

低剂量电离辐射预处理对不同肿瘤细胞周期的影响^{*}

夏景光^{1,2;1)} 李文建¹ 王菊芳¹ 郭传玲¹ 杨建设^{1,2} 高清祥³

1(中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

2(中国科学院研究生院 北京 100049)

3(兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

摘要 实验研究了低剂量 γ 射线预照射对人肝癌细胞系 hep G2 和人宫颈癌细胞系 HeLa 的细胞周期进程的影响. 结果显示: (1) 低剂量 (5cGy) 辐射后, 两种细胞的 G₂/M 期细胞短暂累积; (2) 低剂量辐射促进肿瘤细胞的生长; (3) 高剂量 (3Gy) 辐射后, hep G2 细胞发生 G₂ 期阻滞, HeLa 细胞发生 S 期和 G₂ 期阻滞; (4) 与单纯高剂量照射相比, 低剂量辐射预处理后 4h, 再给予高剂量辐射, 可进一步促进 hep G2 细胞在 G₂/M 期累积, 但是预照射对 HeLa 细胞的周期进程没有明显影响. 因此, 低剂量辐射预处理对高剂量诱导的细胞周期阻滞的影响依赖于肿瘤细胞的类型.

关键词 电离辐射 细胞周期阻滞 肿瘤细胞 DNA 损伤

1 引言

电离辐射等基因毒性剂所造成的损伤引发细胞产生多种反应, 如细胞周期延迟、DNA 损伤和细胞凋亡等, 其中细胞周期延迟可以为细胞提供更多的修复时间, 避免将损伤带入子代细胞. 电离辐射后, 细胞可发生 G₁ 期、S 期和 G₂ 期阻滞. G₁ 期阻滞的发生需要细胞具有野生型 p53 基因, 而 G₂ 期阻滞对 p53 的功能状态没有要求^[1,2]. 目前, DNA 损伤所致的细胞周期阻滞的机理已比较清楚, 即细胞通过目前还没有完全清楚的机制感受 DNA 损伤, 由 ATM 或 ATR 等蛋白激酶将损伤信号传至检查点激酶 chk1 和 chk2, 检查点激酶磷酸化 CDC25 家族成员, 使后者不能激活 cyclin/cdks, 最终导致细胞周期阻滞^[3]. 在 DNA 损伤信号转导途径中, 同时启动 DNA 的修复过程, 如在 G₁ 期阻滞过程中伴随着碱基切除修复、核苷酸切除修复和非同源末端连接等修复过

程, 在 S 期和 G₂ 期阻滞过程中伴随有借助同源染色体的同源重组修复^[4]. 因此, 作为 DNA 损伤反应, 细胞周期阻滞和 DNA 修复具有相关性. 有实验证实, DNA 错配修复体系能调节 G₂/M 检查点、缺失 hMLH 等错配修复基因减弱电离辐射导致的 G₂/M 期阻滞, 从而有可能增加突变几率^[5].

现在普遍认为低剂量电离辐射能诱导辐射适应性反应, 即低剂量辐射 (< 10cGy) 预照射可减轻接下来的高剂量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^[6]. 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^[7-9]. 基于这样的考虑, 本实验以指数生长期的肿瘤细胞为研究对象, 研究了低剂量 γ 射线预处理对高剂量电离辐射诱导的细胞周期阻滞的影响, 分析了不同辐射处理方式对不同肿瘤细胞周期检查点的影响.

2004-06-23 收稿

* 国家自然科学基金(10335050), 国家重大基础研究前期研究专项资助项目(2003CCB00200)资助

1) E-mail: xiajingguang@hotmail.com

2 材料和方法

2.1 细胞培养和 γ 射线照射

人肝癌细胞系 hep G2 和人宫颈癌细胞系 HeLa 购自中国典型培养物保藏中心(中国武汉). 细胞培养基为 RPMI1640(含 10% 新生牛血清, 100U/ml 青霉素和 100U/ml 硫酸链霉素), 接种于培养瓶中的细胞置于 37℃、含 5% CO₂ 的湿润气体环境下培养. 指数生长期的细胞采用兰州医学院第一附属医院的 ⁶⁰Co γ 射线(剂量率为 0.30Gy/min)作如下照射: 低剂量(5cGy)照射, 高剂量(3Gy)照射以及 5cGy 照射后 4h 再 3Gy 照射, 同时有未照射的对照组. 照射后一定时间取样, 每个处理每一时间点取两个样品, 每个实验至少重复一次.

2.2 细胞周期的测定

照射后一定时间, 收集细胞, 取含 1—2 × 10⁶ 个细胞的悬液离心, PBS 洗一次, 75% 冰冷乙醇固定, -20℃ 保存待用. 已固定的细胞离心, 吸弃乙醇, 沉淀用 500 μ l PI 溶液(50 μ g/ml)重悬, 加 RNAase(1mg/ml)1 μ l, 置 37℃ 暗处 30min 或 4℃ 暗处过夜, DNA 含量用 Coulter 公司的流式细胞仪(Coulter[®] Epics XLTM)测定, 数据分析软件为 Muticycle. 实验结果用 t 检验进行统计学分析.

3 实验结果

3.1 低剂量电离辐射对肿瘤细胞周期及生长的影响

图 1 显示的是 5cGy γ 射线辐射后, hep G2 和 HeLa 细胞在 G₂/M 期的百分比随时间的变化. 与对照相比, 辐射后 4h, hep G2 细胞的 G₂/M 期细胞有比较明显的累积, 增加了约 20% ($P < 0.05$); 10h 之后与对照相比, 基本上没有差别. 与 hep G2 细胞相似, 5cGy γ 射线照射后 4h, HeLa 细胞的 G₂/M 期细胞也有比较明显的累积, 为对照的 126.7% ($P < 0.05$), 之后下降至接近对照水平. 总的来看, 5cGy γ 射线照射后, 肿瘤细胞 hep G2 和 HeLa 在 G₂/M 期发生短暂延迟, 这一结果可能说明低剂量辐射对细胞造成的损伤较轻, G₂/M 期检查点只需短暂激活即可修复损伤. 为进一步研究低剂量电离辐射对肿瘤细胞生长的影响, 我们将 1 × 10⁵ 个细胞接种于培养

瓶中, 在 37℃ 培养 24h, 然后用 5cGy γ 射线照射, 照射后一定时间测定细胞数目, 对照的细胞数被规定为 1, 得出辐射后 24h 和 48h 的相对细胞数分别为 1.24 和 2.16, 结果说明 5cGy γ 射线照射能明显促进细胞的增殖(如图 2 所示).

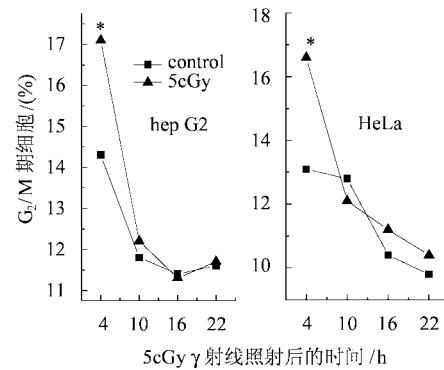


图 1 5cGy γ 射线辐射后 hep G2 和 HeLa 细胞的 G₂/M 期百分比随时间的变化
与对照相比 * $P < 0.05$.

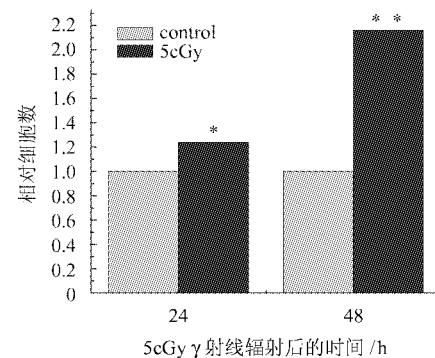


图 2 5cGy γ 射线辐射对 hep G2 细胞生长的影响
与对照相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.2 高剂量电离辐射对肿瘤细胞 hep G2 和 HeLa 细胞周期的影响

图 3 显示的是 3Gy γ 射线照射后, hep G2 和 HeLa 细胞的 G₂/M 期和 S 期细胞百分比随时间的变化. 从图 3(a), (b) 中可以看出, 电离辐射后 hep G2 细胞的 G₂/M 期细胞明显累积, 并在 12h 后达到最大值, 为对照的 291.2%, S 期细胞在辐射后 6h 明显增加, 为对照的 136.6%, 之后下降. 这一结果表明, 电离辐射后 hep G2 细胞的 S 期发生短暂延迟, 而 G₂/M 期发生较长时间的延迟, 说明 S 期检查点只被短暂激活而 G₂/M 期检查点被激活且维持较长时间, 也可能说明电离辐射所导致的 DNA 损伤可能主要在 G₂ 期修复. 电离辐射后的 18h 内, HeLa 细胞发

生 G₂/M 期累积, 6、12 和 18h 后分别是对照的 128.9%, 199% 和 248%; S 期细胞也明显增加, 6、12 和 18h 后分别是对照的 136.7%, 140.1% 和 122.8% (图 3 (c), (d) 所示), 这一结果表明, 电离辐射后 HeLa 细胞的 G₂/M 期检查点和 S 期检查点均被激活并维持较长时间, 也可能说明在 DNA 损伤修复过程中, 两检查点可能都发挥重要作用. 比较 HeLa 细胞和 hep G2 细胞对电离辐射的反应可以看出, 两种细胞的细胞周期检查点的激活和保持是不一样的.

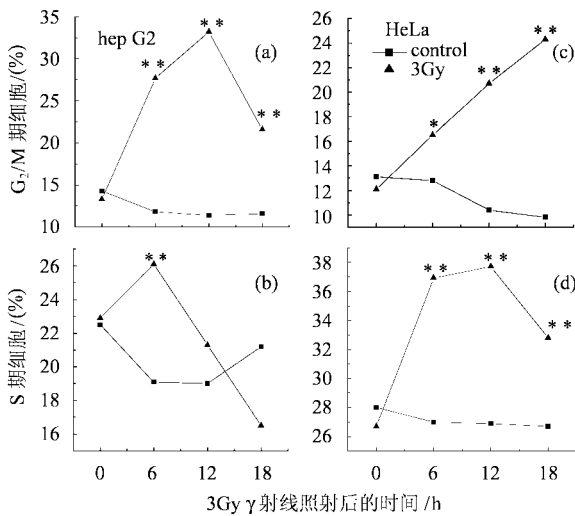


图 3 电离辐射(3Gy)对 hep G2 和 HeLa 细胞周期的影响
与对照相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.3 低剂量电离辐射预处理对高剂量诱导的细胞周期阻滞的影响

指数生长期的细胞先用 5cGy γ 射线照射后, 37°C 放置 4h, 然后再用 3Gy 高剂量照射, 12h 后测定细胞周期. 图 4 给出了不同处理后 G₂/M 期细胞的

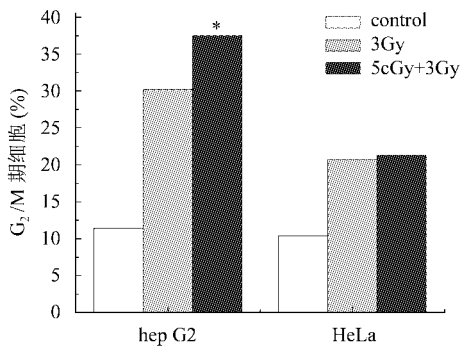


图 4 低剂量(5cGy)预处理对高剂量(3Gy)诱导的细胞周期阻滞的影响

图中所示的是 3Gy 和 5cGy + 3Gy 照射后 12h, hep G2 和 HeLa 细胞的 G₂/M 期百分比, 两种辐射处理之间相比 * $P < 0.01$.

百分比, 由图可见, 低剂量预照射后, hep G2 细胞的 G₂/M 期细胞百分比明显要高一些, 为单纯高剂量照射时的 124.2%; 而 HeLa 细胞的 G₂/M 期细胞百分比变化不明显. 结果表明, 低剂量预处理对肿瘤细胞 hep G2 和 HeLa 的细胞周期的影响是不一样的, 预处理导致 hep G2 细胞在 G₂/M 期的阻滞程度增加, 而预处理不足以改变 HeLa 细胞的细胞周期进程, 这可能与高剂量辐射后 hep G2 细胞只发生 G₂/M 的阻滞, 而 HeLa 细胞的 G₂/M 期和 S 期均发生阻滞有关.

4 讨论

细胞中的膜脂、蛋白质和 DNA 等大分子物质都是电离辐射的作用靶, 一般认为 DNA 是电离辐射引发细胞产生损伤反应的主要靶^[10]. 电离辐射直接或通过裂解水分子产生自由基造成多种类型的 DNA 损伤, 如单双链断裂、碱基氧化、碱基缺失和糖基破坏等, 如果这些类型的损伤在空间上比较靠近, 则形成“簇损伤”(clustered damages), 即局部多损伤位点 (locally multiple damaged sites). 损伤碱基位点专一性内切酶在氧化碱基或无碱基位点产生单链切口, 如果损伤碱基在空间上靠近, 则在内切酶作用后产生双链断裂, 用这种方法, Sutherland 等检测到低剂量电离辐射能产生 DNA “簇损伤”, 其中包括双链断裂^[11]. DNA 双链断裂后, 断裂位点处的组蛋白 H2AX 很快被磷酸化, 形成 γ -H2AX. Rothkamm 和 Löbrich 利用这种方法, 检测到低至 1mGy 的 γ 射线辐射即可在细胞内产生双链断裂^[12]. 本实验结果显示, 5cGy γ 射线辐射能引起 hep G2 和 HeLa 细胞的 G₂ 期短暂延迟, 说明低至 5cGy 的辐射对细胞造成的损伤足以改变细胞周期进程, 只不过由于损伤较轻, 容易修复, 所以只能短暂延缓周期进程. 经过短暂的延迟之后, 5cGy γ 射线照射过的 hep G2 细胞的增殖速度加快, 24h 和 48h 后的细胞数目明显高于对照. 细胞生长加快的原因可能与低剂量辐射激活了 PKC 和 MAPK 等与生长和修复相关的激酶有关^[7,9]. 有实验表明, 电离辐射激活有丝分裂原激活的蛋白激酶激酶 2 (MEK2), 且 MEK2 是电离辐射后细胞通过 G₂/M 检查点阻滞所必需的, 显性负突变的 MEK2 增加细胞对电离辐射的敏感性, 降低细胞从 G₂/M 检查点阻滞中恢复的能力^[13].

本实验结果还显示, 高剂量辐射后, hep G2 细胞只发生 G₂ 期阻滞, HeLa 细胞既发生 G₂ 期阻滞也发生 S 期阻滞, 说明这两种细胞对电离辐射的敏感

程度是有差异的. 敏感程度的差异也反映在低剂量预照射的效应上: 与单纯高剂量辐射相比, 低剂量辐射后 4h 再给予高剂量辐射, 导致 hep G2 细胞在 G₂/M 期进一步累积, 而低剂量预照射对 HeLa 细胞的周期进程没有明显改变. 因此, 低剂量辐射预处理对高

剂量诱导的细胞周期阻滞的影响依赖于肿瘤细胞的种类, 肿瘤细胞对辐射的敏感程度不一样, 低剂量辐射预处理的效应也有可能不一样. 因此, 有必要进一步研究低剂量预照射对不同肿瘤细胞的细胞周期和损伤修复能力的影响.

参考文献 (References)

- Zölzer F, Hillebrandt S, Streffer C. *Radiotherapy and Oncology*, 1995, **37**: 20
- Kuerbitz S J, Plunkett B S, Walsh W V. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 7491
- ZHOU B B, Sledge S J. *Nature*, 2000, **408**: 433
- Bodnarchuk I A. *Radiats Biol Radioecol*, 2003, **43**(1): 19
- YAN T, Schupp J E, Hwang H S et al. *Molecular Biology and Genetics*, 2001, **61**: 8290
- Stecca C, Gerber G B. *Biochemical Pharmacology*, 1998, **5**: 941
- Shimizu T, Kato T, Tachibana A et al. *Experimental Cell Research*, 1999, **251**: 424
- Sasaki M S, Ejima Y, Tachibana A et al. *Mutation Research*, 2002, **504**: 101
- Suzuki K, Kodama S, Watanabi M. *Cancer Research*, 2001, **61**: 5396
- Little J B. *Carcinogenesis*, 2000, **21**(3): 397
- Sutherland B M, Bennett P V, Sidorkina O et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(1): 103
- Rothkamm K, Löbrich M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(9): 5057
- Abbott D W, Holts J T. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(5): 2732

Effects of Low Priming Dose of Radiation on Cell Cycle Arrest of Tumor Cells Caused by High Dose of Radiation *

XIA Jing-Guang^{1, 2; 1)} LI Wen-Jian¹ WANG Ju-Fang¹ GUO Chuan-Ling¹
YANG Jian-She^{1, 2} GAO Qing-Xiang³

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

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

3(School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract Effects of low priming dose of radiation on cell cycle progression in hep G2 and HeLa cells have been investigated. For both cell lines, cells in the G₂/M phase are accumulated temporarily after 5cGy γ -ray exposing, and the proliferation of tumor cells is significantly promoted by low dose radiation. When exposing to 3Gy γ -ray, only the G₂ phase arrest occurred for hep G2 cells, and both S and G₂ arrest occurred for HeLa cells. In contrast to treatment with high dose of radiation, when high dose was delivered 4hr after priming dose, pretreatment facilitates the accumulation of hep G2 cells in G₂/M phase, however, pretreatment does not significantly change the cell cycle progression of HeLa cells. It is concluded that alterations of the cell cycle progression by pretreatment with low dose of radiation are dependent on the type of tumor cell lines.

Key words ionizing radiation, cell cycle arrest, tumor cell, DNA damage

Received 23 June 2004

* Supported by the National Natural Science Foundation of China(10335050), Early Phase Study for Key Basic Research Project(2003CCB00200)

1)E-mail: xiajingguang@hotmail.com