

文章编号: 1007-4627(2009)02-0158-05

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子预辐射对小鼠胸腺脾脏细胞周期进程的影响*

赵卫平^{1,2,3}, 张红^{1,3,#}, 王燕玲^{1,2,3}, 李宁^{1,2,3}, 刘斌¹, 武振华^{1,3},
谢漪^{1,2,3}, 郝冀方^{1,3}, 刘阳^{1,3}

(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;

3 甘肃省重离子束辐射生物医学重点实验室, 甘肃兰州 730000)

摘要: 以0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子全身预辐照昆明小鼠, 间隔4 h后再对小鼠进行4 Gy全身辐射。辐照后12 h用流式细胞仪检测小鼠胸腺脾脏细胞在各细胞周期时相的百分率, 同时用单细胞电泳检测受辐射小鼠胸腺脾脏细胞DNA损伤程度。结果显示, 相对于大剂量预照射组, 各低剂量预照射组胸腺细胞S期细胞百分率显著减少; 脾脏细胞G₀/G₁期细胞百分率明显减少; 同时胸腺脾脏细胞的拖尾率及拖尾长度明显减少, 以0.1 Gy预辐照效果最为明显。这些结果表明, 低剂量预辐射处理可以减弱胸腺细胞的S期阻滞及脾脏细胞的G₁期阻滞, 并明显减轻胸腺脾脏细胞的DNA损伤程度。

关键词: 低剂量碳离子; 预辐射; 细胞周期; DNA损伤

中图分类号: Q691; R392; R339.57 **文献标识码:** A

现在普遍认为低剂量常规的电离辐射能诱导辐射适应性反应, 即低剂量辐射预照射可减轻随后的高剂量照射造成的细胞遗传损伤, 如降低染色体畸变程度和基因突变频率等^[1]。低剂量辐射能诱导一些蛋白激酶如PKC和MAPK等的表达, 这些蛋白激酶可调节许多相互关联的过程(如细胞生长、凋亡和DNA修复等), 所以低剂量预照射可以改变高剂量辐射后细胞的修复能力和细胞周期进程^[2-4]。重离子作为一种致密的电离辐射, 具有高传能线密度(Linear Energy Transfer, 简称LET)、能量沉积密集、局部剂量大和相对生物学效应高等特点, 在各学科领域展现出极大的应用前景, 如重离子治癌是肿瘤定位放疗的发展趋势, 其相关的生物学研究已成为当今放射生物学、放射医学、放射治疗学与重离子物理交叉学科研究的热点和前沿课题^[5, 6]。但是, 关于低剂量重离子预辐射的生物学效应的相关报道数量较少。张红等研究发现低剂量重离子预辐射可减轻大剂量辐射所致小鼠睾丸组织损伤^[7]。

夏景光等研究发现低剂量重离子预辐射可进一步促进hepG2细胞在G₂/M期累积^[8]。本文采用流式细胞术(FCM), 对不同低剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子预处理后攻击剂量辐射小鼠的胸腺及脾脏细胞周期进程的变化进行了较系统的研究, 同时用单细胞凝胶电泳(SCGE)检测胸腺细胞及脾脏细胞DNA损伤情况, 总结最佳预辐射剂量, 以期为重离子治疗恶性肿瘤及宇宙空间飞行过程中的辐射防护提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

昆明小鼠60只(购自兰州生物制品研究所), 体重(20±2)g, 雌雄各半, 随机分为6组, 每组10只。分别为假照组、D₂对照组和D₁+D₂实验组。D₁为预辐射剂量, 分别为0.05, 0.1, 0.25和0.5 Gy。D₂为攻击剂量, 大小为4 Gy。两次照射间隔4 h。

* 收稿日期: 2008-06-17; 修改日期: 2009-03-06

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10675151); 国家自然科学基金重点项目(10835011); 甘肃省重大科技专项项目(O702NKDA045); 中国科学院西部之光人才培养项目(O760160XB0, O860260XB0)

作者简介: 赵卫平(1970-), 男(汉族), 陕西西安人, 助理研究员, 在读博士生, 从事辐射生物学效应方面的研究工作;

E-mail: zhaoweip@impcas.ac.cn

通讯联系人: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

1.2 主要试剂及仪器

碘化嘧啶(propidium iodide, 简称PI)和RNA酶为美国Sigma公司产品, 购自华美生物工程公司, 其他试剂均为国产分析纯。FACSCalibur流式细胞分析仪(Becton Dickinson美国)。

1.3 照射条件

重离子照射在兰州重离子研究装置(HIRFL)辐照终端进行, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束能量为83.18 MeV, LET为35.5 keV/ μm , 吸收剂量率为1 Gy/min。用空气电离室监测剂量, 样品更换及剂量的数据获取由计算机控制, 样品照射在室温下进行。

1.4 细胞悬液制备

照射后12 h, 处死小鼠, 无菌取出胸腺和脾脏, 加入0.01 mol/l PBS研磨, 200目滤网过滤, 将胸腺及脾脏细胞调成 3×10^7 cells/ml的单细胞悬液, 每个样本取0.5 ml, PBS洗2次, 弃上清液, 收集细胞一半做单细胞电泳, 另一半取0.3 ml, 加入1.2 ml 70%(-20 $^{\circ}\text{C}$)的冷乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 固定16 h以上用做细胞周期检测。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期

按Dosik等人的方法但有所修改。取固定的各组织细胞, 室温下用PBS 1200 rotations/min离心清洗2—3次, 除去固定液乙醇, 将细胞计数调整在 1×10^6 — 2×10^6 cells/ml, 加入0.5 ml染色液(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA酶, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 碘化丙啶, 0.1%(v/v) TritonX-100)混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色30 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗存放30 min, 3 h内用FACSCalibur流式细胞仪检测(波长488 nm), ModFit LT 3.0软件分析细胞周期的变化。

1.6 单细胞电泳(SCGE)

(1)制片 用320 $\#$ 水砂纸打磨载玻片, 用70%

的乙醇浸泡过夜, 晾干, 预冷备用。用PBS液配制0.5%正常熔点琼脂糖, 溶解后, 加在事先准备好的载玻片上, 用细棒使胶均匀展开, 常温下固化5 min, 即第1层胶。取新鲜制备的细胞悬液, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下按1:3的比例与用PBS液配制0.5%低熔点琼脂糖充分混匀后, 加入到第1层胶上, 立即加盖盖玻片, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固化20 min, 即第2层胶。

(2)裂解 取下盖玻片, 将凝胶载玻片浸入新配制的裂解液中(2.5 mol/l NaCl, 10 mmol/l Tris, 1% 月桂酰肌氨酸钠, 100 mmol/l EDTA- Na_2 , 先加1% Triton-100和10% DMSO), 裂解1—1.5 h。

(3)解旋 从裂解液中取出载玻片用蒸馏水洗去多余的盐分, 移入水平电泳槽解旋20—30 min(1 mmol/l EDTA- Na_2 , 300mmol/l NaOH, pH13)。

(4)电泳 电压20 V, 电流200 mA, 低温避光, 电泳25 min。

(5)染色 0.4 mol/l Tris (pH7.5) 漂洗3次, 每次5 min, 滴加40 mg/ml 溴化乙锭20 μl 。放置4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 保持湿润。24 h内观察, 以防荧光淬灭。

(6)观察与计数 选择激发波长400 nm, 光栅波长590 nm, 视野200倍, 135(ISO400) 黑白胶片同步照相, 每个剂量3张片子, 每片随机观察50个细胞。测定细胞拖尾距离。计算出拖尾细胞数, 同时求出各组平均尾长及标准差, 以 t 检验测其显著性。

2 结果

2.1 预辐射对小鼠胸腺细胞周期进程的影响

表1显示单纯攻击剂量照射组(4 Gy)小鼠胸腺 G_0/G_1 期细胞百分率明显低于对照组($P < 0.01$), S期细胞百分率显著高于对照组($P < 0.01$), G_2/M 期细胞百分率明显高于假照射组($P < 0.01$), 表明经攻击剂量照射后小鼠胸腺细胞发生了S期阻

表1 预辐射对小鼠胸腺细胞周期进程的影响^{*}

| 剂量/Gy | G_0/G_1 期 | S 期 | G_2/M 期 |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 | 78.92 \pm 1.91 | 14.66 \pm 2.20 | 6.40 \pm 0.90 |
| 0+4 | 68.58 \pm 1.41 ^a | 22.88 \pm 0.85 ^a | 8.54 \pm 1.22 ^a |
| 0.05+4 | 70.54 \pm 2.90 ^b | 20.68 \pm 1.45 ^b | 8.76 \pm 1.42 |
| 0.10+4 | 74.62 \pm 1.75 ^c | 14.78 \pm 1.40 ^c | 10.62 \pm 1.11 ^c |
| 0.25+4 | 71.40 \pm 2.21 ^b | 18.70 \pm 1.66 ^b | 9.92 \pm 2.42 ^b |
| 0.5+4 | 72.68 \pm 2.89 ^b | 16.76 \pm 2.56 ^c | 10.54 \pm 1.26 ^c |

* a $P < 0.01$ 与对照组相比, b $P < 0.05$ 与4 Gy照射组相比, c $P < 0.01$ 与4 Gy照射组相比。

滞和G₂期阻滞。相对于4 Gy辐射处理组，经不同低剂量¹²C⁶⁺离子预辐射处理后，各组G₀/G₁期细胞百分率有不同程度的增加，而S期细胞百分率也有一定程度的减少，G₂/M期细胞百分率增加。结果表明，各个低剂量预辐射处理都可以减弱胸腺细胞的S期阻滞，促进胸腺细胞在G₂/M期累积，以0.1 Gy预辐射后这种趋势最为明显。

2.2 预辐射对小鼠脾脏细胞周期进程的影响

表2显示经单纯攻击剂量照射后，小鼠脾脏G₀

/G₁期细胞百分率明显高于假照射组($P < 0.01$)，S期脾脏细胞百分率显著低于假照射组($P < 0.01$)，(G₂+M)期细胞百分率低于假照射组但无统计学意义，表明细胞发生了G₁期阻滞。相对于4 Gy辐射处理组，经不同低剂量¹²C⁶⁺离子预辐射处理后，各组G₀/G₁期细胞百分率有不同程度的减少，而S期细胞百分率也有一定程度的增加 ($P < 0.01$)。结果表明，各个低剂量预辐射处理都可以减弱脾脏细胞的G₁期阻滞，促进胸腺细胞在S期和G₂/M期累积，以0.1 Gy预辐射后这种趋势最为明显。

表2 预辐射对小鼠脾脏细胞周期进程的影响($\bar{x} \pm s$)^{*}

| 剂量/Gy | G ₀ /G ₁ 期 | S 期 | G ₂ /M 期 |
|--------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 0 | 70.74 ± 7.68 | 15.10 ± 5.06 | 7.42 ± 0.97 |
| 0+4 | 86.68 ± 1.79 ^a | 6.96 ± 1.45 ^a | 6.48 ± 0.71 |
| 0.05+4 | 81.74 ± 3.72 ^b | 11.88 ± 2.57 ^c | 6.40 ± 1.81 |
| 0.1+4 | 75.44 ± 1.53 ^c | 14.66 ± 1.12 ^c | 9.94 ± 0.50 ^c |
| 0.25+4 | 80.98 ± 4.31 ^b | 11.62 ± 4.19 ^c | 7.36 ± 1.02 ^b |
| 0.5+4 | 82.68 ± 1.79 ^b | 10.26 ± 1.45 ^c | 7.18 ± 0.71 ^b |

* a $P < 0.01$ 与对照组相比, b $P < 0.05$ 与4 Gy照射组相比, c $P < 0.01$ 与4 Gy照射组相比。

2.3 预辐射对小鼠胸腺脾脏细胞DNA损伤的影响

在荧光显微镜下，未受损细胞表现为一个荧光球体，即有头无尾的彗星，而受损细胞由于DNA断裂，彗星尾从细胞核中伸向阳极，形成一个光亮的形似彗星的荧光头部和尾部。表3显示与4 Gy辐射

处理组相比，各低剂量¹²C⁶⁺离子预辐射处理均可使小鼠胸腺脾脏细胞的拖尾率及拖尾长度显著减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)，以0.1 Gy预辐射后这种趋势最为明显。

表3 预辐射对小鼠胸腺脾脏细胞细胞拖尾率及拖尾长度的影响^{*}

| 组织 | 剂量/Gy | 观察细胞数 | 拖尾数 | 拖尾率(%) | 拖尾长度/ μ m |
|----|--------|-------|-----------------|-------------------|----------------------------|
| 胸腺 | 0 | 50 | 2 | 4.0 | 13.34 ± 6.13 |
| | 0+4 | 50 | 37 | 74.0 | 52.86 ± 14.06 |
| | 0.05+4 | 50 | 32 ^a | 64.0 ^a | 39.08 ± 15.14 ^b |
| | 0.1+4 | 50 | 24 ^b | 48.0 ^b | 26.37 ± 10.55 ^b |
| | 0.25+4 | 50 | 29 ^a | 58.0 ^b | 37.88 ± 11.19 ^b |
| | 0.5+4 | 50 | 31 ^a | 62.0 ^b | 38.03 ± 16.80 ^b |
| 脾脏 | 0 | 50 | 3 | 6.0 | 11.28 ± 5.34 |
| | 0+4 | 50 | 42 | 84.0 | 47.02 ± 14.16 |
| | 0.05+4 | 50 | 34 ^a | 68.0 ^b | 38.29 ± 9.36 ^b |
| | 0.1+4 | 50 | 25 ^b | 50.0 ^b | 31.84 ± 9.58 ^b |
| | 0.25+4 | 50 | 29 ^b | 58.0 ^b | 41.79 ± 12.67 ^a |
| | 0.5+4 | 50 | 30 ^b | 60.0 ^b | 37.58 ± 10.04 ^a |

* a $P < 0.05$ 与4 Gy照射组相比, b $P < 0.05$ 与4 Gy照射组相比。

3 讨论

电离辐射可以诱发机体细胞发生细胞周期阻滞,包括 G_1 期阻滞、 G_2 期阻滞和S期阻滞,受照射细胞可因细胞种类不同、受照射时的细胞周期时相不同以及射线种类不同而在细胞周期阻滞时相、阻滞峰值出现时间、阻滞程度和阻滞过程等方面呈现显著差异^[9, 10],目前认为,电离辐射所致的DNA损伤可被细胞内特定的感受器(Sensors)如ATM蛋白、DNA依赖性蛋白激酶(DNA-PK)所感知,并且通过很多个基因及分子参与的信号传导网络传递到细胞周期 G_1 -S, S- G_2 和 G_2 -M3个检查点(Cell-cycle checkpoints),引发检查点调控因子反应,导致相应周期时相阻滞,其生物学意义在于有利于DNA损伤的修复,保证基因组的遗传稳定性^[11]。已有的研究表明,低剂量的X射线预辐射可引起小鼠胸腺细胞周期进程的适应性反应^[12]。本研究结果显示不同低剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子预辐射可以减弱小鼠胸腺细胞的S期阻滞,促进胸腺细胞在 G_2 /M期累积;同时减弱小鼠脾脏细胞的 G_1 期阻滞,促进胸腺细胞在S期和 G_2 /M期累积,以10 cGy预辐射后这种趋势最为明显。同样的处理条件为什么会对胸腺和脾脏造成不同的结果?其内在机制有待于进一步探讨。

SCGE技术是近年迅速发展起来的一种快速检测DNA损伤的方法。彗星分析中的慧头是细胞核,主要是未断裂的分子量较大的DNA片段,慧尾是由细胞核电泳出的DNA片段形成,分子量越小的DNA,迁移的距离就越远。本试验利用SCGE的方法检测到单纯攻击剂量(4 Gy)的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 照射对小鼠胸腺脾脏细胞DNA造成了强烈的损伤效应,采用不同低剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 预辐射处理后可以从不同程度减轻DNA的损伤,表现在脾脏及胸腺细胞的拖尾率减小,拖尾长度变短,以0.1 Gy预辐射后这种趋势最为明显。此结果说明,不同的低剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 预辐射可以减轻攻击剂量造成的DNA损伤,以0.1 Gy效果最佳。这为有效地利用重离子治疗恶性肿瘤及辐射防护提供了很有价值的基础数据。

细胞周期及DNA损伤的修复与时间进程密切相关,在不同的时间点细胞周期阻滞情况及DNA的损伤修复状况肯定会发生不同的变化,龚守良等^[12]研究了低剂量X射线预辐射后间隔不同时间(3, 6, 12, 24和60 h)后再以攻击剂量照射小鼠,

结果发现胸腺细胞周期在间隔时间为3, 6或12 h时S期细胞百分数明显增加, G_1 和 G_2 期细胞百分数明显减少,而在其它两个时间段胸腺细胞周期没有发生明显变化。这说明低剂量预辐射诱导机体的适应性反应与间隔时间有密切关系。本文只是研究了间隔4 h这一个时间点的细胞周期变化及DNA的损伤效应,不同的时间间隔以及辐照后不同的时间点对细胞周期及DNA损伤的影响将是下一步需要研究的目标。

参考文献(References):

- [1] Stecca C, Gerber G B. *Biochemical Pharmacology*, 1998, 5: 941.
- [2] Shimizu T, Kato T, Tachibana A, *et al.* *Experimental Cell Research*, 1999, 251: 424.
- [3] Sasaki M S, Ejima Y, Tachibana A, *et al.* *Mutation Research*, 2002, 504: 101.
- [4] Suzuki K, Kodama S, Watanabi M. *Cancer Research*, 2001, 61: 5396.
- [5] Zhang Hong, Liu Bing. *Nuclear Physics Review*, 2007, 24(3): 218(in Chinese).
(张红, 刘兵. *原子核物理评论*, 2007, 24(3): 218.)
- [6] Xiao Guoqing, Zhang Hong, Li Qiang, *et al.* *Nuclear Physics Review*, 2007, 24(2): 85(in Chinese).
(肖国青, 张红, 李强等. *原子核物理评论*, 2007, 24(2): 85.)
- [7] Zhang Hong, Zhang Xu, Zheng Rongliang, *et al.* *Acta Biologica Experimentals Simon*, 2000, 33(2): 97.
- [8] Xia Jingguang, Li Wenjian, Wang Jufang, *et al.* *High Energy Physics and Nuclear Physics*, 2005, 29(2): 201(in Chinese).
(夏景光, 李文建, 王菊芳等. *高能物理与核物理*, 2005, 29(2): 201.)
- [9] Hwang A, Muschel R J. *Radiat Res*, 1998, 150(Suppl): S52.
- [10] Daniel D, Stephen P J. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13: 225.
- [11] Ye Fei, Liu Shuzheng. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 1999, 19(6): 111(in Chinese).
(叶飞, 刘树铮. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1999, 19(6): 111.)
- [12] Gong Shouliang, Liu Shuchun, Lü Zhe, *et al.* *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2004, 22(3): 176(in Chinese).
(龚守良, 刘淑春, 吕哲等. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2004, 22(3): 176.)

Effect of Pre-irradiation with Low Dose $^{12}\text{C}^{6+}$ Ions on Cell Cycle Progression and DNA Damage in Mouse Thymus and Spleen^{*}

ZHAO Wei-ping^{1, 2, 3}, ZHANG Hong^{1, 3, #}, WANG Yan-ling^{1, 2, 3}, LI Ning^{1, 2, 3}, LIU Bin¹,
WU Zhen-hua^{1, 2, 3}, XIE Yi^{1, 2, 3}, HAO Ji-fang^{1, 3}, LIU Yang^{1, 2, 3}

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

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

3 *Key laboratory of Heavy Ion Radiation Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China*)

Abstract: To investigate the effect of low dose $^{12}\text{C}^{6+}$ pre-irradiation on the cell cycle progression and DNA damage in mouse thymus and spleen, Kun-Ming strain mice were whole-body irradiated with 0, 0.05, 0.1, 0.25 or 0.5 Gy of $^{12}\text{C}^{6+}$ ions as the pre-exposure dose, and were then irradiated with 4 Gy of $^{12}\text{C}^{6+}$ ions as a challenging dose at 4 h after pre-exposure. At 12 h after irradiation, cell cycles of thymus and spleen were analyzed by FACS, and the frequencies of cells with tail moment and the tail lengths were determined by the single cell gel electrophoresis. The results showed that compared with high-dose exposure group, the percentages of S phase cells on thymus and the percentages of G_0/G_1 phase cells on spleen significantly decreased via pre-exposure to low-dose $^{12}\text{C}^{6+}$ ions. Moreover, the low-dose pre-exposure significantly reduced length of the tails and the number of cells with tail, especially at the 0.1 Gy pre-exposure. The data suggested that pre-exposure to low-dose heavy ion can alleviate S phase arrest in thymus cells and the G_1 phase arrest in spleen cell, and the degree of DNA damage.

Key words: low dose $^{12}\text{C}^{6+}$ ion; pre-irradiation; cell cycle; DNA damage

* **Received date:** 17 Jun. 2008; **Revised date:** 6 Mar. 2009

* **Foundation item:** National Natural Science Foundation of China(10675151); Key Project of National Natural Science Foundation of China(10835011); Key Scientific Technology Research Project of Gansu Province(0702NKDA045); Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Sciences(O760160XB0, O860260XB0)

Corresponding author: Zhang Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn