

研究简报

照射后 HeLa 细胞对 CDDP 诱导的 DNA 交联产生抗性

黄建鸣 董玉宁 于 曦

(四川省肿瘤研究所, 成都 610041)

摘要 应用 EB 荧光分析法测定了人宫颈癌上皮细胞系 (HeLa line) 经单次⁶⁰Co 照射后顺铂 (CDDP) 诱导的 DNA 链内交联反应 (ct%)。经研究发现, 1~6 Gy 照射后, 细胞相对生长分数 (fraction of control growth, FCG) 减小, 单位细胞 DNA 含量增高, HeLa 细胞与 CDDP 的交联反应明显降低, 且与照射剂量呈依赖关系。结果提示, γ 射线照射后存活的肿瘤细胞可能对 CDDP 或烷化剂的化学治疗作用产生抗性。

关键词 HeLa 细胞系, DNA 交联反应, 顺铂, EB 荧光分析法, 抗性

学科分类号 Q691

许多细胞抑制剂可与细胞 DNA 作用导致细胞复制的 DNA 模板失活, 细胞 DNA 链内交联的形成是抑制肿瘤细胞再增殖能力的有效方法之一, 研究证明, 细胞 DNA 交联剂氯氮顺铂 (CDDP) 可增加肿瘤细胞的放射敏感性^[1,2]和照射可使肿瘤的细胞周期阻滞于 G2 期^[3]。因此, 作者应用 EB 荧光分析法^[4]检测经⁶⁰Co 照射后人宫颈癌上皮细胞系 (HeLa line) 对 CDDP 诱导 DNA 链内交联形成的反应。

1 材料和方法

1.1 药品及细胞培养

溴化乙锭 (EB), Fluka 产品; 氯氮顺铂 (CDDP), HeLa 细胞常规培养于含 10% 新生小牛血清 (newborn cow serum, NCS) 的 RPMI-1640 培养液中。

1.2 照射方法

照射源为⁶⁰Co, 将对数生长期 HeLa 细胞制成单细胞悬液, 1×10^6 接种于培养瓶内立即进行照射。照射条件: 源皮距 80 cm, 照射

面积 10 cm × 10 cm, 剂量率为 0.8 Gy/min, 室温下照射, 照射剂量分别是 0、1、2、3、4、5、6 Gy。

1.3 细胞的增殖测定

按文献 [5] 的方法, 细胞经照射后继续培养 48 h, 用胰酶: EDTA (0.25%: 0.02%) 消化, 收集细胞, 用 0.1% 伊文思蓝计活细胞数。按下式计算细胞 FCG (fraction of control growth):

$$FCG = \frac{\lg \frac{N_C}{N_0}}{\lg \frac{N_R}{N_0}}$$

式中 N_0 为接种细胞数, N_C 和 N_R 分别为对照和照射后培养 48 h 的活细胞数。

1.4 细胞 DNA 含量测定

细胞经照射后继续培养 48 h, 用胰酶: EDTA (0.25%: 0.02%) 消化, 收集细胞, 用密度梯度离心法去除死细胞, 收集活细胞,

用 0.1% 伊文思蓝计活细胞数不低于 95%，按文献 [4] 的方法测定 DNA 含量。

1.5 细胞 DNA 链内交联反应的测定

采用文献 [4] 的肿瘤细胞 DNA 交联反应 EB 荧光分析法，细胞悬于含 100 mmol/L CDDP 和 10% NCS 的 RPMI-1640 培养液，37℃，5% CO₂ 反应 4 h；收集细胞，用 PBS 离心洗 2 次，取细胞悬液 40 μl (3 × 10⁵ 细胞)，于 200 μl 细胞溶解液中，37℃ 水溶 16 h，加 25 μl 肝素 (500 IU/ml)，继续水溶 20 min 后加入 EB 液，混匀后于 100℃ 水浴变性 5 min 后，立即用流水冷却至室温，用 RF-5000 型荧光分光光度计 (日本岛津) 于 E_x= 525 nm，E_m= 600 nm 波长分别测定变性和未变性 DNA 的荧光，并按下式计算 DNA 交联反应 (ct%) 和每分子 DNA 的平均交联数 (n)：

$$ct\% = \frac{\text{变性 DNA 荧光} - \text{空白荧光}}{\text{未变性 DNA 荧光} - \text{空白荧光}} \times 100\%$$
$$n = -\ln X$$

式中 X 为未交联 DNA 的百分比值。

2 结 果

2.1 照射与细胞 FCG 的关系

图 1 显示 HeLa 细胞经 ⁶⁰Co 照射后培养 48 h 的 FCG 曲线，照射各剂量组细胞的 FCG 随照射剂量的递增而减小，表明 HeLa 细胞对 ⁶⁰Co-γ 射线的生长抑制作用与照射剂量呈依赖关系。

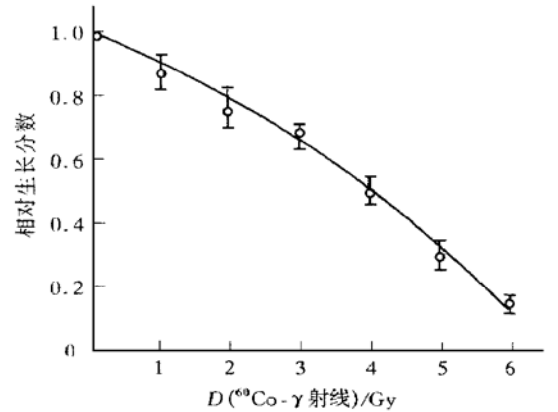


图 1 照射剂量与细胞 FCG 的关系

2.2 照射对细胞 DNA 含量的影响

图 2 显示 HeLa 细胞经 ⁶⁰Co 照射后继续培养 48 h，照射各剂量组的单位细胞 DNA 含量均较同期培养 48 h 的对照组明显增高，其中 2 Gy 和 6 Gy 照射组分别较对照组高 1.1 倍和 1.5 倍，且与照射剂量呈正相关，说明照射使细胞的有丝分裂受到抑制而阻滞于 G2 期。

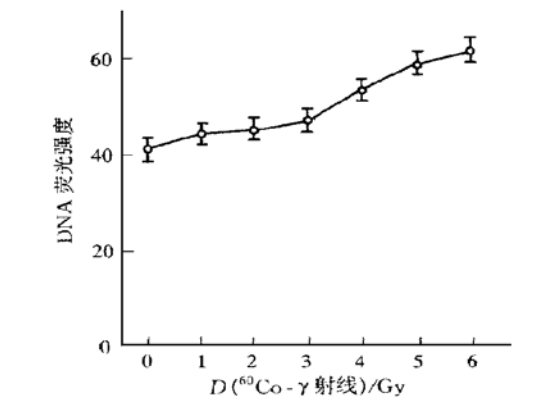


图 2 照射剂量与细胞 DNA 含量的变化

2.3 照射对细胞 DNA 链内交联反应的影响

图 3 显示 HeLa 细胞经 ⁶⁰Co 照射后培养 48 h 的细胞按材料与方法中 1.5 进行，DNA

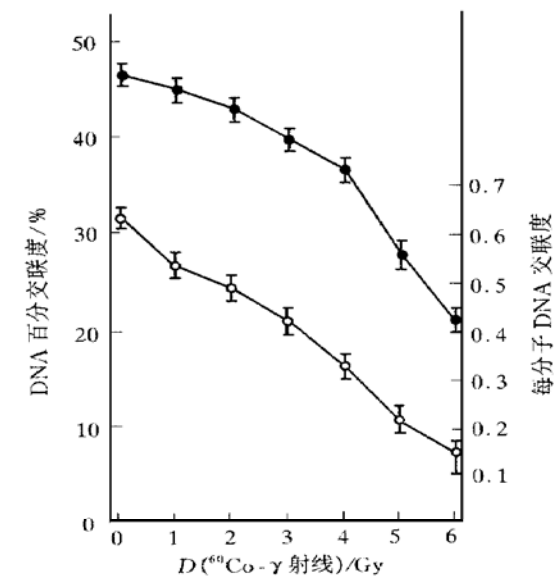


图 3 照射对 HeLa 细胞 DNA 交联反应的影响

●—●: DNA 百分交联度; ○—○: 每分子 DNA 交联度。

交联测定结果显示单位细胞 DNA 链内交联反应均较同期培养 48 h 的对照组明显降低, 其中 2 Gy 和 6 Gy 照射组分别较对照组下降 16.8% 和 70%, 且与照射剂量呈负相关。

3 讨 论

肿瘤细胞在射线的作用下, 细胞的代谢和增殖周期会发生改变。照射对细胞周期的影响主要引起 G2 期阻滞^[3, 6]; 同时照射可诱导细胞 DNA 修复酶系统的活性^[7~9]。CDDP 诱导细胞 DNA 链内交联的形成是由 DNA 的 O⁶-鸟嘌呤烷基化, 形成 DNA-O⁶-甲基鸟嘌呤 (O⁶-mG) 介导的^[10~12]。本实验发现照射后 HeLa 细胞的增殖受到抑制, 细胞阻滞于 G2 期和 DNA 含量增高, 且与照射剂量呈正相关 (图 1 和图 2); 照射后的 HeLa 细胞对 CDDP 诱导的 DNA 链内交联的形成减少, 且与照射剂量呈负相关 (图 3)。结果提示, 经 γ 射线照射后存活的肿瘤细胞对 CDDP 诱导的 DNA 链内交联形成减少或产生抗性。这种现象是否因射线诱导细胞 O⁶-mG 甲基转移酶的活性增加, 通过以 CDDP 交联 DNA 为底物转甲基作用修复 O⁶-mG 的机理抑或是通过对 O⁶-mG 的切除修复作用, 有待进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 Senan S. The interaction of cisplatin and radiotherapy. Clin Oncol R Cell Radiol, 1993, **5** (3): 191~192
- 2 Schilsky R L. Biochemical pharmacology of chemotherapeutic drugs used as radiation enhancers. Semin Oncol, 1992, **19** (4): 2~7
- 3 Cao S. Growth Kinetics of Bp8 mouse ascites sarcoma after single doses of body irradiation II. Analysis of the progression of cells through cell cycle. Acta Radiol Oncol, 1982, **21** (6): 331~335
- 4 黄建鸣, 董玉宁, 许峰等. EB 荧光分析法测定肿瘤细胞 DNA 交联及增殖活性. 生物化学及生物物理进展, 1996, **23** (1): 70~73
- 5 Zwelling L A, Michaels S, Schwartz H *et al.* DNA cross-linking as an indicator of sensitivity and resistances of mouse L1210 leukemia to *cis*-DDP and L-phenylalanine mustard. Cancer Res, 1981, **41** (2): 640~649
- 6 胡长坤, 曹世龙. FCM 在照射后 CNE 细胞周期进程测定中的应用. 中华放射肿瘤学杂志, 1993, **2** (1): 38~40
- 7 Chan C L, Wu Z, Eastman A *et al.* Irradiation-induced expression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase in mammalian cells. Cancer Res, 1992, **52** (7): 1804~1809
- 8 Lefebvre P, Laval F. Enhancement of O⁶-methylguanine DNA-methyltransferase activity induced by various treatment in mammalian cells. Cancer Res, 1986, **46** (11): 5701~5705
- 9 Wilson R F, Hoyes K P, Morris I D *et al.* *In vivo* induction of O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase in response to indium-114. Radiat Res, 1994, **138** (1): 26~33
- 10 Laurent G, Erikson L C, Sharkey N A *et al.* DNA cross-linking and cytotoxicity induced by *cis*-DDP in human normal and tumor cell lines. Cancer Res, 1981, **41** (9): 3347~3351
- 11 Erikson L C, Bradley M O, Ducore J M *et al.* DNA cross-linking and cytotoxicity in normal and transformed human cells treated with antitumor nitrosoureas. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, **77** (1): 467~471
- 12 Erickson L C, Laurent G, Sharkey N A *et al.* DNA cross-linking and monadduct repair in nitrosourea-treated human tumor cells. Nature (London), 1980, **288** (5786): 727~729

Resistance of HeLa Line Irradiated with ⁶⁰Co γ -Ray to the Interstrand DNA Cross-link Induced by Diaminedichloroplatinum.

HUANG Jian-ming, DONG Yu-ning, YU Xi (Sichuan Cancer Institute, Chengdu 610041, China).

Abstract The detection of DNA cross-link induced by diaminedichloroplatinum (CDDP) in HeLa line irradiated with ⁶⁰Co γ -ray was carried out using ethidium bromide fluorescence assay. The results showed that after single doses (1~6 Gy) of irradiation, the fraction of control growth of HeLa cells declined and the DNA content per unit cell of HeLa line increased, and the formation of interstrand DNA cross-link induced by CDDP reduced apparently with increments of dose of irradiation. The findings suggest that tumor cells surviving γ -irradiation may become resistant to chemotherapy with alkylating agents such as CDDP.

Key words HeLa line, DNA cross-link, resistance, EB-fluorescence assay