

研究论文及科研成果报告

光敏剂(PSD-007)— γ 射线辐射对 小鼠白血病细胞 DNA 的影响

郑秀龙 孟祥顺 高建国

(上海第二军医大学)

摘要 小鼠白血病 L 7712 细胞经与不同浓度 PSD-007 保温后, 该药能抑制细胞 DNA 的合成, 在 $10 \mu\text{g/ml}$ 以下, 随药物浓度增加抑制成比例增强, 再增加药量, 则抑制程度增加缓慢。可能与该药被细胞吸收结合部位渐趋饱和有关。经 PSD-007 处理过的细胞在避光条件下, 用 γ 射线照射 10 GY 与未处理受 10 GY 照射细胞的 DNA 链断裂程度无差别, 表明 PSD-007 不能增加电离辐射对 DNA 的损伤效应; 但是处理过的细胞在不避光条件下照射 10 GY, 则 DNA 链断裂明显增加, 与相应避光下照射细胞 DNA 损伤有显著差别; 但经药物处理细胞只曝露在高压汞灯光照下却未检测出 DNA 的损伤, 结果表明 PSD-007 只有在避光下辐照才可增加 γ 射线对细胞 DNA 链断裂损伤。这种新现象的发现, 提示在某些情况下利用光敏剂进行肿瘤放疗, 以及在评价疗效上也许会有所裨益。作者对上述结果及检测中的影响因素进行了讨论。

关键词 光敏剂; DNA 合成抑制; DNA 链断裂。

前 言

许多研究表明血卟啉类光敏剂和一些荧光染料一样能较多滞留于肿瘤组织, 在一定波长的光照下产生特征荧光可藉以诊断肿瘤部位; 若辅以白炽光或激光照射能杀死癌细胞^[1,2], 因此近年来国内外均重视开展血卟啉类化合物或衍生物(HPD)在临床诊治肿瘤中的应用和实验研究。其治疗作用机理, 以往虽作了些工作, 但迄今还未得到满意的解释。鉴于激光的穿透力差, 难以解决一些深部肿瘤诊治的缺点, 因而联想到 HPD 能否增强电离辐射对癌细胞特别是其胞核内重要遗传物质 DNA 的损伤作用是颇感兴趣的问题, 为此, 本文探讨了光敏剂(PSD-007)及其合并 γ 射线照射, 对小鼠白血病细胞 DNA 合成与链断裂损伤的影响。

材 料 与 方 法

1. 细胞

实验采用郑升等^[3]建立的小鼠腹水型淋巴性白血病 L 7712 细胞, 将接种后第 4~6 天发病的 615 小鼠行颈椎脱臼处死, 立即从腹腔抽取新鲜腹水悬于 RPMI 1640 培养液中, 使细胞浓度为 $2\sim4\times 10^6$ 个细胞/ml, 加 PSD-007 在避光条件下于 37°C 保温 1 小时后进行实验。

2. 光敏剂

PSD-007 (下简称 PSD) 系我校抗癌药研究室研制的一种新光敏剂^[4], 为血卟啉及其衍生物的混合物。原液 10 mg/ml , 于 -20°C 冰箱保存, 临用前在避光条件下加生理盐水配制。

3. 照射条件

细胞悬液置试管内,在冰水浴中于 ^{60}Co 源40 cm处,以剂量率3.9 Gy/min γ射线照射10~20 Gy。避光照射时,样品用黑布遮住;不避光照射时,样品在不避光下操作,并暴露在装有两盏250瓦高压汞灯光照下进行辐射,经用CZ-3照度计测得光照度为4000勒克斯,前后约10分钟。

4. PSD对细胞DNA合成影响的测定

细胞悬液经与2~50 μg/ml PSD于37℃保温1小时,加 ^3H -TdR 0.5 μci/ml(比活20 μci/mM)及未灭活马血清20%(v/v)继续保温1小时后,用玻璃纤维(49型)滤膜收集细胞,于脂溶性闪烁液内测定放射性,每个样品重复3次。PSD对 ^3H -TdR参入的抑制%为 $\left(1 - \frac{\text{光敏剂处理样品 cpm}}{\text{对照样品 cpm}}\right) \times 100\%$

5. DNA单链断裂的检测

用我室建立的微孔滤膜碱洗脱荧光法检测DNA单链断裂^[6]。以膜上DNA存留%的变化表示细胞DNA损伤的程度。

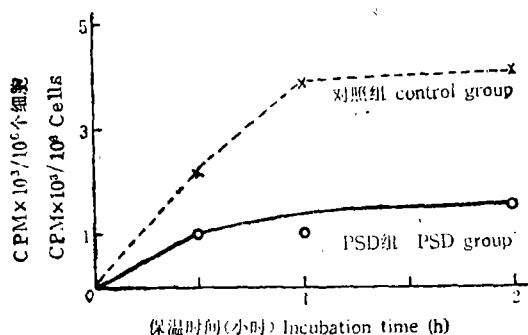


图1 PSD与细胞于37℃保温不同时间后 ^3H -TdR掺入DNA的变化。

Fig 1 Changes of ^3H -TdR incorporated into DNA after different incubation time of cells with PSD.

结 果

(1) 细胞在含10 μg/ml PSD的培液中在37℃下保温不同时间,然后各加 ^3H -TdR和马血清分别保温0.5~2小时后,测定 ^3H -TdR参入DNA的变化(如图1),细胞与PSD保温后 ^3H -TdR参入均较相对照组明显下降,且随保温时间延长(在两小时内)抑制程度益趋严重,但在保温1小时后,抑制增加速度较为缓慢,乃选用1小时观察该药对DNA合成的影响。

(2) 不同浓度PSD对细胞DNA合成的抑制细胞经与不同浓度PSD(2~50 μg/ml)于37℃下保温1小时后,加 ^3H -TdR和马血清继续保温1小时,测

定放射性。 ^3H -TdR参入细胞DNA的变化如(表1)及(图2),结果表明:PSD对细胞DNA合成的影响,在10 μg/ml以下时,随药物浓度增加, ^3H -TdR参入迅速减少,显示抑制强度迅速增强,

表1 不同浓度PSD对L7712细胞DNA合成的抑制

Table 1 Inhibition of DNA synthesis in different concentration of PSD treated L7712 cells

浓度 (μg/ml)	cpm/10 ⁶ 细胞 ± SE	抑制 %
concentration	cpm/10 ⁶ cells ± SE	inhibition %
0	13243 ± 776 (15)	0
2.0	11224 ± 1229 (7)	15.3
5.0	8865 ± 1422 (7)	33.1
10.0	6972 ± 540 (16)	47.4
30.0	5174 ± 742 (6)	61.0
50.0	3257 ± 378 (7)	75.4

注: ()内为实验次数,每个样品重复3次,以下类同。

Number of experiments are shown in parenthesis and each sample is determined in triplicate

但增至 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以上时,抑制作用则较为缓慢。

(3) PSD 与细胞在 37°C 下避光保温不同时间后,测定膜上 DNA 存留%的变化(表 2)。由(表 2)可见 PSD($30\text{ }\mu\text{g/ml}$)与细胞保温直至 180 分钟,对 DNA 链断裂仍无影响($p>0.05$)。

(4) 不同浓度 PSD 与细胞在 37°C 下避光保温 2 小时后,测定膜上 DNA 存留%的变化(表 3)。结果表明 PSD 浓度在 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以内对 DNA 链断裂也无影响($p>0.05$)。

(5) 在研究中我们偶然发现细胞在不避光照射 γ 射线可增加 DNA 链的断裂,为此进行了如下实验:细胞与 $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ PSD 在 37°C 下保温 1 小时,于冰水浴中在避光和不避光条件下照射 10 Gy 后,立即检测膜上 DNA 存留%的变化,结果(见图 3)。

从图 3 中可见细胞受 10 Gy 照后(R 组),膜上 DNA 存留%由照前 $83.05\pm 2.08\%$ 下降至 $66.90\pm 6.35\%$,与我们先前的结果一致^[5],经 PSD 处理后,避光下照射 10 Gy 的细胞(PRB)组亦下降至 $70.90\pm 2.92\%$,经统计学处理两者无明显差别($p>0.05$),

结果表明 PSD 处理过的细胞在避光条件下照射 γ 线并不能使 DNA 链断裂增加。如果将 PSD 处理

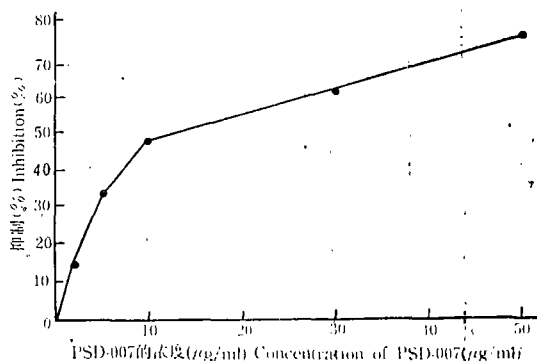


图 2 不同浓度 PSD 对 L7712 细胞 DNA 合成的抑制

fig 2 Inhibition of DNA synthesis in different concentration of PSD treated L7712 cells

表 2 PSD($30\text{ }\mu\text{g/ml}$)与细胞在 37°C 下保温不同时间后,膜上 DNA 存留%的变化

Table 2 Changes of DNA % remaining on the filter, after different incubation time of cells with PSD($30\text{ }\mu\text{g/ml}$) at 37°C

与药物保温时间(分) Incubation time with drug (min.)	膜上 DNA 存留 % DNA % remaining on the filter
无 药 物 对 照 control without drug	$86.0\pm 1.5(3)$
30	$85.0\pm 1.4(3)$
60	$86.1\pm 2.2(3)$
120	$79.8\pm 2.9(3)$
180	$80.1(2)$

表 3 不同浓度 PSD 与细胞在 37°C 保温 2 小时后,膜上 DNA 存留%的变化

Table 3 Changes of DNA % remaining on the filter, after cells were incubated with PSD 2h at 37°C

浓度($\mu\text{g/ml}$) concentration($\mu\text{g/ml}$)	膜上 DNA 存留 % DNA % remaining on the filter
0	$96.3\pm 2.5(4)$
10.0	$95.5\pm 1.0(6)$
30.0	$95.2\pm 1.3(6)$
50.0	$96.8\pm 1.8(4)$
100.0	$91.8\pm 4.3(6)$

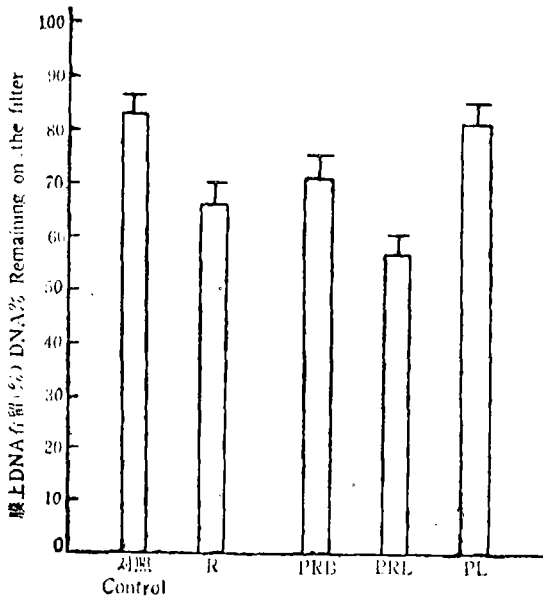


图 3 PSD 与细胞于 37℃ 下保温后, 在避光和不避光条件下照射 10 Gy 后对 DNA 链断裂的影响

Fig 3 Effect of 10 Gy radiation on DNA strand breaks under dark or exposed to visible light, after incubation of cells with PSD.

注 图中除 PL 组系 5 次实验外, 其余均为 8 次实验, 每次实验 3 个复管

In fig, each experiment proceeded in 8 times, except PL group of 5 times, every experiment was in triplicate,

对照: 不加 PSD, 与加 PSD 组同样操作, 但不照射

Control: Process as PSD group but without PSD and irradiation

R: 同上, 在不避光条件下照射 10 Gy

Conditions as control, but irradiated 10 Gy in light

PRB: PSD 与细胞保温后, 完全在避光条件下照射 10 Gy After cells incubated with PSD, irradiated 10 Gy but protected from light completely

PRL: PSD 与细胞保温后, 在不避光条件下照射 10 Gy After cells incubated with PSD, irradiated 10 Gy, in light

PL: 条件同 PRL 组, 但不照射

Conditions as (PRL) group, but without irradiation

过的细胞在不避光条件下照射 γ 射线 (PRL 组), 膜上 DNA 存留 % 则下降至 57.38%, 较在同一条件下避光照射 γ 射线 (PRB 组) 有所下降, 但前者相差显著 ($p < 0.05$), 而用 PSD 处理过的细胞与 (PRL 组), 一样曝露在高压汞灯光照下, 只是不照 γ 射线照射 (PL 组), 则膜上 DNA 存留 % 与对照组无明显差别, 上述结果提示经 PSD 处理过的细胞在高压汞灯光照下 γ 射线照射可引起 DNA 链断裂的增加。

为了进一步验证不避光照射能否增加 DNA 链断裂, 我们又对 PSD 处理细胞前后在不避光条件下经 γ 射线照射 20 Gy 进行了比较, 结果表明处理后细胞的膜上 DNA 存留 % 由处理前 $68.68 \pm 3.81\%$ 下降至 $56.02 \pm 3.61\%$, 相差非常显著 ($P < 0.01$), 结果再次证明不避光照射, PSD 可增加 DNA 链的断裂。

讨 论

在观察 PSD 对 DNA 合成影响的实验中, 因考虑到 PSD 分子较大, 不易进入胞内, 因此

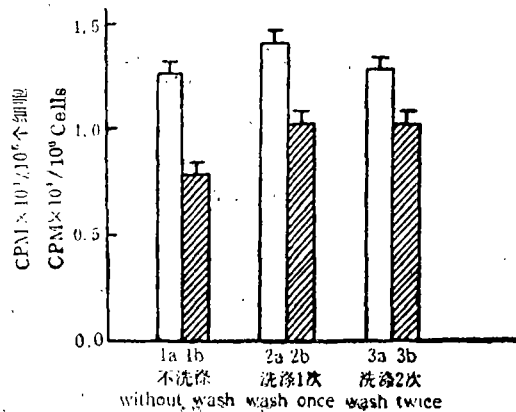


图 4 细胞与 PSD 保温 1 小时后, 残留药物对 $^3\text{H-TdR}$ 参入的影响

Fig 4 The effect of residual drug on $^3\text{H-TdR}$ incorporation, after 1h incubation of cells with PSD

□ 对照组

Control group

▨ PSD 组

PSD group

需要了解它对 $^3\text{H-TdR}$ 参入的真正抑制程度, 为此进行了以下实验, 即将细胞与 PSD (10 $\mu\text{g/ml}$) 保温 1 小时后, 用生理盐水和 1640 培养液洗涤 1—2 次, 再在 1640 培养液内加 $^3\text{H-TdR}$ 及马血清继续保温 1 小时, 测定 $^3\text{H-TdR}$ 的参入。由 (图 4) 可见对照组洗涤前后 (1a-3a), $^3\text{H-TdR}$ 参入无差别

($p > 0.05$), 而 PSD 组(1 b-3 b)均较相应对照(1 a-3 a)明显下降($0.01 < p < 0.05$), 洗涤一次(2 b)与洗涤两次(3 b)间无差别($p > 0.05$), 而经洗涤后的 PSD 组(2 b、3 b)对 $^3\text{H-TdR}$ 参入的抑制程度均较不洗组(1b)明显降低($p < 0.01$), 可减轻抑制达 43% 左右, 这可能与 PSD 分子不易进入细胞内致使核内含药量相对较少和在胞外阻止 $^3\text{H-TdR}$ 进入胞内有关, 因而对 $^3\text{H-TdR}$ 的参入抑制有所减轻, 这提示我们在体外进行药物作用试验时, 应注意残留药物的影响。虽然如此, 在我们的实验(表 1、图 2)中仍显示出 PSD 是个强抑制剂, 其抑制机理还不清楚。Christenson 等^[9]实验证明卟啉类化合物的抑制细胞的增殖作用主要发生在 S 期的中期, 这也提示该药系通过抑制 DNA 合成而抑制了细胞分裂活力, 至于究竟通过什么靶分子而抑制 DNA 合成的尚有待深入研究。

由于 PSD 本身具有荧光, 可能对我们实验中采用滤膜洗脱荧光法检测 DNA 链断裂会产生影响, 对此我们比较了 PSD 与 DNA-DABA 反应产生的荧光进行了激发(E_x)和发射(E_m)光谱的分析, 结果前者的 E_x 和 E_m 与后者有明显差别, 因而在我们的实验中采用 $E_x 408 \text{ nm}$, $E_m 498 \text{ nm}$ 测定 DNA-DABA 反应荧光产物时不受 PSD 荧光的干扰。另外在上述实验中已知 PSD 对 $^3\text{H-TdR}$ 参入有抑制作用, 有必要了解该药对 DNA 链断裂有否影响, 经细胞与 PSD($30 \mu\text{g/ml}$)保温达 180 分钟(表 2)或与不同浓度 PSD($10 \sim 100 \mu\text{g/ml}$)保温试验(表 3), 均对 DNA 链断裂无影响($p > 0.05$), 上述影响因素的排除, 为在实验中检测细胞 DNA 辐射损伤方法的可信性提供了依据。

避光条件下, PSD 合并 γ 射线照射细胞后, DNA 链断裂与单独照射组相比较并不增加(图 3, PRB 和 R 组), 与我室另一组在相同条件下用羟磷灰石离心法分析结果^[7]一致, 这些结果充分证明 PSD 无辐射增敏作用。如果不避光进行 γ 射线照射, 则 DNA 链断裂明显增加(图 3 PRL 和 PRB 组); 而只曝露在汞灯光照下(图 3 PL 组), 则对 DNA 链断裂无影响, 因此在可见光照下可增加 γ 射线对经 PSD 处理过细胞 DNA 链断裂的损伤, 这可能由于可见光对 PSD 的激发或产生光化学变化^[8], 而增强了辐射对细胞 DNA 的损伤作用, 这种新现象的发现, 提示在某些情况下利用光敏剂进行肿瘤放疗以及在评价疗效上, 也许会有所裨益。这些都值得进一步探讨的。

本工作中所用 PSD-007 系本校许德余等同志惠赠, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] J. F. Kelley, M. E. Senll and M. C. Berenbaum, Brit. J. Cancer, 31, 237 (1975).
- [2] T. J., Douherty, J. E., Kaufman, A., Goldfarb, K. R., Weishaupt, D. Boyle, & A., Mittelman, Cancer Res., 38, 2628 (1978).
- [3] 郑 升, 孟德鸣, 张永基, 陈海明, 杨金龙, 潘瑞彭, 肿瘤, 2, 1 (1982).
- [4] 许德余, 殷祥生, 陈 雄, 陈文晖, 刘 军, 第二军医大学学报, 5, 31 (1984).
- [5] 孟祥顺, 郑秀龙, 辐射研究与辐射工艺学报, 2, 25 (1984).
- [6] T., Christensen, J. E. Moan, and R., oftebro, Brit. J. Cancer, 39, 64 (1979).
- [7] 刘 楠, 郑秀龙, 第二军医大学学报, 6, 354 (1985).

(1984 年 12 月 17 日收到)

THE EFFECT OF PHOTSENSITIZING AGENTS (PSD-007) AND γ RAY IRRADIATION ON THE DNA IN MURINE LEUKEMIA CELLS

Zheng Xiulong Meng XiangShun, Gao Jianguo
(Shanghai 2nd Military Medical College)

ABSTRACT Murine lymphoid leukemia L_{7712} cells were incubated with various concentrations of PSD-007, the inhibition of DNA synthesis was observed, the degree of inhibition was proportional to the concentration of the PSD-007 (below 10 $\mu\text{g/ml}$) in the cultural medium, the inhibition increased slowly above that level.

There were no differences in the degree of DNA strand breaks between 10 Gy γ -ray irradiated cells versus PSD-007 treated cells irradiated at the same dose in dark. It showed PSD-007 was unable to induce the effect of ionizing radiation on DNA damage in dark. However, when the treated cells alone were irradiated by 10 Gy γ -ray in visible light, the degree of DNA strand breaks increased distinctly and gave a clear difference versus protected from light group respectively. whereas the treated cells alone exposed to visible light at same conditions, there could not be observed any DNA damage. These results showed that PSD-007 could sole enhance the DNA strand breaks of L_{7712} cells by γ ray irradiation under visible light. This new phenomenon denoted that PSD also may be used in cancer radiotherapy under some circumstances.

The effects of PSD-007 and/or γ ray radiation on DNA and the influence of many factors on assay methods are discussed.

KEY WORDS Photosensitizer; Inhibition of DNA synthesis; DNA strand breaks.