

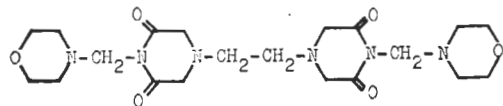
乙双吗啉的放射增敏作用与 DNA 损伤的关系

章扬培、陈月能、范国才、夏寿莹 (军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100800)

提要 本文应用小鼠实体瘤 S180-v 群体与 S 期同步化的细胞, 研究了乙双吗啉放射增敏作用的生化机理。发现该药作用于细胞辐射损伤的靶分子 DNA, 在 γ 射线辐照下, 可引起细胞内 DNA 与蛋白质之间的交联, 且可增加 DNA 单链断裂的产量, 从而加重细胞 DNA 的损伤程度, 表现出放射增敏作用。

关键词 辐射增敏剂; 抗肿瘤药; 肿瘤 DNA; 交联试剂

乙双吗啉(bimolane)化学名: 1,2-双[N⁴-吗啉甲撑-3,5-二氧嘧啶]乙烷, 为中国科学院



Bimolane

上海药物研究所合成的一种新药⁽¹⁾。它有明显的抗肿瘤作用, 化疗指数较高⁽²⁾。在对辐射具有抗性的肿瘤患者, 经 ⁶⁰Co γ 线和乙双吗啉合并处理, 有 61.8% 的病例获明显效果, 并认为它有放射增敏作用⁽³⁾。但对其增敏作用的分子机理, 尚未见报道。本文目的是通过肿瘤细胞 DNA 链断裂和 DNA 蛋白质交联观察此药的作用特点。

材料与 方法

细胞 小鼠实体瘤 S180-v 细胞, 培养于

含有 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 照前 24 h 按 [³H]TdR 11.1 kBq/ml 标记。

药物 乙双吗啉 20 mg, 用 4 ml HCl(0.4 mol/L)溶解, 加生理盐水稀释至 20 ml, 终浓度为 1 mg/ml; 另取乙双吗啉 2 mg, 用 0.4 ml HCl 0.4 mol/L 溶解, 加生理盐水稀释至 20 ml, 终浓度为 0.1 mg/ml。将上述药物溶液各 0.2 ml, 分别加入细胞悬液 1.8 ml 中, 于 37°C 保温 1 h, 使药物透入细胞。

照射 每个样品 2 ml, 含 2×10^5 个细胞, 于 0-4°C 冰浴中, 用 ⁶⁰Co γ 线照射, 照后细胞样品仍置冰浴保存, 以防 DNA 损伤修复。

DNA 单链断裂的检测 用改良的碱洗脱膜过滤法⁽⁴⁻⁶⁾。主要步骤是: 照后细胞用磷酸缓冲液转移至微孔滤膜上, 溶胞, 使 DNA 分子裸露, EDTA-2Na 洗涤, 最后用碱性解链剂四丁基氢氧化铵解螺旋并洗脱。此时由射线造成的细胞 DNA 单链断裂部分可被洗脱而通过滤膜, 而未损伤的 DNA 则被截留在膜上。然后用液体闪烁法分别测量膜上膜下的放射性。以下式表示:

$$\frac{\text{膜上 DNA 放射性}}{(\text{膜上} + \text{膜下}) \text{DNA 放射性}} \times 100\% \\ = \text{膜上 DNA 存留率}$$

膜上存留率愈小, 表示单链断裂愈多。

DNA 单链断裂重接修复的检测 照后细

胞经 37℃保温 30 min, 再用同法检测 DNA 单链断裂。若膜上 DNA 存留率比照后不保温时的膜上存留率升高, 表示 DNA 的单链断裂发生了重接。

DNA-蛋白质交联的检测^(7,8) 在上述碱洗脱法的基础上进行。DNA 和蛋白质的交联阻碍了 DNA 解链和碱洗脱, 导致膜上 DNA 存留率的升高。使用不含 DNase 的碱性蛋白酶 K (proteinase K) 处理, 膜上裸露的 DNA 蛋白质的交联解除。因此, 蛋白酶处理前后膜上 DNA 存留率之差, 反映了 DNA 与蛋白质交联的多少。详细操作见文献(7,8)。

S180-v 细胞的 S 期同步化 方法详见文献(9)。

结 果

乙双吗啉引起 S180-v 细胞 DNA 与蛋白质交联 用碱洗脱法检测 S180-v 细胞 DNA 单链断裂, 未照射组膜上 DNA 存留率 11 次实验为 $94 \pm SD 4\%$, 经 30 Gy 的 γ 线照射后, 膜上 DNA 存留率下降到 $59 \pm 10\%$ (表 1), 说明 γ 线使约 35% 的 DNA 发生链断裂, 30 Gy 照射后, 37℃保温 30 min 再检测, 膜上 DNA 存留率上升到 $88 \pm 3\%$, 说明保温期间大部份断裂的 DNA 链重接。如在 30 Gy 照射后不保温, 并用蛋白酶处理, 然后再行碱洗脱, 膜上 DNA 存留率为 $58 \pm 8\%$, 与未经酶处理的单纯照射组无统计差别, 表明没有 DNA 蛋白质交联体形成。

当乙双吗啉浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 时, 细胞经 30 Gy 照射, 膜上 DNA 存留率升高到 $89 \pm 3\%$, 比对照组 30 Gy 照射要高出约 30%。这说明由于乙双吗啉的作用, 使得原来可以随碱洗脱液通过滤膜的一部分 DNA 片段被截留在膜上。当用蛋白酶消化后, 膜上 DNA 存留率下降到 $20 \pm 7\%$, 那部分被截留的 DNA 又可通过滤膜。可以认为这种 DNA 存留率的下降至少有一部分是由于双吗啉引起了 DNA 与蛋白质的交联。当乙双吗啉浓度为 $100 \mu\text{g/ml}$ 时, 30 Gy

照射后膜上 DNA 存留率为 $80 \pm 6\%$, 也比无药照射对照组的 $59 \pm 10\%$ 高, 使用蛋白酶解除 DNA 与蛋白质交联后, 膜上 DNA 存留率下降到 $26 \pm 4\%$, 从这个结果也可认为乙双吗啉能引起细胞 DNA 与蛋白质交联。

增加 S180-v 细胞 DNA 的单链断裂 如果乙双吗啉只能引起 DNA 与蛋白质交联, 那么用蛋白酶处理后膜上 DNA 存留率只应下降至对照组的 $58 \pm 8\%$ 左右。但实际上当加入乙双吗啉后照射, 膜上 DNA 存留率大幅度下降, 分别为 $20 \pm 7\%$ 和 $26 \pm 4\%$, 比对照组要低得多, 提示乙双吗啉不仅可以引起 DNA 与蛋白质交联, 而且还可以增加 DNA 单链断裂的产量。药物增加的这部分链断裂在未用蛋白酶消化前, 由于交联在 DNA 外边的蛋白质的包裹, 未被碱洗脱下来。一旦蛋白酶使交联解除后, 这部分断裂的 DNA 就随洗脱液通过滤膜 (图 1), 表现为膜上 DNA 存留率下降。

对同步化的 S 期细胞的放射增敏作用 用碱洗脱法检测同步化的 S 期细胞 DNA 膜上存留率时, 未照射组为 $94 \pm 4\%$, 群体细胞 30 Gy 照射组为 $59 \pm 10\%$, 与 S 期的 $64 \pm 2\%$ 相差不显著。这说明相同剂量照射下, S 期细胞 DNA 单链断裂程度, 与非同步化群体细胞相似。但如照射后保温 30 min, S 期细胞的膜上 DNA 存留率为 $71 \pm 5\%$, 远比非同步化群体细胞的 $88 \pm 3\%$ 低, 说明在 S 期 DNA 单链断裂重接的速度慢 (表 1)。

当细胞中加入乙双吗啉后再照射, 不仅可以引起 S 期 S180-v 细胞 DNA 与蛋白质交联, 使膜上 DNA 存留率上升到 $84 \pm 3\%$, 而且还可以增加射线造成的 S 期细胞 DNA 单链断裂的产量, 表现为药物组使用蛋白酶后, 膜上 DNA 存留率下降到 $36 \pm 6\%$, 比对照组的 $60 \pm 5\%$ 低 24% 左右。在群体细胞和 S 期细胞中均可见到药物引起交联后 DNA 链断裂重接受阻。

讨 论

乙双吗啉是一种双丙酰亚胺化合物, 当在

Tab 1. Effect of bimolane on DNA single strand break and DNA-protein crosslink in γ -irradiated S180-V cells (A) and S180-V S phase cells (B). Irradiation dose of ^{60}Co was 30 Gy. Number of experiments in parentheses. $\bar{x} \pm \text{SD}$, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

cell type	Bimolane ($\mu\text{g/ml}$)	DNA remained on filter membrane (%)		
		Irradiation	Irradiation + incubation	Irradiation + proteinase
A	0	59 \pm 10 (20)	88 \pm 3 (9)	58 \pm 8 (6)
	10	89 \pm 3 (5)***	92 \pm 4 (7)*	20 \pm 7 (6)***
	100	80 \pm 6 (19)***	81 \pm 5 (19)*	26 \pm 4 (5)***
B	0	64 \pm 2 (5)	71 \pm 5 (11)	60 \pm 5 (6)
	100	84 \pm 3 (7)***	82 \pm 4 (9)*	36 \pm 6 (5)***

体内吗啉基被水解后，即露出亚胺环。有人认为亚胺环可能与胺基、巯基、磷酸盐反应⁽¹⁰⁾，因此，作者推测乙双吗啉经体内转化后可以作为一种联接媒介，既与蛋白质的巯基结合，又与DNA分子的磷酸基团结合，从而引起DNA与蛋白质交联。由于与磷酸基的作用，也有可能引起DNA上脱氧核糖与磷酸基之间的化学键断裂。引起DNA和蛋白质交联与增加DNA单链断裂的双重作用使乙双吗啉表现出化疗指数高和放射增敏的特点。作者对乙双吗啉可能的生化作用机理的解释见下图。

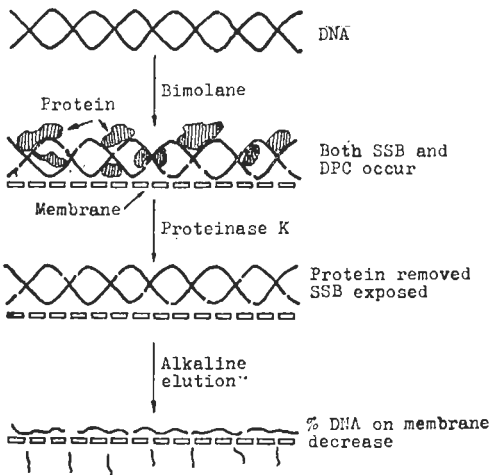


Fig 1. Possible biochemical mechanism of Bimolane — causing both DNA strand break and DNA-protein crosslinking in tumor cells

参 考 文 献

1 任云峰、舒汉丽、张覃沐、陈正玉、林 晨。

- 抗癌新药乙双吗啉(AT1727)的研究。科学通报 1980; 25 : 189
- 张覃沐、陈正玉、林 晨。抗癌新药——乙双吗啉(AT1727)药理研究。药学报 1980; 15 : 577
- Zhang ZY, Liu TF, Zhang XF. Primary report on AT-1727 as a potential radiosensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Physics* 1984; 10 : 2305
- Kohn KW, Erickson LC, Ewig RAG, Friedman CA. Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* 1976; 15 : 4629
- Kohn KW, Ewig RAG, Erickson LC, Zwelling LA. Measurement of strand breaks and crosslink by alkaline elution. In: Friedberg EC, Hanawalt PC, eds. *DNA repair—A laboratory manual of research procedures*; vol 1, pt B. 1st ed. NY: Marcel Dekker, 1981 : 379-401
- 章扬培、夏寿萱、徐惠英。电离辐射引起的哺乳动物细胞DNA单链断裂重接修复的研究。生物化学与生物物理进展。1983; 1 : 37
- 贺福初、夏寿萱。用碱洗脱法检测哺乳动物细胞DNA蛋白质交联和DNA链间交联。生物化学杂志 1986; 2 : 71
- Ewig RAG, Kohn KW. DNA-protein crosslinking and DNA interstrand cross-linking by haloethylnitrosoureas in L1210 cells. *Cancer Res* 1978; 38 : 3197
- 旷 健、柳惠图、王永潮、雷思晋。S180-v系细胞的增殖周期及其同步化研究。中华肿瘤杂志 1983; 5 : 161
- Creighton AM, Birnie GD. Biochemical studies on growth inhibitory bisdioxopiperazines. I. Effect on DNA, RNA and protein synthesis in mouse-embryo fibroblasts. *Int J Cancer* 1970; 5 : 47

Relationship between radiation sensitization and DNA damage by bimolane

ZHANG Yang-Pei, CHEN Yue-Neng, FAN Guo-Cai, XIA Shou-Xuan

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

ABSTRACT It was reported that bimolane [AT1727; bis (N⁴-mopholino-methyl-3,5-dioxopiperazynyl)-1,2-ethane] could be used as a radiosensitizer in the treatment of radio-resistant tumor. By means of Kohn's alkaline elution method in combination with proteinase K digestion, the mechanism of action of bimolane on mouse S₁₈₀-V tumor cells was elucidated. It was found that under 30 Gy γ -ray irradiation, the drug in a final concentration of 10-100 μ g/ml not only caused about 30% of cellular DNA to crosslink with protein, but also induced approximately equal

amounts of DNA single strand breaks (SSB). Similar damaging effects had been observed in synchronized S phase S₁₈₀-V cells, but in which the rejoining DNA SSB were found much slower than in non-synchronized cells. The effect on DNA is discussed in connection with the active imino-groups of the drug, which might be found *in vivo* after biotransformation.

KEY WORDS radiation-sensitizing agents; antineoplastic agents; neoplasm DNA; cross-linking reagents