

核黄素体外辐射增敏机理研究*

刘官树 陆长元 姚思德**

(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室, 上海 201800)

赵芳 孟祥顺 李雨 高建国 蔡建明

(第二军医大学放射医学研究所, 上海 200433)

张黎明 陈志龙

(第二军医大学防化教研室, 上海 200433)

摘要 采用 MTT 方法和荧光显微镜技术, 以小鼠胸腺细胞和人肝 L02 细胞株为研究对象, 对核黄素的体外辐射增敏作用进行研究. 在 5 Gy ^{60}Co γ 射线辐照条件下, 低浓度 (5~50 $\mu\text{mol/L}$) 和高浓度 (100~400 $\mu\text{mol/L}$) 核黄素作用下的小鼠胸腺细胞存活率的时间依赖关系表现出明显的差异, 其规律为: 低浓度下, 细胞受 γ 射线辐照后并不立刻大量死亡, 但随着时间的推移存活率迅速下降, 4 h 后存活水平降低到较低的水平; 而高浓度下, 细胞立刻大量的死亡, 且随时间的变化, 细胞存活仅有微弱的下降. 荧光显微镜研究结果显示, 核黄素在细胞中的分布因高浓度和低浓度而有所不同, 低浓度时核黄素集中于细胞核区, 高浓度时细胞膜区也有较高的分布. 由此得出结论: 低浓度时 (<50 $\mu\text{mol/L}$), 核黄素作用的位点在细胞核, 对 DNA 辐射损伤增敏; 高浓度时 (>100 $\mu\text{mol/L}$), 核黄素辐射增敏的主要靶位点为细胞膜, 两者均显示出核黄素对细胞辐射损伤具有显著的增敏效应.

关键词 核黄素 小鼠胸腺细胞 L02 细胞 MTT 方法 荧光显微镜技术 辐射增敏

核黄素(riboflavin, RF)又称维生素 B₂, 是构成生物氧化过程中所必需的两个辅酶黄素核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的主要活性基团^[1]. 同时由于核黄素的吸收波段很宽(从紫外区到可见光区)且系间窜越的量子产额较高($\Phi_{\text{ISC}} = 0.67$)^[2], 故在光生物学上, 核黄素又是一种重要的光敏化剂. 一般认为在近紫外和可见光范围内, 核黄素是导致细胞受损和死亡最重要的内源性光敏化剂之一^[2,3].

国内外学者对核黄素的光敏化机理进行了大量的研究, 基本上确定核黄素的光敏化作用是比较典型的 Type I 机理, 通常解释为在光作用下, 核黄素分子经光解产生的激发三重态与生物靶分子发生抽氢或电子转移氧化反应, 从而导致靶分子受到损伤; 而核黄素激发态通过产生活性氧对生物靶分子造成的损伤(Type II 机理)可以忽略^[3]. 我们在近来的光敏化机理研究中发现, 核黄素的氧化性自由基可能也是敏化反应的重要活性中间体, 而且其反应产物与激

2000-10-18 收稿, 2001-03-30 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39830090)

** 联系人, E-mail: sideyao@sinr.ac.cn

发三重态氧化的稳态结果一致,反应速率常数相似^[4,5],突破了文献上只考虑核黄素激发三重态氧化性的较片面看法,丰富了对核黄素光敏化损伤生物靶分子机理的认识。

尽管核黄素能以自由或共轭形式广泛分布在人体组织器官中,但是它对靶分子在电离辐射中所起的作用,即核黄素可能具有的辐射增敏性,一直未见研究报道。然而这对全面评价核黄素在体内和体外的作用是非常重要的,尤其是近年来光敏化剂与辐射增敏剂的深层次交叉,使得本研究工作的意义显得尤为重大^[6]。我们近来的脉冲辐解和激光光解研究结果表明,核黄素可以与核苷酸的电子加合物、氢加合物以及还原性羟基加合物发生电荷转移反应,使得辐射损伤的DNA不能自行修复,并最终导致DNA的损伤加剧,同时辐照产生的核黄素氧化性自由基对生物靶分子,包括DNA核苷酸、氨基酸、细胞膜模型化合物亚油酸都具有很强的反应性,可以直接攻击生物靶分子,增强射线对细胞的损伤,达到辐射增敏的效果^[7-9]。它还可以通过氧化体内的含巯基的化合物或其他抗氧化剂减少对损伤的修复来达到目的。这些研究结果均表明核黄素是一种具有潜在辐射增敏效应的药物,而且其增敏作用机理是一种混合机理,即能同时作用于包括DNA、蛋白质、脂类分子和生物抗氧化剂在内的多种生物靶分子。核黄素是生物体所必需的,且被细胞吸收的方式以主动运输为主^[10],可以顺利通过细胞膜,到达靶位点。为此,可利用肿瘤细胞新陈代谢旺盛的特点,通过特殊途径给药加大核黄素在肿瘤细胞中的富集,以适时的药物代谢周期增加肿瘤放疗效果。

通过考察不同浓度核黄素作用于小鼠胸腺细胞和L02细胞的细胞内分布和不同核黄素浓度作用下射线处理后细胞存活的时效关系,我们对核黄素辐射增敏效果进行了研究,得到了细胞水平上核黄素辐射增敏作用的直接证据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和细胞株

昆明种健康小鼠购自第二军医大学实验动物中心,体重18~22 g,雌、雄各半,实验时随机取样。L02人肝细胞株由复旦大学遗传学研究所馈赠。

1.2 小鼠胸腺细胞制备

小鼠脱颈处死,无菌取出胸腺,RPMI-1640培养基冲洗,置平皿中挤压捣碎,无菌纱布过滤,4号针头抽滤,获得单个细胞悬液;离心洗涤2次,细胞沉淀用1640培养基重悬,调整细胞浓度至 $10^5 \sim 10^6$ 个/mL,移入1.5 mL无菌Eppendorf管中,每管0.8 mL,三复管,置于5% CO₂ 37℃恒温培养箱中培养。

1.3 照射条件

采用⁶⁰Co γ射线照射,第二军医大学放射医学教研室⁶⁰Co γ射线照射源,剂量率为1.5 Gy/min。

1.4 主要试剂

RPMI-1640培养基(美国GIBCO公司出品,无酚红)按常规方法配制:含10%新生小牛血清(上海华美生物公司产品),200 μg/mL青霉素,100 μg/mL链霉素。MTT(溴化四甲基唑)为Sigma公司产品,上海生工生物工程公司分装。核黄素为Sigma产品,无血清1640培养基配制成0.5 mmol/L的母液,0.22 μm滤膜除菌,-20℃避光储存备用。

1.5 MTT 法检测核黄素对小鼠胸腺细胞活存的影响

1.5.1 药物作用和辐照 对照组加入正常培养液, 给药组加入不同体积的核黄素母液, 使得终浓度为 5~400 $\mu\text{mol/L}$, 置 5% CO_2 孵箱内, 37 $^\circ\text{C}$ 培养 2 h. ^{60}Co γ 射线源照射 5 Gy.

1.5.2 MTT 法检测 辐照结束后, 400 $\times g$ 离心 5~10 min, 去上清液, 无血清 1640 培养液洗 3 次, 加入正常培养液, 0 h 组直接进行 MTT 检测, 4 h 组继续培养 4 h 后 MTT 检测. MTT 检测时, 每管加入 MTT 80 μL , 于 5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 孵箱内继续培养 2~4 h, 4000 $\times g$ 离心, 弃上层清液, 每管加 750 μL DMSO, 振荡, 混合均匀后, 加入 96 孔板中, 每孔 150 μL , 每管三复孔, 于 ELX 800 型酶联仪(Universal Microplate Reader, Bio-TEK Instruments, Inc)上测定各孔的光吸收值(A 值), 波长选用 490~630 nm 双波长系统^[11,12].

$$\text{存活率}(SF) = \frac{\text{实验组光吸收值}(A)}{\text{对照组光吸收值}(A)}$$

1.5.3 L02 细胞辐射增敏实验 收集对数生长期的 L02 细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液配制成单细胞悬液(细胞浓度 10^4 个/ mL^{-1}), 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔体积 200 μL , 用药与照射条件同上. 辐照后以不含药培养基洗 3 遍, 每孔加正常培养基 200 μL , 培养 72~84 h, MTT 法检测同上.

1.6 荧光显微镜检测核黄素在细胞内的分布

收集对数生长期的 L02 细胞, 调整细胞浓度为 10^6 个/ mL^{-1} 左右, 种植于 20 mm \times 20 mm 盖玻片, 接种于 6 孔细胞培养板中, 培养 2~3 d, 加入不同浓度的核黄素药物作用 2 h, 去培养液, 取出长有细胞的盖玻片, PBS 冲洗 3~5 遍, 100% 甲醇固定 5 min, 荧光显微镜(Olympus BH-2 型, 激发波长 450 nm, 发射波长 520 nm)下观察^[13,14], 拍照.

1.7 统计学处理

t 检验进行统计学处理.

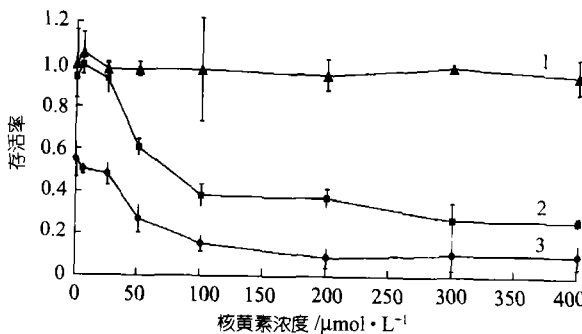


图 1 MTT 方法检测小鼠胸腺细胞的存活率-药物剂量曲线

核黄素药物作用浓度 5~400 $\mu\text{mol/L}$, 作用时间 2 h, 作用条件见第一节, 每点数据均为 3 次独立实验的平均值, 以平均值 \pm 标准偏差的形式表示. 1 示核黄素的细胞毒性; 2 示 5 Gy 辐照后 0 h 的细胞存活; 3 示 5 Gy 辐照后 4 h 的细胞存活

2 结果

2.1 核黄素的细胞毒性

测定在无照射情况下, 各个核黄素浓度作用下细胞转化 MTT 的光吸收值(A), 并依核黄素浓度与小鼠胸腺细胞和 L02 细胞存活的关系得出药物剂量-存活率曲线(图 1-1)和图 2-1).

结果表明, 在本实验所采用的核黄素浓度范围内(5~400 $\mu\text{mol/L}$), 当核黄素作用于体外培养的小鼠胸腺细胞和 L02 细胞时, 对细胞的生长基本无抑制, 无明显的细胞毒性($P > 0.05$).

2.2 核黄素的辐射增敏作用

测定在 5 Gy 的照射剂量下,各核黄素浓度作用下细胞转化 MTT 的光吸收值(A),并依核黄素浓度与小鼠胸腺细胞存活的关系得出照射下的药物剂量-存活率曲线(图 1-2,3),结果表现出明显的辐射增敏效果(0 h 组大于 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 4 h 组大于 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, t 检验结果均 $P < 0.01$,与对照组(5 Gy 不加核黄素空白对比组)的相差非常显著).在 5 Gy ^{60}Co γ 射线辐照条件下,低浓度($< 50 \mu\text{mol/L}$)和高浓度($> 100 \mu\text{mol/L}$)核黄素作用下的小鼠胸腺细胞存活率的时间依赖关系表现出明显的差异,其规律为:低浓度下,细胞受 γ 射线辐照后并不立刻大量死亡,但随着时间的推移存活率迅速下降,4 h 后存活水平降低到较低的水平;而高浓度下,细胞立刻大量的死亡,且随时间的变化,其细胞存活的下降的程度对比低浓度时细胞存活下降的程度要低得多.

2.3 小鼠胸腺细胞体外存活情况

由于小鼠胸腺细胞在体外的生存能力较差,随体外培养时间的延长而产生一定量的细胞死亡,为更准确地研究核黄素对体外培养的小鼠胸腺细胞的作用效果,我们对体外小鼠胸腺细胞在不同体外培养时刻的存活情况进行测定,并作为本实验的本底对照.图 3 表明,在本实验条件下,小鼠胸腺细胞体外存活能力很差,当体外培养 24 h 后,基本上无细胞存活.在以 MTT 方法研究核黄素辐射增敏效应时,选择 4 h 是合适的,因为此时小鼠胸腺细胞的存活情况在无给药的情况下没有太大的变化,本实验中均采用体外培养 4 h 的小鼠胸腺细胞为实验对象.

2.4 核黄素在 L02 细胞内的亚细胞定位

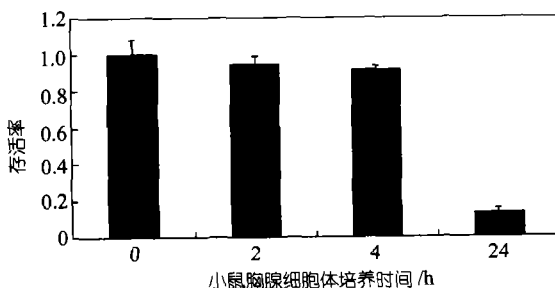


图3 MTT 方法检测小鼠胸腺细胞的存活率-体外培养时间曲线

作用条件见第1节,每点数据均为3次独立实验的平均值,以平均值 \pm 标准偏差的形式表示

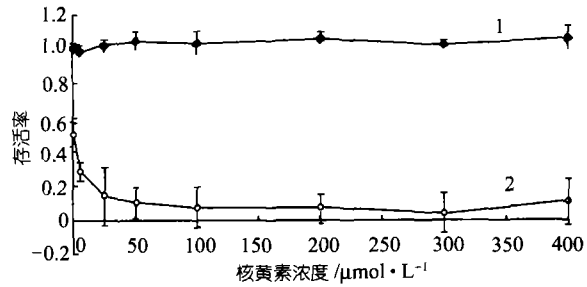


图2 MTT 方法检测 L02 细胞的存活率-药物剂量曲线
核黄素作用浓度为 5 ~ 400 $\mu\text{mol/L}$. 1 示核黄素的细胞毒性; 2 示 5 Gy 辐照的细胞存活,作用条件见第1节,每点数据均为3次独立实验的平均值,以平均值 \pm 标准偏差的形式表示

图版 I (附本刊后,下同)所显示的荧光显微镜照片表明,核黄素在细胞内的分布主要成实心或小圆环状,当药物浓度高到 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞膜上出现一定的分布(呈现大圆环状).把细胞在自然光下的照片与在荧光激发光下的照片对比可知:核黄素在细胞中的分布因高浓度和低浓度而有所不同,低浓度时核黄素主要在细胞内部分布,集中于核膜上和细胞核的内部,说明辐射增敏作用的主要位点是细胞核.当核黄素的浓度较大时(200 $\mu\text{mol/L}$),细胞膜上也有药物的

分布,说明此时细胞膜也是辐射增敏的作用位点之一.

3 讨论

小鼠胸腺细胞是在辐射生物学中已经建立、并被广泛承认的一个辐射生物学模型。胸腺细胞有很高的辐射敏感性，在相对小剂量照射后即发生间期死亡，从其生成的分子机理看则是细胞凋亡，细胞的凋亡可以在辐照后几分钟的时间间隔内表现出来，即滞后期相对较短^[15]。以小鼠胸腺细胞为研究对象，可以在相对较短的时间内对细胞的凋亡予以检测，并对发生在滞后期的分子事件包括 DNA 修复、基因的表达、分化、蛋白质的合成，以及效应蛋白的激活予以推测，从而对核黄素在细胞层次上的辐射敏化作用的分子机理进行推测。

本研究选用小鼠胸腺细胞为对象，对核黄素辐射增敏作用的时效性进行了研究；以 L02 细胞为参考，对核黄素在细胞中的亚细胞定位进行了研究。当然小鼠胸腺细胞和 L02 细胞在许多方面相差很大，可是小鼠胸腺细胞形态较小，且属于悬浮细胞，这对以光学荧光显微镜为手段，观察核黄素在细胞中的定位造成许多困难。由于核黄素为维持生物体正常新陈代谢、细胞功能和生长所必不可少，所以不同细胞对核黄素分子的吸收和利用的方式都是相近的，势必造成核黄素在细胞内的分布相似。本实验选择贴壁成长、便于观察的 L02 细胞的亚细胞定位作为核黄素的作用机理参考应该具有普遍意义。

为对 L02 细胞和小鼠胸腺细胞的差别是否直接影响核黄素的作用方式予以判断，本实验以不同浓度核黄素作用于 L02 细胞，84 h 5 Gy 辐照后培养，MTT 方法测定其存活情况，结果如图 2-2 所示，结果曲线和小鼠胸腺细胞在照后 4 h 的曲线形状基本一致。

图 1 显示在辐照后 0 和 4 h，小鼠胸腺细胞的存活率在低药物浓度时其数值相差很大，而高药物剂量时两者差别较小。图 4 显示在小于 50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下，存活率的变化均大于对照组的变化。结合荧光显微镜照片(图版 I -1)以及我们的激光光解和脉冲辐解研究的结果可知，此时核黄素的作用位点集中在细胞核，核内 DNA 是核黄素辐射增敏作用发生的主要靶位点，核黄素通过电荷转移阻止 DNA 阴阳自由基离子对的重合，辐射中产生的核黄素氧化性自由基可进一步氧化 DNA 靶分子与抗氧化剂，抗氧化剂的消耗又抑制了 DNA 辐射损伤修复，即以两种方式产生辐射增敏效果^[4,9,16]。此时，核黄素辐射增敏作用对细胞间期死亡的贡献主要表现在加剧细胞的凋亡，具有时效性^[15]。

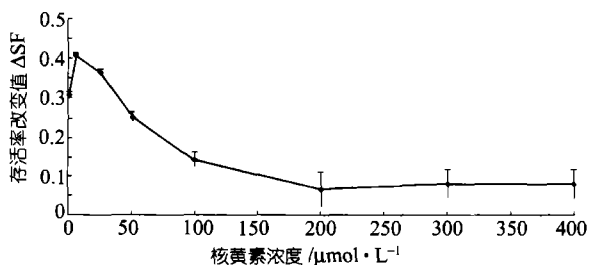


图 4 小鼠胸腺细胞 5 Gy 照射后 0~4 h 存活率的改变值-药物剂量曲线

核黄素作用浓度为 5~400 $\mu\text{mol/L}$, $\Delta\text{SF} = \text{SF}(0 \text{ h}) - \text{SF}(4 \text{ h}) - \Delta\text{SF}(\text{blank})$

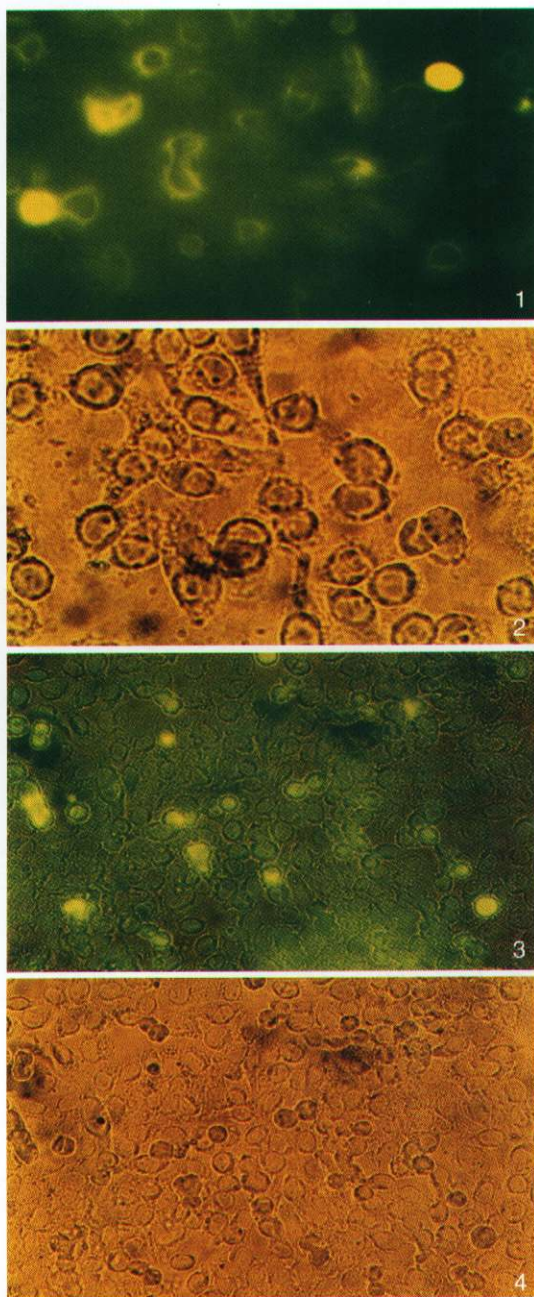
大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时，存活率随浓度的增大而降低的趋势不明显，基本上进入平台期，由此可以认为 100 $\mu\text{mol/L}$ 左右是核黄素辐射增敏效果最优的浓度值。

由于射线的直接和间接作用均会导致细胞器和细胞膜结构的破坏，此时细胞也会发生一定程度的即刻(0 h)死亡，但这种作用的效果并不十分明显。高浓度核黄素作用位点还将集中于细胞膜上(图版 I -3)，细胞膜结构的破坏导致细胞的死亡，这种由于胞膜受损而导致的细胞死亡在分子机理上属于细胞坏死^[15]。结合图 1 和 4，可以看到当核黄素的浓度

综上所述,我们对核黄素在细胞水平上的辐射增敏作用进行了初步的研究,提出并验证了核黄素的辐射增敏性质,从而突破了以往只考虑核黄素光敏性质的局限性,开拓了核黄素新的应用领域。然而,乏氧情况下核黄素辐射增敏的研究结果尚不足,在今后的工作中应继续深入探讨。

参 考 文 献

- 1 Bensasson R V, Land E J, Truscott T G. *Flash Photolysis and Pulse Radiolysis in Biology and Medicine*. Oxford: Pergamon Press, 1983. 140~147
- 2 Heelis P F. The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines). *Chem Soc Rev*, 1982, 11: 15~39
- 3 Ito K, Inoue S, Yamamoto K, et al. 8-Hydroxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin. *J Biol Chem*, 1993, 268: 13221~13227
- 4 Lu C Y, Wang W F, Lin W Z, et al. Generation and photosensitization properties of the oxidized radical of riboflavin: a laser flash photolysis study. *J Photochem Photobiol B: Biology*, 1999, 52: 111~116
- 5 Lu C Y, Lin W Z, Wang W F, et al. Riboflavin (VB₂)-sensitized photooxidation of 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (dGMP) in aqueous solution: a transient intermediates study. *Phys Chem Chem Phys*, 2000, 2: 329~335
- 6 陆长元, 韩镇辉, 潘景喜, 等. 核黄素(维生素 B₂)的光化学活性粒子: 潜在的光生物学效应. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2000, 2: 12~18
- 7 Lu C Y, Yao S D, Lin W Z, et al. Kinetic observation of rapid electron transfer between pyrimidine electron adducts and sensitizers of riboflavin, flavin adenine dinucleotide (FAD) and chloranil: a pulse radiolysis study. *Radiat Phys Chem*, 2000, 59: 61~66
- 8 Lu C Y, Han Z H, Tu T C, et al. Kinetic observation of rapid electron transfer from electron adducts and reducing OH adducts of dAMP to riboflavin, flavin adenine dinucleotide (FAD): a pulse radiolysis study. *Chin J Chem*, 2000, 18: 500~506
- 9 Lu C Y, Yao S D, Han Z H, et al. Reaction of reducing hydroxyl radical adducts of pyrimidine nucleotides with riboflavin and flavin adenine dinucleotide (FAD) via electron transfer: A pulse radiolysis study. *Biophys Chem*, 2000, 85: 17~24
- 10 Hamind M S, Alvaro O, Thomas Y M, et al. Riboflavin uptake by the human-derived liver cells Hep G2: mechanism and regulation. *J Cell Physiol*, 1998, 176: 588~594
- 11 Eble M J, Hensley F W, Flentje M, et al. A modified computer-assisted colorimetric microtitre assay (MTT) to assess *in vitro* radiosensitivity of V79, CaSki, HeLa, and WiDr cells. *Int J Radiat Biol*, 1994, 65: 193~201
- 12 司徒镇强, 吴军正. *细胞培养*. 北京: 世界图书出版社公司, 1996. 186~187
- 13 Odrun A G, Moniue H R, Kristian B, et al. Photodynamically induced effects in colon carcinoma cells (WiDr) by endogenous photosensitizers generated by incubation with 5-aminolaevulinic acid. *J Photochem Photobiol B: Biology*, 1999, 49: 162~170
- 14 Melnikova V O, Bezdetnaya L N, Bour C, et al. Subcellular localization of meta(hydroxyphenyl)-chlorin in human tumor cell subjected to photodynamic treatment. *J Photochem Photobiol B: Biology*, 1999, 49: 96~103
- 15 夏寿萱. *分子放射生物学*. 北京: 原子能出版社, 1992. 342
- 16 Kotaki Y, Yagi K. Fluorescence properties of flavins in various solutions. *J Biochem*, 1970, 68: 509~516



核黄素作用 2 h 的 L02 细胞荧光显微镜照片(1, 3)和自然光显微镜照片(2, 4)
1 和 2 示核黄素浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ (40 倍物镜); 3 和 4 示核黄素浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ (20 倍物镜)