

香兰素衍生物 VND3207 对 α 粒子辐射诱发人成纤维细胞基因组 DNA 损伤的防护研究

陈倩倩^{1,2}, 汪黎², 尚增甫², 刘晓丹², 王豫², 郑红¹, 汪思应¹, 周平坤²

1. 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

摘要 高能 α 粒子辐射所致基因组 DNA 损伤形式为复杂的簇集损伤, 修复难度大, 生物效应严重, 目前尚缺乏有效防护药物。前期发现香兰素衍生物 VND3207 具有抗氧化损伤、促进 DNA 双链断裂损伤修复的作用, 能有效防护低传能线密度 (LET) γ 射线诱发细胞凋亡和基因组损伤。本研究旨在探讨 VND3207 对高能 α 粒子辐射诱发人成纤维细胞基因组 DNA 损伤的防护效应。细胞克隆形成实验表明, VND3207 无论是照射前加药还是照射后加药作用均能增强人成纤维 HFS 细胞对 α 粒子的辐射损伤抗性。通过中性单细胞凝胶电泳 (彗星电泳)、 γ -H2AX 免疫荧光簇集点、 γ -H2AX 蛋白表达水平、细胞微核等多个基因组 DNA 损伤指标分析, 表明了 VND3207 对 α 粒子辐射诱发细胞基因组 DNA 损伤的有效防护作用, 其在 5 ~ 10 μ mol/L 浓度下, 就可产生显著辐射防护效果, 既能减轻 α 粒子辐射诱发细胞 DNA 的原初损伤水平, 又能提高细胞的 DNA 修复能力。因此, VND3207 具有维护高能粒子辐照细胞的基因组稳定性的作用, 有开发成为抗高 LET 辐射损伤新药的价值。

关键词 α 粒子; 辐射防护剂; DNA 损伤; 微核; 香兰素衍生物

中图分类号 R99

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)04-0031-06

Radioprotection of Vanillin Derivative VND3207 Against Genomic DNA Damage of Human Fibroblastoid Cells Induced by α Particles

CHEN Qianqian^{1,2}, WANG Li², SHANG Zengfu², LIU Xiaodan², WANG Yu², ZHENG Hong¹,
WANG Siying¹, ZHOU Pingkun²

1. College of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences of PLA, Beijing 100850, China

Abstract As a high linear energy transfer (LET) radiation, α particles mainly induce DNA clustered damage with low repair efficiency and serious biological effects. There is still no effective radioprotection agent available against the biological detriments induced by α particles. The vanillin derivative VND3207 is a novel radioprotection agent with an antioxidant potentiality and protective effects against the genomic DNA damage and apoptosis induced by low LET γ -ray. The present study is designed to determine the radioprotective effect of VND3207 against the genomic DNA damage of human fibroblast HFS cells induced by high LET α particles. The clonogenic survival assay shows that VND3207 can significantly enhance radioresistance of HFS cells to the irradiation of α particles, no matter the cells are treated with VND3207 before or after irradiation. Multiple indicators of DNA damage detection, including single cell gel electrophoresis, immuno-fluorescent γ -H2AX foci, γ -H2AX protein expression and micronuclei assay, demonstrate that VND3207 can effectively decrease

收稿日期: 2009-12-21

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2007CB914603); 国家杰出青年科学基金项目 (30825011)

作者简介: 陈倩倩, 硕士研究生, 研究方向为放射生物学, 电子邮箱: qqchen0109@yahoo.com.cn; 周平坤 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: M18000002S), 研究员, 研究方向为放射生物学与辐射防护、基因毒理与 DNA 损伤修复, 电子信箱: zhoupk@nic.bmi.ac.cn

the initial DNA double-strand break level as well as increase the cellular DNA repair capacity and reduce the residual damage level. The effective concentration is as low as 10~20 mol/L. In conclusion, VND3207 has radioprotective effects on cell survival and genomic stability against the irradiation of α particles, and it is of value to develop radioprotective drugs against high LET radiation.

Keywords α particles; radioprotective agent; DNA damage; micronuclei; vanillin derivative

0 引言

随着空间科学研究的快速发展,人类未来飞行太空的次数会更多,驻留太空的时间会更长,因而空间环境辐射对航天员健康的影响是人类发展空间技术、开发太空资源所面临的一个严峻挑战。与地面不同的是,空间环境辐射更为复杂,其中包含有生物学危害性更大的高能粒子,如 α 粒子、重离子等,但其医学防护药物还是空白^[1]。另外,人类地球活动空间如居室环境、地下坑道、矿洞等也含有一定水平的核素氡,氡及子体能发散 α 粒子辐射,对人体造成危害。 α 粒子辐射为高传能线密度(Linear Energy Transfer, LET)的粒子辐射,其辐射权重因数是20,为光子辐射的20倍^[2],其诱发基因组DNA损伤是难以修复的复杂性簇集损伤(Cluster Damage)^[2-4],占DNA总损伤的比例大于90%,显著高于低LET的 γ 射线损伤(约60%)^[2],对人体主要的危害是致癌效应。现有的辐射防护药物^[5]主要是针对低LET的 γ 辐射损伤而研发的,因此,研究出能有效防护 α 粒子辐射对基因组DNA损伤的药物显得尤为重要。香兰素因是一种具有抗氧化和抗诱变活性的食品添加剂而被广泛应用^[6],能抑制低LET的X射线诱发的DNA单链断裂、染色体断裂和交联损伤^[7-8],显示了一定的抗辐射损伤作用,但其有效浓度相对较高。为此,本课题组从香兰素的系列衍生物中,筛选出能更有效地防护 γ 射线对DNA的损伤、清除自由基以及提高细胞DNA修复能力的化合物3,5-二甲氧基-4-羟基苯甲醛(VND3207)^[9-10]。本研究进一步探讨VND3207对高能 α 粒子辐射诱发正常人成纤维细胞基因组DNA损伤的保护作用,为发展其为高LET辐射防护药物提供直接实验依据,也为人类基因组DNA损伤防护药物的研究提供技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

香兰素衍生物VND3207(3,5-二甲氧基-4-羟基-苯甲醛)原料药购自浙江衢州市瑞尔丰化工有限公司,由军事医学科学院放射与辐射医学研究所植物药物化学研究室王林教授完成纯化工艺,纯度>99.5%;药物用二甲亚砜(Dimethyl Sulphoxide, DMSO)溶解,储存液为20mmol/L,用时以磷酸盐缓冲液(PBS,氯化钠8.0g,氯化钾0.2g,磷酸氢二钠1.15g,磷酸二氢钾0.2g,蒸馏水1000mL)稀释。二甲亚砜、细胞松弛素B(Cytochalasin B, CB)、十二烷基肌氨酸钠、碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)均购自Sigma公司。低熔点琼脂糖购自Promega公司。 γ -H2AX抗体购自Upstate公司。蛋白裂解液购自Pierce公司,硝酸纤维素膜购自Amersham

Pharmacia Biotech公司。其他试剂多为国内公司生产的分析纯产品。

1.2 细胞培养

人皮肤成纤维细胞(Human Foreskin Fibroblastoid cell, HFS cell)由美国佛罗里达大学分子遗传与微生物学系Cheng L. J.博士提供,本实验室保存。在含10%胎牛血清的DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(Gibco公司)培养液中,37℃、5% CO₂培养箱中培养,选择对数生长期进行实验。

1.3 照射条件和实验分组

α 粒子照射装置为²³⁸PuO₂电沉积源,剂量率为0.2Gy/min。实验分为正常组和照射组,照射组又分别设VND3207药物0.5、10、20、50、100 μ mol/L和二甲亚砜(Dimethyl Sulphoxide)溶剂对照。

1.4 辐射细胞克隆形成分析(细胞活存)

将对数期的实验组和对照组细胞按500/皿、1000/皿的细胞浓度接种于 ϕ 60mm的培养皿中,每组剂量设3个平行样,置于37℃、5% CO₂孵箱培养10d后,PBS洗2次,甲醇固定30min,自然晾干后Giemsa染色30min,计数细胞克隆数(计数 $\geq$ 50个细胞的单克隆),并计算克隆形成率和存活分数(survival fraction),绘制存活曲线。

克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%

细胞存活率(%)=(照射细胞克隆形成率/对照细胞克隆形成率) $\times$ 100%

1.5 中性单细胞凝胶电泳(SCGEA)检测DNA双链断裂损伤

细胞受照射后,分别在0、1、2、4h时间点收集,PBS洗涤后制成单细胞悬液,与1%低熔点琼脂糖1:1混合后铺胶,将制片置于新鲜配制的预冷裂解液(2.0mol/L NaCl,30mmol/L 乙二胺四乙酸(Na₂EDTA)、10mmol/L 羟甲基氨基甲烷(Tris)、1%十二烷基肌氨酸钠、1%曲拉通(Triton)和10%DMSO)中4℃裂解2h,0.5% TBE(0.2mmol/L Na₂EDTA、9mmol/L Tris、9mmol/L 硼酸)中和3次,每次1h。样品置于盛有0.5% TBE中性电泳缓冲液的电泳槽中,碘化乙锭(Propidium Iodide)25V、8mA、4℃条件下电泳25min,碘化乙锭(5 μ g/mL)避光染色10min。荧光显微镜观察、采集图像,每组各采集100个细胞信息,用CASP-1软件分析结果,以尾矩(Olive Tail Moment)表示DNA双链断裂损伤程度。实验重复3次。

1.6 γ -H2AX免疫荧光检测

受照射细胞培养30min后收集样品,在4%多聚甲醛中静置30min,用PBS洗3 $\times$ 10min,使用0.1% Triton X-100在冰上透化15min,然后使用含1%的胎牛血清白蛋白的PBS室温下封闭3 $\times$ 10min。使用抗 γ -H2AX的一抗,按1:200稀释后

4℃孵育过夜,用 PBS 洗 3×5min。接着使用荧光标记的羊抗鼠二抗(Alexa Fluor 488/TRITC)(1:200 稀释)室温孵育 1h,再用 PBS 洗 3×5min。细胞样本使用 DAPI 染色 10min,用 PBS 洗 3×5min,10% 甘油封片,使用激光共聚焦扫描显微镜观察 γ -H2AX 杂交斑点图像,一个 γ -H2AX 簇集斑点就表示一个 DNA 双链断裂簇集损伤位点。

1.7 免疫印迹杂交 (Western blotting) 检测细胞 γ -H2AX 蛋白水平

细胞受照射后 0 和 0.5h 收集,用冰冷的 PBS 洗两遍,使用蛋白裂解液处理细胞、提取总蛋白。经考马斯亮蓝染色法定量蛋白。检测 γ -H2AX 表达水平时取 40 μ g 总蛋白上样,经 15% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1~2h,用 TBST 按 1:1000 稀释抗 γ -H2AX 单抗,4℃下作用过夜,辣根过氧化酶标记兔抗鼠的二抗,室温作用 1h 后显影。通过检查肌动蛋白 (β -actin) 水平作为蛋白上样量的标定。

1.8 CB 法检测细胞微核

细胞受照射后 6h 加入细胞松弛素 B (Cytochalasin B) (终浓度 3 μ g/mL) 培养 24h 后终止培养,离心收集细胞,加入 2mL 0.075mol/L KCl 溶液低渗处理,轻轻吹打混匀后立即加入 3mL 新配的固定液 (冰醋酸:甲醇=1:3) 充分混匀,以 1200r/min 离心 7min。弃上清后加入 5mL 固定液,充分混匀后静置 30min 固定;以同样速度离心,留沉淀物,轻轻吹打混匀成细胞悬液,滴加到预冷的载玻片上,酒精灯烘干。用磷酸盐缓冲液 (pH6.8) 稀释的吉姆萨染液 (1:10) 染色,盲法阅片。在油镜下观察 1000 个双核细胞,依微核判断标准计数细胞微核数^[1],实验重复 3 次。

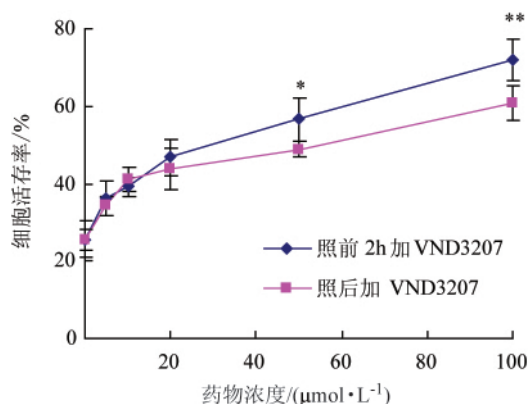
1.9 统计学方法

实验数据用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,组间比较采用方差分析及 t 检验进行统计分析。

2 结果

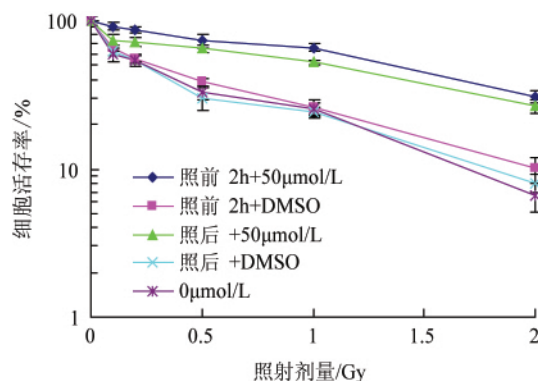
2.1 VND3207 提高 HFS 细胞对 α 粒子辐射抗性

HFS 细胞在 1.0Gy 的 α 粒子照射前 2h 或照射后立即加入 0~100 μ mol/L VND3207 药物,通过细胞克隆形成实验检测 VND3207 对 α 粒子照射细胞的保护作用。如图 1(a) 所示,1.0 Gy 的 α 粒子照射 HFS 细胞的存活率为 26%,无论照射前或照射后用药,5 μ mol/L VND3207 即可提高细胞存活率,并随着药物浓度的增加受照射细胞的存活率呈递增趋势。另外,还可见照射前用药效果优于照射后用药。对 HFS 细胞进行不同剂量 α 粒子照射 (0~2Gy),观察照射前或照射后用 50 μ mol/L VND3207 药物的保护作用,并与 7.04 μ mol/L DMSO 的相等浓度溶剂对照组比较。从图 1(b) 中看到,照射后加 DMSO 的溶剂对照组与单纯照射组细胞比较,细胞存活率没有明显差异,照射前 2h 加入 DMSO 预处理细胞,一定程度上提高了细胞在



(a) 不同浓度 VND3207 对 1.0Gy α 粒子辐射细胞的活存的影响

(a) Effects of VND3207 treated 2h before irradiation or immediately post-irradiation on survival of 1.0Gy α particles irradiated HFS cell



(b) 50 μ mol/L VND3207 对不同剂量 α 粒子辐射细胞存活的影响

(b) Effects of VND3207 at 50 μ mol/L on survival of HFS cell irradiated with different doses of α particles

图 1 细胞克隆形成法检测 VND3207 对 α 粒子照射 HFS 细胞存活的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Radioprotection of VND3207 on the clonogenic survival of human fibroblastoid HFS cells irradiated by α particles ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: 照射前药物处理组与照射后给药组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

7.04 μ mol/L DMSO 作为溶剂对照组

Notes: significant different between VND3207 added 2 h before and immediately after irradiation, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. 7.04 μ mol/L DMSO is solution control group

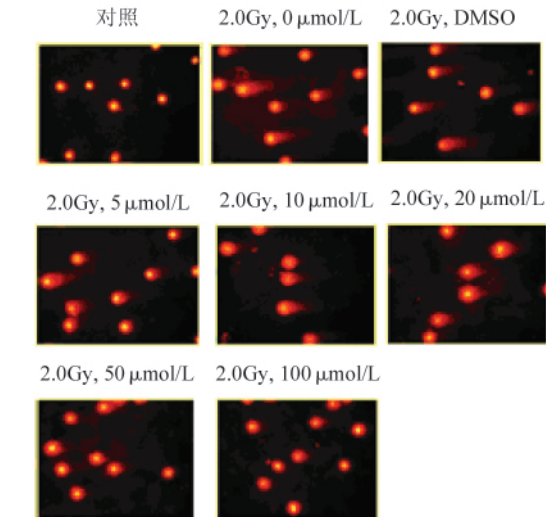
较高剂量 α 粒子照射细胞的活存率,但程度有限。而无论照射前 2h 或照射后加入 50 μ mol/L VND3207 处理,都显著提高了 HFS 细胞存活率,并且照射前 2h 药物处理效果更为明显。

2.2 VND3207 对 α 粒子诱发细胞 DNA 双链断裂损伤的保护效应

DNA 双链断裂损伤 (Double Strand Break, DSB) 是与电离辐射致细胞死亡、癌变等严重生物学后果密切相关的分子损伤事件。采用中性单细胞凝胶电泳又名彗星电泳检测 DNA

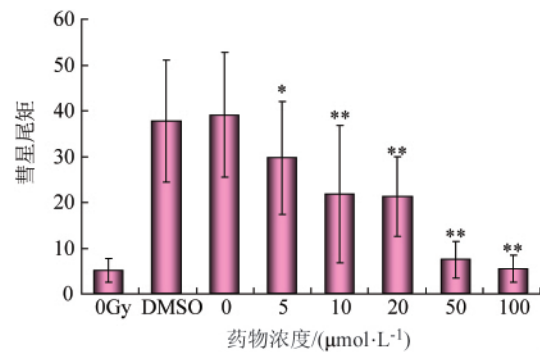
DSB, 彗星尾部 DNA 含量和尾长即尾矩代表了 DNA 损伤程度。2.0 Gy α 粒子照射 HFS 细胞后 1h 检测 DNA 损伤,如图 2(a)所示,在照射前 2h 加入不同浓度 VND3207 保护下, α 粒子照射细胞的 DNA 拖尾现象明显减轻。图 2(b)为 CAPS-1 软件分析的细胞彗星尾矩参数,可看出 VND3207 在 5 μ mol/L 浓度下能显著减轻受照细胞的 DNA 损伤($P<0.05$),并且减轻

的程度呈药物浓度依赖性效应关系。14.08 μ mol/L DMSO 溶剂对照组(等同于 100 μ mol/L 药物组中的 DMSO 溶剂量)与未加药组比较,彗星尾矩无统计学差异。在 2.0Gy α 粒子照射后,0、1、2、4h 不同时间点检测 DNA 双链断裂损伤,可见照射前 2h 加入 50 μ mol/L VND3207 药物保护,各时间点的 DNA 损伤(彗星尾矩)均有明显减少(图 2(c)和 2(d)),其中 0h 时间点



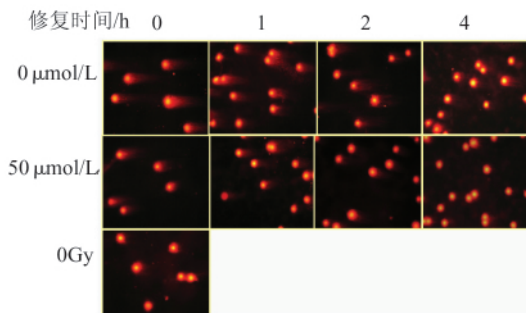
(a) 不同浓度 VND3207 对 2Gy α 粒子照射 HFS 细胞 DNA 损伤保护效应的彗星图像

(a) Comet image of 2Gy α particles-induced DNA double-strand break (DSB) in HFS cells pretreated 2h with VND3207 at different concentrations



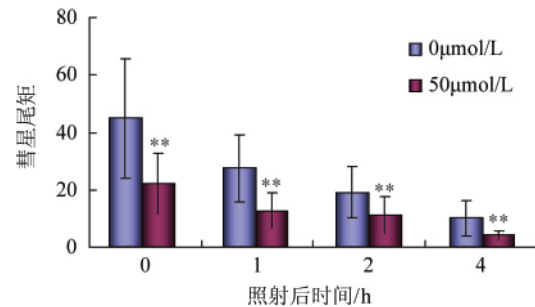
(b) 不同浓度 VND3207 对 2.0Gy 照射 HFS 细胞后 1h DNA 损伤(彗星尾矩)的保护效应($\bar{x}\pm s, n=3$)

(b) Dose-dependent protective effect of VND3207 on the comet tail moment of HFS cells DNA damage detected at 1h post 2.0Gy irradiation ($\bar{x}\pm s, n=3$)



(c) 50 μ mol/L VND3207 对 2Gy 照射 HFS 细胞不同时间点 DNA 损伤保护效应的彗星图像

(c) Comet image of DNA DSB in HFS cells detected at given times of repair post 2Gy-irradiation and the protection of VND3207 at 50 μ mol/L concentration



(d) 50 μ mol/L VND3207 对 2.0Gy 照射 HFS 细胞后不同时间点 DNA 损伤(彗星尾矩)的保护效应($\bar{x}\pm s, n=3$)

(d) Protective effect of 50 μ mol/L VND3207 on the comet tail moment of HFS cells detected at given times of repair after 2.0Gy irradiation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

图 2 中性单细胞凝胶电泳检测 α 粒子诱发 HFS 细胞 DNA 双链断裂及 VND3207 药物保护作用

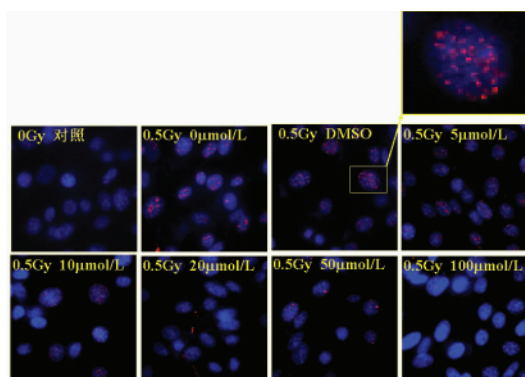
Fig. 2 Protective effect of VND3207 on the induction and repair of DNA double-strand breaks in α -particles irradiated HFS cells detected by single cell gel electrophoresis

注: 细胞彗星尾矩代表 DNA 损伤; (b): 药物组与 0 μ mol/L 组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$, DMSO 溶剂对照浓度为 14.08 μ mol/L; (d): 50 μ mol/L 药物组与 0 μ mol/L 组比较, $**P<0.01$. DMSO 溶剂对照浓度为 7 μ mol/L

Notes: Olive tail moment represents DNA damage; (b): As compared to 0 μ mol/L control group $*P<0.05$, $**P<0.01$, 14.08 μ mol/L DMSO was taken as solution control group; (d): Comparison between 50 μ mol/L VND3207 group and 0 μ mol/L control group at a same time point, $**P<0.01$, 7.04 μ mol/L DMSO was taken as solution control group

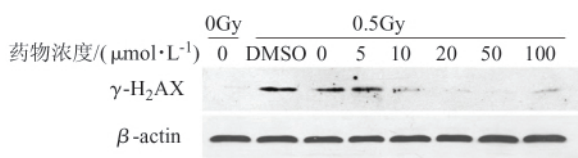
代表 DNA 原初损伤,表明 VND3207 对 α 粒子辐射细胞 DNA 损伤有显著保护作用。

DNA 双链断裂损伤后,很快诱发组蛋白 H2AX 的第 139 位丝氨酸磷酸化为 γ -H2AX, γ -H2AX 对于募集其他 DNA 损伤修复反应蛋白到 DNA 损伤位点处起着非常关键的作用, γ -H2AX 簇集点也被用作 DNA 双链断裂损伤的特异分子标记物^[12-13]。由图 3(a)可以看出,0.5Gy α 粒子照射后 30min,可见细胞内大量的 γ -H2AX 簇集点,照射前 2h 用 5~100 μ mol/L VND3207 药物保护,细胞内 γ -H2AX 簇集点明显减少,而且药物浓度越高,作用越明显,进一步说明 VND3207 能有效减轻 α 粒子对细胞基因组 DNA 的损伤作用。同时,本研究用免疫印迹杂交法检测细胞内总的 γ -H2AX 表达水平,也证明了 10 μ mol/L 以上浓度的 VND3207 能显著降低 γ -H2AX 的量(图 3(b))。



(a) 激光共聚焦显微镜观察 α 粒子照射细胞后 0.5h 的 γ -H2AX 免疫荧光簇集点及 VND3207 的保护作用

(a) Immuno-fluorescent staining of γ -H2AX foci in HFS cells 0.5h after α particles irradiation and the protective effect of VND3207



(b) 免疫印迹杂交检测 α 粒子照射后 0.5h 的 γ -H2AX 总蛋白表达水平的变化

(b) Effect of VND3207 on γ -H2AX protein expression level in HFS cells 0.5h after α particles irradiation

图 3 VND3207 对 0.5Gy α 粒子照射 HFS 细胞诱发 γ -H2AX 簇集点及蛋白表达变化的影响

Fig. 3 Effect of VND3207 on γ -H2AX foci and protein expression level in HFS cells irradiated with 0.5Gy of α particles

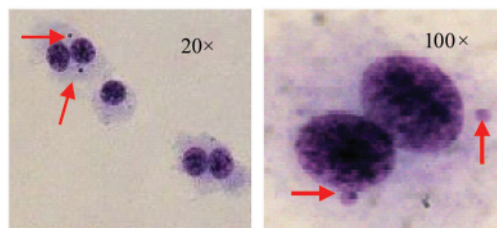
注: 溶剂对照的 DMSO 浓度为 14.08 μ mol/L

Note: 14.08 μ mol/L DMSO was taken as solution control group

2.3 VND3207 对 α 粒子照射诱发细胞微核的影响

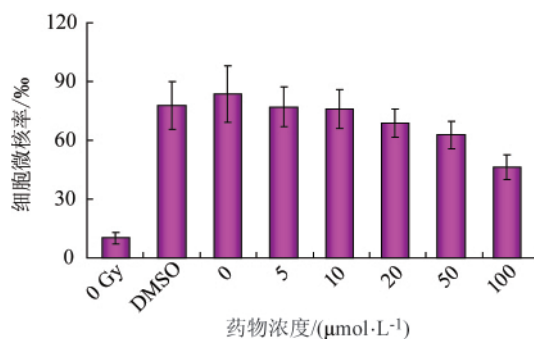
微核实验是反映染色体 DNA 损伤的指标之一,广泛应用

于遗传、药物、环境等领域的遗传效应评估。图 4(a)为 α 粒子照射细胞的微核图像,箭头所示为微核。HFS 细胞在不同浓度 VND3207 预先作用 2h 后经 2.0Gy α 粒子照射诱发微核率的测定结果如图 4(b)所示。可以看出,2.0Gy α 粒子照射细胞的微核率明显增加,在 20 μ mol/L 以上浓度 VND3207 保护下细胞微核率显著下降,并随着药物浓度的增加,微核率下降程度更加明显,表明 VND3207 能有效地保护 α 粒子辐射细胞染色体损伤。



(a) α 粒子照射 HFS 细胞的微核图像(箭头所指)

(a) Micronuclei image of HFS cells irradiated with α particles (arrow)



(b) 不同浓度 VND3207 对 2.0Gy α 粒子诱发细胞微核率的影响

(b) Micronuclei frequency of HFS cells induced by 2.0Gy of α particles and the protective effect of VND3207 treatment 2h before irradiation at 0~100 μ mol/L concentrations

图 4 VND3207 对 α 粒子诱发细胞微核的影响

Fig. 4 Protective effect of VND3207 against the induction of micronuclei in HFS cells by α particles

注: 溶剂对照组的 DMSO 浓度为 14.08 μ mol/L; $\bar{x}\pm s$, $n=3$; VND3207 保护组与 0 μ mol/L 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Notes: 14.08 μ mol/L DMSO was taken as the solution control group; $\bar{x}\pm s$, $n=3$; As compared with 0 μ mol/L group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

α 粒子作为高 LET 辐射引起的生物学效应极为严重,所致 DNA 损伤以簇集损伤为主,即在 DNA 双螺旋结构域数个碱基范围内有两个或多个损伤位点,其中损伤位点包括 DNA 单链断裂、碱基损伤、糖丢失、脱嘧啶/嘌呤位点等^[3]。由于其修复难度大,DNA 簇集损伤是相对生物效应导致 α 粒子辐射很高的主要原因,主要危害是致癌效应。根据矿工患肺癌的流

行病学资料显示,肺癌发生的 10%~20% 归于氡及其子体的 α 粒子辐射^[14],其发病机制为呼吸道长期接触的氡气及其子体不断发射高能 α 粒子,能量沉积在细胞核 DNA 分子周围直接导致 DNA 分子损伤。另一方面,辐射引起细胞内水分子辐解,导致大量自由基的生成,间接造成细胞内 DNA 损伤和染色体断裂、基因组不稳定性等多种基因突变累积以及甲基化修饰等表观遗传改变,继而诱发细胞恶变^[15-18]。因此,减轻 DNA 双链断裂,特别是簇集损伤,提高细胞 DNA 修复能力,是防护高能粒子辐射后致癌效应的最有效的技术途径。过去研究报道或药效评价的辐射防护剂绝大部分是针对低 LET 辐射开展的^[5,19-21],除少数采用体外纯化质粒 DNA 的保护试验外,很少有在细胞基因组 DNA 水平上研究和评价针对高能粒子辐射损伤的防护剂。本研究结果显示,无论是照射前还是照射后给予一定浓度的 VND3207 药物,均能有效地防护 α 粒子辐射对人成纤维 HFS 细胞基因组 DNA 的损伤,5~10 μ mol/L 浓度就有显著效果。照射前用药效果比照射后用药更好,反映出本课题组以前报道的 VND3207 清除自由基的作用,由此减轻了辐射对 DNA 的间接损伤效应^[9]。照射前用药,在照射即刻的检测结果显示的是 VND3207 降低 DNA 原初损伤的效应。而 VND3207 在细胞照射后用药显示出的辐射防护效应,表明其具有促进细胞 DNA 损伤修复的功能,这可能与它能提高 DNA 双链断裂损伤关键修复蛋白 DNA-PKcs 的表达水平有关^[9]。

4 结论

本研究通过中性单细胞凝胶电泳(彗星电泳)、 γ -H2AX 簇集点和蛋白表达变化、细胞微核和细胞克隆形成实验多个指标分析,表明了 VND3207 对 α 粒子辐射细胞基因组 DNA 损伤的防护作用,照射前和照射后加药均有效。VND3207 在 5~10 μ mol/L 浓度下就能发挥维护辐射细胞基因组 DNA 稳定性的作用,具有开发为防护高能粒子辐射损伤的抗辐射新药的价值。

参考文献 (References)

- [1] 周平坤. 模拟空间辐射生物学效应研究进展 [J]. 辐射防护通讯, 2009, 29(5): 2-6.
Zhou Pingkun. *Radiation Protection Bulletin*, 2009, 29(5): 2-6.
- [2] The International Commission on Radiological Protection (ICRP). The 2007 recommendations of the international commission on radiological protection[R]. Publication 103, Annual of the ICRP, 2007, 37(2-4).
- [3] Hada M, Georgakilas A G. Formation of clustered DNA damage after high LET irradiation: A review [J]. *Radiation Research*, 2008, 49: 203-210.
- [4] Terato H, Ide H. Clustered DNA damage induced by heavy ion particles [J]. *Biological Science in Space*, 2004, 18(4): 206-215.
- [5] 高月, 马增春. 辐射损伤防治药物发展历史与展望 [J]. 辐射防护通讯, 2009, 29(5): 30-35.
Guo Yue, Ma Zengchun. *Radiation Protection Bulletin*, 2009, 29(5): 30-

35.

- [6] 国家质检总局. 食品添加剂香兰素[S]. 国家标准 GB 3861-2008, 北京: 知识产权出版社, 2008-12-03.
General Administration of Quality Supervision. Food additives Vanillin [S]. National Standard GB3861-2008. Beijing: Intellectual Property Publishing House, 2008-12-03.
- [7] Sasaki Y F, Ohta T, Imanishi H, *et al.* Suppressing effects of vanillin, cinnamaldehyde, and anisaldehyde on chromosome aberrations induced by X-rays in mice[J]. *Mutation Research*, 1990, 243(4): 299-302.
- [8] Maurya D K, Adhikari S, Nair CK, *et al.* DNA protective properties of vanillin against γ -radiation under different conditions: Possible mechanisms[J]. *Mutation Research*, 2007, 634(1-2): 69-80.
- [9] Zheng H, Chen Z W, Wang L, *et al.* Radioprotection of 4-hydroxy-3, 5-dimethoxybenzaldehyde (VND3207) in culture cells is associated with minimizing DNA damage and activating Akt [J]. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 2008, 33(1): 52-59.
- [10] 黄锐, 贺性鹏, 徐勤枝, 等. 香兰素衍生物 VND3207 对 γ 射线照射人淋巴瘤细胞基因组损伤和凋亡的保护作用[J]. 辐射防护, 2009, 29(4): 225-231.
Huang Rui, He Xingpeng, Xu Qinzhi, *et al.* *Radiation Protection*, 2009, 29(4): 225-231.
- [11] Fenech M. The invitro micronucleus technique [J]. *Mutation Research*, 2000, 455(1-2): 81-95.
- [12] 郑红, 周平坤, 汪思应, 等. DNA 损伤应答与 DNA 双链断裂 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2007, 27(6): 607-610.
Zheng Hong, Zhou Pingkun, Wang Siying, *et al.* *Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection*, 2007, 27(6): 607-610.
- [13] Kuo L J, Yang L X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks [J]. *In Vivo*, 2008, 22(3): 305-309.
- [14] The International Commission on Radiological Protection (ICRP). Lung cancer risk from indoor exposures to radon daughters [C]. ICRP Publication 50. Annual of the ICRP, 1987, 17(1).
- [15] Sui J L, An J, Sun J F, *et al.* Spindle checkpoint and apoptotic response in α particles-transformed human bronchial epithelial cells [J]. *Radiation & Environmental Biophysics*, 2004, 43(4): 257-263.
- [16] Sun J F, Sui J L, Zhou P K, *et al.* Decreased efficiency of γ -ray-induced DNA double-strand break rejoining in malignant transformants of human bronchial epithelial cells generated by alpha-particle exposure [J]. *International Journal of Radiation Biology*, 2002, 78(9): 773-780.
- [17] 隋建丽, 范保星, 孙敬芬, 等. α 粒子诱发人支气管上皮细胞癌变的 DNA 修复基因表达谱研究[J]. 癌变·突变·畸变, 2004, 16: 257-260.
Sui Jianli, Fan Baoxing, Sun Jingfen, *et al.* *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 2004, 16: 257-260.
- [18] Andreev S G, Eidelman Y A, Salnikov I V, *et al.* Mechanistic modelling of genetic and epigenetic events in radiation carcinogenesis [J]. *Radiation Protection Dosimetry*, 2006, 122(1-4): 335-339.
- [19] Mishra K, Bhardwaj R, Chaudhury N K. Netropsin, a minor groove binding ligand: A potential radioprotective agent[J]. *Radiation Research*, 2009, 172(6): 698-705.
- [20] Weiss J F, Landauer M R. History and development of radiation-protective agents [J]. *International Journal of Radiation Biology*, 2009, 85(7): 539-573.

(责任编辑 李慧政)