

文章编号: 1007-4627(2005)02-0212-04

利用 PCC 技术预测 γ 射线对肝癌细胞的辐射效应*

杨建设^{1,2}, 李文建¹, 赵 靖^{1,2}, 高清祥³, 王转子^{1,2}, 夏景光^{1,2}, 金晓东^{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 100039;

3 兰州大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 利用早熟染色体凝集技术预测研究了 γ 射线对肝癌细胞 SMMC-7721 的辐射效应。结果表明, G1 和 G2 期细胞内的染色单体和等点染色单体断裂数与照射剂量之间存在线性相关性, 染色单体断裂总数与细胞存活率之间存在良好的线性相关性。说明辐射诱导的染色单体断裂可以作为预测 SMMC-7721 细胞内在辐射敏感性的指标, 也可为临床诊断和治疗肝癌提供依据。

关键词: 早熟染色体凝集技术; 预测; 肝癌; 辐射; 效应

中图分类号: Q813.5; TL99 **文献标识码:** A

1 引言

癌症是致死率很高的疾病之一。放射生物学家都把研发一种能够预测肿瘤放射效应的方法作为主要目标。精确的肿瘤放射效应的预测分析方法不仅可以为癌症的治疗提供理论依据, 而且能够给临床医生选择诊疗方案提供极大的帮助。

克隆形成法是一种常用的研究肿瘤放射效应的方法之一^[1-4], 但是作为一种常规的方法, 它至少需要 14—21 d 的时间才能形成克隆, 对于临床诊断和治疗就不太可行。应用早熟染色体凝集技术来研究肿瘤的辐射效应, 从细胞处理到结果统计仅需要 2 d 时间。

自从 Johnson 等^[5], Hittelman 等^[6] 和 Cornforth 等^[7] 应用早熟染色体凝集 (premature chromosome condensation, 简称 PCC) 技术研究放射诱导的染色体损伤以来, PCC 技术已经成为一种研究辐射诱导各细胞周期时相染色体原初损伤的成熟的方法^[8-11], 尤其在 G2 期, 这一技术效果更佳。文献^[12-19] 介绍了不同种类的细胞系经不同种类的射线, 如 X 射线、 γ 射线以及重离子束, 照射后表现出了线性剂量依赖关系。但大多数的研究侧重于对细胞 G2 期的研究, 对于 G1 期以及 G1 期和 G2 期相关

性的研究报道很少。我们采用了化学诱导的 PCC 技术对人类肝癌细胞系 SMMC-7721 进行 γ 射线的放射效应研究。

2 材料和方法

细胞培养 人类肝癌细胞系 SMMC-7721 (购自 CCTCC) 用含有 10 % 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液在 37 °C, 5 % CO₂ 的恒温培养箱内培养。

细胞照射 用兰州医学院第一附属医院⁶⁰Co 源产生的 γ 射线 (剂量率 0.2 Gy/min) 照射指数生长期的 SMMC-7721 细胞。

PCC 方法和染色体制备 Calyculin-A (购自美国 BIOMOL 公司) 是一种良好的 PCC 诱导剂, 将其溶于 100% 的乙醇制成 1 mmol/L 的储存液。照射前将其加入需照射细胞的培养液内, 终浓度为 50 nmol/L。细胞照射后在 37 °C, 5% CO₂ 的恒温培养箱内继续培养 30 min。收集细胞, 75 mM KCl 低渗处理 20 min, 卡诺氏液固定, 最后以少量固定液悬浮细胞, 滴片, 在热蒸汽上烘干, 5% Giemsa 染色。

染色体观察与计数 按照 Savage^[20] 的标准, 观察每个剂量点不少于 40 个的 G2 期细胞并计算其染色单体和等点染色单体的断裂数。同时, 记录

收稿日期: 2004 - 02 - 27; 修改日期: 2004 - 06 - 15

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (10335050); 国家重大基础研究前期研究专项基金资助项目 (2003CCB00200)

作者简介: 杨建设 (1975—), 男 (汉族), 甘肃山丹人, 博士生, 从事辐射生物学研究;

E-mail: youngkinsun@yahoo.com.cn

在此过程中出现的 G1 期细胞, 并计算其染色单体断裂数。每个等点染色单体断裂被计为两个断裂。

3 结果

3.1 细胞存活率测定

图 1 为 SMMC-7721 经 γ 射线照射后的存活曲线。该曲线经线性平方拟合后结果良好, 拟合函数为 $S = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$, 相关系数 $R^2 = 1$, α 和 β 值分别为 0.03 和 0.06。 β 值大于 α 值表明在细胞

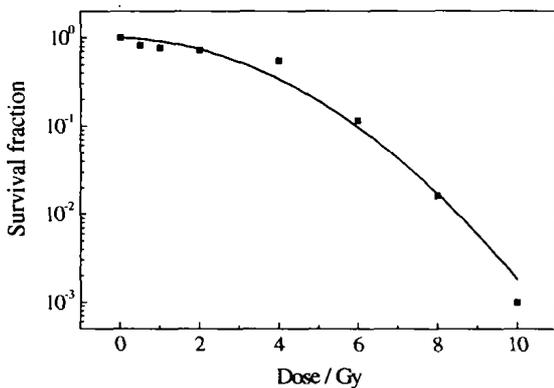


图 1 SMMC-7721 细胞存活曲线

表 1 G1 期与 G2 期早熟染色体凝集细胞数及比例

Dose/Gy	0	0.5	1	2	4	6	8	10
G1 cells	7	6	5	5	6	8	7	8
G2 cells	40	40	40	40	40	40	40	40
G1/G2 (%)	17.5	15	12.5	12.5	15	20	17.5	20

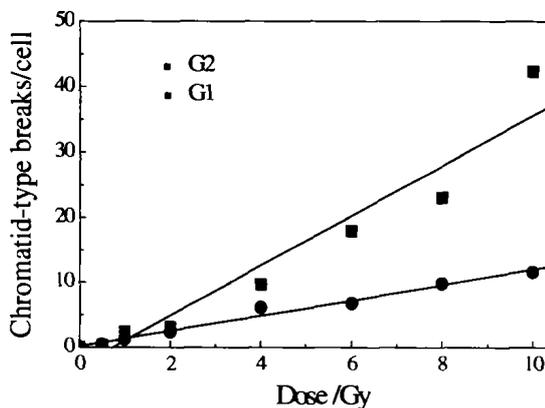


图 2 G1 与 G2 期染色单体断裂剂量效应关系

3.4 G2 期等点染色单体断裂

图 3 为 G2 期细胞等点染色单体断裂与照射剂量之间的关系。经线性回归分析, 其回归方程为

杀伤贡献方面, 高剂量辐射较好地克服了细胞修复即时效应, 存活率以指数形式衰减, 而不像低剂量辐射时以线性衰减为主。

3.2 PCC 诱导效率

Calyculin-A 是一种蛋白丝氨酸/酪氨酸磷酸酶抑制剂, 能够在细胞周期的不同时相诱导 PCC 形成^[8-21], 尤其在 G2 期^[22] 其诱导效率更高。Calyculin-A 在 50 nM 的浓度下可使混合细胞发生早熟染色体凝集, 被凝集的染色体中, G1 期细胞约占 20%, G2 期细胞占 80% 左右, 把这两个时相细胞数的比例称为 PCC 诱导效率。在各个剂量点, 当计数 40 个 G2 期细胞时, 分别有 5—8 个 G1 期细胞进入计数范围, 说明在此实验中 PCC 诱导效率是 12.5%—20%, 结果见表 1。

3.3 G1 和 G2 期细胞照射后染色单体断裂

图 2 显示了 G1 和 G2 期细胞染色单体断裂数与照射剂量之间的关系。不论在 G1 还是 G2 期, 染色单体断裂数与剂量呈线性增长关系。在同一剂量点, G2 期染色单体的断裂数约为 G1 期的 3—4 倍。

$y = 0.01 + 0.2x$, $R^2 = 0.99$, 说明两者之间具有良好的线性相关。

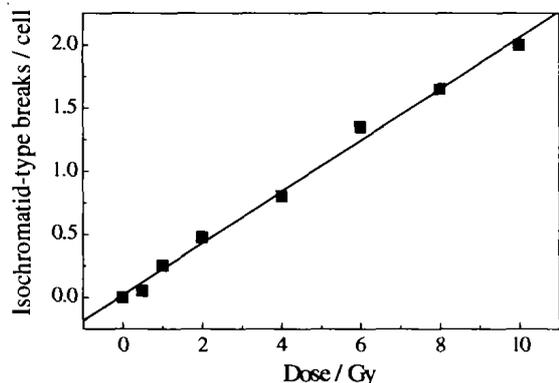


图 3 G2 期等点染色单体断裂剂量效应关系

3.5 染色单体断裂与细胞存活分数关系

图 4 为 G2 期染色单体断裂数和等点染色单体

断裂数与细胞存活之间的关系。应用直线回归分析,在 G2 期细胞中,染色单体断裂数和等点染色单体断裂数与细胞存活率之间具有比较好的相关性。尽管个别数据点小幅偏离拟合曲线,但断裂数随着细胞存活率下降而增长的趋势是明显的。

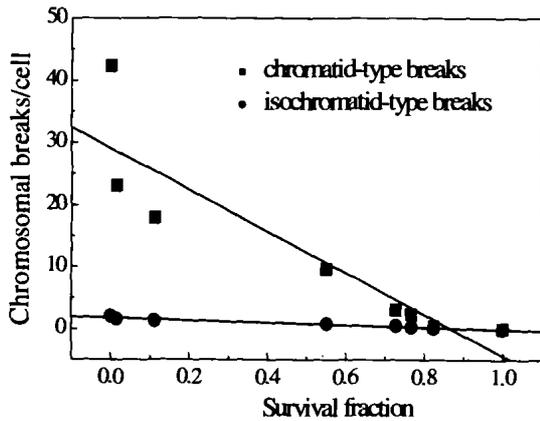


图 4 G2 期染色单体断裂及等点染色单体断裂与细胞存活率关系

4 讨论

Calyculin-A 是一种有效的 PCC 诱导剂,它可以在细胞周期的各个时相诱导染色体凝集,尤其在 G2 期其诱导效率更高。在此研究中发现,Calyculin-A 诱导 G2 期染色体凝集的效率是 G1 期的 5—8 倍,与 Goodwin 等^[23]和 Durante 等^[9]的研究结果一致,但其机理有待进一步研究。

在此研究中,SMMC-7721 细胞经⁶⁰Co γ 射线照射后细胞存活率和照射剂量之间存在线性关系,这已被许多研究^[21, 25, 1, 11, 17]所证实。在 G1 期和 G2 期,染色单体断裂数的增加与细胞存活率的下降都具有良好的线性相关性。

Durante 等^[26]报道了经 X 射线照射后染色单体断裂数与剂量线性相关,Kawata 等^[4, 11]的研究

结果显示等点染色体断裂与接受照射的 X 射线剂量也呈线性相关。我们的研究中,SMMC-7721 细胞染色单体断裂数和等点染色单体断裂数都随着 γ 射线剂量的增加而线性增长,表明在更高的剂量下,将会有更多的电子击中靶物质——染色体,所以染色体断裂的产额会响应增加。

然而,G2 期等点染色单体断裂的绝对增加值远少于染色单体断裂的绝对增加值。Kawata 等^[11]在研究不同 LET 射线的生物学效应后发现,在低 LET 射线,如 X 和 γ 射线,照射后细胞染色体的断裂以染色单体断裂为主,而在接受高 LET 射线照射后,染色体的断裂形式则以等点染色单体断裂为主,可能是因为多数等点染色单体断裂是电子分别击中姐妹染色单体所致。对于低 LET 射线,它在单位射程内损失的能量不足以导致姐妹染色单体断裂,因此,在击中姐妹染色单体中的一条后,能量损失殆尽或者剩余的能量不够造成对另一染色单体的损伤。因此,在低 LET 射线照射后染色体断裂多为染色单体断裂。

在 G1 期,染色体相对松散地聚集在一起,但是在 G2 期,由于染色体已经过复制,并且为有丝分裂做好准备,染色体的聚集状态要远比 G1 期紧密得多。因此,同样能量的射线与染色体的作用截面要大于 G1 期的,这样,G2 期染色体断裂的产额就会高于 G1 期的。

5 结论

放射治疗是一种非常有效的癌症治疗方法,对于临床医生和患者而言,早期诊断和制定治疗方案非常重要。化学诱导的早熟染色体凝集技术已经被广泛应用。作者认为线性增长的肝肿瘤细胞 SMMC-7721 G2 期细胞染色单体断裂暗示其与该细胞系放射敏感性之间存在着密切的相关性。

参 考 文 献:

[1] Girinsky T, Bernheim A, Lubin R, *et al.* International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 1994, **30**: 789.
 [2] West C M, Davidson S E, Roberts S A, *et al.* British Journal of Cancer, 1997, **76**: 1 184.
 [3] Coco Martin, J M, Mooren E, Ottenheim C, *et al.* International Journal of Radiation, Biology, 1999, **75**: 1 161.
 [4] Kawata T, Ito H, George K, *et al.* Radiation Research, 2003, **159**: 597.
 [5] Johnson R T, Rao P N. Nature, 1970, **226**: 717.
 [6] Hittelman W N, Rao P N. Mutation Research, 1974, **23**: 251.
 [7] Cornforth M N, Bedford J S. Science, 1983, **222**: 1 141.

- [8] Gotoh E, Asakawa Y, Kosaka H. *Biomedical Research*, 1995, **16**: 63.
- [9] Durante M, Frusawa Y, George K, *et al.* *Radiation Research*, 1998, **49**: 446.
- [10] Kawata T, Gotoh E, Durante M, *et al.* *International Journal of Radiation Biology*, 2000, **76**: 929.
- [11] Kawata T, Durante M, Frusawa Y, *et al.* *International Journal of Radiation Biology*, 2001, **77**: 165.
- [12] Pantelias G E, Maillie H D. *Mutation Research*, 1985, **149**: 67.
- [13] Bedford J S, Goodhead D T. *International Journal of Radiation Biology*, 1989, **55**: 211.
- [14] Goodwin E H, Blakely E A, Tobias C A. *Radiation Research*, 1994, **138**: 343.
- [15] Cornforth M N, Goodwin E H. *Radiation Research*, 1991, **127**: 61.
- [16] Suzuki M, Watanabe M, Suzuki K, *et al.* *International Journal of Radiation Biology*, 1992, **62**: 581.
- [17] Suzuki M, Watanabe M, Kanai T, *et al.* *Advances in Space Research*, 1996, **18** (1/2): 127.
- [18] Suzuki M, Kase Y, Kanai T, *et al.* *International Journal of Radiation Biology*, 1997, **72**: 497.
- [19] 李文建, 周光明, 卫增泉等. *原子核物理评论*, 2003, **20**: 42.
- [20] Savage J R K. *Journal of Medical Genetics*, 1975, **13**: 103.
- [21] Alsbeih G, Raaphorst G P. *Anticancer Research*, 1999, **19**: 903.
- [22] Gotoh E, Kawata T, Durante M. *International Journal of Radiation Biology*, 1999, **75**: 1 129.
- [23] Goodwin E H, Blakely S M, Chen D J, *et al.* *Advances in Space Research*, 1996, **18**: 93.
- [24] Pandita T K, Hittleman W N. *Radiation Research*, 1992, **131**: 214.
- [25] Sasai K, Evans J W, Kovacs M S, *et al.* *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 1994, **30**: 1 127.
- [26] Durante M, Gialanella G, Grossi G F, *et al.* *International Journal of Radiation Biology*, 1994, **65**: 437.

Predictive Assay of Radiant Response of Hepatoma Cells Exposed to γ -rays Measured by PCC Technique^{*}

YANG Jian-she^{1, 2}, LI Wen-jian¹, ZHAO Jing^{1, 2}, GAO Qing-xiang³,

WANG Zhuan-zi^{1, 2}, XIA Jing-guang^{1, 2}, JIN Xiao-dong^{1, 2}

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

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;*

3 *Life School of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*)

Abstract: We investigate the radiation response of hepatoma cells SMMC-7721 by premature chromosome condensation (PCC) technique. A dose-dependent increase in radiation-induced chromatid/isochromatid breaks was observed in G1 and G2 phase respectively. A good relationship was found between cell survival and chromatin breaks. The results implied that low LET radiation-induced chromatid/isochromatid breaks can be possibly used as a good predictor of radiosensitivity of SMMC-7721 hepatoma cells, also it could be used to design radiotherapy schedule for liver cancer patients.

Key words: premature chromosome condensation technique; predict; liver cancer; radiation; response

^{*} **Foundation item:** Major Subject of National Natural Science Foundation of China(10335050); Pre-studies Subject of National Basic Research Program of China(2003CCB00200)