

小鼠乳癌细胞辐射敏感突变株SX-9 DNA 双链断裂及其重接修复研究

周平坤 魏 康

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

摘要 本研究采用一种新的细胞 DNA 双链断裂检测方法——脉冲电场电泳法, 检测了两株来源相同而辐射敏感性不同的细胞 SR-1 和 SX-9 的 X 线照射所致 DNA 双链断裂的产生和修复。结果表明两株细胞的 DNA 双链断裂产生没有差别, 而辐射敏感细胞 SX-9 的 DNA 双链断裂重接修复能力明显低于 SR-1 细胞, 本文对此结果与细胞辐射敏感性的关系进行了讨论。

关键词 DNA 双链断裂, 细胞辐射敏感性, 脉冲电场电泳, 辐射敏感突变株

在放射生物学研究中, 人们很早就认识到不同种类细胞, 甚至同一种细胞的不同细胞周期细胞群之间存在辐射敏感性差异, 并对此提出多种解释。然而有关决定细胞辐射敏感性的分子基础仍然是一个尚未解决的问题, 目前主要存在两种观点, 一种认为单位长度 DNA 或单位吸收剂量所产生的 DNA 损伤不同, 决定了细胞辐射敏感性的差异^[1-3]; 另一种认为不同细胞辐射敏感性的差异是由于细胞修复损伤能力的差别所致^[4-8]。但上述研究很多是在细胞活存率低于百分之一的照射条件下进行的, 实际上从众多的非活存细胞中获取有关代表活细胞的 DNA 损伤和修复的信息, 这样难免出现相反的论点。本文以两株来源相同而辐射敏感性不同的细胞为研究对象, 其中电离辐射敏感细胞 SX-9 是以野生型细胞 SR-1 经过诱变剂 MNNG 诱变获得, 由于两株细胞的形态和基本结构以及主要代谢特点相同、生长周期相近, 因此两者的研究可比性强。利用新型细胞 DNA 双链断裂检测方法——脉冲电场凝胶电泳法(PEGE), 在较低剂量 X 线照射下检测这两株细胞的 DNA 双链断裂的产生和修复, 从中探讨影响细胞辐射敏感性的分子机理。

材 料 和 方 法

1. 细胞培养

SR-1 细胞是小鼠乳癌细胞 FM 3 A 的一个衍生株。SX-9 细胞是从 SR-1 细胞经过诱变剂 MNNG 诱变获得的一个电离辐射敏感突变株^[9]。两株细胞均由日本放射线医学总合研究所佐藤弘毅博士惠赠。在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 于 37℃、4% 二氧化碳、饱和湿度下悬浮培养。细胞接种在 0.3% 琼脂半固体培养体系中进行活存率分析。

2. 细胞 DNA 标记和 X 线照射

指数生长细胞于 X 线照射前 20 h 更换含有 $1.85 \times 10^4 \text{ Bq/ml}$ $^3\text{H-TdR}$ 的培养液, 继续培养, 进行 DNA 标记。收集细胞后冰浴下照射 X 线, 照射条件为电压 180 kV、电流 10 mA、0.5 mmCu + 1.0 mmAl 的过滤板, 剂量率为 0.67 Gy/min。

3. DNA 双链断裂的检测

用脉冲电场凝胶电泳法^[10]。采用 DY-4 型交变脉冲电泳仪, 主要步骤如下: 收集细胞包埋在

0.5%的低熔点琼脂糖胶块中,在含2mg/ml蛋白酶E、1%SDS、0.5 mol/L EDTA、10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)反应液中,50℃、48 h溶胞、去蛋白,然后用TE溶液清洗胶块。将制备好的DNA样品胶插入电泳凝胶加样孔中,在六角形双向电极电泳槽中电泳。电泳条件为脉冲时间420 s、电压80 V、凝胶浓度为1%、温度14—18℃、0.5 XTBE电泳缓冲液,总电泳时间72 h。电泳完毕,分别将凝胶原点处和进入凝胶的DNA样品胶切割下来,用100%(重量/体积)三氯醋酸完全消化后加入10 ml闪烁液,用LKB液闪计数器分别测量两部分放射性强度,以凝胶原点DNA的放射性计数占总放射性计数的百分比(原点DNA残留率%)表示细胞DNA双链断裂程度。DNA双链断裂修复率的计算按下式进行^[11]

$$\text{DNA双链断裂重接修复率} = \frac{\text{Log}(X_t/X_0)}{\text{Log}(X_c/X_0)} \times 100\%$$

其中 X_t 为细胞照射后修复一定时间(t)所检测到的DNA残留率, X_c 为没有照射的对照细胞的DNA残留率, X_0 为没有进行修复的DNA残留率。

结 果

1. 两株细胞X线照射活存曲线

通过检测X线照射下的活存率,能明确反映突变细胞SX-9的电离辐射敏感性高于野生型细胞SR-1(图1),SR-1细胞的活存曲线有一个肩区,而SX-9细胞无肩区,其X线照射后活存水平显著低于SR-1细胞。SR-1和SX-9细胞在0.3%琼脂培养体系中接种率分别为 $72.2 \pm 8.2\%$ 和 $46.9 \pm 8.0\%$ 。

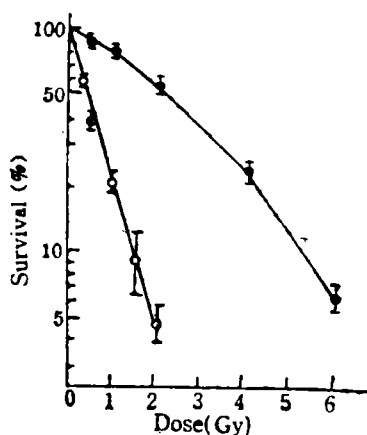


Fig 1. Survival curves of SR-1 (●) and SX-9 (○) cells after X-ray irradiated

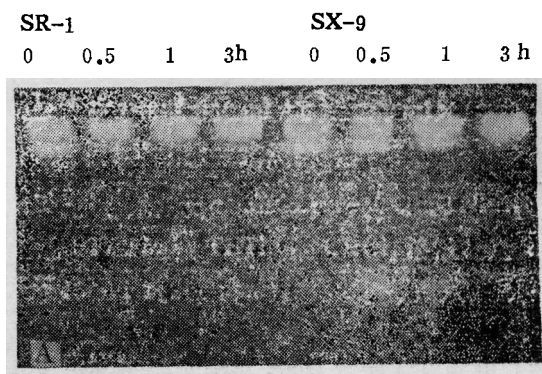


Fig 2. DNA DSB inspected by PFGE at 0 to 3h postirradiation incubation time in 8Gy X-ray irradiated SR-1 and SX-9 cells

2. DNA双链断裂的产生

表1结果是不同剂量X线照射SR-1和SX-9细胞的DNA电泳后凝胶原点残留率,随着X线剂量增加,DNA残留率逐渐降低,而且两株细胞的下降幅度非常接近。在全部剂量点中,相同剂量照射下,两株细胞的DNA凝胶原点残留率无明显差别(统计处理 $P>0.5$)。

3. DNA双链断裂重接修复

图2是两株细胞8 Gy X线照射后的DNA双链断裂重接修复结果。SR-1细胞在照后30 min

Tab 1. The rate of DNA remaining in well after pulsed field gel electrophoresis in SR-1 and SX-9 cells irradiated with 0 to 20 Gy

Cell strain	X ray dose (Gy)					
	0	3	5	8	12	20
SR-1	92.9±0.6	85.7±1.7	76.2±1.5	69.8±1.4	56.3±2.1	42.7±2.6
SX-9	95.5±0.3	87.2±0.5	79.9±0.8	72.0±1.3	58.6±1.9	45.6±1.4

(n = 7, Mean ± SE)

Tab 2. The rate of DNA remaining in well after pulsed field gel electrophoresis in SR-1 and SX-9 cells at 0 to 180 minutes following dose of 8 Gy X ray.

Cell strain	Postirradiation time(min)						0 Gy
	0	15	30	60	120	180	
SR-1	73.6±1.1	84.5±0.6	87.5±0.8	90.4±0.7	92.7±1.0	93.7±1.1	95.1±0.9
SX-9	70.4±1.0	75.7±2.1	77.7±2.7	79.3±2.2	81.7±1.8	81.7±2.2	93.1±1.0

(n = 4 to 7, Mean ± SE)

双链断裂 DNA 就有明显的修复, 具体表现在进入凝胶的 DNA 量明显少于未经修复组, 而 SX-9 细胞修复缓慢, 而且不完全。

表 2 是 8 Gy X 线照射两株细胞修复不同时间后的 DNA 电泳凝胶原点残留率, 很明显, SX-9 细胞的 DNA 双链断裂修复水平显著低于野生型细胞 SR-1。从 DNA 双链断裂修复曲线来看(图 3)两株细胞都呈双相修复, 即开始的快速和接着的缓慢相, SX-9 细胞的两相修复水平都低于 SR-1 细胞。开始 15 min, SR-1 细胞有 54% 的双链断裂 DNA 被修复, 而 SX-9 细胞只有 26%, 到 3 h 后 SR-1 细胞只有 5.8% 的双链断裂 DNA 残留, SX-9 细胞仍然残存着 46.7% 的双链断裂 DNA。

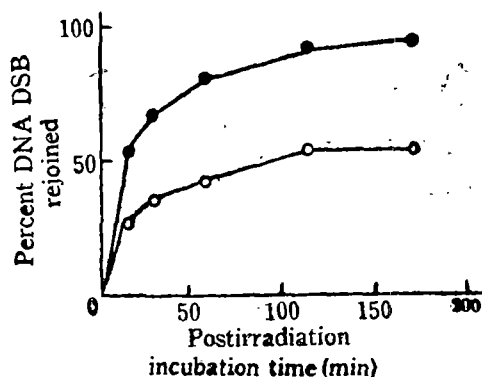


Fig 3. Kinetics of DNA DSB rejoining repair in SR-1(●) and SX-9 (○) cell irradiated with 8 Gy X ray

讨 论

脉冲电场电泳检测 DNA 双链断裂的方法建立, 大大提高了此类损伤检测的灵敏度, 极有利于细胞辐射敏感性的分子机理研究。本文比较了两株不同辐射敏感细胞的 DNA 双链断裂的产生, 尽管两株细胞的活存水平相差很大, 活存曲线中一个细胞有肩区, 另一个没有, 但两者 DNA 双链断裂的产生无明显差别, 由此可见 DNA 双链断裂的产生水平与两株细胞的辐射敏感性差异无关。也有学者用中性滤膜洗脱技术检测了不同辐射敏感细胞的 DNA 双链断裂, 提出不同细胞辐射敏感性的差异与 DNA 双链断裂开始产生的量的不同有关^[1-3], 其根据是辐射敏感细胞的 DNA 双链断裂剂量效应曲线有肩区, 而不敏感的细胞没有肩区。但用中性滤膜洗脱技术所检出的肩区出现在小于 25 Gy 剂量范围中, 而细胞活存曲线肩区的剂量范围几乎要小 10 倍, 因此, 将两种肩区联系在一起考虑要特别慎重, 并且使用中性滤膜洗脱技术时, 改变洗脱条件将会改变洗脱反应曲线的形状^[12]。

从两株细胞的 DNA 双链断裂修复水平来看,辐射敏感细胞 SX-9 的 DNA 双链断裂修复能力,明显低于野生型细胞 SR-1,8 Gy X 线照射细胞经 3 h 修复后,SR-1 细胞已有 94.2% 的双链断裂 DNA 被重接修复,而 SX-9 细胞只有 53.3%,其所残存的双链断裂 DNA 是 SR-1 细胞的 8 倍。目前发现有 DNA 双链断裂修复缺陷的辐射敏感细胞还有 EM-9^[4]、XR-1^[5]、xrs 系列^[6]、XR-VIS B^[7]和 BLM-2^[8]等。因此,本文认为 DNA 双链断裂的修复能力是影响细胞辐射敏感性的一个重要因素。有人认为当细胞带有未修复的 DNA 损伤进入细胞周期的 S 期时,这些损伤将在 S 期固定或转变为不可修复的染色体损伤^[13],而染色体损伤是细胞死亡的直接原因,因此细胞 DNA 双链断裂的修复缺陷将在一定程度上扩大了这种损伤成分,从而导致细胞辐射敏感性的提高。总之,从本文结果来看,DNA 双链断裂修复能力是决定细胞辐射敏感性的重要因素。

参 考 文 献

- 1 Radford I R. Int. J. Radiat. Biol., 1986, 49:621
- 2 Radford I R. Int. J. Radiat. Biol., 1986, 49:611
- 3 Radford I R. Int. J. Radiat. Biol., 1986, 49:909
- 4 Van Ankeren S C. Radiat. Res., 1988, 116:511
- 5 Giaccia A. Somatic Cell and Mol. Genet., 1985, 11:485
- 6 Kemp L M. Mutat. Res., 1984, 132:189
- 7 Zdzenicka M Z. Mutat. Res., 1988, 194:239
- 8 Robson C N et al.. Mutat. Res., 1989, 217:93
- 9 Sato K et al.. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 1986, 77:456
- 10 周平坤, 魏 康. 生物化学杂志, 1991, 7:513
- 11 Koval T M, Kazmar E R. Radiat. Res., 1988, 113:268
- 12 Okayasu R, Iliakis G. Int. J. Radiat. Biol., 1989, 55:569
- 13 Iliakis G, Nüsse M. Radiat. Environ. Biophys., 1983, 22:201

(稿件收到日期:1990年11月26日)

STUDIES ON DNA DSB AND ITS REJOINING REPAIR IN A MUTATED RADIOSENSITIVE MOUSE MAMMARY CANCER CELL LINE, SX-9

Zhou Pingkun Wei Kang

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

ABSTRACT The initial amount and repair of DNA double strand breaks (DSBs) in the radiosensitive cell SX-9 and wild-type cell SR-1 irradiated by X ray were detected by pulsed field gel electrophoresis. The results showed that the extent of DNA DSBs was similar in these two cell lines under same X ray doses, but the rejoining repairability of DNA DSBs in SX-9 cells was significantly lower than that in SR-1 cells. Results suggested that the increased radiosensitivity in SX-9 cells could be correlated with a defect in the repair of DNA DSBs.

KEYWORDS DNA double strand breaks (DSBs), Radiosensitivity, Pulsed field gel electrophoresis, Radiosensitive mutant