

影响而定,酒量太大,难以获得分裂相,酒量太小则不致于影响 SCE 频率。因此,选择了含酒 0.005—0.02 毫升/每毫升培养基作为本实验浓度。

本文的实验设计得到中国医科院肿瘤研究所的吴旻,王秀琴两位大夫的亲自指导,并提供本实验的必需药品。本文 SCE 照片蒙山东中医药研究所赵东坡和山东医科所李仁被两位大夫拍照,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Solomon, E. et al.: *Mutation Res.*, **30**, 273, 1975.
[2] 吴旻、王秀琴:《实验生物学报》,1979 年,第 12 卷,第

1 期,第 31 页。

- [3] Dutrillaux, B. et al.: *Chromosoma*, **48**, 327, 1974.
[4] Latt, S. A. et al.: *Handbook of Mutagenicity test Procedures*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 275, 1977.
[5] Chaganti, R. S. K., *Proc. Nat. Acad., Sci. (U.S.)*, **71**, 4508, 1974.
[6] Galloway, S. M. et al.: *Cell Genet.*, **15**, 17, 1975.
[7] Nicholas, A. H. et al.: *Mut. Res. Sect. Genet. Toxicol. Testing*, **67**(2) 167, 1979.
[8] 单耀忠译:《国外食品科技》1980 年,第 7 期,第 44 页。
[9] 四川泸州曲酒厂:《全国辐射保藏食品专业座谈会资料汇编》原子能出版社 1979 年,第 140 页。
[10] 上海第一医学院《实用内科学》编写组编:《实用内科学》人民卫生出版社,1973 年,第 449 页。

[本文于 1981 年 2 月 12 日收到]

人类肝癌细胞的质膜额外损伤与辐射引起 DNA 断链的重接修补*

陈去恶 周启玲

(中国科学院生物物理研究所)

放射生物学正在形成一个重要的概念,即各种细胞对射线的杀伤及诱变(包括癌变)的耐受性不同,主要是因为细胞正确地修补自身受损伤 DNA 的能力不同。因此设法保护与提高细胞修补 DNA 的能力,将有利于防护辐射对机体细胞的杀伤并减低细胞癌变的机率;设法抑制或消除癌细胞修补 DNA 的能力,将增强射线及药物对癌细胞的杀伤,以便提高疗效。如果能找出一种在 DNA 修补过程中起重要作用的结构或成份,有选择地加以保护或破坏,就有可能达到上述两种目的。

1971 年 Myers^[1] 报道,用 X 射线照射大肠杆菌 B/r,如果有辐射敏化剂碘乙酰胺或碘化钾存在,杆菌的质膜受到额外损伤,其修补 DNA 链断裂的能力几乎完全丧失;无敏化剂存在的对照组则能修补到接近于照前水平。表明此杆菌的 DNA 修补作用与质膜的机能有关。迄今还没有见到有关哺乳类细胞类似的实验报道。鉴于哺乳类细胞质膜在细胞的一系列生命

活动中起重要作用,因而探讨它与细胞 DNA 修补是否有关是很有意义的问题。

本研究的目的是探讨: 1. 有辐射敏化剂碘化钾存在时照射人类细胞,质膜是否会受到额外损伤(辐射损伤以外,由敏化剂引起的损伤); 2. 质膜受到额外损伤后,其修补辐射打断的 DNA 主链的能力是否会被消除或受抑制。

材 料 与 方 法

样品用 ⁶⁰Co γ 射线在室温(25—27℃)下照射,剂量率为 1,250rad/分。

1. 检测 KI 存在下照射人类细胞,质膜是否会受到额外损伤 正常成年男性外周红细胞,放在含有不同浓度 KI 的生理盐水中受 γ 射线照射,然后检查冷贮期间含 KI 组及对照组血红蛋白的漏出量;如含 KI 组血红蛋白漏出量增

*《英汉原子能词典》(原子能出版社 1978 年北京第一版)第 723 页涉及“repair”的翻译有两处,可译为“修补”、“修复”等,这里取其前者。

多,则表明细胞质膜受到额外损伤。基本方法前已报道^[2],我们将冷贮时每管细胞悬液体积(4ml)减半,细胞总数不变;冷贮时间改为22小时。冷贮后各管样品用0.9%NaCl稀释到16ml,离心8分钟(2,000转/分),取上清液,用分光光度计在420nm比色。以同体积0.1%皂角素水溶液处理的全溶血组血红蛋白量作100,算出各管漏出血蛋白相对量。

2. 检查质膜受到额外损伤后,是否影响细胞修补DNA断链的能力 人类肝癌细胞BEL-7402(上海细胞生物研究所建株)在加有20%小牛血清的“199”培养基中生长3—4天,在原位上用PBS洗,经胰蛋白酶处理,在含有不同浓度KI的无钙及镁的PBS中制成悬液,在试管中受照射,每管含细胞 $2-4 \times 10^5$ 个,体积1.2ml。不给修补条件的对照组,照后立即加入与悬液同体积的含0.02%EDTA的无钙及镁的PBS,暂放于冰瓶;需要观察DNA修补情况的样品,加入4倍于悬液体积的上述培养基,在37℃温箱中保温1.5小时,然后加入与保温液同体积的上述含EDTA的PBS。

检查细胞DNA链断裂及修补情况,主要依照Parodi等的碱液洗脱法^[3],我们作了一些简化和修改。微孔滤膜用上海第十制药厂出品,直径25mm,孔径 1.2μ ;胞溶液依照Swenberg等法^[4];洗脱用的碱性液依照Parodi等法^[3],NaOH浓度改为0.05M。洗脱器(图1)自行设计;将洗脱时的蠕动泵省掉,改用普通的“由”字夹使流速受控在每分钟约0.3ml;又以圆筒形玻璃比色杯代替石英荧光比色杯。流经洗脱器的碱性液为10ml,收集在一个容器里;取下滤膜,在25ml碱性液中弄碎,浸泡12小时;然后用干净的碱性液将前一种液体补充到25ml;各取出5ml,经过处理^[3],用荧光分光光度计测定两部份DNA的相对量。

细胞DNA洗脱后被分成两部份:被碱性液洗下来的部份,分子量较小;剩留在微孔滤膜上的另一部份,分子量较大。细胞受照后,滤膜上剩留的DNA量在DNA总量(洗脱量+剩留量)中所占比例下降;受照细胞经保温修补

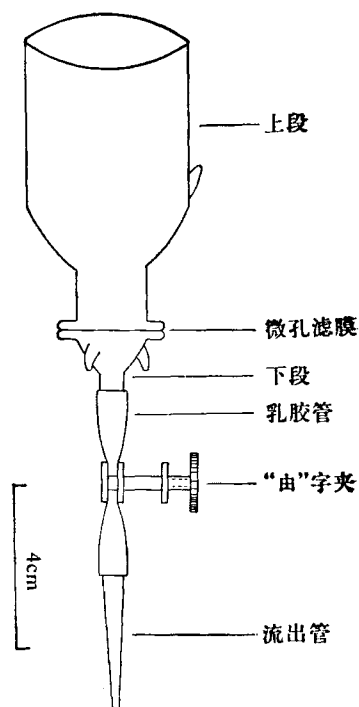


图1 玻璃洗脱器(示意图)

上段和下段的表面上各有玻璃“羊角”3个,相距120°,使用时以橡皮筋拉住,微孔滤膜夹在接头处经仔细磨平处理过的两段之间

DNA后,滤膜上剩留量所占比例回升。下降和回升的程度,分别反映DNA链断裂和重接修补的程度。为了使结果可靠,每次实验的各组都使用同一瓶碱性洗脱液,并以不照射对照组在滤膜上剩留DNA所占的百分比例数作为1,与其余各组的相应百分数比较,得出相对剩留量。

结 果

1. 在KI存在下照射人类红细胞,实验三次,照射剂量分别为20,000, 30,000和40,000rad;KI浓度范围在0.001—64mM之间,照后4℃冷贮的22小时内血红蛋白的漏出量与对照组比较有不同程度的增多(图2),证明照射时有KI存在,细胞质膜受到额外损伤。

2. 人类肝癌细胞在无KI存在时受照射,经37℃保温1.5小时,具有明显的修补DNA断链的能力;随着照射剂量增大,DNA链断裂数

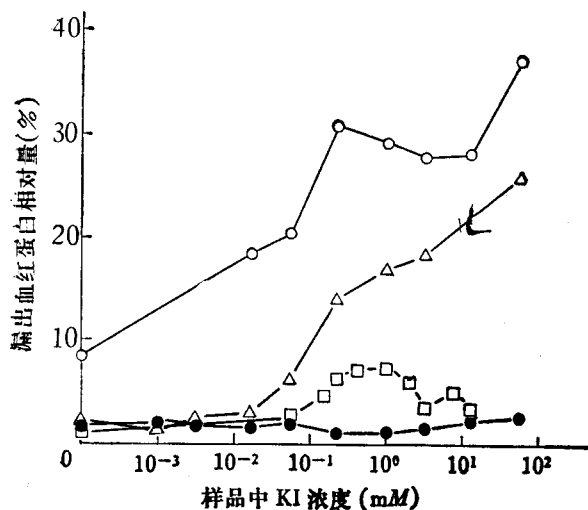


图2 γ 射线照射处在不同浓度KI溶液中的人类外周红细胞, 照后冷贮22小时血红蛋白相对漏出量

○—○ 40Krad; △—△ 30Krad;
□—□ 20Krad; ●—● 0 rad

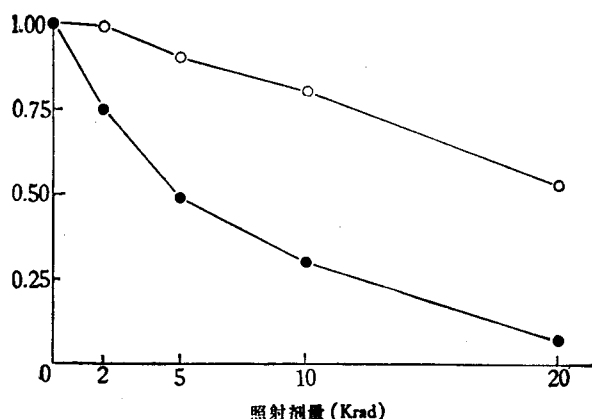


图3 照射剂量与人类肝癌细胞DNA断链的关系及保温1.5小时后的DNA重接修补情况

○—○ 照射+保温 ●—● 照射+不保温

量增多, 因而照后保温重接修补也越不完全(见图3)。

人类肝癌细胞在含KI的环境中受照射, 让其质膜受到额外损伤。实验5次, KI浓度在0.016—128mM之间, 照射剂量为5,000和10,000rad, 结果修补DNA断链的能力未见被消除; 经1.5小时的保温后, 其DNA相对残留量都有回升, 均比不经保温修补的组高(表1)。当KI浓度超过16mM, 细胞修补能力趋于下降, 10,000rad照射组修补能力下降显著($p <$

表1 KI存在下受 γ 射线照射的人类肝癌细胞经保温1.5小时后DNA断链重接修补结果

照射时 KI 浓度 (mM)	照后保 温时间 (小时)	滤膜上 DNA 相对残留量							
		照射 5Krad				照射 10Krad			
		$\bar{x}$	d	$\bar{d}$	P	$\bar{x}$	d	$\bar{d}$	P
0	0	0.49	—	—	—	0.30	—	—	—
		0.90	—	—	—	0.80	—	—	—
0.016		—	—	—	—	0.83	-0.03	—	—
0.031		0.89	0.01	—	—	0.80	0	—	—
0.063		0.87	0.03	—	—	0.94	-0.14	—	—
0.125		0.95	-0.05	—	—	0.87	-0.07	—	—
0.25		0.84	0.06	—	—	0.89	-0.09	—	—
0.5		0.94	-0.04	0	0.05	0.89	-0.09	-0.074	0.01
1		0.86	0.04	—	—	0.80	0	—	—
2		0.92	-0.02	—	—	0.89	-0.09	—	—
4		0.89	0.01	—	—	0.95	-0.15	—	—
8		0.94	-0.04	—	—	0.88	-0.08	—	—
16	1.5	0.85	0.05	0.043	0.05	0.74	0.06	0.115	0.05
32		0.91	-0.01	—	—	0.71	0.09	—	—
64		0.81	0.09	—	—	0.70	0.10	—	—
128		—	—	—	—	0.59	0.21	—	—
		—	—	—	—	—	—	—	—

注: ① 以不照射、不保温细胞的残留百分数作为1。

② 表中符号所代表的是:

$\bar{x}$ = 相对残留量的平均值。

d = 无KI组的 $\bar{x}$ 与有KI组的 $\bar{x}$ 之差。

$\bar{d}$ = d 的平均值。

P = 估计不准概率。

③ 表中第一行是照后不经保温修补的。

0.05), 但5,000rad照射未见明显差异。

讨 论

含碘化合物是早经发现的能加重细菌辐射杀伤的一类敏化剂^[5,6], 常见的有碘乙酰胺^[5,6]、碘乙酸^[7,8]、过碘酸^[9]及碘化钾^[1,9]等。早期曾认为碘乙酰胺和碘乙酸的作用是它们直接消除细胞内天然存在的辐射防护物质巯基, 因而削弱细胞的辐射耐受性^[6,8]; 现在人们又认为含碘化合物敏化作用主要是它们的 I^- 离子与水的辐射产物 $OH^\cdot$ 起作用, 产生 $I^\cdot$ 自由基^[10], $I^\cdot$ 进攻

细菌的细胞膜^[7], 因为膜上有与 DNA 修补有关的酶, 受进攻之后细胞修补 DNA 的能力被破坏^[7, 11], 阻碍细胞的恢复。

我们的结果表明, 在 KI 的敏化作用中人类红细胞的质膜会受到额外损伤(图 2)。人类肝癌细胞经 KI 敏化、质膜被额外损伤后, 是否其修补 DNA 断链的能力受到影响:

1. 能引起质膜额外损伤的 KI 浓度并不抑制肝癌细胞修补 DNA 断链的能力。我们的实验结果中, 当 KI 浓度低于 8mM, 修补能力不受抑制; 而这种浓度在红细胞实验中是会引起质膜额外损伤的。据文献报道, 含碘化合物浓度在 0.1—10mM 时, 都会对细菌的辐射杀伤引起显著的敏化作用^[5, 6, 9]。所以发生肝癌细胞质膜额外损伤无疑是存在的, 但没有见到 DNA 断链修补能力受抑; 如果质膜在哺乳类细胞 DNA 断链修补中起重要作用, 就不会不表现修补受抑的现象。

2. 我们在 10,000rad 照射组中见到, 当 KI 浓度达到 16mM 以上时, 肝癌开始表现修补 DNA 能力部份受抑的趋势(表 1), 这可解释为: ① KI 浓度增高, 导致质膜损伤加重; ② 由于照射剂量增大(照射时间延长)和 KI 浓度增高, 在照射过程中 KI 进入细胞而引起细胞内部结构额外损伤的可能性增大; ③ KI 浓度过高, 产生高渗。有人报道, 在照前^[12]或照后^[13]用低渗或高渗溶液处理 20 分钟, 会妨碍哺乳类细胞的恢复, 致使存活率下降。本实验中的 DNA 修补能力部份受抑, 可能是细胞存活率下降的一个原因。在我们的实验全过程中, 细胞与 KI 接触的时间远远超过 20 分钟, 对于含 KI 浓度较高的样品, 高渗作用是很难避免的。

3. 关于 KI 存在下受照的某些组修补效果略高于没有 KI 存在的对照组的问题, 目前无法作出解释。

总之本研究的总结果表明, 人类肝癌细胞质膜受到敏化剂 KI 的额外损伤后, 其 DNA 断链重接修补的能力没有被消除; KI 浓度不超过 8mM 时, 修补能力没有受到任何影响。这似乎表明, 这种真核细胞的质膜对于 DNA 的重接修补是无关紧要的。之所以与大肠杆菌^[11]不同, 可能是由于真核细胞 DNA 及其质膜之间, 在结构及生理上的关系不如细菌的密切。还需要进一步用其他真核细胞探讨这个问题。

日本大阪大学医学部近藤宗平教授曾寄赠荧光测定用的药品二氨基苯甲酸等; 实验中受到郑德存和贾先礼等同志的协助; 谨此一并致谢!

参 考 文 献

- [1] Myers, D. K.: *Int. J. Rad. Biol.*, 19, 293, 1971.
- [2] 陈去恶, 甘大清: 《实验生物学报》, 1979 年, 第 12 卷, 257 页。
- [3] Parodi, S. et al.: *Mutation Res.*, 54, 39, 1978.
- [4] Swenberg, J. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 732, 1976.
- [5] Dean, C. J. et al.: *Nature*, 196, 1324, 1962.
- [6] Dean, C. J.: *Brit. J. Radiol.*, 35, 73, 1962.
- [7] Shenoy, M. A. et al.: *Science*, 160, 999, 1968.
- [8] Alexander, P.: *The initial effects of ionizing radiation on cells* (R. J. C. Harris ed.), Academic Press, p. 9, 1961.
- [9] Kada, T. et al.: *Int. J. Rad. Biol.*, 17, 407, 1970.
- [10] Mullenger, L. et al.: *Nature*, 216, 372, 1967.
- [11] Alexander, P.: *Radiation damage and sulphhydryl Compounds*, Proc. of a panel organized by IAEA, Vienna, Oct. 63, 1968.
- [12] Raaphorst, G. P. et al.: *Int. J. Rad. Biol.*, 29, 433, 1976.
- [13] Utsumi, M. et al.: *Rad. Res.*, 77, 346, 1979.

[本文于 1981 年 2 月 18 日收到]

(上接第 72 页)

层析方法分离总量为 1 A 左右的四个核苷酸的图谱。(过去分离四核苷酸时一般要求总量应大于 10 A)。表 1 是分析样品中四核苷酸的实际含量和用本仪器测试的结果对照。其中 C、U 组分结果偏低是柱回收率低所致。(在 10 A 以上四核苷酸分离中亦有此现象), 结果还是很令

人满意的。

参 考 文 献

- [1] 章蔚娟等: 《生物化学和生物物理进展》1980 年第四期, 第 74 页。
- [2] 李清泉等: 集成运算放大器原理和应用。第一版, 科学出版社, 北京, 1980 年。
- [3] George Niel: *Electron Design* 21, 4, 1973.