

米索硝唑和粉防己碱对白血病 L7712 细胞 DNA 辐射损伤与修复的影响

刘楠 郑秀龙 (第二军医大学, 上海 201903)

提要 用羟磷灰石离心法证实 Mis 能选择性增加 γ 线缺氧照射后 L7712 细胞 DNA 单链断裂的产量,

10 mM Mis 的 ER 值为 2.6. Tet 不影响照射后 DNA 单链断裂产量, 但可抑制其重接. Tet 对 DNA 合成和非预定合成(UDS)也有明显的抑制作用.

1983年11月26日收稿 1984年12月29日修回

关键词 米索硝唑, 辐射增敏剂, 粉防己碱,

脱氧核糖核酸修复, 缺氧症, 白血病 L7712 细胞

增加肿瘤细胞尤其是其中的缺氧细胞对辐射的敏感性是提高放疗疗效的重要措施之一, 硝基咪唑类化合物米索硝唑 (misonidazole, Mis) 是针对缺氧细胞的有效辐射增敏剂^(1,2), 临床上发现粉防己碱(Tet)对晚期肺癌放疗也有一定的增敏作用⁽³⁾. 故本文观察 Mis 和 Tet 对 γ 线照后细胞 DNA 单链断裂损伤及其修复的影响。

材料与方 法

细胞及其 DNA 的标记 按前法⁽⁴⁾ 将小鼠白血病 L7712 细胞悬浮于 RPMI-1640 培养液中(含 20% 非灭活马血清)。加入 [³H]TdR 1.85×10^4 Bq/ml 37°C 保温 2-4 h。照前将细胞在无 ³H 的培养液中继续保温 1 h。

药物 Mis 是美国 Roche 有限公司产品, 临用时溶于 RPMI-1640 培液中使成 10 mM。Tet 是上海医工院合成, 纯度 > 98%, 以 2 M HCl 配成 Tet 盐酸盐溶液, pH 7。

缺氧条件 将 2 ml 标记细胞悬液置于通 N₂ 管内, 由内插管距液面上 0.5 cm 处通入纯度 > 99.99% 的 N₂(上海吴淞化工厂产品), 压力 1 kg/cm², 流量 1.5-2.5 l/min, 通 N₂ 30 min 后关闭进出口活塞立即进行照射。

照射 通 N₂ 或在空气中放置 30 min 后的细胞悬液置冰水浴中, 在距 ⁶⁰Co γ 源 40 cm 处照射 10-40 Gy, 剂量率 3.26-3.48 Gy/min。

羟基磷灰石(HA)离心法 按前法⁽⁴⁾ 将细胞悬于冰冷生理盐水中, 取 0.2 ml 细胞悬液 ($4-8 \times 10^5$ 个细胞)于平底塑料管中, 加入 1 ml 碱性溶胞液 (30 mM NaOH, 10 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH > 12)。使细胞溶破, DNA 解链。加 34 mM HCl 1 ml 中和。经超声处理使 DNA 剪切成单、双链短片段。加 0.5% SDS 2 ml 混匀后, 用 HA 吸附单、双链 DNA, 再分别在 60 和 80°C 依次用 125 mM 和 250 mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.9)洗脱单、双链 DNA,

洗脱液 0.2 ml 与 1 N HCl 0.1 ml 及水溶性闪烁液(PPO 4 g; POPOP 0.2 g; 乙二醇乙醚 350 ml; 二甲苯 650 ml) 8 ml 混合, 用 TRI-CARB 460 CD 或 FJ-353 液闪计数器测定 cpm。计算双链 cpm 占单、双链 cpm 总和的百分比, 即 dsDNA%, 以此衡量 DNA 单链断裂(ssb)的变化。

结果与讨论

有氧与缺氧照后细胞 DNA 损伤效应比较 由通 N₂(>99.99%)获得缺氧条件。用 BNE-32 型血气分析仪测定通 N₂ 后氧分压(pO₂)的变化。在 20°C 通 N₂ 10 min 后, pO₂ 由 170 mm Hg 下降至 30 mm Hg, 延长通 N₂ 时间至 60 min, pO₂ 不再继续下降。依气体扩散原理可认为液面上下 N₂ 已达平衡。估计液内 O₂ 含量低于 100 ppm。5 次结果表明, 通 N₂ 后 dsDNA% 为 83 ± 6%, 与对照(84 ± 5%)无显著差异。用台盼兰染色法观察通 N₂ 前后拒染细胞均在 98% 以上。说明通 N₂ 对细胞活力及 DNA 结构均无明显影响。

细胞在有氧或缺氧条件下经 γ 线照射后, dsDNA% 均随照射剂量(0-40 Gy)的增加而呈线性减少(图 1)。等剂量照后, 有氧条件下 dsDNA% 下降程度均高于缺氧条件。有氧照后 dsDNA%(F)与照射剂量(D)间的直线回归方程为 $\log F = -0.01357 D - 0.1108$, 相关系数 r 为 -0.9995。缺氧照后为 $\log F = -0.004385 - 0.09328 D$, r 为 -0.9802。由两条直线斜率之比得氧增强比(OER)为 3.1。上述结果表明, 在有氧和缺氧照后, DNA ssb 均与照射剂量成正比, 有氧照射 DNA ssb 量是缺氧照射的 3.1 倍。结果与文献 OER 值(3.0)⁽⁵⁾ 很接近。

Mis 和 Tet 对照后 L 7712 细胞 DNA ssb 产量的影响 将细胞悬于含 10 mM Mis 或 25 μ M Tet 的培液中, 在室温(15-20°C)通 N₂ 30 min 后照射, 并立即检测 dsDNA% 的变化。图 1 显示 Mis 在有氧和缺氧条件下照射作用不同。Mis 能增加缺氧照射 ssb 量, 其回归方程为

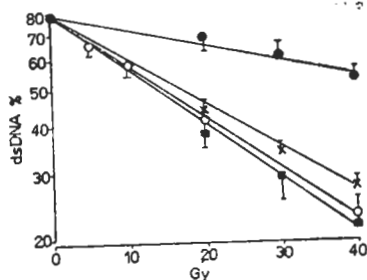


Fig 1. Effects of γ -irradiation on dsDNA% of L7712 cells in air (○) or N₂ (●) and in the presence of misonidazole under anoxic (×) or aerobic (■) conditions.

$\log F = -0.01162 D - 0.1141$, r 为 -0.9961 。而在有氧照射剂量效应曲线几与未用药组相重合, 回归方程为 $\log F = -0.01383 D - 0.1184$, r 为 -0.9974 。以 Mis 缺氧照射与单纯缺氧照射直线斜率之比得 10 mM Mis 的增强比 (ER) 为 2.6。以上结果表明, Mis 对缺氧照射细胞 DNA 有选择性增敏作用, DNA ssb 量是单纯缺氧照射的 2.6 倍。但 Tet 对有氧或缺氧照射后 DNA ssb 均无影响, 且在各剂量点上 Tet 处理前后细胞 dsDNA% 均无显著差异 (表 1)。

Mis 对缺氧细胞 DNA 损伤的选择性增敏作用与其高度电子亲和性有关⁽⁶⁾。在本实验条件下 Mis 处理前后未照射细胞 dsDNA% 无显著差别, 故可认为 Mis 增加缺氧照射后 ssb 是其参与辐射物化反应的结果, 而不是 Mis 的毒性作用可能引起的 DNA 损伤⁽⁷⁾。

Mis 和 Tet 对 DNA ssb 重接的影响 受照射细胞重新悬浮于不含 ³H 的培养液中, 37℃ 保温不同时间后测定 dsDNA% 的变化 (图 2)。根据

Tab 1. Effect of tetradrine on dsDNA% after irradiation of cells. Number of experiments in parentheses. $\bar{x} \pm SD$.

Gas	Tet	5 Gy	20 Gy	40 Gy
Air	0 μ M	65 \pm 3 (6)	41 \pm 5 (6)	22 \pm 2 (6)
	45 μ M	67 \pm 3 (4)	43 \pm 4 (4)	—
N ₂	0 μ M	—	69 \pm 4 (6)	53 \pm 3 (6)
	25 μ M	—	65 \pm 5 (6)	53 \pm 5 (6)
	60 μ M	—	—	52 \pm 3 (5)

DNA ssb 的 OER 和 ER 值可知在有氧照射后 ssb 量是 Mis 缺氧照射后的 1.16 倍, 因此 Mis 缺氧照射下需照射 46.4 Gy 方可与有氧照射 40 Gy 的 dsDNA% 进行比较。

有氧照射 40 Gy 后, dsDNA% 随保温时间增加而增加, 保温 120 min 已接近照射前水平。保温 30 min 前 DNAssb 重接速率较快, 其后减慢, 呈典型的双相动力学反应。Mis 缺氧照射后 dsDNA% 也随保温时间的延长而增加, 但快重接速率明显低于有氧组。保温 30 min 时重接率下降 18% (表 2)。但 120 min 后 ssb 仍可大部分被重接。因此 Mis 对缺氧细胞选择性增敏作用不仅和其增加缺氧照射细胞 DNA ssb 有关, 而且可能产生与有氧照射后类型不同的 DNA 损伤, 从而影响其重接动力学变化。Fielden⁽⁸⁾等在 *E. coli* 也观察到类似结果。

Tet 对 DNA ssb 重接有明显的抑制作用 (图 2)。保温 120 min 的重接率较对照约低 40% (表 3), 且照射前或照射后加药结果基本相同, 提示照射时 Tet 存在与否与 ssb 重接抑制无关, 而可能是 Tet 本身其它药理作用所致。

Tab 2. Relative dsDNA% and rejoining ratio of cells irradiated 40 Gy in air or 46.4 Gy under hypoxia in the presence of 10 mM Mis. Number of experiments in parentheses. $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$ *** $p < 0.01$.

Time (min)	Relative dsDNA%		Rejoining ratio (%)	
	O ₂ + 40 Gy	N ₂ + Mis + 46.4 Gy	O ₂ + 40 Gy	N ₂ + Mis + 46.4 Gy
0	34 \pm 5 (8)*	34 \pm 3 (6)*	—	—
15	68 \pm 3 (7)	—	52	—
30	82 \pm 5 (12)***	70 \pm 5 (6)***	73	55
60	91 \pm 4 (12)*	90 \pm 7 (6)*	86	85
120	98 \pm 5 (10)*	95 \pm 11 (6)*	96	93

Tab 3. Relative dsDNA% and rejoining ratio of cells irradiated without (A), before (B) and after (C) tetradrine treatment. Number of experiments in parentheses. $\bar{x} \pm SD$.

Time (min)	Relative dsDNA%			Rejoining ratio		
	A	B	C	A	B	C
0	34 ± 5 (8)	34 ± 5 (8)	34 ± 5 (8)	—	—	—
60	91 ± 3 (8)	78 ± 5 (8)	77 ± 8 (8)	86	67	65
120	97 ± 4 (8)	72 ± 4 (8)	72 ± 5 (8)	96	58	57

B vs C: $p > 0.05$. A vs B or C: $p < 0.01$.

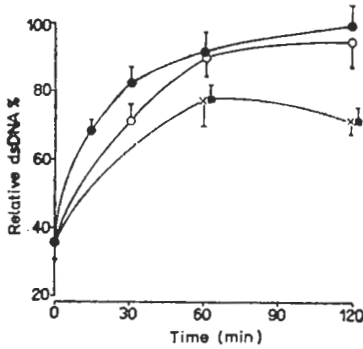


Fig 2. Rejoining of radiation-induced DNA single strand breaks in the cells untreated (●) or treated (○) with 10 mM misonidazole, and effects of tetrandrine 25 μ M on rejoining of DNA single strand breaks in L 7712 cells before (×) or after (■) irradiation.

Tet 对 L7712 细胞 DNA 合成和 UDS 的影响 Tet 对 L 7712 细胞 DNA 合成具有很强的抑制作用(表 4)。其抑制 [3 H]TdR 参入的 ED_{50} 为 0.2 μ M, 较 S 180⁽⁹⁾ 和人食管癌细胞⁽¹⁰⁾ 敏感。45 μ M Tet 几乎使 DNA 合成完全抑制。为了解此作用与 Tet 抑制 ssb 重接的关系, 又观察了 Tet 对 UDS 的影响。用羟脲 50 mM 抑制 DNA 合成, 抑制率约 90%, 照射 40 Gy 的细胞与 [3 H]TdR 3.7 $\times 10^4$ Bq/ml 37 $^{\circ}$ C 保温 60 min

Tab 4. Influence of tetrandrine on DNA synthesis in L 7712 cells. n = 3. $\bar{x} \pm SD$.

Tetrandrine	cpm/1 $\times 10^6$ cells	Inhibition
0	51596 \pm 4333	
0.5 μ M	19843 \pm 2059	65%
2 μ M	6347 \pm 907	88%
10 μ M	2135 \pm 412	96%
25 μ M	1081 \pm 119	98%
45 μ M	567 \pm 174	99%

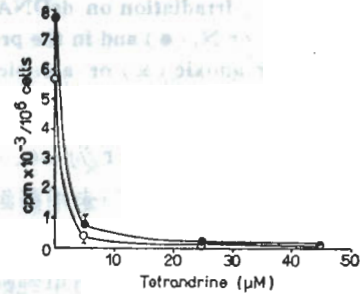


Fig 3. Effect of tetrandrine on unscheduled DNA synthesis after 40 Gy irradiation (●). DNA synthesis was inhibited by ~90% with 50 mM hydroxyurea. (○) control cells. n = 6. $\bar{x} \pm SD$.

后用膜片法测量 cpm。结果 Tet 处理后无论是照射组或对照组, [3 H]TdR 参入量均显著减少, 说明 Tet 对未被羟脲抑制的那部分 DNA 合成也有抑制作用。因此将照射组和对照组参入量之差作为 UDS 部分。图 3 表示随 Tet 浓度增加, UDS 参入量减少。Tet 5 μ M 的 UDS 抑制率为 81.4%, 25 μ M 则增加到 98.7%。

由此可见 Tet 对 DNA ssb 重接修复和切除修复均有抑制作用, 这可能与其辐射增敏作用有关。

参 考 文 献

- Hohman WF, Palcic B, Skarsgard LD. *Int J Radiat Biol* 1976; 30 : 247
- Skov KA, Palcic B, Skarsgard LD. *Radiat Res* 1979; 79:591
- 高龄山. 中医杂志 1980; 21 : 37
- 刘楠、郑秀龙. 生物化学与生物物理进展 1985; 1 : 42
- Palcic B, Skarsgard LD. *Int J Radiat Biol* 1972; 21:417
- Adams GE, Cooke MS. *Ibid* 1969; 15:457

- 7 Skov KA, Palcic B, Harrison IE, Skarsgard LD.
Ibid 1980; 37:601
 8 Fielden EM, Sapora O, Loveroek PS. *Ibid* 1978;

- 33:41
 9 Creasey W. *Biochem Pharmacol* 1976; 25:1887
 10 王瑞珍、潘琼晴. *中华肿瘤杂志* 1981; 3:86

Acta Pharmacologica Sinica 1985 Sep; 6 (3) : 209-213

EFFECTS OF MISONIDAZOLE AND TETRANDRINE ON PRODUCTION AND REPAIR OF RADIATION-INDUCED DNA DAMAGE IN L7712 CELLS

LIU Nan, ZHENG Xiu-long (Second Military Medical College, Shanghai 201903)

ABSTRACT Using the modified method of hydroxyapatite centrifugation, we studied the effects of misonidazole (Mis) and tetrandrine (Tet) on the production and repair of DNA single strand breaks (ssb) induced by irradiation in cultured murine L 7712 cells.

DNA ssb increased linealy with the dose (0-40 Gy) of γ -ray irradiation. The production of DNA ssb in the presence of O_2 was 3.1 times as that under hypoxia (oxygen enhancement ratio = 3.1). Mis selectively increased the production of ssb in cells irradiated in hypoxia (enhancement ratio = 2.6 for 10 mM Mis), but had no effect on that of those supplied with O_2 ; Tet did not influence the yields of DNA ssb in

either case.

The DNA ssb caused by irradiation under hypoxia in the presence of 10 mM Mis was rejoined and the extent of rejoining 120 min after incubation was similar to that with O_2 . But the kinetics was significantly different. Tet inhibited the rejoining of DNA ssb, no matter when the irradiation was applied. There were only 57% ssb that could be rejoined 120 min after incubation. The inhibition of UDS and DNA synthesis by Tet was also seen.

KEY WORDS misonidazole, radiation-sensitizing agents, tetrandrine, DNA damage, DNA repair, anoxia, leukemia L 7712 cells