

上述结果说明照射过程中氧并不影响 3T3 细胞 DNA 链断裂的数量, 但有氧和乏氧照射所产生的链断裂性质可能不同, 乏氧受照细胞 DNA 链断裂易于修复, 再氧合可促进 DNA 修复, 缺氧可显著地抑制 DNA 修复。这些结果与氧对细胞活存的效应相一致, 即氧可增强电离辐射对细胞的杀伤作用, 又促进亚致死损伤的修复。细胞活存的 OER 可能受 DNA 修复的影响。上述结果与 Edgren 等^[7]报道的谷胱甘肽(GSH)合成酶缺陷型人成纤维细胞株结果相似。氧效应与细胞核内巯基化合物含量成正相关^[8], 机体内最主要的巯基化合物为 GSH, GSH 合成酶缺陷细胞的 OER 值均较低, 但 3T3 细胞是否属 GSH 合成酶缺陷型细胞尚未见报道。

4. 二硫代苏木糖醇(DTT)对 ^{60}Co γ 线诱发 3T3 细胞 DNA 链断裂氧效应的影响

为了探讨 3T3 细胞是否有 GSH 缺陷反应, 又采用了加 DTT 作了下述试验, 处于对数生长期的 3T3 细胞经换入含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DTT 及 $25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Hepes 和 20% 新生小牛血清的 DMEM 培养基后继续培养 30 min, 然后按前述方法在冰水浴中通氮及照射。照后制备细胞悬液并测定其 DNA 链断裂损伤, 观察加入外源性巯基化合物 DTT 后对其 DNA 链断裂及其 OER 有无影响。图 8 结果表明, 在有氧条件下, 经 DTT 处理后 3T3 细胞的剂量效应曲线: $Q_D = 1.097X + 0.910$; 而在乏氧条件下, DTT 处理后的 3T3 细胞的 $Q_D = 0.588X - 0.981$, 则得出 OER 值为 1.9 左右。与图 6 结果比较表明, DTT 可减少 γ 线诱导 3T3 细胞 DNA 链断裂损伤。在空气条件下 $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ DTT 的剂量减低系数(DMF)为 $1.386/1.097 \approx 1.26$; 在乏氧条件下的 $\text{DMF} = 1.371/0.588 \approx 2.33$ 。DTT 对乏氧条件下受照 3T3 细胞 DNA 的保护作用明显高于有氧照射时的保护作用, 因而使 OER 值升高。说明氧效应与细胞内的巯基化合物有关。这与 Edgren^[8]应用谷胱甘肽合成酶缺陷的人成纤维细胞株所得结论一致。故我们初步认为 3T3 细胞的谷胱甘肽合成酶可能有缺陷。

上述结果表明: 我们结合本室实验条件, 除应用以往已用过 CSF-1 A 型超声波清洗机代替

Birnboim 等所用的探针式超声波仪对 DNA 进行超声剪切外, 经多次摸索, 我们将 Birnboim 等配制、操作较麻烦的解旋溶胞液作了改进, 细胞 DNA 解旋时, 只要一次加入 0.2 ml 溶液 IV 即可, 操作简便, 易于掌握且重复性好。应用本法测定 L₇₇₁₂ 细胞的 OER 值与用经磷灰后离心法测得结果相似^[6]; 而应用本法测得 3T3 细胞的 OER 值很低只有 1.37, 若在培液中外加 DTT 则 OER 值可提高到 1.9, 这些结果与 Edgren 用 GSH 合成酶缺陷型细胞实验结果一致。因此, 初步认为 3T3 细胞有可能也属这一类型的细胞, 当然有待更多的工作来证明。以上结果说明我们改进和建立的 FADU 法是可行的, 但在操作中必须严格仔细。还可较敏感地检测其它理化因子对各种组织细胞 DNA 的损伤效应^[9]。

参 考 文 献

- [1] H. C. Birnboim and J. Jevcak. *Cancer Res.*, 41, 1889-1992, (1981).
- [2] R. S. McWilliams, W. G. Cross, J. G. Kaplan and H. C. Birnboim, *Radiat. Res.*, 94, 499-507 (1983).
- [3] D. Thierry, O. Rigaud, I. Duranton, E. Moustacchi and H. Magdelenat, *Radiat. Res.*, 102, 347-358 (1985).
- [4] 郑升, 孟德鸣, 张永基, 陈黎明, 杨金龙, 潘瑞彭, 肿瘤, 1, 6 (1982).
- [5] 郑秀龙, 丁振英, 高建国, 第二军医大学学报, 4(2), 131 (1983).
- [6] 刘楠, 郑秀龙, 中国药理学报, 6(3), 209 (1985).
- [7] M. Edgren, A. Larsson and L. Revesz, *Int. J. Radiat. Biol.*, 40, 355-363 (1981).
- [8] M. Edgren, *Proceedings of the 8th International Congress of Radiation Research, Edinburgh*, vol. 2, edited by E. M. Fielden et al., pp. 683-688, 1987.
- [9] J. R. McLean, R. S. McWilliams, J. G. Kaplan and H. C. Birnboim, In "Progress in Mutation Research". Vol. 3 (K. C. Bora et al, Eds.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 137-141. 1982.

(稿件收到日期: 1988 年 5 月 16 日)

FLUOROMETRIC ANALYSIS OF DNA UNWINDING METHOD AND ITS APPLICATION IN THE STUDIES OF DNA DAMAGE AND ITS REPAIR

Zhang Peng and Zheng Xiulong

(Second Military Medical College, Shanghai)

ABSTRACT In this paper we described a modified fluorometric analysis of DNA unwinding method for the detection of DNA strand breaks in cells. Some factors which might influence the results were also investigated, and the effect of oxygen on the induction of DNA strand breaks and its repair in γ -irradiated mammalian cells was observed. It was shown that a liner relationship existed between the dose and the extent of DNA damage. OER of L₇₇₁₂ cells was 3.0, while OER of 3T3 cells were 1.37 and 1.01 under two different irradiation conditions. The differences between them were an interested and significant question. Incubated at 37°C under oxic condition, the hypoxically irradiated 3T3 cells rejoined their strand breaks more rapidly and efficiently than the oxicly irradiated cells did. Post-irradiation hypoxia could inhibit the rejoining of strand breaks in the hypoxically irradiated 3T3 cells.

KEY WORDS Fluorometric analysis of DNA unwinding, Oxygen effect, DNA strand breaks and its rejoining