

二乙基硫辛酰胺对受 γ 线照射小鼠骨髓细胞DNA的损伤和修复的影响

夏寿萱 徐惠英 黄速敏 范国才 (军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100800)

提要 应用我们改良的微孔滤膜过滤法证明辐射防护剂DELA能减轻小鼠骨髓细胞 γ 线体外照射所致的DNA双链断裂,并能促进其重接。经DELA预防的小鼠受 γ 线全身分次照射后用羟基脲抑制骨髓细胞DNA的半保留复制,观察到非预定DNA合成比对照组明显增强。通过这两种不同途径证明了DELA对小鼠造血细胞DNA大分子的保护作用。

关键词 二乙基硫辛酰胺; 辐射防护剂; 实验性辐射损伤; DNA修复

细胞受到电离辐射后DNA损伤的轻重和修复的完全与否决定着细胞的死活。二乙基硫辛酰胺(简称DELA)是一个具有较好效价和较低毒性的辐射防护剂。前文已经报道它对小鼠造血组织具有良好的保护作用⁽¹⁾,并且初步研究了它对核酸代谢的影响及其抗辐射作用的生化机制⁽²⁾。本文进一步探讨DELA对受照小鼠骨髓细胞DNA双链断裂及其重接的影响,并观察DELA对受照骨髓细胞非预定DNA合成(unscheduled DNA synthesis简称UDS)的保护作用。

方 法

药物 DELA由本所合成,剂型同前文⁽²⁾。

动物 本院种小鼠,♂,体重16-20g。

DNA双链的断裂及重接

1. 细胞的标记及照射 小鼠断头取股骨,用含10%小牛血清的Eagle氏培养液冲出骨髓并制成均匀悬液,于2ml悬液中(约含 7×10^6 有核细胞),加 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 1 μCi ,于37°C振荡保温1h以进行标记,在冰浴中照射, ^{60}Co 源距离20cm,剂量率1407.46-1438.38 R/min。

照后存在冰浴中待测以防DNA断链重接。

2. 双链断裂的检测 采用我们改进的Bradley和Kohn的微孔滤膜法^(3,4):将照射后的细胞悬液2ml转移到装有醋酸纤维微孔滤膜(直径25mm,孔径5 μm ,上海医药工业研究院制)的Seitz型塑料漏斗中,用冰冷的磷酸缓冲生理盐水(每升含NaCl 8.0g, KCl 0.2g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g)冲洗,加入溶胞液(2M NaCl-0.02M EDTA· Na_2 -3% Triton X-100以4N NaOH调pH至8.8)10ml使细胞溶破,再加入6ml脱蛋白液(0.05M Tris-0.05M 甘氨酸-25mM EDTA· Na_2 -Pronase E 2mg/ml,用4N NaOH调pH至9.6)进一步脱蛋白使DNA充分裸露,用pH 9.6的洗脱液(0.05M Tris-0.05M 甘氨酸-25mM EDTA· Na_2 -2% SDS)20ml洗脱,以微量蠕动泵控制流速,分部收集洗脱液,滤膜用HCl于70°C消化30min,以NaOH中和,用液体闪烁谱仪分别测量膜上和洗脱液中的放射性,以存留在膜上的cpm占总cpm的%(称为膜上DNA存留率)来衡量DNA双链断裂的程度,存留率越小,表示双链断裂越多,DNA分子量越小。

3. 断链重接修复的检测 将照射后的细胞悬液于37°C水浴中保温30min,然后再倾至滤膜上,按上法测双链断裂。

非预定DNA合成的测定 小鼠ip DELA 1.1mg/鼠,10min后以 ^{60}Co 照射7Gy,剂量率68.05 R/min,照后1,3,5d再照2.5Gy以激活UDS。第2次照后1h活杀,取股骨制取骨髓细胞悬液(4×10^6 个有核细胞/ml),分成2份,每份4.5ml。一份加100mM羟基脲0.5ml(溶于Eagle液中),用于测UDS;另一

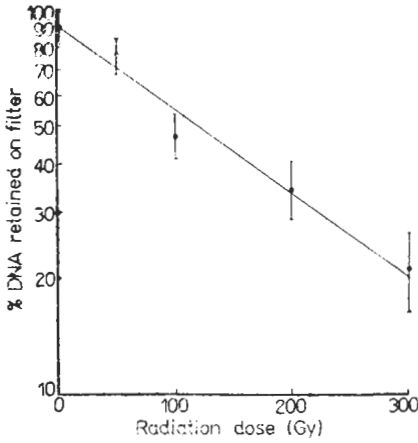


Fig 1. Dose-response curve of DNA double strand breaks of γ -irradiated mouse bone marrow cells

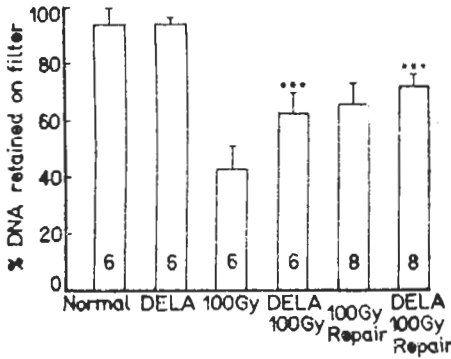


Fig 2. Radioprotective effect of DELA on DNA double strand breaks and their rejoining in mouse bone marrow cells

份加 Eagle 液 0.5 ml, 用于测 DNA 正常合成。于这两份细胞悬液中分别加入 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 使终浓度为 $4 \mu\text{Ci/ml}$ 。于 37°C 振荡保温 1 h 使 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 参入 DNA。离心并洗去未参入部份。用 3 ml 7% 过氧酸于 90°C 加热 20 min 以提取 $[^3\text{H}]\text{DNA}$, 测 OD_{268} 和 ^3H 放射性。方法详见文献⁽⁵⁾。

实验结果

DNA 双链断裂及其重接修复 从图 1 可见在 0-300 Gy 剂量范围内, DNA 双链断裂程度和骨髓细胞的受照剂量成正比, 如将膜上 DNA 存留率的对数值对照射剂量作图, 可得一直线, 直线回归方程式和相关系数为:

Tab 1. Protective effect of DELA on unscheduled DNA synthesis of bone marrow cells of γ -irradiated mice, $[^3\text{H}]\text{TdR}$ incorporation in presence of hydroxyurea. Number of mice in parentheses, $\bar{x} \pm \text{SD}$

	cpm/0.1 OD_{268}		
	d 1	d 3	d 5
—	$434 \pm 66 (6)$	$337 \pm 52 (6)$	$438 \pm 87 (10)$
DELA	$369 \pm 49 (6)$	$1022 \pm 101 (6)$	$683 \pm 130 (10)$
p value	>0.05	<0.01	<0.05

$$100 \log Y = -4.1402 - 0.2174 X \quad r = -0.9893$$

Y 代表膜上 DNA 存留率, X 代表照射剂量(Gy)。以上的线性关系为估计 DELA 对 DNA 双链断裂及其重接的影响提供了基础。

在细胞悬液中加入 DELA $100 \mu\text{g/ml}$, 于 37°C 保温 10 min, 然后置冰浴中照射 100 Gy, 并与不加药单照射、单加药不照射, 以及正常组作比较, 单纯照射组的膜上 DNA 存留率为 $47 \pm 7\%$, 而预防组却为 $61 \pm 6\%$, $p < 0.01$ 。说明 DELA 能预防 γ 射线所致的 DNA 双链断裂。在相同条件下正常组的膜上存留率为 $92 \pm 7\%$, 单加药不照射组为 $91.5 \pm 0.5\%$, 表明药物本身对双链断裂无影响。

将受照细胞于 37°C 保温 30 min 后再测双链断裂, 则可观察到预防组的膜上 DNA 存留率为 $72 \pm 4\%$, 而照射对照组为 $64 \pm 5\%$, $p < 0.01$, 说明 DELA 对双链断裂的重接也是有益的(图 2)。

UDS DELA 对受照小鼠骨髓细胞 UDS 的保护作用见表 1。

从上表可见: (1) 对照组 UDS 的 cpm 数在照后 1, 5 d 基本相同, 在照后 3 d 有所下降。而预防组的 UDS 在照后 3, 5 d 都比照后 1 d 明显增加; (2) 将照后同一天内 UDS 的 cpm 相比, 照后 1 d 预防组与对照组差别不明显, 而在照后 3, 5 d 预防组的 UDS 则明显高于对照组, 表明 DELA 能保护受照骨髓细胞的 DNA 修复合成。

应该指出, 上述实验是在 10 mM 羟基脲存在时进行的, 这时正常 DNA 合成(简称 NDS)

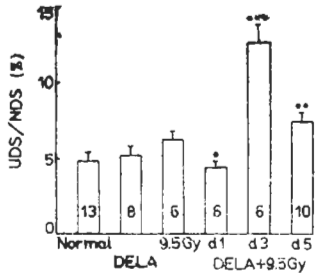


Fig 3. UDS/NDS ratio in bone marrow cells after wholebody irradiation in DELA-protected mice

已被抑制 $95.3 \pm 0.8\%$ 。因此，其残留部分对实验的干扰不大。为了进一步澄清这个问题，比较了照后不同天数 UDS/NDS 的比值。从图 3 可见正常组和单给药不照射组的比值分别为 $4.7 \pm 0.7\%$ 和 $5.3 \pm 0.8\%$ ，而照后 3, 5 d 预防组的 UDS/NDS 依次为 $13.0 \pm 1.5\%$ 和 $7.9 \pm 1.4\%$ ，均高于对照组 (3 d 时 $p < 0.01$)。说明 UDS 的增加明显快于 NDS，从而显示了 DELA 对 DNA 修复合成的保护作用 (图 3)。

讨 论

单链和双链断裂是电离辐射对 DNA 大分子所致损伤的重要形式。近年来的资料证明在真核细胞中 DNA 双链断裂的危害远较单链断裂为大，我们在中国仓鼠卵巢细胞上的实验所获的印象也是如此⁽⁶⁾。因此用 DNA 双链断裂这一指标评价药效有其重要意义。DELA 对小鼠骨髓细胞 DNA 双链断裂的防护作用和对断裂重接的促进作用为这个防护剂对造血细胞的

直接效应⁽¹⁾增添了一个有力的证据。当然，也应指出，由于本文方法的局限性，这里反映的只是双链断裂的重接和可能发生的重组，并不能排除错误倾向修复 (error-prone repair) 发生的可能性⁽⁷⁾。但从细胞受照后 UDS 增加这一事实看，DELA 对 DNA 正确修复能力有较好的保护作用，这是因为切除 (excision) 修复是 UDS 中所包括的主要修复方式，而目前认为切除修复属于无错误 (error-free) 修复这一类型。

DNA 双链断裂及其重接修复和 UDS 属于不同概念范畴，但却从不同角度并且分别从体外体内反映了 DELA 对小鼠造血细胞 DNA 损伤的防护作用和修复的促进作用，从而对 DELA 的抗辐射作用的分子机制⁽²⁾作了进一步阐明。

参 考 文 献

- 1 夏寿萱、徐惠英、陈能乾、沈倍奋。中国药理学报 1982; 3: 136
- 2 夏寿萱、沈倍奋、徐惠英、沈付生、毛慧生。同上 1982; 3: 193
- 3 夏寿萱、徐惠英、章扬培。辐射研究与辐射工艺学报 1984; 2: 51
- 4 Bradley MO, Kohn KW. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 793
- 5 Hollatz R, Tempel K. *Radiat Environ Biophys* 1978; 15: 77
- 6 章扬培、夏寿萱、徐惠英。生物化学与生物物理进展 1983; (1): 37
- 7 Weibezahn KF, Coquerelle T. *Nucleic Acids Res* 1981; 9: 3139
- 8 Okada S. *Radiation biochemistry*; vol 1. 1st ed. NY: Academic Press, 1970: 210-1 & 301-3

Acta Pharmacologica Sinica 1984 Dec; 5 (4): 261-264

EFFECT OF DIETHYLLIPOAMIDE ON DNA DAMAGE AND REPAIR OF γ -IRRADIATED MOUSE BONE MARROW CELLS

XIA Shou-xuan, XU Hui-ying, HUANG Su-min, FAN Guo-cai

(Inst of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800)

ABSTRACT By means of Bradley and Kohn's neutral elution method modified by us, the

radioprotective agent DELA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) reduced the DNA double strand breaks and acceler-

ated their rejoining in mouse bone marrow cells after 100 Gy γ -irradiation *in vitro*. If the mice received the first whole-body irradiation of 7 Gy 10 min after ip DELA 1.1 mg/mouse and the second irradiation of 2.5 Gy 60 min before sacrifice, and hydroxyurea used for inhibiting the normal DNA synthesis, the unscheduled DNA synthesis of bone marrow cells in DELA-

protected mice was greatly enhanced on d 3 and d 5. These results showed that DELA protected effectively the DNA macromolecules in irradiated hematopoietic cells.

KEY WORDS diethylipoamide; radiation-protective agent; experimental radiation injuries; DNA repair

* * *

* * *