

高温对人淋巴细胞 DNA 单链断裂及其修复的影响*

王明锁 孙国器 蔡伟波 冯纪辛 易 剑

(苏州医学院, 放医系)

提 要

高温作为辐射增敏技术与辐射相结合, 用于临床治疗肿瘤已取得显著的疗效。高温能引起淋巴细胞 DNA 单链断裂, 高温对辐射引起的淋巴细胞 DNA 单链断裂有协同作用, 并且这种协同作用与加热和辐照的顺序有关。高温还能极大地抑制受照淋巴细胞 DNA 单链断裂的重接修复。

高温效应在放射治疗中有广泛的应用, 对于高温效应杀伤肿瘤细胞的生物化学基础进行了研究。有人报道高温合并辐射引起的哺乳动物细胞 DNA 结构损伤与高温引起的细胞存活变化有关^[1]。在研究高温合并辐射引起哺乳动物损伤的过程中, 已发现高温与 DNA 链断裂的修复有关^[2]。但这些作者所采用的加热时间都比较短, 因此在单纯加热的过程中多未见到细胞 DNA 链的断裂。至于人血淋巴细胞体外加热对 DNA 链断裂的影响迄今未见报道。我们选用入血淋巴细胞, 应用羟基磷灰石 (Hydroxyapatite, 简称 HAP) 层析法^[3], 在较长加热时间内进一步观察了高温对辐射所致的人血淋巴细胞 DNA 单链断裂和重接修复的影响。

材 料 与 方 法

1. 淋巴细胞的分离和体外培养及 ^3H -TdR 标记

取由肝素抗凝的健康献血员的静脉血, 用淋巴细胞分离液 ($d = 1.077$, 上海试剂二厂) 离心分离淋巴细胞^[4], 用 Hank's 平衡液洗涤二次后, 用 RPMI-1640 培养液制成细胞悬液, 细胞数为 $3 \times 10^5/\text{ml}$, 取 2 ml 细胞悬液分装于培养瓶中 37°C 培养, 54 小时后分别加入 $50 \mu\text{Ci}/\text{ml}$

的 ^3H -TdR 溶液, 使培养液中 ^3H -TdR 的最终浓度为 $0.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ 。连续 37°C 培养 18 小时后, 将细胞离心分离, 用 Hank's 液洗脱, 离心, 然后用新鲜培养基制成细胞悬液, 再温育 2 小时。

2. 加热和照射条件

将样品放入超级恒温水浴 ($\pm 0.2^\circ\text{C}$) 中加热, 加热结束后立即将样品投入冰浴中。照射组样品仍置于冰浴中, 用 ^{60}Co 源 (1.2×10^4 克镭当量) 进行照射 (剂量率 $1 \text{ Gy}/\text{min}$)。

3. 细胞溶破和 HAP 层析

将经加热或照射的细胞悬液离心, 分离出淋巴细胞, 弃去上清液, 然后分别加入碱性溶胞液 (0.03 N NaOH , 0.9 N NaCl pH 12) 1.0 ml, 于暗处静置 30 分钟, 再将样品放入冰浴中, 迅速加入 $0.02 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ (含酚红指示剂) 1.0 ml 进行中和。用 CPS-1 型超声波粉碎机超声处理 1 分钟, 加入 2% SDS 0.5 ml, 混匀后置于冰箱内保存。

按羟基磷灰石层析法^[3], 在 60°C 条件下用 HAP 进行层析, 用 0.125 M 磷酸钾盐缓冲液 (简称 KPB, pH 6.8, $60 \pm 1^\circ\text{C}$) 洗脱并收集单链 DNA, 用 0.25 M KPB ($60 \pm 1^\circ\text{C}$) 洗脱并收集双链 DNA, 将所收集的洗脱液置于冰箱保存。

* 本文系中国科学院基金会资助课题

4. 放射性强度 (cpm) 的测定

从经 HAP 分离后的每份洗脱液中各取出 0.5 ml 样品, 并加入 0.2 ml 1N HCl, 0.2 ml 1% 牛血清清蛋白, 置于 4℃ 冰箱中保存过夜。次日将每份样品转移至 $\phi 25$ 的 49 型玻璃纤维膜上, 依次用 10% TCA 和无水乙醇抽滤洗脱, 在干燥箱中 60℃ 烤干, 加入 5 ml 二甲苯闪烁液 (含 0.4% PPO, 0.04% POPOP) 后用 J-2101 G 型双道液闪仪测定。

5. 数据处理

每实验组重复 5 次, 各样品一式三份, 将所得结果进行统计学处理。DNA 单链断裂的相对百分率 (SSB%) 以下式表示^[5]

SSB%

$$= \frac{0.125M \text{ KPB 洗脱液 cpm} \times 100}{(0.125M \text{ KPB} + 0.25M \text{ KPB}) \text{ 洗脱液 cpm}} \%$$

加热处理后, 细胞 DNA 链断裂热增比 (Thermal Enhancement Ratio 简称 TER)^[6] 以下式表示

$$TER = \frac{\text{高温处理细胞 SSB}\%}{37^\circ\text{C 培养细胞 SSB}\%}$$

结 果

1. 单纯加热处理后淋巴细胞 DNA 单链断裂相对百分率的变化

将单纯加热处理组的细胞样品分别经 43℃ 加热处理 0.5—5.0 小时后, 经 HAP 层析后所

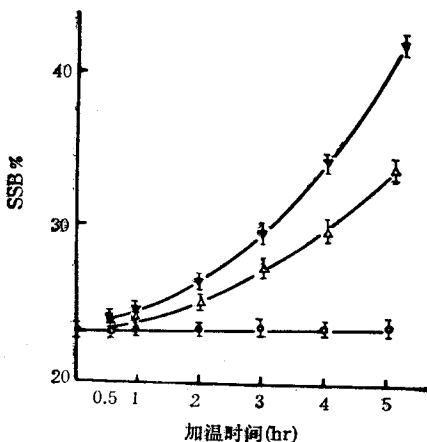


图 1 加热时间对细胞 DNA 单链断裂的影响

○—○ 37℃ 对照组 △—△ 43℃ 高温组 ▼—▼ 45℃ 高温组 SSB%: 单链 DNA 断裂百分率

测得的细胞 SSB% 变化如图 1。由图 1 可知入外周血淋巴细胞 43℃ 加热组 SSB% 的平均值与对照组 SSB% 平均值以及 45℃ 加热组 SSB% 平均值与 43℃ 加热组 SSB% 平均值均差异显著 ($P < 0.05$), 45℃ 加热组 SSB% 平均值与对照组 SSB% 平均值之间有非常显著差异 ($P < 0.01$)。随加热时间的延长, 各组样品的 DNA 单链断裂百分率逐渐增大, 45℃ 加热组比 43℃ 加热组的递增率大, 前者 DNA 单链断裂的百分率比后者高得多。

2. 高温合并辐射处理的先后顺序对细胞 DNA 单链断裂的百分率影响

将实验分成四组: (1) 照射前加热组: 43℃ 或 45℃ 加热 1 小时, 立即照射; (2) 照射后加热组: 照射后 43℃ 或 45℃ 加热 1 小时; (3) 照射组; (4) 对照组, 每组所测得的 DNA 单链百分率结果如图 2。各组均数间的比较表明, 照射前加热组, 照射后加热组, 照射组与对照组之间的 SSB% 均有显著差异 ($P < 0.01$), 照射前加热组与照射后加热组之间的 SSB% 有显著差异 ($P < 0.05$), 唯 45℃ 照射后加热组与 43℃ 照射后加热组之间的 SSB% 无显著差异 ($P > 0.05$)。在加热 1 小时, 照射剂量为 4 Gy 的条件下, 比较高温合并辐射对 DNA 单链断裂的百分率的影响, 结果如图 3。由图 3 可见, 高温合并辐射处理的先后顺序对细胞 DNA 断裂的 TER 有

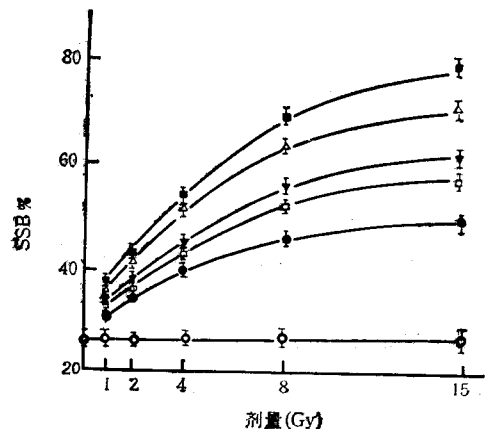


图 2 高温合并电离辐射对细胞 DNA 单链断裂的影响

○—○ 对照组 ●—● 单纯照射组 △—△ 照射前 43℃ 加热组 ▼—▼ 照射后 45℃ 加热组 □—□ 照射后 43℃ 加热组 ■—■ 照射前 45℃ 加热组

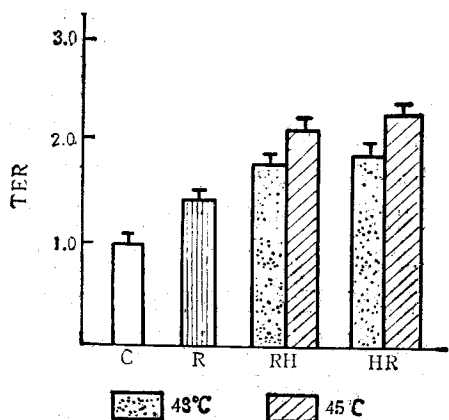


图3 按不同顺序对细胞给予4Gy照射和加热1小时处理与细胞DNA断裂增比(TER)的关系
C: 对照组(37℃不进行照射) R: 细胞只接受4Gy照射 RH: 先以4Gy照射细胞再分别以43℃, 45℃加热1小时 HR: 先分别以43℃, 45℃对细胞加热1小时再以4Gy照射细胞

很大的影响。照射前加热比照射后加热引起的单链DNA断裂的百分率更大($P < 0.05$), 高温和电离辐射之间所产生的协同效应比单纯电离辐射引起的DNA损伤效应大得多($P < 0.01$)。

3. 高温与DNA单链断裂重接修复的关系

电离辐射诱导的淋巴细胞的DNA单链断裂可以修复。为观察高温对细胞DNA单链断裂重接的影响, 将经30Gy照射和43℃或45℃加热1小时的细胞样品分成4个实验组, 于不同保温时间分析DNA单链断裂的百分率变化(如图4), 实验结果表明, 43℃加热修复组和45℃加热修复组与对照组之间的SSB%均存在非常显著的差异($P < 0.01$)。45℃加热效应不但使单链修复完全被抑制, 而且随着保温时间的延长, DNA单链断裂的百分率有不断上升的趋势, 这提示有新的单链DNA片段不断产生出来, 显然经45℃加热处理可使正常细胞受到极严重的损伤。

讨 论

单纯高温处理细胞, DNA的合成受到明显抑制^[2], 但对细胞DNA链断裂的影响却有不同报道。Lunec等^[1]将Hela S₃细胞在44℃

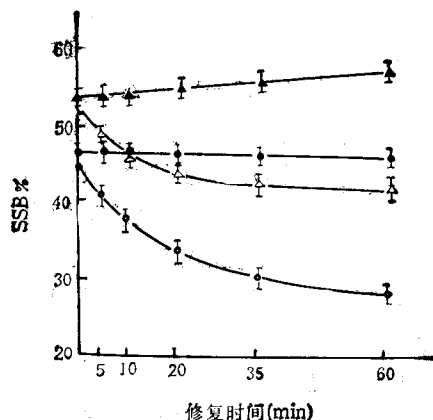


图4 不同温度加热处理对细胞DNA单链断裂的影响
○—○ 30Gy照射后, 37℃条件下修复组 ●—● 30Gy照射后0℃条件下修复组 △—△ 43℃加热1小时再经30Gy照射后37℃条件下修复组 ▲—▲ 45℃加热1小时再经30Gy照射后, 37℃条件下修复组

加热时, 在1小时内没有见到DNA断裂的显著变化。Jorritsman^[7]等用Hela S₃和EA细胞做实验, 在43°—45℃加热, 加热时间延长至1—5小时, 发现细胞DNA断裂有明显增加, 但在42℃条件下加热细胞, 加热时间延长至1小时, 未见DNA链断裂增加。我们将淋巴细胞在42℃加热, 加热时间延长至2小时也未见加热组与对照组之间DNA单链断裂的百分率有显著差异。但在43°—45℃范围内, 如加热时间达1小时以上时, 则可见到加热组与对照组之间DNA单链断裂的百分率有显著差异。所得结果表明, 单纯加热可引起细胞DNA单链断裂, 在单纯加热过程中加热时间也是一个重要因素。分析单纯加热处理DNA单链断裂的影响其结论不一致的原因不仅与加热温度的高低有关, 而且与加热时间的长短有关系, 不同细胞对热均有一定的耐受能力。本实验表明当温度和加热时间都超过一定阈值时就会出现DNA链断裂。在对淋巴细胞进行加热处理时, 当加热温度达到43℃, 加热时间超过1小时, 即可观察到链断裂显著增加。

高温和电离辐射对引起DNA损伤有协同作用, 但对辐射和加热的先后顺序对DNA断裂的影响有不同的报道。Dikomery认为照射后

加热只有当温度超过 45℃ 时才能产生细胞链断裂^[8]。而且 Corry 等发现照射前加热比照射后加热细胞 DNA 链断裂的百分率高 10—20%^[2]。这与我们的实验结果相近。这也许是因为高温造成 DNA 链直接或潜在的断裂,再加上电离辐射,两者的协同作用就增强了 DNA 损伤。至于照射后加热,有的研究表明主要表现为高温对 DNA 重接修复功能的抑制^[7]。这提示在放射治疗中,在照射肿瘤前进行高温处理能够提高疗效。

关于高温对细胞 DNA 链断裂重接修复的抑制,过去报道也不一致。有人认为高温促进了细胞内 DNA 单链断裂的修复^[6]但是本实验结果与 Corry 和 Jorritsman 等结果相似^[4,5],这表明 43℃ 高温极大地抑制了淋巴细胞 DNA 链断裂的重接修复。由于重接修复是一个酶促反应的生化过程,因此 DNA 修复与促使与 DNA 修复有关的酶的失活有密切关系。已有报道,高温对 DNA 聚合酶 β 的活力下降影响十分

明显^[9],这使单链 DNA 重接修复速度减慢乃至停止。

综上所述,高温合并辐射对细胞有杀伤作用,引起细胞死亡的原因是多方面的,本文的实验所观察的仅是单次加热处理对 DNA 损伤及其修复的影响。

参 考 文 献

- [1] Lunec, J. et al.: *Radiat. Res.*, **85**, 116, 1981.
- [2] Corry, P. M. et al.: *Radiology*, **123**, 475, 1977.
- [3] Rydberg, B.: *Radiat. Res.*, **61**, 274, 1975.
- [4] Boyum, A.: *Scand. J. Clin. Invest., Supple* **97**, 21, 1968.
- [5] Sakai, K. et al.: *J. Radiat. Res.*, **22**, 415, 1981.
- [6] Robinson, J. E.: *Radiology*, **113**, 195, 1974.
- [7] Jorritsman, J. B. M. et al.: *Radiat. Res.*, **98**, 198, 1984.
- [8] Dikomery, E.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **41**, 603, 1982.
- [9] Spiro, I. J.: *Radiat. Res.*, **89**, 134, 1982.

[本文于 1987 年 1 月 16 日收到]

(上接第 7 页)

始向研究生物体内其它无机阳离子扩展,如 K^+ 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 等^[19,20]。这些新技术的出现,可望使目前对活细胞中无机阳离子代谢研究的水平,产生一个飞跃。

参 考 文 献

- [1] Duhm, J. et al.: *Hypertension*, **4**, 477, 1982.
- [2] Dorns, E. et al.: *Science*, **205**, 932, 1979.
- [3] Rubython, E. J. et al.: *Clin. Sci.*, **64**, 441, 1983.
- [4] Cameron, I. L. et al.: *Cancer Res.*, **40**, 1493, 1980.
- [5] Kissel, T. R. et al.: *Clin. Chem.*, **28**, 449, 1982.
- [6] Pike, M. M. & Springer, Jr. C. S.: *J. Magn. Reson.*, **46**, 348, 1982.
- [7] Gupta, R. K. & Gupta, P.: *J. Magn. Reson.*, **47**, 344, 1982.
- [8] Ogino, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5185, 1983.

- [9] Ogino, T. et al.: *ibid.*, **82**, 1099, 1985.
- [10] Pike, M. M. et al.: *Am. J. Physiol.*, **246**, C528, 1984.
- [11] Cowan, B. E. et al.: *FEBS Lett.*, **184**, 131, 1985.
- [12] Rotman, A. et al.: *23th NMR Ampere Conference Symposium*, 532, 1986.
- [13] Pike, M. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 810, 1982.
- [14] Balchi, J. A. et al.: *Biophys. J.*, **38**, 323, 1982.
- [15] Matwiyoff, N. A. et al.: *Magn. Reson. Med.*, **3**, 164, 1986.
- [16] Pettegrew, J. W. et al.: *J. Magn. Reson.*, **57**, 185, 1984.
- [17] Ting, D. Z. et al.: *Biophys. J.*, **34**, 189, 1981.
- [18] Nicolay, K. et al.: *Arch. Microbiol.*, **133**, 83, 1982.
- [19] Pike, M. M. et al.: *Inorg. Chem.*, **22**, 2388, 1983.
- [20] Chu, S. C. et al.: *J. Magn. Reson.*, **56**, 33, 1984.

[本文于 1986 年 12 月 9 日收到]