

文章编号: 1007-4627(2006)01-0043-03

γ 射线对肝癌细胞 G2 染色体的原初损伤*

王转子^{1,2}, 李文建¹, 杨建设¹, 周利斌^{1,2}, 魏巍^{1,2}, 毛淑红^{1,2}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 用 Calyculin-A 诱导的早熟染色体凝集技术研究了 γ 射线诱导人肝癌细胞株 HepG2 细胞 G2 期染色体的原初损伤。结果表明: G2 等点染色单体断裂畸变与辐射剂量呈线性平方关系, G2 染色单体断裂畸变和 G2 期染色单体断裂畸变总数与辐射剂量呈线性正相关关系, 发生各类断裂畸变的细胞率与剂量也呈线性正相关关系。 γ 射线诱发的断裂畸变主要是 G2 染色单体断裂畸变, 断裂畸变的细胞主要是发生 G2 染色单体断裂畸变。

关键词: 早熟染色体凝集技术; HepG2 细胞; γ 射线; G2 染色单体断裂畸变; 断裂畸变细胞率

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

恶性肿瘤经放疗后局部复发率仍然较高, 一个重要原因是个体或肿瘤细胞本身对射线的反应存在很大的差异。用于描述射线对细胞作用的指标很多, 理论上任何生物学终点都可以反映射线对细胞的作用, 但是多数指标, 如细胞受照后的克隆形成率和微核率等, 都受到细胞增殖等因素的影响, 不能快速而直接地反映射线对细胞的作用。研究间期染色体畸变则可以避免上述问题。早熟染色体凝集(PCC)技术的问世^[1]为之提供了有效手段, 尤其是 Calyculin-A 能快速诱导间期染色体凝集^[2]并排除了诱导细胞的影响。PCC 技术多用于研究射线对 G0/G1 期细胞的作用, G0/G1-PCC 染色体畸变与辐射剂量的关系是线性正相关关系^[3], 而有关射线作用下 G2-PCC 染色体畸变的报道很少。本文用 Calyculin-A 诱导的 G2-PCC 技术研究了 γ 射线对人肝癌细胞株 HepG2 细胞 G2 染色体的原初损伤作用, 以期对辐射敏感性判断提供新的指标。

2 材料和方法

2.1 细胞培养

HepG2 肝癌细胞株, 用含有 10% 小牛血清 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640

(GIBCO)的培养液, 在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 的条件下培养, 两天 1 次换液, 3 天 1 次传代。

2.2 辐照

选取密度适宜的指数生长期细胞, 倒掉培养液, 用 PBS 缓冲液洗涤一次, 并留少量缓冲液以防细胞干死。在兰州大学第一附属医院放射科的 ⁶⁰Co 源上进行辐照, 吸收剂量分别为 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 和 8 Gy, 剂量率 0.20 Gy/min, 均匀度小于 95%。每个样品 3 次重复。

2.3 G2-PCC 的制备与观察

PCC 诱导剂 Calyculin-A (日本) 用 100% 的乙醇配成 0.1 mM 的储存液。

给每个样品各加入 2 mL 的新鲜培养液, 并在辐照前 5 min 加入 Calyculin-A 储存液, 使之最终浓度为 50 nM; 辐照结束后, 在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 条件下培养 30 min^[4]。制备 G2-PCC 同中期染色体制片一样^[5]。Giemsa 染色, 依据 Savage 等^[6]的畸变标准, 在显微镜下, 统计 50 个细胞中发生 G2 等点染色单体断裂数(iso-chromatid break)和 G2 染色单体断裂数(chromatid-type break)及发生两类断裂畸变的细胞数。G2 期染色单体断裂总数(total

收稿日期: 2005 - 09 - 05; 修改日期: 2005 - 11 - 08

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10335050); 国家科技部重大基础研究专项基金资助项目(2003CCB00200)

作者简介: 王转子(1971-), 女(汉族), 山西乡宁人, 博士研究生, 从事肿瘤辐射生物学研究; E-mail: yancz@lzb.ac.cn

chromatid breaks) 包括 G2 等点染色单体断裂和 G2 染色单体断裂, 其中每个 G2 等点染色单体断裂计为两个 G2 染色单体断裂。断裂畸变细胞率为 50 个细胞中平均每个细胞发生某类断裂畸变的几率。

3 结果与讨论

图 1 给出了 G2 染色体断裂畸变的量效关系, G2 等点染色单体断裂与辐射剂量之间符合线性平方关系, 其剂量-效应曲线的回归方程式为 $Y=0.03+0.015 \times D+0.035 \times D^2$, 拟合度 $R^2=0.987$, $P < 0.01$ (见图 1 (a)); G2 染色单体断裂和 G2 期染色单体断裂总数与辐射剂量之间都符合线性关系, 剂量-效应曲线的回归方程式分别为 $Y=0.324+3.17 \times D$, 相关系数 $r=0.99$ 和 $Y=0.486+3.75 \times D$, 相关系数 $r=0.99$, 两者相关系数的显著性 P 均小于 0.01 (见图 1 (b))。可以看出, 随着剂量的增加二者与剂量之间都存在显著正相关性。

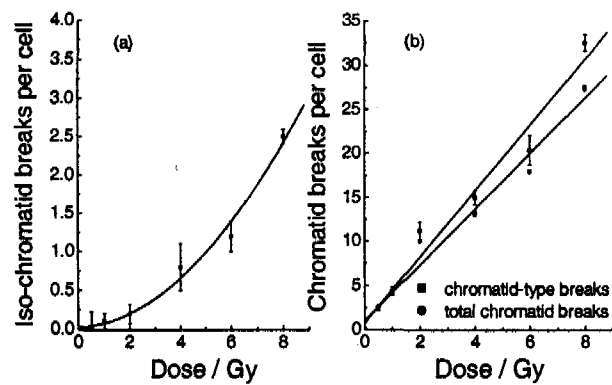


图 1 断裂畸变的量效关系
(a) 等点染色单体断裂的量效关系, (b) 染色单体断裂和染色单体断裂总数的量效关系。

按剂量效应曲线估算辐射诱发的 G2 等点染色单体断裂数与 G2 染色单体断裂数的比值, 范围在

表 1 G2 等点染色单体断裂与 G2 染色单体断裂的理论比值

剂量 /Gy	每个细胞中染色单体断裂量(a)	每个细胞中等点染色单体断裂量(b)	b/a
0.5	1.909	0.046	0.024
1	3.494	0.080	0.023
2	6.664	0.200	0.030
4	13.004	0.650	0.050
6	19.344	1.380	0.071
8	25.684	2.390	0.093

2.3%—9.3% (表 1)。说明 γ 射线诱发的 G2 染色体断裂畸变主要是 G2 染色单体断裂畸变; 但随着照射剂量的增加, 两者差别有缩小的趋势, 这可能是由于随剂量的增加, 两个或两个以上电子径迹引起两条姊妹染色单体同时断裂的机会增加。

图 2 给出了断裂畸变细胞比例的量效关系, 结果表明: 随着剂量的增大, 发生各类断裂的细胞比例增加; 并且随着剂量的增加, 发生 G2 期总断裂畸变细胞比例与 G2 染色单体断裂细胞比例趋于一致。当剂量达到 8 Gy 时, G2 期总断裂畸变细胞比例达到 86%, G2 染色单体断裂细胞比例约为 83%, 而此时发生 G2 等点染色单体断裂的细胞比例约为 41%。说明在一定的剂量范围内, 含断裂畸变的细胞主要发生的是 G2 染色单体断裂畸变。G2 期总断裂畸变细胞比例并不是 G2 染色单体断裂细胞比例和 G2 等点染色单体断裂细胞比例的直接相加, 而是小于两者之和, 这说明发生 G2 等点染色单体断裂的细胞往往伴随着 G2 染色单体断裂。当剂量从 4 Gy 增大到 8 Gy 时, 发生 G2 等点染色单体断裂的细胞比例增大了 1 倍, 而发生 G2 染色单体断裂的细胞比例只增大约 0.5 倍, 这可能是由于随剂量的增加, 特别是在较大剂量时, 辐射诱发的含 G2 染色单体断裂的细胞已接近饱和状态, 随着剂量的进一步增大, 含 G2 染色单体断裂的细胞进一步发生 G2 等点染色单体断裂的几率增加。

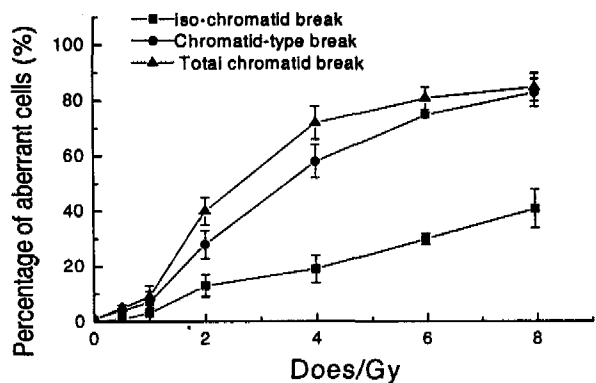


图 2 照射剂量与断裂畸变细胞比例的效应关系

G2 染色单体断裂和 G2 染色单体断裂畸变总数与辐射剂量之间呈线性关系, 说明 G2 原初染色单体断裂畸变与吸收剂量直接成正比关系。而 G2 等点染色单体畸变与剂量呈线性平方关系, 其中线性系数很低(0.015), 平方系数相对高(0.035)。这说明由一个电子径迹诱导等点染色单体断裂的可能

性是很小的, 等点染色单体的断裂主要是由两个以上电子径迹引起两条姊妹染色单体同时断裂, 即 γ 射线诱导等点断裂存在平方协同关系; 因此染色单体断裂的产额比等点染色单体断裂的产额要高, 从图 1 及表 1 可以得出这一点, 这正是 γ 射线这种稀疏电离辐射的特性^[7, 8]。 γ 射线是一种低 LET 射线, 其能量在其射程内呈指数衰减, 射线与染色体作用发生的物理过程是弹性散射, 沉积在单位质量染色体内的能量相对较少, 因此染色单体断裂的产额就比较低, 尤其是引起两条染色单体同时断裂的产额就更低。在本次实验中平均染色单体断裂产额小于 $5/(Gy \cdot cell)$, 平均等点染色单体断裂产额小

于 $0.5/(Gy \cdot cell)$ 。

G2 染色体初始畸变反映了射线对细胞的直接损伤, 避免了由于辐射引起的细胞周期阻止、细胞间期死亡、细胞凋亡和细胞分裂等因素的影响, 因此可用于快速而直接的研究射线对细胞的原初损伤作用, 进而用于研究 G2 染色体畸变与细胞辐射敏感性的关系。发生染色体畸变的细胞比例与辐射剂量直接相关, 而畸变的细胞比例及细胞畸变的程度都与细胞辐射敏感性密切相关, 因此进一步研究发生各类断裂畸变的细胞比例及修复后的断裂畸变细胞比例与细胞辐射敏感性的关系具有重要的临床意义。

参 考 文 献:

- [1] Johnson R T, Rao P N. *Nature*, 1970, **226**: 717.
- [2] Begg A C, Sprong D, Balm A, *et al.* *Radiotherapy and Oncology*, 2002, **62**: 335.
- [3] Durante M, Frusawa Y, George K, *et al.* *Radiation Research*, 1998, **149**: 446.
- [4] Kawata T, Durante M, George K, *et al.* 1th International Workshop on Space Radiation Research and 11th Annual NASA Space Radiation Health Investigators' Workshop Arona (Italy), 2000, May, 27—31, 226.
- [5] 司图镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版公司, 2003, 194—196.
- [6] Savage J R. *Journal of Medical Genetics*, 1976, **13**: 103.
- [7] Kawata T, Durante M, Furusawa Y, *et al.* *International Journal of Radiation Biology*, 2001, **77**(2): 165.
- [8] Kawata T, Gotoh E, Durante M, *et al.* *International Journal of Radiation Biology*, 2000, **76**(2): 929.

Initial Damage of G2-chromosome in Hepatoma Cells Induced by γ -rays*

WANG Zhuan-zi^{1,2}, LI Wen-jian¹, YANG Jian-she¹, ZHOU Li-bin^{1,2},
WEI Wei^{1,2}, MAO Shu-hong^{1,2}

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: A chemically induced premature chromosome condensation technique with Calyculin-A has been employed to estimate the initial chromosome damage in HepG2 condensed in G2 phase and the percentage of aberrant cells after exposure to γ -rays. The results show that the dose-response for iso-chromatid breaks is linear-quadratic manner, while chromatid-type breaks and total chromatid breaks show a positive linear dose-response. The percentages of all kinds of aberrant cells are increasing linearly with increasing doses. G2 chromatid-type breaks and the percentage of G2 chromatid-type aberrant cells are predominate in G2 total chromatid breaks induced by γ -rays.

Key words: premature chromosome condensation; HepG2 cell; γ -ray; G2 chromatid break; percentage of aberrant cell

* **Foundation Item:** National Natural Science Foundation of China(10335050); Dedicated Project of Science and Technology Ministry of China(2003CCB00200)