

文章编号: 1007-4627(2003)01-0042-06

## 重离子辐射哺乳动物细胞敏感性的分子机理\*

李文建, 周光明, 卫增泉, 王菊芳, 李 强, 党秉荣, 颌红梅

(中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000)

**摘 要:** 研究了用传能线密度  $125.5 \text{ keV}/\mu\text{m}$  的  $^{12}\text{C}^{6+}$  辐照小鼠黑色素瘤、中国仓鼠肺、人的宫颈癌、人的肝癌细胞的敏感性以及 DNA 双链断裂和 DNA 双链断裂片段分布, 结果表明细胞敏感性与 DNA 双链断裂之间没有一致的关系, 提出了细胞辐射敏感性的一种可能的分子机理, 即 DNA 序列敏感性位点协同 DNA 双链断裂互补性机理. 由此解释了 4 种细胞系的不同敏感性问题.

**关键词:** 重离子; 哺乳动物细胞; 辐射敏感性; 分子机理

**中图分类号:** Q691 **文献标识码:** A

### 1 引言

电离辐射哺乳动物细胞的敏感性依赖于许多因素, 包括 DNA 损伤(单链断裂、双链断裂、碱基或糖损伤、DNA-蛋白质交联)<sup>[1, 2]</sup>、DNA 修复<sup>[2, 3]</sup>、细胞增殖率和周期不同时相的细胞比例<sup>[4, 5]</sup>, 以及 DNA 含量. 已经证明, 每一个因素对不同细胞的敏感性影响是不一样的, 而且在某些情况下辐射敏感性与一个或更多的因素有关<sup>[6]</sup>. 然而, 有更多的证据表明 DNA 双链断裂(DSB)与细胞死亡关系最为密切. 最有力的证据来自于啮齿类突变体的敏感性细胞的研究. 许多被分离出的突变体与野生型的细胞系比较, 这种敏感性的突变体具有 DNA 双链断裂修复率低的特性<sup>[7, 8]</sup>. 比较有争议的是 Radford 提出的观点, 认为 DNA 断裂的起始水平才是决定细胞死亡的主要原因<sup>[9-11]</sup>.

对人的肿瘤细胞, 人们描述了 DNA 断裂的起始量及其修复率这两个因素. Mcmillian 等<sup>[12]</sup>发现人体不同组织的肿瘤细胞中, 具有不同的 DNA 双链断裂水平, 而且在人的肿瘤细胞敏感性和 DSB 之间存在明显的统计学关系<sup>[2]</sup>. Schwartz 等<sup>[13, 14]</sup>的结果表明, 相对敏感的磷状癌细胞的 DSB 修复率低, 而且采用较新的更为敏感的脉冲场凝胶电泳(PFGE)得到了进一步证实<sup>[15]</sup>.

然而, DSB 产额和修复作为确定细胞辐射敏感性的两个因素遇到了困难, 出现了一些相反或无相关性的结果. 例如, 近年来引起放射生物学界广泛重视的人类毛细血管扩张性共济失调症(AT)是对电离辐射高度敏感的一种疾病. 来自 AT 病人的细胞在离体实验中表现出对电离辐射的致死效应及染色体断裂效应高度敏感性. 然而, 采用各种分析方法, 其中包括中性洗脱法<sup>[16-20]</sup>、中性琼脂糖梯度沉降法<sup>[21, 22]</sup>及脉冲场凝胶电泳法<sup>[23, 24]</sup>, 均未发现 AT 细胞和正常细胞之间在 DSB 和辐射敏感性关系上存在差异, 尽管两种类型的细胞辐射敏感性有很大不同. 同时, AT 细胞和对照的成纤维细胞之间也没有发现存在 DNA 双链断裂修复的区别(在  $4^\circ\text{C}$  下照射 30 Gy, 然后在  $37^\circ\text{C}$  下修复 6 h)<sup>[25]</sup>. 另外, 辐射敏感的 *irs* 突变体修复 DSB 与其母本 V79 细胞几乎有相同的效率<sup>[26]</sup>等.

可见, DSB 产额及修复作为确定细胞辐射敏感性的两个因素是有其局限性的, 因此, 有理由认为还存在未被揭示细胞辐射敏感性的其它机制. 鉴于此, 我们最近对哺乳动物细胞辐射敏感性进行了实验研究, 对其可能分子机制进行了深入探讨. 其目的在于试图解决在用 DNA 双链断裂量解释不同细胞具有不同辐射敏感性时所遇到的困难问题.

收稿日期: 2002-09-17; 修改日期: 2002-09-26

\* 基金项目: 中国科学院西部之光资助项目(XB980604); 中国科学院院长特别支持基金资助项目(TB990601)

作者简介: 李文建(1959-), 男(汉族), 河北辛集人, 研究员, 博士生导师, 从事辐照生物学研究.

## 2 实验材料与方法

### 2.1 细胞培养

细胞为小鼠黑色素瘤(B16)、人的宫颈癌(HeLa)、中国仓鼠肺(V79)、人的肝癌(SMMC-7721)。前3种细胞由中国医学科学院肿瘤研究所提供,后1种由上海第二军医大学提供。辐照前细胞用含10%小牛血清的RMPI-1640培养基(Gibco产品)于培养瓶中在37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每2—3天传一代。辐照前一天,将细胞接种于φ35mm的培养皿中培养,细胞浓度为5×10<sup>4</sup>/mL,临照射前吸出培养基,用PBS冲洗一次,然后用经灭菌的4μm厚Mylar膜封口,将其安装在辐照终端样品盘上。

### 2.2 DNA 样品准备

培养48h后,胰酶消化,在离心机中以转速为1500r/min离心5min,从而收集细胞,用PBS液清洗3次并稀释至细胞浓度为1×10<sup>7</sup>/mL,然后将预热的等体积低熔点琼脂糖(1%,pH8.0,Sigma产品)加到细胞悬浮液中,这种混合液体在4℃下被倒入制作胶块的模子中并冷却1h至凝固。凝固的胶块(直径5mm,厚度2mm)从模子中取出置于反应液(1mg/mL蛋白酶K(Sigma产品),1%SDS,0.5mol/L EDTA,10mmol/L Tris-HCl,pH8.0)中,50℃处理48h,然后用TE(1mmol/L EDTA,10mmol/L Tris-HCl,pH8.0)洗涤3次,加保存液(0.5mol/L EDTA,pH8.0)在4℃保存。

### 2.3 辐照

细胞存活实验 碳离子由兰州重离子加速器(HIRFL)提供,初始能量为50MeV/u,经过降能吸收片后照射样品的能量为14.54MeV/u(在水中LET为125.5keV/μm),剂量为0,0.5,1,1.5,2,3,4,5,6和8Gy;剂量率为3Gy/min。

DSB DNA胶块的辐照采用50MeV/u碳离子的展宽峰区,其使用峰区宽度为2.5mm(取射程2—4.5mm的区域),对应的LET在水中的数值为79.96keV/μm。HIRFL提供的剂量依次为0,10,20,30,40,50,60,70,80,90和100Gy,剂量率为4Gy/min。其它与细胞存活方法相同。辐照的胶块保存于4℃0.5mol/L EDTA中。

细胞和DNA胶块均由50mm×50mm的束流

辐照。剂量和样品更换通过微机自动完成,束流辐照样品的剂量由空气电离室给出。

### 2.4 细胞克隆分析

辐照后,细胞用胰酶消化,取少量样品计数并稀释到适宜浓度,接种到培养皿(φ60mm)中,每皿加4mL培养液,于37℃,CO<sub>2</sub>含量为5%的培养箱中培养8—12天取出,PBS冲洗,用卡诺液固定,Giemsa染色,统计大于50个细胞形成的集落数,每个实验点有6皿样品重复。

### 2.5 DSB 产额测量

DSB产额的测量方法是倒转脉冲场凝胶电泳(FIGE)和荧光扫描。电泳时,用TBE(89mmol/L Tris-HCl,89mmol/L 硼酸,2.5mmol/L EDTA,pH8.0)制备0.8%琼脂糖(华美公司产品)凝胶(0.5μg/mL溴乙锭),将样品块插入样品孔。凝胶大小为13.5cm×12.5cm。以0.5TBE为缓冲液,于36V,12℃左右,用DF-4型交变脉冲电泳仪电泳72h。正反方向交替时间为5:1。标准DNA为Sacharomyces sereviae(大小为225kbp—2.2Mbp)。

电泳完毕,照相,并用CS-910型薄层扫描仪(Shimadzu)对凝胶进行荧光扫描,激发波长为254nm,发射波长为600nm。每一个实验点有3个样品重复。

### 2.6 DSB 产额的计算

令样品块中总DNA大小为S Mbp(兆碱基对),并用PR代表从样品块中释放的DNA百分比,则DNA片段总长为S×PR Mbp;设DNA片段平均分子量为T Mbp,则样品块中产生的DNA片段数为S×PR/T,故DSBs(DNA双链断裂数)为(S×PR)/(T-n),n为样品块中染色体总条数。那么,DNA断裂水平(L)为(S×PR/T-n)/S。每个哺乳动物细胞的DNA总长约6000Mbp,而染色体条数在40左右(正常人的体细胞染色体为46条,小鼠为40条),故n/S≈0,则

$$L = \frac{PR}{T} \quad (1)$$

由该公式计算得到L与剂量之间一般存在较好的线性关系,由此求拟合直线的斜率就是DNA双链断裂产额。

### 3 实验结果

#### 3.1 细胞存活和 DSB

图 1 是 B16, HeLa, V79, SMMC-7721 的细胞存活曲线. 根据细胞存活率从低到高的顺序排列, 它们依次是 B16, V79, HeLa 和 SMMC-7721, 对应的半致死剂量  $D_{50}$  分别是 0.74, 1.70, 1.87 和 3.85 Gy. 换句话说, 低存活率的细胞系具有高的辐射敏感性. 例如, B16 细胞系具有最高的辐射敏感性. 其次为 V79 细胞系, 第 3 为 HeLa 细胞系, 最后为 SMMC-7721 细胞系.

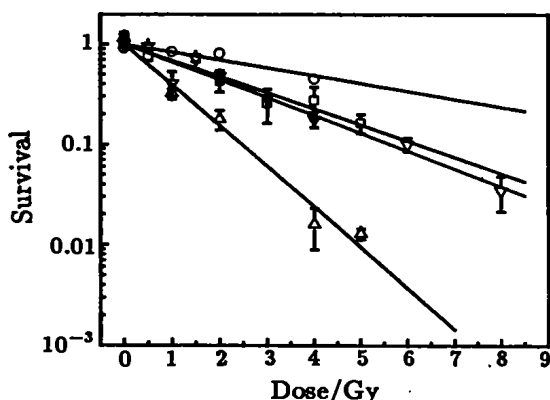


图 1 125.5 keV/ $\mu\text{m}$   $^{12}\text{C}^{6+}$  离子辐照 4 种哺乳动物细胞的存活曲线  
 $\Delta$  B16,  $\square$  HeLa,  $\circ$  SMMC-7721,  $\nabla$  V79.

图 2 为  $L$  (DSBs/Mbp) 与辐照剂量的关系. 从图 2 可以求得 B16, SMMC-7721, HeLa 和 V79 细胞的 DSB 产额分别是 0.40, 0.69, 0.82 和 0.98.

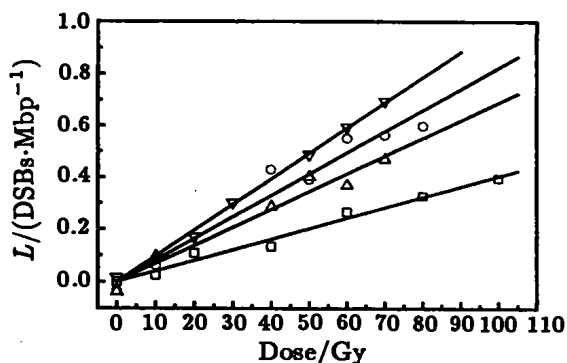


图 2 79.96 keV/ $\mu\text{m}$   $^{12}\text{C}^{6+}$  离子辐照 4 种脱蛋白 DSB Yield/(DSBs 100 Mbp $^{-1}$  · Gy $^{-1}$ );  $\square$  B16 0.404,  $\circ$  HeLa 0.824,  $\Delta$  SMMC-7721 0.689,  $\nabla$  V79 0.984.

#### 3.2 细胞敏感性与 DNA 双链断裂水平间的相关性

如图 3 所示, 当 3 种细胞 SMMC-7721, HeLa

和 V79 的敏感性依次增加时, 它们的  $L$  也依次增加. 但是, 当从较敏感的 V79 细胞继续向更高敏感的 B16 细胞变化时, 反而出现  $L$  的倒转变化. 这个结果表明, 细胞敏感性与  $L$  之间不存在线性关系. 可能还存在未被解释的新机制.

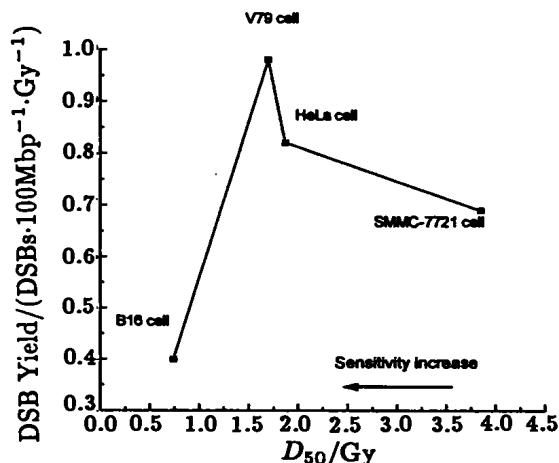


图 3 细胞敏感性与 DNA 双链断裂产额之间的关系

#### 3.3 DNA 序列敏感性位点协同 DNA 双链断裂互补性机理

从图 4 可以看到, 鼠类细胞系 B16, V79 分别在 1.2 Mbp 和 1.1 Mbp 分子处出现 DSB 片段峰, 表明该分子量大小的片段比其它长度的 DSB 片段

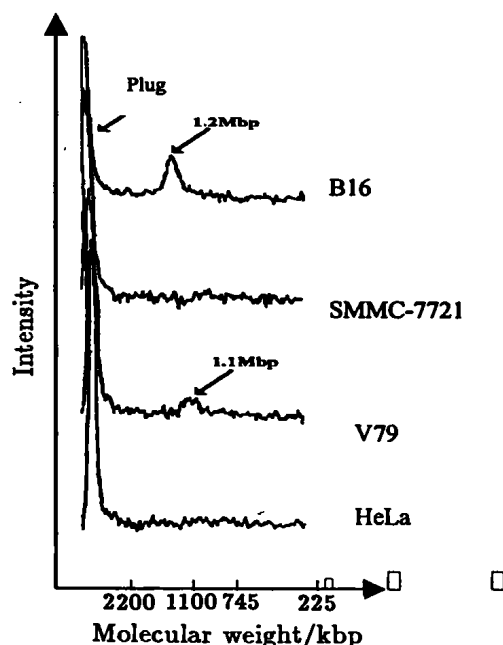


图 4 79.96 keV/ $\mu\text{m}$   $^{12}\text{C}^{6+}$  离子 10 Gy 辐照 DNA 分子双链断裂的荧光密度扫描迹线

分子优先断裂,因此, DNA 分子存在敏感的碱基序列,称为敏感位点. B16 DNA 的峰面积(24.22%)大于 V79 DNA 的峰面积(10.31%). 这意味着 B16 DNA 比 V79 DNA 有更敏感位点,因此 B16 细胞比 V79 细胞具有更高的辐射敏感性. 比较 V79, HeLa 和 SMMC-7721 细胞,发现 HeLa 和 SMMC-7721 两种细胞系没有 DSB 的片段峰,而 V79 细胞却存在这样的峰;表明 V79 存在 DSB 敏感区域,即敏感位点,这可能是 V79 敏感性较高的原因之一. 最后通过 DNA 双链断裂产额(见图 3)比较 HeLa 和 SMMC-7721 细胞,得到 HeLa 细胞比 SMMC-7721 细胞具有较高的敏感性.

#### 4 讨论

在本项研究中,提出了“DNA 序列敏感性位点协同 DNA 双链断裂互补性机理”的观点. 应用这一观点成功地解释了仅由 DNA 双链断裂观点难以解释细胞辐射敏感性的机理问题. 实际上,该观点是 DNA 双链断裂观点的更为深层次的发展——DNA 序列敏感性位点. 它是上述两个因素的统一体,缺一不可;其中“DNA 序列敏感性位点”起主导地位,而“DNA 双链断裂”处于从属地位.

在 DNA 双链断裂实验中,采用了脱蛋白的 DNA 分子并且在室温下进行辐照,以便消除在辐照过程中和停照后的一段时间来自细胞修复因素的影响. 为了达到同样的目的,以前的研究方法是:在辐照前将细胞放在冰上至少冷却 30 min,然后在冰上辐照;辐照后立即将培养基吸出并加入 4 °C 的 PBS,以阻止 DNA 双链断裂修复<sup>[10, 25]</sup>.

可以推知,来自不同组织结构的 DNA 分子尽管其碱基排列不清楚,但它们具有不同的 DNA 序列,特别是人类细胞和啮齿类细胞之间尤其如此. 如图 4 所示,来自于 B16, SMMC-7721, V79 和 HeLa 细胞的 4 种不同的 DNA 分子表现出两组不同的 DSB 分布. 一组为 B16 和 V79,均呈现出 DNA 片段峰,即 DNA 双链断裂片段的非随机分布;另一组为 SMMC-7721 和 HeLa,都没有出现 DNA 片段峰,换句话说,都出现了 DSB 片段的随机分布. 显然,上述两组的区别是由人类细胞系(HeLa, SMMC-7721)和鼠类细胞系(B16, V79)的明显差异造成的. 从而,在 DNA 分子水平上证实了人类细胞系与鼠类细胞系的不同;同时得出结

论, DNA 双链断裂片段分布与 DNA 序列有关.

最近有关紫外线辐照嘧啶二聚体的研究报道了人类 DNA 分子中碱基序列的敏感顺序为 G-T-T-T-C-A>G-T-T-C-A>G-T-T-G<sup>[27]</sup>,这证明了敏感位点的存在. 另外,我们还给出了敏感位点产生的机理,认为离子沉积的能量引起 DNA 分子化学键振动并沿着 DNA 链将这种振动直接或间接传递,所以相对弱的键优先断裂,在 DNA 分子上形成敏感位点.

图 4 中 79.96 keV/ $\mu\text{m}$   $^{12}\text{C}^{6+}$  离子 10 Gy 照射后, B16, V79 DNA 分子分别在 1.2 和 1.1 Mbp 处出现 DSB 片段峰(即敏感位点);而 60 Gy 辐照时(图 5), B16 和 V79 的 DSB 片段峰(即敏感位点)不在 1.2 和 1.1 Mbp 处,却出现了较大和较小的 DSB 片段峰,这是因为较大剂量照射会导致较小 DSB 片段量增加,即出现较小的 DSB 片段峰,以及不敏感的较高分子量的 DNA 分子在高剂量照射时开始断裂,即出现较大的 DSB 片段峰. 因此给出了不同剂量照射时,敏感位点不同的定性解释.

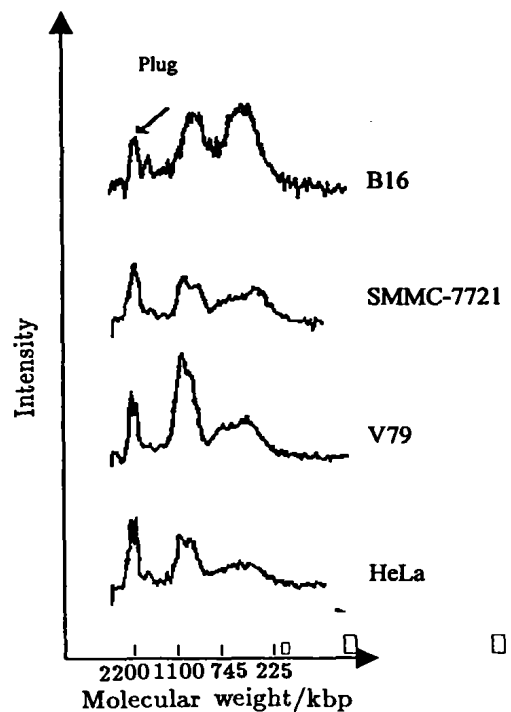


图 5 79.96 keV/ $\mu\text{m}$   $^{12}\text{C}^{6+}$  离子 60 Gy 辐照 DNA 分子双链断裂的荧光密度扫描迹线

人的细胞系(SMMC-7721, HeLa)没有 DSB 片段峰(见图 4),这表明 SMMC-7721 和 HeLa 的 DNA 分子在 10 Gy 辐照时没有敏感位点产生,所

以它们的敏感性低于鼠类细胞系(B16, V79);然而,当人细胞系的 DNA 分子被 60 Gy 辐照时,却产生了明显的 DSB 片段峰,即敏感位点(见图 5);因此, DNA 敏感位点的产生依赖于辐照剂量. 我们注意到,超剂量辐射会在细胞敏感性与 DNA 序列

敏感位点的关系建立上造成不利的影 响,其原因是“超杀”湮灭了不同细胞系之间敏感位点的差异. 最近,我们正在计划进行关于 DNA 序列敏感位点的剂量效应的研究,以便寻求到抗性细胞系产生 DSB 片段峰的最低剂量.

### 参 考 文 献:

- [1] Painter R B. The Role of DNA Damage and Repair in Cell Killing Induced by Ionizing Radiation[M]. Radiation Biology in Cancer Research, New York: Raven Press, 1980, 59—68.
- [2] Whitaker S J, Ung Y C, Mcmillan T J. DNA Double-strand Break Induction and Rejoining as Determinants of Human Tumour Cell Radiosensitivity[J]. Int J Radiat Biol, 1995, 67: 7.
- [3] Heilmann J, Rink H, Taucher-Scholz G, *et al.* DNA Strand Break Induction and Rejoining and Cellular Recovery in Mammalian Cells after Heavy-ion Irradiation[J]. Radiat Res, 1993, 135: 46.
- [4] Quiet C A, Weichselbaum R R, Grdina D J. Variation in Radiation Sensitivity during the Cell Cycle of Two Human Squamous Cell Carcinomas[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1991, 20: 733.
- [5] Cheong N, Wang Y, Jackson M. Radiation Sensitive *irs* Mutants Rejoin DNA Double-strand Breaks with Efficiency Similar to that of Parental V79 Cells but Show Altered Response Radiation-induced G2 Delay[J]. Mutat Res, 1992, 247: 111.
- [6] Schwartz J L. Alterations in Chromosome Structure and Variations in the Inherent Radiation Sensitivity of Human Cells[J]. Radiat Res, 1998, 149: 319.
- [7] Jeggo P A, Kemp L M. X-ray Sensitive Mutants of Chinese Hamster Ovary Cell Line[J]. Mutat Res, 1983, 112: 313.
- [8] Giaccia A J, Schwartz J, Shieh J, *et al.* The Use of Asymmetric-field Inversion Gel Electrophoresis to Predict Tumor Cell Radiosensitivity[J]. Radiotherapy and Oncology, 1992, 24: 231.
- [9] Radford I R. The Level of Induced DNA Double-strand Breakage Correlates with Cell Killing after X-irradiation[J]. Int J Radiat Biol, 1985, 48: 45.
- [10] Radford I R. Evidence for a General Relationship between the Induced Level of DNA Double-strand Breakage and Cell Killing after X-irradiation of Mammalian Cells[J]. Int J Radiat Biol, 1986a, 49: 611.
- [11] Radford I R. Effect of Radiomodifying Agents on the Ratios of X-ray Induced Lesions in Cellular DNA: Use in lethal lesion determination[J]. Int J Radiat Biol, 1986b, 49: 621.
- [12] Mcmillan T J, Cassoni A M, Holmes S, *et al.* The Relationship of DNA Double-strand Break Induction to Radiosensitivity in Human Tumor Cell Lines[J]. Int J Radiat Biol, 1990, 58: 427.
- [13] Schwartz J L, Rotmensch J, Giovanazzi S, *et al.* Faster Repair of DNA Double-strand Breaks in Radioresistant Human Tumor Cells[J]. Int J Radiat Oncol Biol and Phys, 1988, 15: 907.
- [14] Schwartz J L, Mustafi R, Beckett M A, *et al.* Prediction of the Radiation Sensitivity of Human Squamous Cell Carcinoma Cells Using DNA Filter Elution[J]. Radiat Res, 1990, 123: 1.
- [15] Giaccia A J, Schwartz J, Shieh J, *et al.* The Use of Asymmetric-field Inversion Gel Electrophoresis to Predict Tumor Cell Radiosensitivity[J]. Radiotherapy and Oncology, 1992, 24: 231.
- [16] Shihoh Y, van der Schans G P, Lohman P M, *et al.* Induction and Repair of DNA Damage in Normal and Ataxia-telangiectasia Skin Fibroblasts Treated with Neocarzinostatin[J]. Carcinogenesis, 1983, 44: 917.
- [17] Van der Schans, Paterson, Cross W G. DNA Strand Break and Rejoining in Culture Human Fibroblasts Exposed to Fast Neutron or Gamma Rays[J]. Int J Radiat Oncol Biol and Phys, 1983, 44: 75.
- [18] Peacock H, Eady J J, Edwards S, *et al.* Initial Damage or Repair as the Major Determinant of Cellular Radiosensitivity [J]. Int J Radiat Biol, 1989, 56: 543.
- [19] Radford I R, Hodgson G S. A Comparison of the Induction of DNA Double-strand Breakage and Lethal Lesions by X-Irradiation in Ataxia Telangiectasia and Normal Fibroblasts[J]. Radiat Res, 1990, 124: 334.
- [20] Pandita T K, Hittelman W N. Initial Chromosome Damage but not DNA Damage Is Greater in Ataxia Telangiectasia Cells[J]. Radiat Res, 1992, 130: 94.
- [21] Taylor A M R, Harnden D G, Arlett C F. Ataxia Telangiectasia: A human mutation with abnormal radiation sensitivity [J]. Nature, 1975, 258: 427.
- [22] Lehmann A R, Stevens S. The Production and Repair of Double Strand Breaks in Cells from Normal Humans and from Patients with Ataxia Telangiectasia[J]. Biochimica and Biophysica Acta, 1997, 475: 49.
- [23] Blöcher D, Kuhin M. DNA Double-strand Break Analysis by

- CHEF Electrophoresis[ J]. *Int J Radiat Biol*, 1991, **58**: 23.
- [24] Wurm R, Burnt N G, Duggal N, *et al.* Cellular Radiosensitivity and DNA Damage in Primary Human Fibroblasts[ J]. *Int J Radiat Oncol Biol and Phys*, 1994, **30**: 65.
- [25] Foray N, Fertil B, Alsbeih M G A, *et al.* Dose-rate Effect on Radiation-induced DNA Double-strand Breaks in the Human Fibroblast HF19 Cell Line[ J]. *Int J Radiat Biol*, 1996, **69**: 241.
- [26] Cheong N, Wang Y, Jackson M. Radiation Sensitive irs Mutants Rejoin DNA Double-strand Breaks with Efficiency Similar to that of Parental V79 Cells but Show Altered Response to Radiation-induced G2 Delay[J]. *Mutat Res*, 1992, **274**: 111.
- [27] Friedberg E C, Walker G C, Seide W. DNA Repair and Mutagenesis[M]. Washington DC: ASM press, 1995

## A Possible Molecular Mechanism of Radiosensitivity in Mammalian Cells Exposed to Heavy Ions\*

LI Wen-jian, ZHOU Guang-ming, WEI Zeng-quan, WANG Ju-fang,  
LI Qiang, DANG Bing-rong, XIE Hong-mei

(*Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*)

**Abstract:** Four types of cells, melanoma B16, cervical squamous carcinoma HeLa, Chinese hamster V79 and hepatoma SMMC-7721, were irradiated by 125.5 keV/ $\mu\text{m}$  carbon ions. Cellular sensitivities to irradiation indicated by  $D_{50}$ , DNA double strand break (DSB) and distribution of DSB fragments expressed by molecular weight are studied. The results show that there is not a consistent relationship between cellular sensitivity and DNA DSB induction, a possible molecular mechanism of radiosensitivity which is defined as "a complementary mechanism of DNA sequence sensitive sites in cooperation with DNA DSB induction" is proposed. It gives a possible explanation of different sensitivity in four types of cell lines.

**Key words:** heavy ion; mammalian cell; radiosensitivity; mechanism

\* **Foundation item:** West Light Foundation, Chinese Academy of Sciences (XB980604); Prtesident Special Foundation (TB990601), Chinese Academy of Sciences