

双标记碱性洗脱法研究电离辐射引起的 细胞 DNA 单链断裂与修复

何介薇

Michael A Bender

(上海医科大学放射医学研究所)

(Brookhaven National Lab, Long Island, New York)

摘要 本文应用双标记碱性洗脱法对 X 射线照射引起的正常人纤维细胞、毛细血管扩张性共济失调症(AT)纤维细胞、AT 肿瘤突变细胞 DNA 单链断裂及重接修复进行了研究。结果提示 10 Gy X 射线照射对三种不同类型纤维细胞 DNA 的单链断裂与各自的不照射对照组比较有显著差别。而三种不同细胞株之间比较则无明显差别。细胞接受 10 Gy X 射线照射后在 37℃ 孵育箱中孵育 15、30 和 60 min 可见三种细胞株 DNA 单链断裂都能立即进行重接修复, 60 min 内大部分已重接, 细胞在 10 Gy 照射后加 5×10^{-4} mol/L aphidicolin/皿抑制聚合酶 α , 经 37℃ 孵育 60 min 也有一定程度的修复。

关键词 电离辐射, ^3H 、 ^{14}C 双标记碱性洗脱, DNA 单链断裂与修复

众所周知, DNA 损伤与细胞死亡之间有着密切的关系。电离辐射引起细胞的损伤在一定程度上能进行修复。测定辐射引起细胞 DNA 单链断裂及其修复能力, 有助于认识辐射对细胞的损伤修复机理。本文选用正常人纤维细胞、毛细血管扩张性共济失调症(AT)细胞及 AT 肿瘤突变株细胞, 观察它们受辐照后 DNA 单链断裂及其修复程度, 以进一步了解辐射对正常细胞、辐射敏感细胞及肿瘤突变细胞 DNA 单链断裂重接修复的情况。

材 料 和 方 法

1. 细胞及其处理

正常人纤维细胞(1066 T)、毛细血管扩张性共济失调症纤维细胞(2052 AT)和 AT 肿瘤突变株细胞(GM 3396 Het), 培养在 Eagle's MEM α (Gibco)培养液中, 加 56℃ 加热的 10% 灭活胎牛血清、青霉素和链霉素。在 37℃ 7% CO_2 孵育箱中培养, 每培养皿(Φ 60 mm)种植 2.5×10^5 细胞。实验所用的细胞都为 8 至 18 代。为避免可见光对 DNA 链断裂的影响, 所有实验操作都在黄灯条件下进行。

细胞标记 DNA, 分别在每皿中加入 $(1.85 - 3.7) \times 10^3 \text{ Bq/ml}$ [$2\text{-}^{14}\text{C}$]胸腺嘧啶核苷培养液(New England Nuclear)或 $1.11 \times 10^4 \text{ Bq/ml}$ [甲基- ^3H]胸腺嘧啶核苷(培养液 Amersham), 7% CO_2 孵育箱中 37℃ 培养 72 h。细胞在照射前用冷磷酸缓冲液洗三次。

为观察 37℃ 孵育不同时间对细胞 DNA 单链断裂修复的影响, 在照射后即刻分别将 ^3H -TdR 标记和 ^{14}C -TdR 标记的细胞放置在 7% CO_2 孵育箱中 37℃ 孵育 15、30、60 min, 然后作碱性洗脱法。

于 10 Gy X 射线照射后, 即刻在 ^3H -TdR 标记的细胞培养皿内, 加入 5×10^{-4} mol/L aphidicolin (APC, Sigma), 并以加入等量的其溶解液 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma)作为对照, 立即在 37℃、7% CO_2 孵育箱中孵育 60 min。然后作碱性洗脱法观察 APC 对辐照细胞 DNA 单链断裂修

复的影响。

2. 照射条件

用 General Electric Maxitron X 线机, 250 kV, 30 mA, 滤片为 1.0mm Al 加 0.5 mm Cu, 剂量率为 0.9 Gy/min, ^{14}C -TdR 标记的细胞照射 3 Gy, 作为内标对照。然后对所有的培养皿包括 ^3H -TdR 标记的细胞照射 10 Gy。

3. DNA 单链断裂的测定

用改良 Kohn 碱性洗脱法进行 DNA 单链断裂的测定。在塑料过滤器中安装一张直径 25 mm、孔径 2 μm 滤膜(polycarbonate Nuclepore Corp), 上方接一个 50 ml 塑料注射器, 成为一个洗脱器, 下方连接蠕动泵, 由泵输出到收集管。加样前滤膜上下的空间要用 PBS 填满, 不含气泡。取 ^{14}C 和 ^3H 标记的细胞悬液以 10—15 倍的 EDTA-磷酸缓冲液稀释, 注入洗脱器, 让膜上方的液体自然流过, 液面降到膜的水平上, 使细胞停留在膜上。然后细胞以 2 ml 蛋白酶 K 1 mg/样品(Sigma)、溶胞液(2% SDS、0.02 mol/L EDTA Na_2 , 0.1 mol/L 甘氨酸)胞溶 1 h, 自然过滤膜, 以 3 ml 0.02 mol/L EDTA Na_2 , pH 10 淋洗。然后加入 15 ml 洗脱液(0.02 mol/L EDTA Na_2 , 2% 氢氧化四丙铵 tetrapropylammonium hydroxide, 0.1% SDS, pH 12.1)洗脱, 通过蠕动泵使洗脱速率为 0.02 ml/min, 每隔 50 min 收集 1 管, 连续收集 15 h 左右。洗脱结束后, 将滤膜取出, 加 1.0 ml 0.4 mol/L NaOH, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中保温 1 h, 烘干后, 加 Aquasol II (New England, Nuclear) 测定膜上残留的 DNA 量。在收集的各管洗脱液中加 5 ml Aquasol II 分别作 ^3H 、 ^{14}C 的液体闪烁计数(Beckman LS 7800)。并分别计算出各份洗脱液的闪烁计数占总计数的百分数。以各份洗脱液残留在膜上的 ^3H 计数占总计数的百分数为纵座标; 以各管洗脱液残留在膜上的 ^{14}C 占总计数的百分数为横座标, 在双对数纸上作图。膜上残留量所占比例数的下降和回升分别反映 DNA 单链断裂和重接修复的程度。

各细胞株及各组实验均重复进行两次或两次以上, 取平均值作图。

结 果

1. 10 GyX 射线照射对三种不同类型纤维细胞单链断裂与各自对照组相比较有显著差别, 而三种不同细胞株在接受 10 GyX 线照射后, 其 DNA 单链断裂程度相似(见图 1)。

2. 三种不同细胞在接受 10 GyX 射线照射后, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中分别孵育 15、30、60 min, 可见不同细胞株 DNA 的单链断裂都能立即进行重接修复。它的修复程度随孵育时间的延长而增强。孵育 30 min 后修复缓慢。在孵育 60 min 时大部分 DNA 断裂单链已重接。三种不同细胞的 DNA 单链断裂的修复趋势相似(见图 2)。

3. 三种不同细胞接受 10 GyX 射线照射后即刻加入 5×10^{-4} mol/L APC, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育 60 min 后 DNA 单链断裂有一定程度的修复(见图 3)。

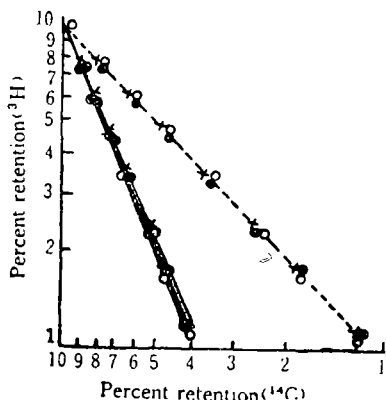


Fig 1. Single-strand break of fibroblast after X irradiation

(---) control cell, (—) 10 Gy irradiated cell (●—● normal cell, ○—○ AT cell, ×—× AT heterozygote cell)

讨 论

用 Kohn 碱性洗脱法观察细胞的 DNA 损伤及修复已有

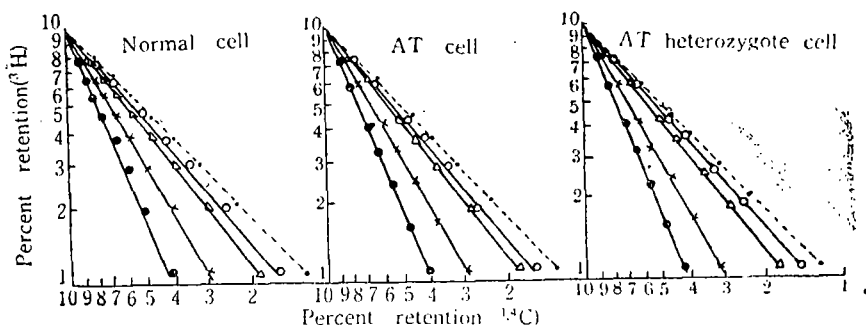


Fig 2. The repair of single-strand break after X irradiation

●---● control cell, ●—● 10 Gy irradiated cell, ×—× 15 min incubation after irradiation
△—△ 30 min incubation after irradiation, ○—○ 60 min incubation after irradiation

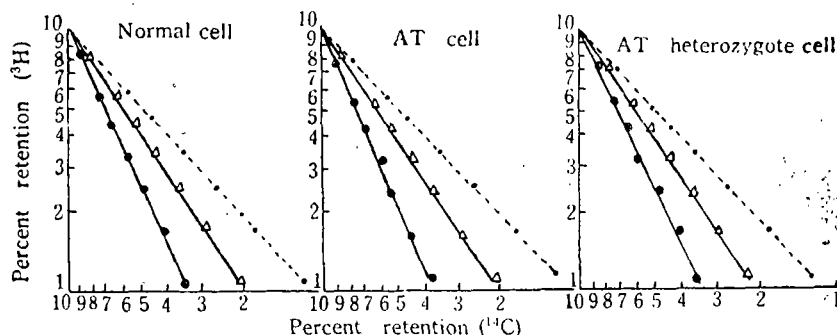


Fig 3. Effects of 5×10^{-4} mol/L aphidicolin on the single-strand break and repair

●---● control cell, ●—● 10 Gy irradiated cell, △—△ 60 min incubation after irradiation

不少研究^[1-3]。我们采用 ^3H -TdR 和 ^{14}C -TdR 双标记细胞的方法。由于所用的细胞标记物胸嘧啶核苷是在分子结构的不同部位氢和碳两个原子上的标记。因此,对于经不同条件处理的细胞之间作相对比较时增加了测定的准确性。这样为在电离辐射作用下细胞 DNA 损伤及修复的研究提供了一种更加正确敏感的方法。

实验选用 AT 细胞是一种毛细血管扩张性共济失调症(AT)的皮肤纤维母细胞。毛细血管扩张性共济失调症是一种自身免疫缺陷症,特征性地表现为神经血管系统和免疫学的改变。它是一种进行性疾病,常常有遗传倾向。这种病人容易转变肿瘤,通常有 10% AT 病人在 20 岁之前会发展成肿瘤,大多数是淋巴网状内皮系统肿瘤。淋巴细胞染色体的特殊改变部位是基因 14 q 12 带。由于常伴随着免疫缺陷,因此表现为血清 IgA 和 IgG 的水平较低。实验选用的 AT 肿瘤突变株细胞是来自毛细血管扩张性共济失调症有肿瘤突变的皮肤纤维母细胞。

大多数细胞中 DNA 单链断裂能很快修复。许多研究者曾报道正常细胞和 AT 细胞在 X 射线照射后,其 DNA 单链断裂和双链断裂在数量和比率上相同。Rubin 等曾报道正常细胞和 AT 细胞经 X 射线或紫外线照射后,细胞染色体的断裂和修复的数目和比率相同^[4-7]。Cornforth 和 Bedford 报道在 6 Gy X 射线照射后,AT 细胞和正常细胞 DNA 单链断裂发生频率和重接修复率是相同的,即使是 DNA 双链断裂,在 37℃ 孵育 1-2 h 内也能重接修复^[8]。本实验结果证实不论是正常纤维母细胞,还是 AT 细胞或 AT 肿瘤突变细胞经 10 Gy X 射线照射后,经 37℃ 孵育 60 min,细胞 DNA 的大部分单链断裂已重接修复。

APC 是 DNA 聚合酶 α 的抑制剂。此酶在哺乳类细胞中参予 DNA 半饱和复制。近年来的研究认为 X 射线引起细胞产生染色体畸变, 而 APC 只影响 G_0 期产生染色质型畸变, 在 APC 剂量较高时, 能引起细胞在受紫外线照射后 DNA 单链断裂的累积, 抑制 X 射线引起细胞 DNA 单链断裂的修复, 而 APC 在一定浓度范围内对细胞生长影响不大。如对人纤维细胞进行紫外照射时, 发现当加入 APC 的浓度在 $1 \mu\text{g/ml}$ 培养液时, 37°C 孵育 1 h 后细胞存活增加, 当加入的 APC 在较高浓度时 ($20 \mu\text{g/ml}$ 培养液), 即使在低剂量紫外线照射也会有 90% 左右的修复^[8-11, 13]。当 APC 浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 培养液在 37°C 孵育 3-5 h, 能完成修复复制^[12]。本实验证实 AT 肿瘤突变细胞即在接受 10 Gy X 射线照射后, 加 $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ APC/皿, 在 37°C 孵育 60 min, DNA 单链断裂也有部分修复。

对于细胞 DNA 修复能力与修复机理的研究, 无疑地对于实际应用是有指导意义的。根据细胞 DNA 修复能力与辐射敏感性的关系, 在辐射防护研究中, 除考虑对 DNA 分子的直接保护外, 也应考虑保护细胞内与 DNA 修复有关的酶, 并给细胞创造有利于辐照后修复的条件, 以达到提高细胞存活率减少细胞损伤。由于肿瘤突变细胞在射线作用后在适宜条件下会有一定程度的修复。因此, 在肿瘤放疗研究中也应考虑消除或削弱其 DNA 的修复能力, 以达到提高肿瘤细胞杀伤率。

参 考 文 献

- [1] K. W. Kohn, In: E. Friedberg P. Hanawalt, Eds, DNA Repair: A laboratory manual of research procedures, Marcel Dekker, New York, 1981, pp 379-402.
- [2] D. Murray, S. C. van Ankeren, and R. E. Meyn, Anal. Biochem., 160, 149(1987).
- [3] M. A. Bender, In: W. M. Genevoso, M. D. Shelby and F. J. Deserres Eds. DNA repair and mutagenesis in eukaryotes, Plenum, New York, 1980, pp 245-265.
- [4] A. J. Jr, Fornace and J. B. Little, Biochim. Biophys., 607, 432(1980).
- [5] P. V. Hariharan, S. Elezko, B. P. Smith and M. C. Paterson, Radiat. Res., 86, 589 (1981).
- [6] A. R. Lehman and S. Steven, Biochem. Biophys. Acta., 474, 49(1977).
- [7] J. S. Rubin, Int. J. Radiat. Biol., 54, 309(1988).
- [8] M. N. Cornforth and J. S. Bedford, Science., 227, 1589(1985).
- [9] S. M. Keyse and R. M. Tyrrell, Mutation Res., 46, 109(1985).
- [10] L. R. Kelland and G. G. Steel, Int. J. Radiat. Biol., 54, 229(1988).
- [11] M. Fukuda and M. Ohashi, Cell Biology International Reports, 7, 579(1983).
- [12] M. A. Bender and R. C. Moore, Mutation Res., 198, 227(1988).
- [13] R. M. Tyrrell, S. M. Keyse, F. Amaudruz and M. Pidoux, Int. J. Radiat. Biol., 48, 723 (1985).

(稿件收到日期: 1989 年 11 月 1 日)

STUDY ON THE REPAIR OF DNA SINGLE-STRAND BREAK IN CELLS AFTER RADIATION BY DOUBLE LABEL ALKALINE ELUTION

He Jiewei

(Shanghai Institute of Radiation, Shanghai Medical University, Shanghai)

Michael A Bender

(Brookhaven National Lab. Long Island, New York, U. S. A.)

ABSTRACT DNA single-strand break and rejoin were assayed in normal fibroblast ataxia telangiectasia (AT) and AT heterozygote cells by double label alkaline elution. The single-strand break in these three different lines of cells after 10 Gy X-radiation is about the same, but there is significantly different from the control. After 37°C incubation, the single-strand break of these three lines cells repaired accordingly with the time 15, 30, 60 minutes. There are almost repaired within 60 minutes. The single-strand break in three different lines of cells are partly repaired after 37°C incubation when 5×10^{-4} mol/L aphidicolin was added.

KEYWORD Radiation, ^3H , ^{14}C double label, Alkaline elution, DNA single-strand break repair