

荧光法检测辐射所致肿瘤细胞 DNA 链断裂与3-氨基苯甲酰胺对重接修复的抑制

贺 涛 夏寿萱

(放射医学研究所, 北京)

摘要 采用简化的 DNA 解旋荧光法(FADU), 检测 HeLa S3 细胞在受到 γ 射线照射后的 DNA 链断裂, 在 10 Gy 以内, 剂量效应曲线呈线性。ADP-核糖基转移酶特异性抑制剂 3-氨基苯甲酰胺(3AB), 在无毒性浓度下可以抑制 HeLa S3 细胞 DNA 链断裂重接, 并可降低 HeLa S3 细胞照射后活存率。3AB 单独与 HeLa S3 细胞保温, 不造成 DNA 链断裂, 同时未见对细胞有毒性反应。3AB 可以作为有希望的放疗增敏剂深入研究。

关键词 DNA链断裂重接, ADP-核糖基转移酶, 3-氨基苯甲酰胺(3AB), 放疗增敏

DNA 是电离辐射和化学毒物攻击的主要靶分子, 检测 DNA 损伤对于了解损伤程度及细胞对 DNA 损伤的修复机理, 具有重要的意义。在电离辐射所致的 DNA 不同类型的损伤中, 链断裂是主要形式。目前, DNA 链断裂的常用检测方法有^[1]: 蔗糖密度离心法、滤膜洗脱法、羟基磷灰石法等。但以上方法均有操作复杂费时的缺点。1981年, Birboim等^[2]报道了一种新型的 DNA 损伤快速检测法, 即 DNA 解旋的荧光检测法(Fluorometric Assay of DNA Unwinding, 简称 FADU), 其后 Thierry^[3]又加以改进。此法以染色质 DNA 对碱的稳定性和溴乙锭(EB)嵌入 DNA 所发荧光的强弱为基础, 不需放射性同位素标记, 具有简便、快速、灵敏的优点。

ADP-核糖基转移酶(ADPRT)是广泛存在于真核细胞核的核内酶, ADPRT 参与细胞内多种重要的生理过程^[4]。近年来发现, ADPRT 活力在细胞 DNA 受到损伤后显著上升, 特别是 DNA 链断裂的形成, 对 ADPRT 活力上升刺激最强^[5]。已有资料表明, ADPRT 活力上升是启动 DNA 修复的必要条件。因此, 以 ADPRT 特异性抑制剂探讨此酶的作用过程并作为增强辐射损伤的一条途径引起了广泛的兴趣。

本文应用改进的 FADU 法检测 γ 射线所致入 HeLa S3 细胞 DNA 链断裂, 并观察了 ADPRT 特异性抑制剂 3-氨基苯甲酰胺(3-aminobenzamide, 3AB)对 HeLa S3 细胞 DNA 链断裂重接修复的抑制, 以及 3AB 对 HeLa S3 细胞辐射后活存的影响, 为临床上进行肿瘤的放射治疗时使用 3AB 作为增敏剂提供理论依据。

材料与 方法

1. 细胞培养

人 HeLa S3 细胞(日本京都大学放射线生物研究中心池永满生教授惠赠)培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 内加终浓度为 100 Iu/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 饱和湿度下培养。

2. 照射与药物处理

^{60}Co γ 射线, $0-4^\circ\text{C}$ 照射, 剂量率为 $1.19-1.06\text{ Gy/min}$ 。—3 AB(日本京都大学石崎宽治博士赠送与本所合成室合成)溶于无血清 DMEM 培养液中, 通过孔径为 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤除菌, 于照前 $15-30\text{ min}$ 加入细胞悬液。

3. 荧光法检测 DNA 链断裂

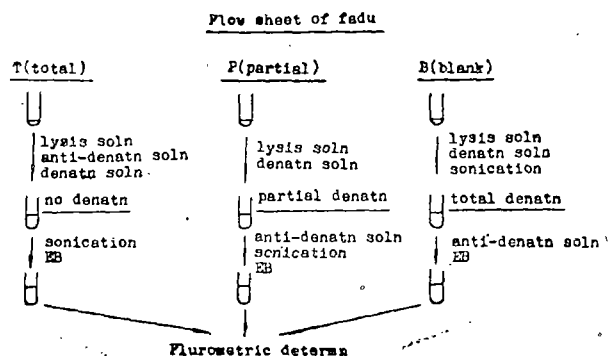
(1) 试剂与仪器: 裂解液(9 mol/L 尿素, 10 mmol/L NaOH, 2.5 mmol/L EDTA- Na_2 , 0.3% Sarkosyl), 变性液 I (0.45 体积裂解液溶于 0.2 mol/L NaOH), 变性液 II (0.4 体积裂解液溶于 0.2 mol/L NaOH), 抗变性液(1 mol/L 葡萄糖, 14 mmol/L 巯基乙醇), 溴乙锭液 ($1.0\text{ }\mu\text{g/m}$ EB, 13.3 mmol/L NaOH), MSE-150 超声波仪, 日立 MPF-4 荧光分光光度计。

(2) 检测过程: 参见流程图, 详细步骤见另文^[6]。

(3) 数据处理: 计算碱变性后对照与照射细胞 DNA 残存双链百分数, 分别以 D_0 与 D_1 表示。为获得直线型剂量-效应关系曲线, 引入 Q_d 值, $Q_d = 100(\log D_0 - \log D_1)$, Q_d 值的大小反映了 DNA 链断裂程度的高低。

4. 细胞活存测定

照射与对照细胞按一定比例稀释, 种入培养皿, 培养 $12-14\text{ d}$, 中期换液一次。计数前, 倾去培养液, 用 95% 乙醇固定, 结晶紫染色, 计数大于 50 个细胞的克隆。



结 果

1. 细胞 DNA 含量与相对荧光强度的关系

一定量未照射的 HeLa S3 细胞经裂解, 在未变性的条件下, 加入溴乙锭溶液, 检测相对荧光强度。以小牛胸腺 DNA 作为标准 DNA, 溶于 SSC 溶液(0.15 mol/L NaCl, 15 mmol/L 柠檬酸钠), 加入溴乙锭溶液, 同样检测荧光强度, 结果见图 1。可知在 $2.5 \times 10^2 - 4 \times 10^5$ 细胞数条件下, 细胞 DNA 量与相对荧光强度呈线性关系, $r = 0.9975$ 。在以下实验中选用 2×10^5 细胞/样品, 以便于操作、计算和比较。

由荧光扫描曲线可知, 激发光谱峰值在 $510-530\text{ nm}$, 发射光谱峰值在 $590-600\text{ nm}$ 。本实验选择激发光 520 nm , 发射光 590 nm 作为工作波长。

2. 荧光法检测 HeLa S3 细胞照后 DNA 链断裂

对数生长期 HeLa S3 细胞制成 PBS 悬液(10^6 细胞/ml), 冰浴 10 min 后照射, 照后立即用荧光法检测 DNA 链断裂。 10 Gy 剂量范围内的 DNA 链断裂效应曲线见图 2, 线性关系良好, 相

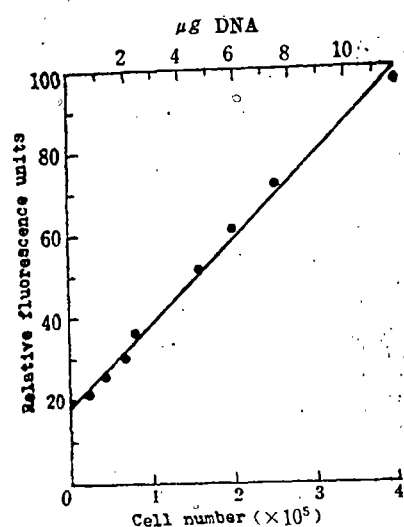


Fig 1. Fluorescence enhancement of EB by HeLa S3 cells

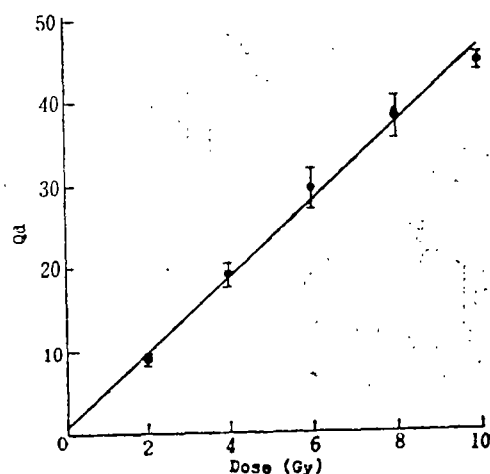


Fig 2. Dose-response curve of DNA strand breaks in γ -irradiated HeLa S3 cells $\bar{x} \pm S. E.$, $n=4$ (quadruplicate determinations in each experiment)

关系数 $r = 0.9995$ 。表明 DNA 解旋的荧光法适用于检测 HeLa S3 细胞受 γ 射线照射后形成的 DNA 链断裂。

3. 3 AB 对细胞的毒性

4 或 8 mmol/L 3 AB 与 HeLa S3 细胞在 37℃ 保温 1 h 后, 经 FADU 法检测 DNA 链断裂, 发现 DNA 残存双链百分数与对照细胞无差别, 表明在此条件下, 小于 8 mmol/L 3 AB 与细胞温育 1 h 内不产生 DNA 链断裂。

HeLa S3 细胞按一定比例种入培养皿, 加入终浓度为 1、2、4、8 mmol/L 3 AB, 96 h 后换液除去 3 AB, 继续培养一周, 固定, 染色, 计数克隆。3 AB 对克隆形成能力的影响见表 1, 表中数据以活存分数表示, 经单因素方差分析, 结果 $p > 0.05$, 说明在 3 AB 浓度不超过 8 mmol/L, 药物与细胞接触时间小于 96 h 时, 3 AB 对 HeLa S3 细胞克隆形成能力没有影响。

4. 3 AB 对 HeLa S3 细胞照射后链断裂重接的抑制作用

将对数生长期 HeLa S3 细胞制成 PBS 悬液 (10^6 /ml)。照射前 15--30 min 加入 3 AB, 药物

Tab 1. Effect of 3-Aminobenzamide on the Clone Formation of HeLa S3 Cells

Expt No.	3AB (mmol/L)				
	0	1	2	4	8
1	1.00	0.96	1.00	0.94	1.08
2	1.00	1.06	1.19	1.06	0.91
3	1.00	0.87	0.85	0.82	0.70
4	1.00	0.91	0.96	1.09	0.87
5	1.00	1.02	0.97	0.89	0.98
X	1.00	0.96	1.00	0.98	0.91
SD	—	0.08	0.12	0.11	0.14

Figure expressed as survival fraction

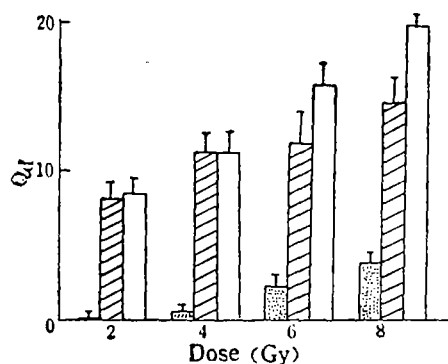


Fig 3. Inhibition of rejoining of radiation induced DNA strand breaks by 3-aminobenzamide.
 $\bar{x} \pm S.E.$, $n = 8-12$.

(□) 37°C 30 min. after irradiation
 (▨) 37°C 30 min. with 4 mmol/L 3 AB after irradiation
 (▧) 37°C 30 min. with 8 mmol/L 3 AB after irradiation

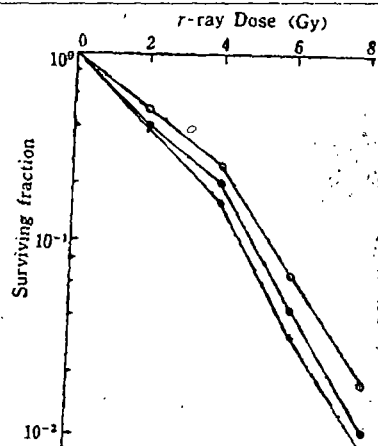


Fig 4. Effect of 3-aminobenzamide on the survival of γ -irradiated HeLa S3 cells

(○—○) no 3AB (•—•) 4 mmol/L 3AB
 (×—×) 8 mmol/L 3AB
 $P < 0.01$ for all points with 3 AB vs no 3 AB except the point of 4 mmol/L 3 AB, 4 Gy, no statistic difference between 4 mmol/L and 8 mmol/L 3 AB.

终浓度为 4 或 8 mmol/L; 照射后 37°C 水浴保温 30 min, 荧光法测定 DNA 链断裂, 以修复后残存 DNA 链断裂(Q_d 值)表示, 结果见图 3。

由图 3 可以看出, 当未经 3 AB 处理的受照细胞保温 30 min 后, 残存 DNA 链断裂很少, 8 Gy 照射后 Q_d 值仅为 3.7, 表明辐射所致 DNA 链断裂已基本修复, 这与以前的研究结果一致^[7]。当 4 或 8 mmol/L 存在时, 残存 DNA 链断裂明显增加, 随着照射剂量和 3 AB 浓度的增大, 代表残存 DNA 链断裂的 Q_d 值也增大。经多元回归实验分析, 有无 3 AB 之间差别显著($p < 0.01$), 3 AB 不同浓度之间差别不显著。表明 3 AB 可以抑制 HeLa S3 细胞经 γ 射线照射后 DNA 链断裂重接修复。

5. 3 AB 对 HeLa S3 细胞照射后活存的抑制作用

对数生长期 HeLa S3 细胞制成一定浓度的细胞悬液, 3 AB 在照射前 15—30 min 加入, 终浓度为 4 或 8 mmol/L。照射后种于培养皿中, 保持 4 或 8 mmol/L 3 AB 浓度, 72 h 后换液时去除 3 AB, 继续培养 10 d, 固定, 染色, 计数克隆。3 AB 对 HeLa S3 细胞照射后活存的抑制见图 4。图中细胞活存以活存分数(S. F.)表示。可以看出, γ 射线照射后可以使 HeLa S3 细胞活

Tab 2. Inhibition of the Survival in γ -irradiated HeLa S3 Cells by 3-Aminobenzamide

Treatment	D_{37} (Gy)	ER
no 3AB	2.83	
4 mmol/L 3AB	2.08	1.36
8 mmol/L 3AB	2.04	1.39

ER, Enhancement Ratio

存降低, 3 AB 存在可以显著加强 γ 线照射对 HeLa S3 细胞的杀伤能力。为定量说明 3 AB 的增效效果, 计算了不同浓度 3 AB 相应的增强比, 见表 2, 其中 $ER = (\text{无 3 AB 时 } D_{37}) / (\text{加入 3 AB 时 } D_{37})$

讨 论

FADU 方法的建立是基于以下几点: (1) DNA 双螺旋遇碱会发生解旋; (2) 当 DNA 中存在链断裂, 这种解旋速度加快; (3) 溴乙锭(EB)可以嵌入双螺旋而引起荧光值增高。因此, 凡可造成直接、间接 DNA 链断裂的损伤均可由此方法检测出来。直接链断裂可由 γ 、X 射线造成, 烷化剂形成的加成物在 DNA 切除修复中也可造成间接链断裂, 另外碱不稳定部位在此方法处理条件下也可产生链断裂。在 γ 射线照射后, 一般认为双链断裂仅占单链断裂的 $1/15-1/20^{[8]}$, 因此可以认为本文检测的损伤基本上为 DNA 单链断裂。

Birboim^[2] 首次建立的 FADU 方法是以人淋巴细胞为材料; 此后 Thierry^[3] 简化此法时亦以静止细胞为材料; Heussen^[9] 等将此法应用于分离的染色质, 以探讨辐射后染色质结构的变化; 本文以人 HeLa S3 肿瘤细胞为材料, 也获得了成功的结果, 表明此方法用于检测 DNA 损伤具有一定的普遍意义。此法快速、简便、灵敏, 可以应用于辐射与毒物所致的 DNA 损伤与修复的研究。

ADPRT 是以 NAD 为底物合成聚(ADP-核糖), γ 射线照射后形成的 DNA 链断裂可以强烈激活此酶。文献报导^[10] 此酶活性与 DNA 损伤修复过程中的连接步骤有关, 近年来以 ADPRT 抑制剂研究此酶在 DNA 损伤修复中的作用及抑制剂本身作为辐射、化疗增敏剂引起了广泛兴趣。本文观察到经不同剂量 γ -线照射后, 37℃ 保温 30 min, DNA 链断裂大部分被修复, 即使 8 Gy 照射修复 30 min 后残存 DNA 链断裂(Q_d 值)也仅为未修复时的 10%。若在照射前向细胞悬液中加入 3 AB, 且在照射后修复过程中继续维持其浓度, 修复后残存 DNA 链断裂(Q_d 值)增加, 表明 DNA 链断裂重接受到抑制, 这为 3 AB 作为辐射增敏剂提供了理论基础。

从以上 DNA 链断裂重接与细胞活存的实验结果可以看到, 3 AB 对 HeLa S3 细胞照射后 DNA 链断裂重接与细胞存活都有抑制作用, 同时在相应的浓度范围内, 3 AB 对细胞没有毒性, 值得作为一个有希望的增敏剂进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 夏寿萱, 中华放射医学与防护, 3(2), 61, (1983)。
- [2] H. C. Birboim and J. J. Jevcak, Cancer Res., 41, 1189(1981)。
- [3] D. Thierry, O. Rigaud, I. Duranton, E. Moustacchi and H. Magdelenat, Radiat. Res., 102, 347(1985)。
- [4] K. Ueda and O. Hayaishi, Ann. Rev. Biochem., 54, 73(1985)。
- [5] N. A. Berger, Radiat. Res., 101, 4(1985)。
- [6] 贺涛、夏寿萱, 军事医学科学院院刊 14, 170(1990)。
- [7] 章扬培、夏寿萱、徐惠英, 生物化学与生物物理进展, (1), 37(1983)。
- [8] 朱壬葆, 辐射生物学, 科学出版社, 北京, 1987, 第118—120页。
- [9] C. Heussen, Z. Nackerdien, B. J. Smit and L. Bohm, Radiat. Res., 110, 84(1987)。
- [10] D. Creissen and S. Shall, Nature, 296, 271(1979)。

(稿件收到日期: 1989 年 3 月 6 日)

DETECTION OF RADIATION-INDUCED DNA DAMAGE AND INHIBITION OF REPAIR BY 3-AMINOBENZAMIDE USING FLUOROMETRIC ASSAY OF DNA UNWINDING

He Tao and Xia Shouxuan

(Institute of Radiation Medicine, Beijing)

ABSTRACT Simplified fluorometric assay of DNA unwinding was used to detect DNA strand breaks in HeLa S3 cells after γ -irradiation. Linear dose-response curve was obtained within 10 Gy. In the presence of 3-aminobenzamide(3AB), a specific inhibitor of poly (ADP-ribose) transferase, the rejoining of DNA strand breaks in HeLa S3 cells after γ -irradiation was inhibited. 3AB also lowered the clone formation ability of HeLa S3 cells after irradiation. No DNA strand breakage and cytotoxicity were seen when HeLa S3 cells were treated with 3AB alone.

KEY WORDS DNA strand break rejoining, Poly (ADP-ribose) transferase, 3-Aminobenzamide (3AB), Radiosensitization

《黎明化工》1991 年征订启事

《黎明化工》系综合性化工科技刊物。主要刊登无机化工、胶粘剂和聚氨酯等高分子合成材料、精细化工、塑料成型加工、分析检测、环境保护、计算机应用等专业的科研成果、适用技术方面的文章,同时还刊登综述、信息、动态、新产品介绍等。可供化工科研、生产、教学和经营管理人员参考。

本刊,每期定价2元,全年订费8元。需订阅者可来函索取订单。现已开始办理1991年征订业务,欢迎订阅。

地址:河南省洛阳市 054 信箱

《黎明化工》编辑部

邮政编码: 471001