

聚合酶 β 在肝癌细胞DNA辐射损伤修复中的作用

蔡建明 郑秀龙 高建国 李百龙 杨立锡 杨如俊

(第二军医大学放射医学研究所, 上海 200433)

罗成基 程天民

(第三军医大学防原教研室, 重庆 630038)

摘要 利用第二军医大学裸鼠移植性肝癌细胞(SMMC-LTNM)和不同的DNA聚合酶选择性抑制剂NEM与 d_2 TTP,探讨了肿瘤细胞核中DNA聚合酶 β 参与 γ 射线辐射损伤DNA修复的作用特点。结果表明,该酶参与真核细胞 γ 射线辐照损伤的DNA修复合成,是一种重要的DNA修复酶,与正常肝细胞相比,SMMC-LTNM肝癌细胞DNA聚合酶 β 的DNA修复合成反应速度快,修复能力强。提示某些肿瘤细胞中该酶的DNA辐射损伤修复合成功能比正常细胞的大。

关键词 脱氧核糖核酸聚合酶 β , 脱氧核糖核酸修复, SMMC-LTNM肝癌, γ 射线

聚合酶 β (以下简称 β 酶)是真核细胞内五种DNA聚合酶之一,其生物学功能尚未彻底阐明,研究资料提示^[2],该酶可以参与DNA紫外线照射和化学性损伤的修复,更近的一些报道还提示,该酶同肿瘤的发生和疗效可能有联系。前期研究则表明^[1,2], β 酶参与了真核细胞内DNA γ 射线辐射损伤修复合成过程,是一种重要的DNA修复酶,在此基础上,本文进一步探讨正常肝细胞和肝肿瘤细胞中 β 酶参与DNA γ 射线辐射损伤修复合成的不同。

1 材料与 方法

1.1 动物和关键试剂

BALB/c 和 NC 成年裸鼠,第二军医大学病理解剖学教研室裸鼠房提供,每鼠皮下接种有SMMC-LTNM肝癌细胞,瘤重1.5g左右时解剖取样。 β 酶,美国德克萨斯大学分子科学中心Rawson教授赠。氘-胸腺嘧啶核苷三磷酸(^{3} H-TTP),上海原子核所产品。N-乙基马来酰亚胺(NEM),中科院上海生化所东风厂产品。2',3'-双脱氧胸腺嘧啶核苷三磷酸(d_2 TTP),Boehringer公司产品。

1.2 样品照射

参照前文^[2]制备肝癌和正常肝细胞核悬液与小牛胸腺DNA溶液。辐照时,将小牛胸腺DNA溶液或细胞核悬液分装入Eppendorf小管,置冰浴中,距 ^{60}Co 源0.6~1.5m处,按实验需要以不同的剂量或不同的剂量率进行照射。

1.3 DNA含量测定

国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 初稿 1995-09-12, 修改稿 1995-10-31

参考文献[3]。

1.4 DNA 修复合成检测^[1]

在硅化的小试管内加入 0.1 ml 待测样品和 0.1 ml 反应液, 内含 ATP 2 mmol/L, dCTP、dGTP、dATP 各 1 mmol/L, ^3H -TTP $3.7 \times 10^4 \text{ Bq}$, pH 8.5 Tris Cl, 再按需要加入终浓度为 10 mmol/L 的 NEM 或 d_2TTP ($\text{d}_2\text{TTP}/\text{dTTP}$ 的比值为 2.5), 经适当平衡后于 37℃ 恒温振荡水浴中保温 120 min, 加入 1 ml 反应终止液, 然后收集 DNA 样品, 用液体闪烁计数器测定样品中的放射性强度。修复合成的程度以 “Counts·min⁻¹· μgDNA^{-1} ” 表示。

2 结 果

2.1 β 酶的 DNA 辐射损伤修复合成作用

2.1.1 无细胞体系中 DNA 辐射损伤修复合成 将受与未受 10 Gy ^{60}Co γ 射线照射(剂量率 5 Gy/min)的小牛胸腺 DNA 水溶液, 加入修复合成检测体系, 再加入人工提取的 β 酶, 避免了细胞核内其它酶的干扰。利用酶-底物单纯反应体系, 获取 β 酶参与 DNA γ 射线辐射损伤修复合成的直接证据。结果见图 1, 可见受照射 DNA 中 ^3H -TTP 掺入率显著高于未照射组 ($p < 0.01$), 这种 ^3H -TTP 掺入率增高可以被 β 酶专一性抑制剂 d_2TTP 所抑制, 但不受对 β 酶无抑制效应的 NEM 的影响。

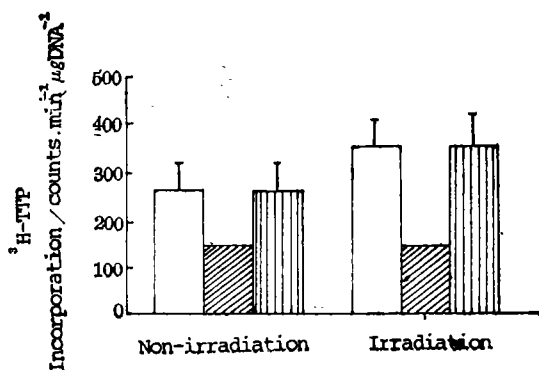


Fig 1. The effects of selective inhibitors on DNA repair synthesis induced by DNA polymerase β
(□) No inhibitor (▨) d_2TTP (▤) NEM

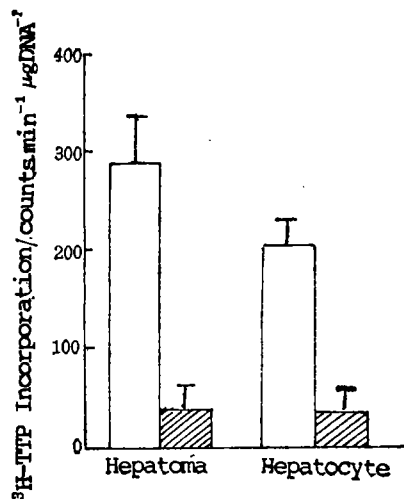


Fig 2. The inhibitive effect of d_2TTP on the DNA repair synthesis induced by polymerases in nuclei of hepatoma and hepatocyte
(□) control (▨) d_2TTP

2.1.2 受照射肝癌和正常肝细胞核内 DNA 的修复合成 细胞核悬液照射 10 Gy 后, 再以 10 mmol/L NEM 选择性抑制核内除 β 酶以外的其它几种 DNA 聚合酶, 测定核内 DNA 修复合成, 并与未照射细胞核相比较。发现两种受照射细胞核内 ^3H -TTP 掺入率均显著高于未照射组 ($p < 0.05$, 见表 1); 为进一步明确受照射细胞核 DNA 中 ^3H -TTP 掺入率增加是否由 β 酶所诱导, 把两种细胞核各分成两组, 一组加入 β 酶抑制剂 d_2TTP , 另一组不加 d_2TTP 作为对照组, 两组细胞核均经照射 10 Gy 后进行 DNA 修复合成检测, 结果如图 2 所示, 无 d_2TTP 组受照射细胞核内 ^3H -TTP 掺入率较高, 加有 d_2TTP 的受照射细胞核内 ^3H -TTP 掺入率增加不明显, 两组间有显著差别 ($p < 0.05$)。

Tab 1. The effect of DNA polymerase β on the repair of γ -ray irradiated nuclei DNA with different dose rate($\bar{x} \pm s$)

Dose rate/Gy min ⁻¹	³ H-TTP Incorporation/counts·min ⁻¹ · μ g DNA ⁻¹	
	Hepatoma nuclei	hepatocyte nuclei
1	281 $\pm$ 50 ⁽¹⁾	207 $\pm$ 24 ⁽¹⁾
5	282 $\pm$ 27 ⁽¹⁾	204 $\pm$ 18 ⁽¹⁾
10	284 $\pm$ 37 ⁽¹⁾	208 $\pm$ 22 ⁽¹⁾
Control	236 $\pm$ 35	179 $\pm$ 17

n = 7 ⁽¹⁾P < 0.05 vs control group

2.2 肿瘤细胞与正常细胞 β 酶 DNA 辐射损伤修复合成作用比较

不同的细胞, 由于其修复酶的种类与活力等不同, 其 DNA 修复功能可以有差异, 实验以 SMMC-LTNM 肝癌细胞和裸鼠正常肝细胞为研究对象, 探讨细胞中 β 酶的 DNA 修复合成作用有无不同。从表 2 可见, 在相同的反应条件和相同的照射剂量(10 Gy)下, 各照射率组别中, 肝

Tab 2. The comparison of the increment of ³H-TTP incorporation of irradiated hepatoma nuclei with that of hepatocyte nuclei/Counts min⁻¹· μ g DNA⁻¹, ($\bar{x} \pm s$)

Dose rate/Gy min ⁻¹	Increment of ³ H-TTP Incorporation	
	Hepatoma nuclei	Hepatocyte nuclei
1	45 $\pm$ 8.0 ⁽¹⁾	28 $\pm$ 2.0
5	46 $\pm$ 4.4 ⁽¹⁾	29 $\pm$ 4.1
10	48 $\pm$ 6.3 ⁽¹⁾	32 $\pm$ 5.1

n = 7 ⁽¹⁾P < 0.01 vs hepatocyte nuclei group

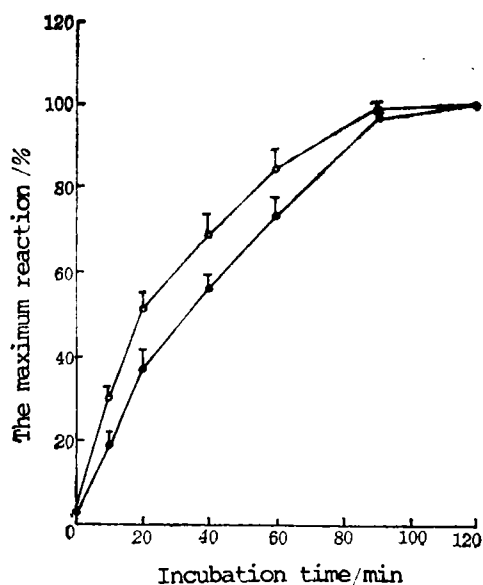


Fig 3. The extent of ³H-TTP incorporating into irradiated nuclei of hepatoma and hepatocyte at different incubation time induced by DNA polymerase β (○) Hepatoma (●) Hepatocyte

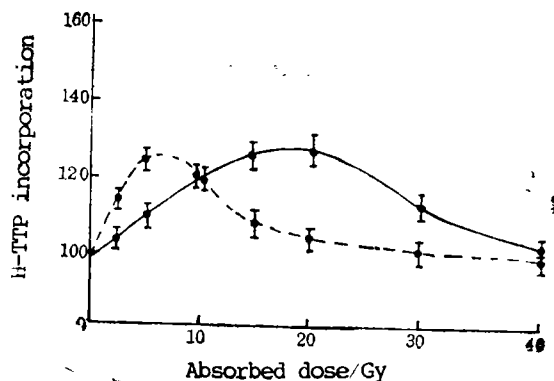


Fig 4. The DNA repair synthesis induced by DNA polymerase β from hepatoma and hepatocyte nuclei at different doses (---)hepatoma (—) hepatocyte n = 6

癌细胞核 ^3H -TTP 掺入率的增加(照射组细胞核 DNA ^3H -TTP 掺入率-未照射组细胞核 DNA 中 ^3H -TTP 掺入率)均明显大于正常肝细胞($p < 0.01$)。

进一步研究发现,两种细胞核内 β 酶在修复合成反应速度上有明显差别,肝癌细胞核 ^3H -TTP 掺入率达最大值 50% 水平所需时间,明显小于正常肝细胞,前者需 18 min,而后者则需 32 min 左右(图 3)。不仅如此,不同剂量照射下上述两种细胞内 ^3H -TTP 掺入率达最大值时,对应的吸收剂量也有区别,见图 4。

3 讨 论

已有的研究表明,电离辐射引起的 DNA 各类损伤,在一定条件下能发生不同程度的修复,但它们的修复机理十分复杂,一种损伤可能有多种修复途径,一种修复途径也可用于处理多种损伤,是一个十分复杂的酶促化学反应过程,不少重要问题远未阐明, β 酶的修复功能就是其中之一^[4,5]。

图 1 结果证明, β 酶确实参与 γ 射线辐射损伤 DNA 的修复合成,因为在获得这一结果时,反应体系中除 β 酶外无其它 DNA 修复酶的存在,受照射 DNA 中 ^3H -TTP 掺入率的增加,直接反映出 β 酶催化受损 DNA 的修复合成,比以往采用细胞核的研究更有说服力。

更令人感兴趣的是,实验发现 β 酶不仅可以参与肝癌细胞和正常肝细胞核中 DNA 辐射损伤的修复合成,并且这两类细胞核内 β 酶的修复作用有差异。与正常肝细胞相比,SMC-LTNM 肝癌细胞核内 β 酶的作用有如下特点,(1) DNA 辐射损伤修复合成的反应速度较快,(2) 核 DNA 中 ^3H -TTP 掺入量较大,(3) 核内 ^3H -TTP 掺入率最大时的受照射剂量比正常肝细胞低。这些特点总的说明,肝癌细胞内 β 酶较正常细胞的 DNA 辐射损伤修复合成作用强。产生这些特点的主要原因,发现与细胞内该酶基因转录活跃,表达过度 and 酶活力较高有关(另文发表)。因此,肝癌细胞 β 酶的这些作用特点,可能增加了肿瘤细胞 DNA 辐射损伤修复能力,削弱射线对肿瘤细胞的杀伤作用,使某些肿瘤对放/化疗耐受性提高,复发几率增加。根据本实验结果,认为应对这些肿瘤中 β 酶的生物学特性作进一步研究,并且可尝试通过选择性抑制肿瘤细胞内 β 酶的 DNA 修复作用,提高肿瘤的放/化疗效果。

参 考 文 献

- 1 Cai Jianming et al. J. Med. Coll. PLA., 1995, 10: 75
- 2 蔡建明,郑秀龙,高建国等. 中华放射医学与防护杂志, 1995, 15(2): 99
- 3 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术, 高等教育出版社, 1987 第一版, 219
- 4 Wang T S F. Ann. Rev. Biochem., 1991, 60: 513
- 5 Bardwell A J et al. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1994, 726: 281

THE ROLES OF DNA POLYMERASE β IN HEPATOMA CELLS DNA REPAIR SYNTHESIS AFTER γ -RAY IRRADIATION

Cai Jianming Zheng Xiulong Gao Jianguo Li Bailong Yang Lixi Yang Rujun
(Department of Radiation Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Luo Chengji Cheng Tianmin

(Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 630038)

ABSTRACT The roles and characteristics of DNA polymerase β of hepatoma cells in participating in DNA repair synthesis induced by ^{60}Co γ -rays irradiation were studied. Transplanted SMMC-LTNM hepatoma in mice was used as a tumor cells model. NEM and d_2TTP were used as selective inhibitors to DNA polymerase α and β respectively. It was showed that the polymerase β could take part in repair synthesis of DNA damaged by γ -rays. The increment of ^3H -TTP incorporation into DNA of SMMC-LTNM hepatoma cells nuclei was higher than that of normal hepatocyte nuclei ($P < 0.01$). The DNA repair synthesis induced by DNA polymerase β reacted more fast in hepatoma cells nuclei than in hepatocytes nuclei too. These results indicated that the DNA repair synthesis of polymerase β in some tumor cells might be stronger than normal cells.

KEYWORDS DNA polymerase β , DNA repair, SMMC-LTNM hepatoma, γ -radiation