

文章编号: 1007-4627(2009)02-0248-05

# 辐照诱导的人正常肝细胞系 HL-7702 细胞延迟效应\*

陶家军<sup>1,2</sup>, 李 强<sup>1, #</sup>, 吴庆丰<sup>1, 2</sup>

(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:** 利用 X 射线辐照人正常肝细胞系 HL-7702 细胞, 运用胞质分离阻滞微核法实验检测细胞微核率, AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡率, 细胞微核率和凋亡率随着辐照剂量的增加而显著增加。X 射线照射后细胞传代培养, 第 7 代时不同剂量辐照后子代细胞微核率和凋亡率同未辐照细胞相比已无明显区别。对不同剂量辐照后传代 7 代的细胞再次照射 2.5 Gy 的相同剂量, 发现它们细胞微核率和凋亡率存在明显差异, 即初次受辐照剂量高的细胞, 再次以相同剂量辐照后的微核率和凋亡率也高。这些结果表明, X 射线辐照导致了 HL-7702 细胞基因组不稳定性这一辐射延迟效应, 再次辐照使得辐射的延迟效应得以明显的表现。

**关键词:** 延迟效应; 微核; 凋亡; 细胞损伤; 基因组不稳定性

**中图分类号:** Q691

**文献标识码:** A

## 1 引言

近年来, 放射治疗在肿瘤治疗中的作用受到了越来越多的重视, 放疗技术和手段的迅速发展为人们选择放疗创造了更多的机会<sup>[1]</sup>。放疗是利用电离辐射对细胞, 特别是细胞中的遗传物质 DNA 的损伤作用, 诱发病灶部位不正常细胞的凋亡来治疗肿瘤的。可是, 在治疗的过程中难免对正常组织和细胞造成一定程度的损伤, 而且随着辐射的远后效应和旁效应的发现, 也使得放射治疗肿瘤的安全性受到了很大的关注。要想充分发挥放疗的优势, 而又使其对人体正常组织的毒副作用尽可能降低, 就必须搞清楚电离辐射对细胞造成各种损伤的类型及其分子机理, 同时还需要了解辐射的延迟效应。

辐射延迟效应的主要表现之一是基因组不稳定性。基因组不稳定性广泛存在于受到损伤的细胞或机体中, 可能是多级致癌理论中至关重要的一步, 其在受损细胞后代中的传递和表达的最终结果将使细胞内稳定性突变不断得到积累而有可能导致细胞

癌变。因此, 对基因组不稳定性的进一步研究将为揭示细胞凋亡和癌变形成起到重要的作用。耿晓华等<sup>[2]</sup>利用  $\gamma$  射线照射人正常肝细胞, 检测克隆形成率和微核发生率, 利用单细胞凝胶电泳技术检测 DNA 损伤情况。发现  $\gamma$  射线不仅在肝细胞中产生直接的生物效应, 而且还可以诱发产生可遗传的基因组不稳定性, 使子代细胞中的突变频率增加, 表现出滞后的遗传改变。

本文研究了 X 射线辐照在 HL-7702 细胞中诱导的延迟效应, 探讨了二次辐照在使得细胞辐射延迟效应得以表现中的作用。

## 2 材料与方法

### 2.1 细胞培养及辐照

本实验采用人正常肝细胞系 HL-7702 细胞, 购自上海中国科学院细胞库。细胞在含 15% 小牛血清、100 u/ml 青霉素和 80  $\mu$ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。辐

\* 收稿日期: 2008-11-18; 修改日期: 2008-12-26

\* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA02Z499); 中国科学院百人计划项目(O506120BR0); 甘肃省科技支撑计划—社会发展计划项目(0708NKCA095)

作者简介: 陶家军(1980-), 男(汉族), 河北唐山人, 硕士研究生, 从事重离子治癌研究; E-mail: taojiajun@impcas.ac.cn

# 通讯联系人: 李强, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

照前一天将细胞接种于 25 cm<sup>2</sup> 的玻璃培养瓶中。X 射线辐照是在兰州军区兰州总医院放射治疗科的医用 6 MV 电子直线加速器 (CL2100, Varian) 上完成的。辐照时该加速器产生的 X 射线剂量率为 4 Gy/min。细胞样品初次辐照的剂量分别为 0, 0.5, 2.5, 4.0 和 6.0 Gy, 每个剂量设 3 个重复。

## 2.2 细胞传代及二次辐照

X 射线辐照后存活的 HL-7702 细胞继续传代, 传代培养条件与照前相同。在含 15% 小牛血清、100 u/ml 青霉素和 80 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。传代 7 代后, 接种于 25cm<sup>2</sup> 的玻璃培养瓶中, 次日对初次辐照剂量分别为 0, 0.5, 2.5, 4.0 和 6.0 Gy 的传代细胞再次以 2.5 Gy 的相同剂量辐照。X 射线辐照条件同初次辐照。

## 2.3 荧光染色胞质分离阻滞微核实验

本研究采用 1985 年 Fenech 等提出的胞质分离阻滞微核法<sup>[3,4]</sup>进行微核检测, 并在具体操作方法上做了适当改进。具体操作如下: 辐照后的细胞用含 2 μg/ml 细胞松弛素 B 的培养基培养 36 h 后, 倒掉培养基用 1×PBS 清洗两次, 用 0.075 M 的 KCl 溶液 37℃ 低渗 15 min, 然后用 -20℃ 预冷的甲醇固定两次, 每次 20 min, 用 AO 染色后在荧光显微镜 (Olympus BX51) 下观察、拍照, 对双核细胞数 (N)、含 1 个微核的双核细胞数 (M<sub>1</sub>)、含 2 个微核的双核细胞数 (M<sub>2</sub>)、含 3 或 4 个微核的双核细胞数 (M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>) 进行计数统计。每个剂量计数 1000 个左右双核细胞。微核的确定标准: 位于主核大小一致的双核细胞胞质内, 核膜独立或条带 (核浆桥) 相连; 微核直径是主核的 1/16—1/3, 面积是主核的 1/256—1/9; 圆形或卵圆形, 染色与主核相同, 可与主核分开; 无折光性, 可与伪影分开<sup>[5]</sup>。微核率计算公式<sup>[5]</sup>如下:

$$\text{微核率} = [M_1 + 2M_2 + 3(M_3 + M_4)] / N。$$

## 2.4 AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测

本研究检测细胞凋亡所用试剂盒为凯基 AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒, 所用流式细胞仪是 BD FACSCalibur (美国)。细胞凋亡检测的具体操作步骤参照试剂盒使用说明书。每个剂量点检测 10000 个细胞。

## 3 结果

HL-7702 细胞初次受不同剂量辐照后的微核率实验结果见图 1。可以看到, 未受到辐照细胞的微核率为 0.018, 随着照射剂量的增加微核率相应增加, 当剂量达到 4.0 Gy 时基本达到最高值, 6.0 Gy 时略有升高但不明显。

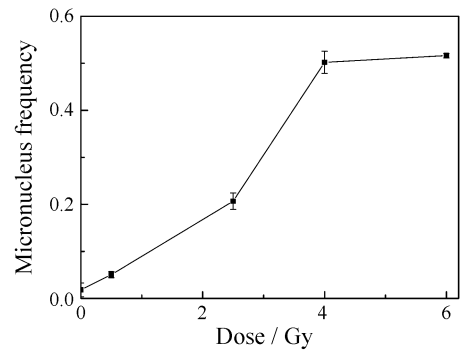


图 1 X 射线辐照后 HL-7702 细胞的微核率

HL-7702 细胞初次受不同剂量辐照后细胞凋亡率的实验结果见图 2。很明显, 随着照射剂量的增加辐照后 72 和 96 h 时 HL-7702 细胞凋亡率逐渐增加, 但辐照后 96 h 时的细胞凋亡率要明显高于辐照 72 h 的。

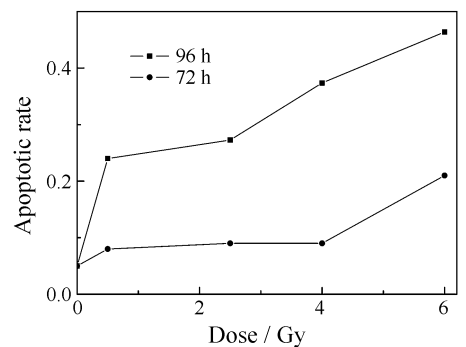


图 2 X 射线辐照后 72 和 96 h 时 HL-7702 细胞的凋亡率

X 射线不同剂量初次辐照后 HL-7702 细胞继续传代 7 代时, 再次接受 2.5 Gy 相同剂量辐照后细胞的微核率实验结果见图 3。初次受不同剂量辐照后传代 7 代的 HL-7702 细胞的微核率与未受到辐照细胞的微核率相比已经没有很大区别, 但当再次接受 2.5 Gy X 射线辐照后, 细胞微核率又明显升高, 且与初次辐照剂量呈现正相关性。

传代 7 代的细胞再次接受 2.5 Gy 相同剂量辐

照后 96 h 细胞的凋亡率见图 4。初次受不同剂量辐照后代 7 代的 HL-7702 细胞的凋亡率仍略高于未受到辐照细胞的凋亡率, 而再次受到 2.5 Gy 相同剂量辐照后, 其凋亡率显著升高, 且与初次辐照剂量存在正相关性。

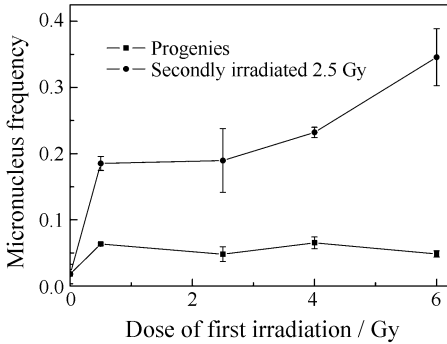


图 3 不同剂量 X 射线辐照后代 7 代的细胞再次照射 2.5 Gy 后的微核率

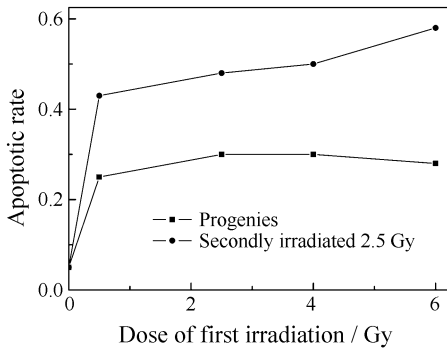


图 4 不同剂量 X 射线辐照后代 7 代的子代细胞及再次照射 2.5 Gy 后 96 h 的凋亡率

用 SPSS17.0 对微核实验结果进行相关性分析表明: 初次辐照剂量、初次辐照微核率、二次辐照微核率之间在  $p=0.01$  水平上存在明显的相关性, 而它们与传代 7 代后细胞的微核率则不存在相关性。

用 SPSS17.0 对凋亡实验结果进行相关性分析表明: 初次辐照剂量、初次辐照细胞凋亡率、二次辐照细胞凋亡率之间在  $p=0.01$  水平上存在明显的相关性, 而它们与传代 7 代后细胞的凋亡率之间则不存在相关性。

用 SPSS17.0 对二次辐照后微核实验结果和凋亡实验结果进行相关性分析表明: 初次辐照剂量、二次辐照微核率与二次辐照细胞凋亡率之间在  $p=0.01$  水平上存在明显的相关性。

## 4 讨论

受到 X 射线辐照后的 HL-7702 细胞传代 7 代以后, 微核率和细胞凋亡率都已经明显下降, 基本恢复到正常水平, 可是当再次受到相同剂量 X 射线辐照以后, 微核率和细胞凋亡率与初次辐照剂量之间仍存在着明显的剂量-效应关系, 说明初次辐照所造成的细胞损伤不会随着细胞传代而马上消失, 而是传递到子代细胞中, 从而对二次辐照的损伤作用产生影响。

这种可遗传的损伤一般被认为是电离辐射诱发的基因组不稳定性引起的, 可供检测的生物学终点有染色体的改变、多倍体数的改变、微核形成、基因突变和扩增、小卫星和微卫星(短串联重复序列)不稳定性以及克隆形成率的下降等<sup>[6]</sup>。本研究中把检测细胞遗传学中的微核率作为衡量细胞基因组不稳定性的指标。

初次辐照后微核率随着辐照剂量的增加而增加, 在 2.5 Gy 到 4.0 Gy 时上升迅速, 而 4.0 到 6.0 Gy 时变化不大; 辐照细胞传代 7 代以后再次检测, 受到不同剂量辐照的细胞微核率都显著下降, 而且各组之间已经没有显著差异。这是因为细胞经过多次传代以后 DNA 损伤已经得到修复, 微核作为染色体畸变的一种表现形式, 也就进入了稳定表达阶段。但是这种修复并不能使细胞真正恢复到受照前的状态, 当再次给予相同剂量的辐照之后, 初次辐照对细胞造成的损伤被激活, 微核率与初次辐照剂量之间呈现出明显的剂量相关性。这说明电离辐射对细胞造成的损伤是可以遗传的, 虽然在传代之后这种损伤被部分修复, 不能够直接通过微核实验检测到, 但却以一种隐蔽的形式保留在细胞中, 基因组不稳定性就是这种潜伏的延迟损伤的表现之一。

辐射损伤到底以什么形式得以在细胞传代中保留一直是广泛争论的焦点。Grosovsky 等<sup>[7]</sup>和 Ullrich 等<sup>[8]</sup>认为, 由于受到辐照的细胞丧失细胞周期调控机制, 使其继续通过细胞周期, 并把损伤传递给子代。但显然, 子代中保留下来的损伤已经不同于辐照后可以直接检测的损伤, 因而这种观点有待进一步研究。而 Little 等<sup>[9]</sup>的研究表明, 受照细胞分裂 30 代后, *hprt* 基因自发突变率显著升高。耿晓华等<sup>[2]</sup>的研究表明,  $\gamma$  射线辐照人肝细胞传代 40 代后进行二次辐照, 细胞的彗星电泳尾长和微核率与初次辐照剂量之间仍然存在明显正相关性。综合

上述研究,可以认为细胞受到电离辐射以后,通过传代培养,致死的损伤由于细胞死亡而丢失,可以修复的损伤则被细胞自身修复,不可遗传的损伤则通过传代而得以隔离,只有那些不能导致细胞直接死亡的不可修复的可遗传的细胞损伤才得以传递给子代细胞。这种延迟损伤可能包括多种类型,虽然长期以来人们都渴望找到这种损伤“记忆”得以保留的机制,但至今尚未取得突破。

电离辐射是诱发细胞凋亡的环境因素之一,辐射所致的细胞凋亡除了核固缩、质膜发泡、细胞器紧缩等普通特征性改变之外,其细胞膜结构与功能、膜通透性及染色质形态结构变化更加突出<sup>[10-12]</sup>。细胞凋亡的影响因素也较为复杂,基因突变、染色体变异、线粒体功能异常、细胞膜结构损坏等都可以导致细胞走向凋亡。在电离辐射对细胞损伤作用的研究中,曾经认为是细胞的遗传物质结构遭到破坏造成的,但是越来越多的证据表明电离辐射对细胞的损伤作用是一个复杂的事件,不仅与核内的遗传物质有关而且与细胞质、细胞膜和各种细胞器存在着十分密切的联系。本研究中把细胞凋亡作为衡量细胞损伤程度的一个综合指标来考虑。

与微核率类似,初次辐照后细胞凋亡率随着照射剂量的增加而升高,当传到第7代时,初次受到不同剂量辐照的细胞的细胞凋亡率都显著降低,各剂量点间不存在明显差异,而二次辐照以后细胞凋亡率与初次辐照剂量再次表现出正相关性。这些结果表明,潜伏在子代细胞中的辐射延迟损伤不仅能影响第二次照射后细胞的微核率而且同样可以影响细胞凋亡率。说明微核率和细胞凋亡率作为检测辐照子代细胞受到再次照射时所表达的辐射延迟损伤时具有高度的一致性。然而,微核率和细胞凋亡率分别代表了细胞核和细胞整体的损伤程度,那么在二次辐照时,初次辐照的延迟损伤是如何被激活并协调影响这两个不同水平的事件的呢?要解答这个问题必须从细胞分子层面进行更加深入细致的研究来确定辐射延迟损伤的具体形式。

有人认为造成基因组不稳定性的原因是受照细胞子代的突变,而不是由射线本身引起的细胞的直接损伤。Little等<sup>[9]</sup>的研究表明,在受照细胞分裂30代后,*hprt*基因突变率明显高于正常细胞。Kadhim等<sup>[13]</sup>用 $\alpha$ 粒子照射小鼠干细胞,照射剂量为每个细胞产生1次损伤,结果却发现40%—

60%细胞的核型发生了异常。Limoli等<sup>[14]</sup>用1 Gy剂量的X射线照射仓鼠-人杂交细胞GM10115,然后用荧光原位杂交来检测不稳定性,结果在子代细胞中观察到辐射诱发的染色体不稳定性约为3%,而用高传能线密度(LET)Fe离子照射后,染色体不稳定性高达4%<sup>[15]</sup>。上述研究中的不稳定性发生频率大大超过已报道的相同剂量下基因突变发生的频率。然而,无论是那种观点,目前都缺乏直接的实验结果的支持,而且受照子代细胞突变率增加与辐射损伤之间本来就存在着密切的联系,甚至基因组不稳定性是否是导致辐射延迟效应的唯一根本原因本身也还有待深入研究。

二次辐照使得初次辐照的辐射延迟效应表现的可能机制是,初次辐照以后潜藏在辐照存活细胞子代细胞中的不能导致细胞直接死亡的不可修复的可遗传的细胞损伤,造成不同程度的细胞基因组的损伤或基因突变,从而使得细胞受到二次辐照的时候对于相同剂量的辐射表现出不同的敏感性。

总之,通过本文的研究,证实了X射线辐照导致了HL-7702细胞基因组不稳定性这一辐射延迟效应,再次辐照使得辐射的延迟效应得以明显的表现。电离辐射延迟效应的存在使得辐射安全防护和癌症放射治疗计划的制定变得更加复杂,必须考虑正常组织细胞的辐射延迟损伤及其对后期治疗的影响,这样才能更加真实地反映放疗过程中患者接受射线辐照的真实情况,增加放射治疗的科学性与安全性<sup>[16]</sup>。

**致谢** 感谢兰州军区兰州总医院放射治疗科李莎主任医师在X射线辐照实验中提供的帮助。

## 参考文献(References):

- [1] Jin Xiaodong, Li Qiang, Guo Chuanling, *et al.* Nuclear Physics Review, 2006, 23(2): 242(in Chinese).  
(金晓东,李强,郭传玲等.原子核物理评论,2006,23(2): 242.)
- [2] Geng Xiaohua, Guo Xianhua, Zuo Yahui, *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 2007, 27(2): 135(in Chinese).  
(耿晓华,郭鲜花,左雅惠等.中华放射医学与防护杂志,2007,27(2): 135.)
- [3] Fenech M, Morley A A. Mutat Res, 1985, 147: 29.
- [4] Lin Yulong. Mod Diagn Treat, 1997, 8(3): 323(in Chinese).  
(林珏龙.现代诊断与治疗,1997,8(3): 323.)

- [5] Ye Weijun, Min Huaqing. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2007, 14(21): 1612(in Chinese).  
(叶伟军, 闵华庆. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(21): 1612.)
- [6] Zuo Yahui, Guo Xianhua, Wang Xiaoli, *et al.* *Radiation Protection*, 2007, 27(3): 145(in Chinese).  
(左雅慧, 郭鲜花, 王小莉等. 辐射防护, 2007, 27(3):145.)
- [7] Grosovsky A J, Parks K K, Giver C R, *et al.* *Mol Cell Biol*, 1996, 16(11): 6252.
- [8] Ullrich R L, Ponnaiya B. *Int J Radiat Biol*, 1998, 74: 747.
- [9] Little J B, Gorgojo L, Vetros H. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1990, 19(6): 1425.
- [10] Kronenberg A. *Int J Radiat Biol*, 1994, 66(5): 603.
- [11] Little J B. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 397.
- [12] Morgan W F. *Radiat Res*, 2003, 159(5): 567.
- [13] Kadhim M A, MacDonald D A, Goodhead D T, *et al.* *Nature*, 1992, 355(6362): 738.
- [14] Limoli C L, Corcoran J J, Milligan J R, *et al.* *Radiat Res*, 1999, 151(6): 677.
- [15] Limoli C L, Ponnaiya B, Corcoran J J, *et al.* *Adv Space Res*, 2000, 25(10): 2107.
- [16] Yan Zheng, Li Qiang, Jin Xiaodong, *et al.* *Nuclear Physics Review*, 2006, 23(2): 229(in Chinese).  
(闫铮, 李强, 金晓东等. 原子核物理评论, 2006, 23(2): 229.)

## Radiation-induced Delayed Effect in Human Normal Liver HL-7702 Cells<sup>\*</sup>

TAO Jia-jun<sup>1, 2</sup>, LI Qiang<sup>1, #</sup>, WU Qing-feng<sup>1, 2</sup>

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

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

**Abstract:** Human normal liver cell line HL-7702 cells were irradiated with different doses of X-rays. Micronucleus and apoptosis rates in the irradiated cells were measured with cytokinesis-block micronucleus method and Annexin V-FITC apoptosis detection kit, respectively. Experimental data showed that the micronucleus and apoptosis rates increased obviously with increasing irradiation dose. After seven population doublings, the micronucleus and apoptosis rates of the cells surviving exposure to the X-rays reduced to the same levels as non-irradiated control cells; the progenies of the cells were secondly exposed to X-rays at the same dose of 2.5 Gy. We found that the progenies of the cells surviving the first irradiations of the various doses showed markedly differential micronucleus frequencies and apoptotic rates. Although the same dose of 2.5 Gy was applied in the second irradiations, the micronucleus frequencies and apoptotic rates of the progenies of the cells initially exposed at higher doses were significantly higher than the others. These results indicate that X-rays lead to genomic instability in HL-7702 cells, which is an important manifestation of radiation-induced delayed effect, and a second radiation stimulus makes the delayed effect in the progeny of the previously irradiated cells be expressed obviously.

**Key words:** delayed effect; micronucleus; apoptosis; cell damage; genomic instability

\* **Received date:** 18 Nov. 2008; **Revised date:** 26 Dec. 2008

\* **Foundation item:** National High Technology Research and Development Program of China(863 program)(2006AA02Z499); Hundred Talent Program of Chinese Academy of Sciences(O506120BR0); Gansu Provincial Science and Technology Support Social Development Program(0708NKCA095)

# **Corresponding author:** Li Qiang, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn