

DNA 双链断裂的组成与自由基清除效能的关系*

邵春林 齐藤真弘¹ 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程中心, 合肥 230031;

¹ 日本京都大学原子炉实验所健康物理部, 大阪 5900494)

关键词: 电离辐射, pBR322, DNA 双链断裂(DSB)组成, 甘露醇

学科代码: B030701, B030901, B030902

DNA 双链断裂(DSB)是重要的辐射生物学效应之一,它是导致细胞死亡和变异的主要因素^[1,2]. 大量研究表明,DSB 由 α DSB 和 β DSB 两部分组成,分别为电离辐射能量沉积的单击作用(包括 LMDS 机制和单自由基传递机制)和双击作用所致^[3-5]. 但对不同的生物体系,由于靶体积大小等不一, α 、 β 有不同的值. 从根本上讲, α 、 β 与电离辐射的径迹如粒子的种类、LET 等有关, α 在中等 LET 时最大,而 β 则在低 LET 辐射时占优势^[6]. 研究 α 、 β 与生物体系之间的关系,将有助于加深人们对电离辐射物理化学效应的理解. 到目前为止,还未见有关 α 、 β 与自由基清除效能 σ (scavenging capacity)关系的研究报导,本文将以含甘露醇的超螺旋 pBR322 质粒溶液这一模式系统对该问题作一探索.

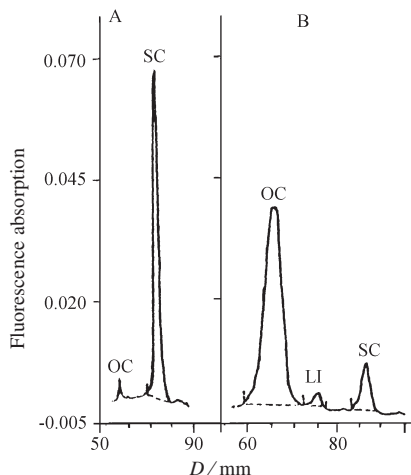


图 1 辐照前后质粒 DNA 样品的凝胶色谱图

Fig. 1 Chromatogram of plasmid DNA in agarose gel

Plot A: without irradiation; Plot B: irradiation with 120 Gy

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用含 95% (质量分数)以上超螺旋成份的 pBR322 质粒 DNA 的提取见参考文献 [7], 其长度 L 为 4363bp. 以岛津 CS-9000 薄层色谱扫描仪对 DNA 凝胶进行荧光扫描.

1.2 方法

1.2.1 DNA 的辐照

配制含不同浓度甘露醇(从 0.081 到 972.0 mmol · L⁻¹)的 DNA (37.5mg · L⁻¹) 溶液 8 μ L, 于空气饱和条件下以 Co⁶⁰ γ -射线辐照, 其剂量由 FeSO₄ 剂量计测量. 由于剂量率对 DNA 链断裂产额没有明显影响^[8], 实验所用剂量率通过调节样品与放射

1999-03-24 收到初稿, 1999-07-09 收到修改稿. 联系人: 邵春林, E-mail, CLShao@mail.ipp.ac.cn * 国家自然科学基金资助项目(19605005)

源间的距离选为 $6.0 \sim 27.4 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$. 辐照前后的样品置于冰浴中.

1.2.2 DNA 双链断裂的测量

以前文[7]所述方法进行凝胶电泳和荧光扫描. 以 260nm 紫外光作为荧光激发波长, 可提高检测灵敏度至少 4.7 倍以上^[9]. 通过扫描得到对应于 DNA 超螺旋(SC)、线性(LI)和开环(OC)3 个组分的色谱图(见图 1), 对各峰面积积分后可得 DNA 各组分的百分比. 考虑到 EB 与超螺旋 DNA 的结合能力弱于与另两种 DNA 的结合力, 在计算超螺旋 DNA 份额时应乘上一校正系数. 对 pBR322, 该校正系数为 $1.7^{[10]}$. 测量显示, 在很广的 DNA 质量范围内, DNA-EB 的发射荧光强度与 DNA 质量成正比. 因而可以下式计算 DNA 链断裂数^[11]:

$$\text{DSBs/Plasmid} = f(\text{LI}) / [1 - f(\text{LI})] \quad (1)$$

其中 $f(\text{LI})$ 为线性 DNA 的份额.

2 结果与讨论

2.1 超螺旋 DNA 的损伤与双链断裂

电离辐射诱导产生的链断裂使得超螺旋 DNA 的残余份额随着辐射剂量的增大而减小. 图2 给出了 DNA 溶液中含 $124\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇时超螺旋 DNA 的残余率, 其剂量效应曲线在半对数图中为一直线, 符合靶学说关系式 $y = a \times \exp(-kD)$, 拟合得 $a = 0.99$, $k = 0.00224 \text{ Gy}^{-1}$.

同时, 根据凝胶扫描所得 DNA 各组分的份额, 由(1)式计算可得 DNA 双链断裂数的剂量

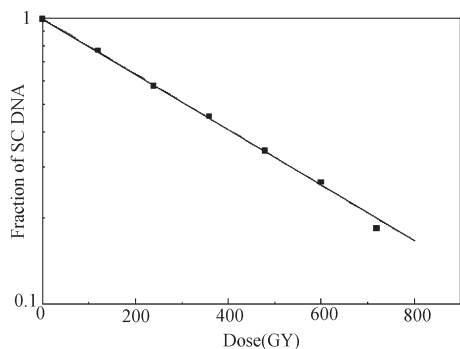


图 2 超螺旋 DNA 残余分数的典型剂量效应

Fig. 2 A typical dose response of the residual fraction of supercoiled plasmid

The curve is fitted with the equation $y = a \times \exp(-kD)$

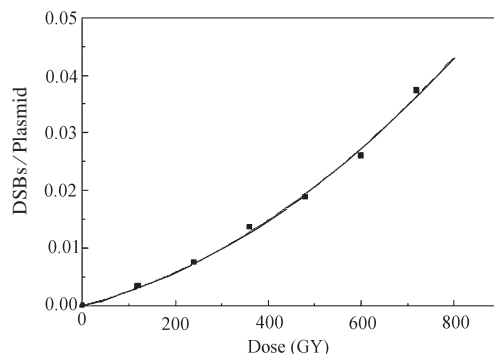


图 3 DNA 双链断裂数的典型剂量效应

Fig. 3 A typical dose response of DSBs per plasmid

The curve is fitted with the equation $\text{DSBs} = \alpha D + \beta D^2$

效应, 图 3 为 DNA 溶液中含 $124\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇时的情况. 由于零剂量时 DNA 样品中几乎不含线性 DNA 成分, 对图 3 结果以线性 - 平方关系式 $\text{DSBs} = \alpha D + \beta D^2$ 可进行很好的拟合, 拟合结果如图中曲线所示, 拟合参数 $\alpha = 2 \times 10^{-5} \text{ Gy}^{-1}$, $\beta = 4.24 \times 10^{-8} \text{ Gy}^{-2}$.

2.2 α 、 β 与自由基清除效能 σ 的关系

通过上述方法, 可以得到 DNA 溶液中含不同浓度甘露醇时 DNA 双链断裂数的剂量效应, 由此, 进一步得到 α 、 β 与自由基清除效能 σ 的关系(如图 4), 这里自由基清除效能 $\sigma = k_s \times c_s$, 其中 k_s 为甘露醇与 $\cdot\text{OH}$ 的反应速率常数, 等于 $1.8 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, c_s 为甘露醇浓度.

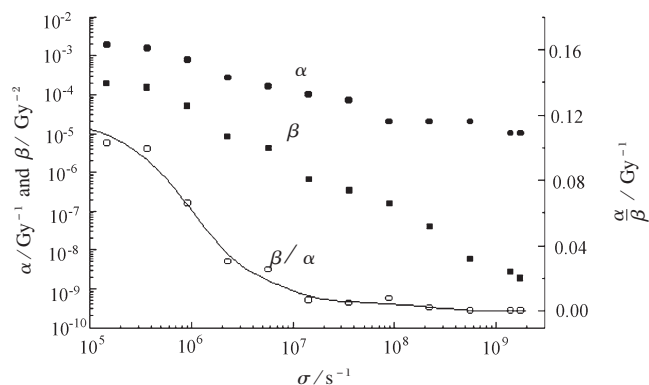


图4 α 、 β 与自由基清除效能 σ 的关系

Fig. 4 Responses of the coefficients α and β of DSBs to the scavenging capacity σ

可见,随着 σ 的增大, α 、 β 以不同的程度减小.当 σ 从 10^5s^{-1} 增加到约 $2 \times 10^9\text{s}^{-1}$, β 从 10^{-4}Gy^{-2} 减小 5×10^4 倍到 $2 \times 10^{-9}\text{Gy}^{-2}$,而 α 的减小程度则小得多,从 $2 \times 10^{-3}\text{Gy}^{-1}$ 减小200倍到 10^{-5}Gy^{-1} .特别需注意的是,在 $10^8 \sim 2 \times 10^9\text{s}^{-1}$ 的 σ 值范围内, α 的变化非常小,仅减小2倍左右,即 α DSB较难受自由基清除剂的影响,这是由于当 σ 值很大时,溶液中自由 $\cdot\text{OH}$ 大多被清除,DSB主要由电离辐射的直接作用和刺团(spur)内 $\cdot\text{OH}$ 所引起,其中有相当部分是不能被清除剂所清除的,如所谓的不可清除(unscavengable)的 $\cdot\text{OH}$ ^[12].因此, α DSB将随 σ 的增大而越来越难受自由基清除剂的影响.

α 与 β 的以上关系能被 β/α 更好地表示出来.由图4中 β/α 与 σ 的响应关系可以看出,当 σ 从 10^5s^{-1} 增加到 10^7s^{-1} 时, β/α 迅速减小;但当 σ 大于 10^7s^{-1} 时, β/α 变化很小.这似乎意味着DNA之DSB的组成有一个 σ 阈值,稍大于 10^7s^{-1} ,当 σ 大于此值时,DSB的主要成份为电离辐射能量沉积一次击中事件诱发的 α DSB.

另一方面,根据Chadwick和Leenhouts的放射分子生物学理论^[6], β/α 与辐射产生的 $\cdot\text{OH}$ 自由基等击中DNA链的几率等有关:

$$\beta/\alpha = f_1 n_1 \mu_1 k_1 (1 - \Omega k) / 2 \Omega k \quad (2)$$

其中 f_1 为DNA单链断裂未修复部分的比例,由于DNA溶液中的甘露醇分子仅起自由基清除剂的作用,还未见其能与DNA自由基反应从而修复DNA损伤的报导,故可设 $f_1 = 1$; n_1 反映了可形成一个双链断裂的两个断裂单链之间的碱基对距离, k 、 k_1 分别为粒子靠近核苷酸碱基通过时,发生能引起链断裂的能量沉积的几率, Ωk 表示单个粒子在引起一个链断裂的同时引起另一链断裂的几率,它们均与自由基清除效能无关; μ_1 为每单位剂量下一个电离粒子靠近DNA核苷酸碱基通过的几率,它与溶液中电离粒子数的产额相关.在含氧溶液中,除直接作用外,辐射诱导的 $\cdot\text{H}$ 和 e_{aq}^- 因与氧反应形成不活泼基团而不能有效地引起DNA链断裂, $\cdot\text{OH}$ 粒子是引起DNA链断裂的主要因素.设溶液中能靠近DNA核苷酸碱基通过的 $\cdot\text{OH}$ 粒子产额为 $G_{\text{eff}}(\text{OH})$,称为有效 $\cdot\text{OH}$ 产额,并设 μ_1 正比于 $G_{\text{eff}}(\text{OH})$,则由(2)式可知:

$$\beta/\alpha \propto G_{\text{eff}}(\text{OH}) \quad (3)$$

因此,图4中 β/α 与 σ 的关系曲线在一定程度上反映了 $G_{\text{eff}}(\text{OH})$ 的变化规律.

以前的研究表明电离辐射引起的自由分布的 $\cdot\text{OH}$ 产额与 σ 有如下关系^[13]:

$$G(\text{OH}) = 2.7 + 3.2 \sqrt{\alpha/\lambda} / (1 + \sqrt{\alpha/\lambda}) \quad (4)$$

其中 $\lambda = 4.7 \times 10^8\text{s}^{-1}$.可见 $G(\text{OH})$ 随 σ 的增加而增大,特别是当 $\sigma < 10^7\text{s}^{-1}$ 时增加很快,之后逐渐达到最大值5.9.

$G(\text{OH})$ 的这种变化规律与 $G_{\text{eff}}(\text{OH})$ 的显著不同,可能是由于以下原因.首先,(4)式表明 $G(\text{OH})$ 对 σ 的导数 $dG(\text{OH})/d\sigma \ll 1$ ($\sigma > 0$ 时),意味着随自由基清除剂浓度的增加,清除剂

分子与 $\cdot\text{OH}$ 反应程度即 σ 增加的速率远大于 $G(\text{OH})$ 增加的速率。其次, $\cdot\text{OH}$ 与甘露醇反应的速率 $1.8 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ 亦大于与 DNA 反应的速率 $5.64 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ [14]。因此,在 σ 较大时, $\cdot\text{OH}$ 主要与自由基清除剂分子反应,与 DNA 反应的有效 $\cdot\text{OH}$ 数较少,此时,引起 DNA 链断裂的主要因素是不易受到自由基清除剂攻击的位于刺团(spur)内的 $\cdot\text{OH}$ 自由基和电离辐射的直接作用。根据 Ward 等提出的 LMDS 理论,刺团内 $\cdot\text{OH}$ 可直接引起 DNA 双链的断裂,并且与直接作用诱发的双链断裂一起组成 DNA 双链断裂的 α 部分即 αDSB 。这也正是图 4 所反映的在高 α 区段 αDSB 占 DSB 主要部分的原因。

参 考 文 献

- 1 Hutchinson F. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **1985**, **32**: 115
- 2 Maki H, Saito M, Kobayashi T, et al. *Int. J. Radiat. Biol.*, **1986**, **50**: 795
- 3 Ward J F. *Radiat Res.*, **1981**, **86**: 185
- 4 Ward J F. *Progress in Nucleic Acids and Molecular Biology*, **1988**, **35**: 95
- 5 Siddiqi M A, Bothe E. *Radiat Res.*, **1987**, **112**: 449
- 6 Chadwick K H, Leenhouts H P. Trans. Zhang Qingxi, Du Delin, Wei Kang, The Molecular Theory of Radiation Biology, Beijing: Atomic Energy Press, 1987 [查德威克 K H, 莱恩豪特 H P, 著. 张卿西, 杜德林, 魏康译, 放射生物学分子理论, 北京: 原子能出版社, 1987]
- 7 Shao Chunlin, Masahiro Saito, Yu Zengliang. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **1999**, **31**(1): 67
[邵春林, 齐藤真弘, 余增亮. 生物化学与生物物理学报 (*Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao*), **1999**, **31**(1): 67]
- 8 Milligan J R, Ward J F. *Radiat Res.*, **1994**, **137**: 295
- 9 Shao Chunlin, Masahiro Saito, Yu Zengliang. *Acta Laser Biology Sinica*, **1999**, **3**: 238
[邵春林, 齐藤真弘, 余增亮. 激光生物学报 (*Jiguang Shengwu Xuebao*), **1999**, **3**: 238]
- 10 Stankus A A, Xapsos M A, Kolanko C J, et al. *Int. J. Radiat. Biol.*, **1995**, **68**: 1
- 11 Spothem-Maurizot M, Charlier M, Sabbattier R. *Int. J. Radiat. Biol.*, **1990**, **57**: 301
- 12 Klimczak U, Ludwig D C, Mark F, et al. *Int. J. Radit. Biol.*, **1993**, **64**: 497
- 13 Mark F, Becker U, Herak J N, et al. *Radiat. Environ. Biophys.*, **1989**, **28**: 81
- 14 Shao Chunlin, Masahiro Saito, Yu Zengliang. *Acta Laser Biology Sinica*, **1999**, **2**: 97
[邵春林, 齐藤真弘, 余增亮. 激光生物学报 (*Jiguang Shengwu Xuebao*), **1999**, **2**: 97]

Relationship between the Constitutes of DNA Double Strand Breaks and Scavenging Capacity

Shao Chunlin Saito Masahiro¹ Yu Zengliang

(Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics, the Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031; ¹Research Reactor Institute, Kyoto University, Osaka 5900494, Japan)

Abstract Measured by gel electrophoresis scanning, it was shown that the double-strand breaks (DSBs) of pBR322 irradiated by γ -rays were constituted by two parts, αDSB and βDSB , and the relationship between α , β and scavenging capacity σ was obtained. Results showed that β/α non-linearly decreased with increasing σ . Moreover, the yield of the OH free radicals reacting with DNA was analyzed.

Keywords: Irradiation, pBR322, Constitutes of DSB, Mannitol