

哺乳动物细胞 DNA 单链断裂 与重接修复的研究

孟 紫 强

(山 西 大 学)

摘要 本文运用羟基磷灰石柱层析法对 ^{60}Co γ 线引起的中国田鼠肺细胞 (CHL) 和 615 小鼠离体脾细胞 DNA 单链断裂和重接进行了研究。在 1~10 Gy 剂量范围内, 两种细胞 DNA 单链断裂的程度均与剂量呈线性关系。两种细胞每单位剂量诱发的 DNA 单链断裂的数量是相似的。CHL 细胞 DNA 单链断裂能迅速进行重接, 其重接速率和程度与剂量呈负相关。同时, 单链重接与培养条件也密切相关, CHL 细胞在无血清培养液中比在含小牛血清培养液中其 DNA 断链重接速率慢、程度低, 而离体的小鼠脾细胞 DNA 断链在无血清培养液中甚至未见重接修复。

关键词 羟基磷灰石柱层析法; DNA 链断裂; DNA 修复; CHL 细胞; 小鼠脾细胞。

引 言

电离辐射引起 DNA 单链断裂是常见的 DNA 辐射损伤类型之一^[1]。我们曾用 Kohn 碱洗脱法对哺乳动物细胞 DNA 单链断裂与重接的规律进行了研究。本文采用 Ahnström^[2] 及 Rydberg^[3] 的细胞 DNA 碱解旋速率法, 以羟基磷灰石柱层析法分离单、双链 DNA 分子, 对 ^{60}Co γ 线引起的中国田鼠肺细胞和 615 小鼠离体脾细胞 DNA 单链断裂和重接修复的规律进行了初步探讨。

材 料 与 方 法

1. 细胞与标记

中国田鼠肺细胞 (CHL) 于 TC 199 液 (含小牛血清 10%) 中在 37℃ 下培养。照前用 0.73×10^4 Bq/ml (即 0.2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) 的 ^3H -TdR ($\text{S.A. } 6.66 \times 10^{11} \text{ Bq}/\text{m} \cdot \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 即 18 Ci/m·mol·dm⁻³) 将细胞标记 20 小时。615 小鼠脾细胞悬液的制备见前文^[4]。每毫升 RPMI 1640 培养液 (pH 为 7.4, 含小牛血清 10%) 中含有 1×10^6 个脾有核细胞, 再用 3.67×10^4 Bq/ml (即 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) 的 ^3H -TdR ($\text{S.A. } 6.66 \times 10^{11} \text{ Bq}/\text{m} \cdot \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 在 37℃ 下放射性同位素标记 2~4 小时。

2. 照射与照后孵育

照射前将 CHL 细胞培养瓶中含 ^3H -TdR 的培养液弃去, 再用不含 ^3H -TdR 的 TC 199 液洗贴壁细胞两次, 加含 10% 小牛血清的 TC 199 液, 37℃ 下继续孵育 3 小时。之后, 用 0.05% 胰蛋白酶液消化分散细胞, 用 TC 199 液 (含 20% 小牛血清) 制成含 1×10^5 细胞/ml 的悬液, 于冰水浴中进行 ^{60}Co γ 线照射, 剂量率为 1 Gy/min, 照后的细胞于冰水浴中保存。在 DNA 断链重接修复实验中, 细胞受照后于 37℃, 在含 20% 小牛血清或不含任何血清的培养液中孵育到所需时间, 再保存于冰水中, 直至分析。

小鼠脾细胞用 ^3H -TdR 标记以后, 弃去含 ^3H -TdR 的培养液, 用不含 ^3H -TdR 的 RPMI 1640 液

洗细胞两次,并制成细胞悬液,于 37℃ 下继续孵育 3 小时。之后,换用不含血清的 RPMI 1640 液制成含 1×10^5 脾有核细胞/ml 的悬液,于冰水浴中进行 ^{60}Co γ 线照射。照射和照后孵育的方法同 CHL 细胞。

3. 羟基磷灰石(HA)的制备

基本按照 Tiselius 等方法进行^[5]。

4. HA 柱洗脱法

(1) 样品处理 取 0.1 ml 细胞悬液 (1×10^4 个细胞) 注入含 1 ml 解旋液 0.03 mol/L NaOH, 0.01 mol/L Na_2HPO_4 及 0.9 mol/L NaCl, pH 为 12.0 的试管中,立即将试管置于冰水浴中,于黑暗处静置 30 min,使细胞 DNA 发生解旋作用。之后,立即加入 1 ml 0.034 mol/L HCl(含酚红指示剂),调 pH 7~8。随即于冰水中用 CPS-1 型针形超声波破碎机超声 15 秒钟,使 DNA 分子量降至 2×10^5 道尔顿左右。每管加入 0.2 ml 2% 十二烷基硫酸钠(SDS),使蛋白质变性而后与 DNA 分离,混匀,置 4℃ 下保存。

(2) 洗脱 洗脱方法是按 Rydberg 等法^[3]略加修改后进行。洗脱液为 pH 6.8~6.9 的磷酸钾缓冲液(KPB)。除特殊说明外,洗脱速度为 0.15 ml/min。① 首先向每支层析柱内滴入 HA 悬浊液 3 ml(相当于 HA 干粉 0.5~1 g),再以 1.5 ml 的 0.5 mol/L KPB 和 1.5 ml 0.01 mol/L KPB 先后洗涤柱内 HA, KPB 靠重力自然流下。② 将含有约 0.2% SDS 的样品在 60℃ 下温浴数秒钟以使 SDS 溶解后,再将样品移于层析柱内 HA 上面。③ 样品全部进入 HA 后,加 3 ml 0.01 mol/L KPB 以洗去 SDS、NaCl、酚红及残余 ^3H -TdR。④ 在 60℃ 下每次以 3 ml 0.125 mol/L KPB(预热至 60℃)洗脱单链 DNA 两次,分别收集。⑤ 在 80℃ 下每次以 3 ml 0.25 mol/L KPB(预热至 80℃)洗脱双链 DNA 两次,分别收集。

5. 测定与计算

将收集的 0.125 mol/L 和 0.25 mol/L KPB 洗脱部分,用微量注射器吸取 100 μl 滴于 ϕ 25 mm 的玻璃纤维滤纸园片上,如此制成两个平行的玻璃纤维滤纸园片。在 60℃ 下烘干后加 5 ml 甲苯闪烁液(内含 0.4% PPO, 0.04% POPOP),于 Beckman L-9000 液闪计数器进行放射性计数。

计算:以 0.25 mol/L KPB 洗脱的双链 DNA 部分的放射性计数的百分数(ds DNA%)来衡量 DNA 单链断裂的程度。dsDNA% 值愈小,表示该细胞 DNA 解旋速率愈快,单链断裂愈严重。计算公式为:

$$\text{dsDNA}\% = \frac{0.25 \text{ mol/L KPB 洗脱部分的放射性总和}}{0.25 \text{ mol/L KPB 洗脱部分放射性总和} + 0.125 \text{ mol/L KPB 洗脱部分放射性总和}} \times 100\%。$$

结果及分析

1. 单链断裂

CHL 细胞悬液与小 鼠脾细胞悬液经 γ 线照射和经碱解旋后,两种细胞 DNA 中残留的双链 DNA 分子在总 DNA 中所占的百分率(即 dsDNA%),在 1~10 Gy 剂量范围内,均随剂量增加而呈线性降低,剂量与效应密切相关。其相关系数两种细胞均为 -0.99。显示两种细胞 DNA 的单链断裂均随剂量的增加呈线性增加(图 1)。

2. 重接修复

(1) 将受 10 Gy 和 30 Gy 照射的 CHL 细胞,于 37℃ 下孵育不同时间后,dsDNA% 随孵育时间

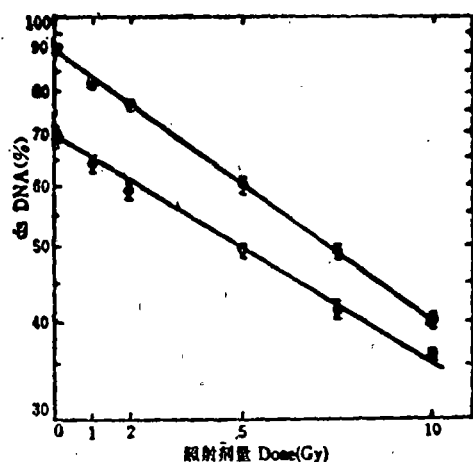


图 1 γ 线照射对小鼠脾细胞和 CHL 细胞 DNA 解旋速率的影响。

Fig. 1 Dose response of DNA strand separation for mouse spleen cells and CHL cells.

●—● CHL 细胞。CHL cells.

○—○ 脾细胞。mouse spleen cells.

$$ds\ DNA\ \% = \frac{\text{双链 DNA 放射性计数 (cpm)}}{\text{单双链 DNA 放射性计数总和 (cpm)}} \times 100\%$$

图中各点是三个样本的均值 $\pm$ SE。
 $ds\ DNA\ \% = [\text{Radioactive (cpm) of DNA double-strand} / \text{The total radioactive (cpm) of DNA single-and double-strand}] \times 100\%$

Each point is mean value of triplicate cultures, vertical bars represent SE.

的延长逐渐增加,表明 DNA 断链又重接修复。DNA 断链的重接修复,起始早、速度快、在照后孵育 30 min 内绝大部分断链已重接修复。结果还表明,受 10 Gy 照射的比受 30 Gy 照射的 CHL 细胞 DNA 断链的重接修复更加迅速和完全,受 10 Gy 照射后在含小牛血清的培养液中比在无血清培养液中孵育,其断链重接比较迅速和完全。细胞受 10 Gy 和 30 Gy 照射后,其 DNA 断链的重接过程均不是匀速进行的,孵育刚开始重接速度较快,随孵育时间的延长逐渐减慢;10 Gy 照射者,断链在 60 min 之内似能全部重接,而 30 Gy 照射者,断链重接曲线在 30 min 以后出现平坦部分,重接不再有明显增加(图 2.A)。

(2) 小鼠脾细胞受 10 Gy γ 线照射后,在无血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃ 孵育不同时间后,其 DNA 断链未显示明显的重接修复作用;而在此培养条件下,按前文所述方法^[4]通过 ^3H -TdR 在 DNA 的掺入表明,脾细胞 DNA 的生物合成可以进行(图 2.B)。

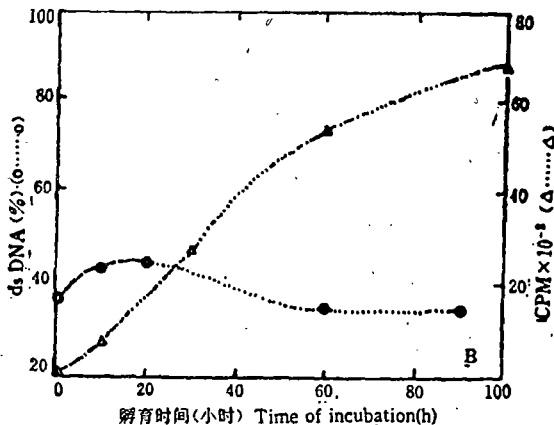
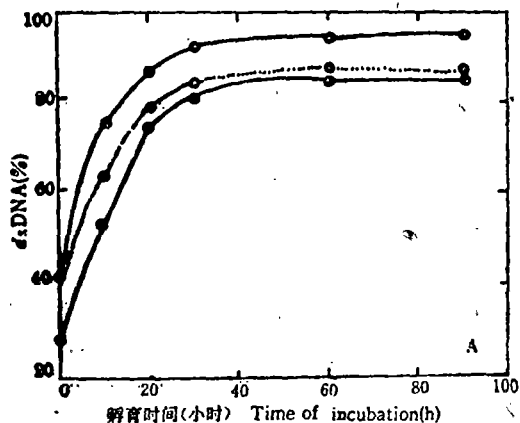


图 2 CHL 细胞(A)和小鼠脾细胞(B)受照后 DNA 断链的重接修复。

Fig. 2 Repair of radiation induced DNA strand breaks in CHL cells (A) and mouse spleen cells(B).

细胞受照后在含小牛血清(○—○10 Gy, ●—●30 Gy)或不含血清(○·····○10 Gy, △—△DNA 合成)的培养液中孵育。各点为三个样本的均值。

The cells were incubated in medium with 20% new born Calf serum(○—○10 Gy, ●—●30 Gy) or without any serum (○·····○10 Gy, △·····△DNA synthesis),

Each point represents mean value of triplicate observations,

讨 论

Ahnström 和 Erixon 首先报道哺乳动物细胞受照射以后, 其 DNA 在碱性溶液中由双链向单链转化的速率增加^[2], 随后这一方法得到 Rydberg 的进一步发展^[3]。Jolley 等采用等密度超离心技术建立了与 Ahnström 等类似的方法^[6], Kohn 等建立了单链 DNA 的碱洗脱技术^[7]。近年来国内开始用羟基磷灰石离心法与荧光测定 DNA 相结合, 对照射引起细胞 DNA 链断裂和再接的规律进行了研究^[8,9]。本文应用羟基磷灰石柱层析法结合 DNA 放射性同位素标记和测定技术, 对 γ 线引起的细胞 DNA 单链断裂和重接修复进行了探讨。

结果表明, 在 1~10 Gy 剂量范围内, γ 线引起 CHL 细胞和离体小鼠脾细胞 DNA 单链断裂的严重程度与剂量呈线性相关。启示本法不仅可用于研究培养细胞也可用于研究离体动物组织细胞 DNA 损伤的规律。

从图 1 可知, 两条曲线的截矩有较大差别: 未受照脾细胞的 dsDNA% 仅为 70%, 而未受照 CHL 细胞的 dsDNA% 为 91.5%, 且这一差别也存在于两曲线各相应剂量组。这可能是由于离体脾细胞①在分离过程中 DNA 模板受损伤, 使其复制的 ^3H -DNA 易于解旋、②对体外培养缺乏适应, 使合成的 ^3H -DNA 易于解旋、③合成的 ^3H -DNA 受体外非生理条件的作用引起链断裂。这样在每个剂量组离体脾细胞 DNA 链断裂, 是辐射引起的和上述非辐射条件引起的链断裂的总和。而 CHL 细胞能适应培养条件, 非辐射性链断裂轻微, 在每个剂量组其 DNA 链断裂主要是照射所致。显然, 非辐射性链断裂是脾细胞剂量-效应曲线下移的主要原因。另一方面, 这两条曲线几乎平行, 二者斜率接近 (分别为 0.6 与 0.7 左右), 表明单位剂量的 γ 线照射使两种细胞 DNA 单链断裂的程度相似。

图 2 表明, CHL 细胞受 10 Gy γ 线照射后, 在含小牛血清的培养液中比在无血清培养液中解育, 其断链重接更为迅速和完全, 说明断链再接与细胞培养条件密切相关。与人血淋巴细胞实验结果相似^[10], 离体脾细胞受 10 Gy γ 线照射后在无血清的 RPMI 1640 液中解育, DNA 断裂未能重接, 这可能是由于脾细胞 DNA 修复系统在此条件下未能启动或其活性受抑之故。相反, 离体脾细胞在此条件下可进行 DNA 的生物合成, 启示细胞在进行这两个生物学过程时需要不同的培养条件。对于影响哺乳细胞 DNA 断链重接的因素及作用机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 夏寿萱, 中华放射医学与防护杂志, 3(2), 61~64 (1983).
- [2] G. Ahnström, and K. Erixon, Int. J. Radiat. Biol. 23, 285~289 (1973).
- [3] B. Rydberg, Radiat. Res. 61, 274~287 (1975).
- [4] 孟紫强, 动物学报, 32(2), 194~195 (1986).
- [5] G. Bernardi, In: Methods in Enzymol. V 21, part D. (Grossman, L. & K. Moldave, eds) pp 95-139. Academic Press New York-London. (1971).
- [6] G. M. Jolley, and M. G. Ormerod, Biochim Biophys Acta, 353, 200~214 (1974).
- [7] K. W. Kohn and R. A. Grimek-Ewig, Cancer Res. 33, 1849-1853 (1975).
- [8] 郑秀龙等, 辐射研究与辐射工艺学报, 3(1), 28~33 (1985).
- [9] 刘楠等, 生物化学与生物物理进展, (1), 42~46 (1985).
- [10] 胡斌等, 中华放射医学与防护杂志, 3(3), 25~27 (1983).

(1986年5月4日收到)

RADIATION-INDUCED DNA SINGLE STRAND BREAKS AND THEIR REJOINING IN MAMMALIAN CELLS BY HYDROXYLAPATITE CHROMATOGRAPHY

Meng Ziqiang

(Department of Environmental Sciences, Shanxi University, Taiyuan)

ABSTRACT The ^{60}Co γ -ray induced single strand breaks of DNA and their rejoining in cultured chinese hamster lung (CHL) cells and mouse spleen cells isolated freshly from mice were detected by hydroxylapatite chromatography. The method is based on the observation that the rate of denaturation of DNA to single strands in alkali is increased after irradiation, the interpretation being that this effect is due to DNA strand breaks. The percentage of labeled DNA that remained double strand after 30 min alkali treatment was inversely proportional to the radiation dose within the range of 1-10Gy for the two kinds of cells.

The DNA strand breaks in unirradiated spleen cells was more than in unirradiated CHL cells, but the yield of breaks induced per 0.01Gy was found to be similar in the spleen cells and CHL cells. In contrast with these findings, most DNA strand breaks in the CHL cells were rejoined within 30min, the breaks were rejoined faster in the cells incubated in medium with 20% new born calf serum after irradiation than in medium without any serum. The repair of damaged DNA could not be detected in the spleen cells cultured in RPMI 1640 medium without any serum.

KEY WORDS Hydroxylapatite chromatography; DNA strand breaks; DNA repair; CHL cells; Mouse spleen cells.

简 讯

放射增敏研究及其它在肿瘤放疗上的应用学习班举办

辐射研究与工艺本学会委托上海医科大学放射医学研究所于87年9月3日~8日,举办了首次“放射增敏研究及其它在肿瘤放疗上的应用”全国学习班,学员来自北京、天津、南京、沈阳、浙江、上海等地。学习班由英国医学研究委员会放射生物研究所 Ian. J. Stratford 博士主讲,同时邀请国内有关专家林念芸、刘仁忠、沈瑜、刘泰福、徐素娟、郑秀龙以及上海医科大学中山医院汤剑猷教授,肿瘤医院院长曹世龙教授进行讲学。学习班内容比较系统全面,最后 Stratford 博士综合介绍了不久前在英国爱丁堡召开的第8届国际辐射研究会议中有关放射增敏研究的最新进展。学员普遍反映收益很大,这次学习班对我国今后放射增敏研究的开展,将起有一定的推动作用。

(上海医科大学放射医学所金一尊报道)