

文章编号: 1007-4627(2004)01-0053-03

γ 射线对 A172 胶质瘤细胞的生物学效应

赵 靖^{1,2}, 李文建¹, 高清祥³, 王菊芳^{1,2}, 毛淑红^{1,2}, 夏景光^{1,2}, 杨建设^{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: 以不同剂量照射后的细胞存活率、微核率和微核细胞率作为生物学终点, 研究了 γ 射线对 A172 细胞的生物学效应. 结果表明: 细胞存活率与剂量之间满足回归方程 $\lg Y = -0.06427X + 1.83354$, 其回归系数 $r = -0.9886$, $P < 0.01$. 剂量为 1 Gy 时微核率和微核细胞率达到最大值, 此时的微核率为 $(66.75 \pm 3.564)\%$, 微核细胞率为 $(53.9 \pm 0.7849)\%$, 微核率和微核细胞率均随着剂量的增大先增大后减小, 并分别维持在 42% 和 37% 左右.

关键词: γ 射线; A172 胶质瘤细胞; 存活率; 微核

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

神经胶质瘤简称胶质瘤, 是一种最常见的颅内恶性肿瘤, 以男性较多见, 它起源于脑组织中的神经胶质细胞, 占颅内肿瘤的 46% 左右. 恶性神经胶质瘤是一种临床上浸润性极强的脑瘤, 快速生长后肿瘤损坏大脑, 大多数病人在一年内就会死亡. 在全球范围内, 脑胶质瘤至今也没有很好的治疗方法, 被称为癌症王国中的“癌后”. 因此, 研究神经胶质瘤细胞的生物学效应显得很有意义.

通常情况下, 辐射造成的危害主要取决于生物体的吸收剂量, 而吸收剂量与细胞存活率之间的剂量效应是放射生物学研究中的一个重要方面. 用细胞微核可以快速检测电离辐射和化学诱变剂对细胞染色体的损伤^[1], 是体现细胞遗传性损伤的一个重要指标^[2]. 电离辐射诱发的细胞微核数与剂量存在一定的函数关系, 大量资料表明, 微核率和细胞存活率能够准确反映辐射对细胞的损伤程度.

本文选用细胞存活率、微核率和微核细胞率作为生物学终点, 研究了 γ 射线照射引起的 A172 细胞辐射生物学效应, 并为 γ 射线辐射治疗提供一定的生物学依据.

2 材料与方法

2.1 细胞培养

胶质瘤细胞 A172 (购自中国科学院上海细胞所) 培养于 RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司), 贴壁生长, 其中含 10% 胎牛血清 (中国杭州四季清公司)、100 units/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下, 两天换液一次, 3 天传代一次, 接种密度 1×10^5 cells/ml.

2.2 辐照

在兰州医学院第一附属医院放射科用 ^{60}Co 源辐照细胞, 辐照剂量分别为 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 4 和 6 Gy, 剂量率 0.20 Gy/min. 每个样品 3 次重复. 辐照前将培养基弃掉, 换上 PBS 缓冲液.

2.3 样品处理

辐照后, 一部分细胞换上含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基继续培养. 两天后, 取样品用酶液消化, 收集培养液、PBS 洗液及酶液, 并统一定容到 5 ml, 0.2% 台盼兰染色 (细胞悬液: 染液 = 4: 1), 立即用血球计数板统计死活细胞数. 其细胞存活率依照 (活细胞数/死、活细胞总数) $\times 100\%$ 得到.

另一部分样品倒弃 PBS, 酶液消化, 然后取适量细胞接种到 $\phi 60$ 的培养皿中, 待对照样品的细胞长满, 用固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定 30 min, 吖啶橙染色 12 min, PBS 缓冲液封片, 用荧光显微镜(Olympus)观察, 并盲计 1 000 个细胞的微核数、微核细胞数. 然后按照下列公式计算微核率和微核细胞率: 微核率=(微核数/细胞数) $\times 100\%$ 和微核细胞率=(微核细胞数/细胞数) $\times 100\%$.

3 结果

3.1 细胞存活率

经过观察与统计可以看出, 随着辐照剂量的增加细胞存活率呈递减趋势, 如图 1 所示.

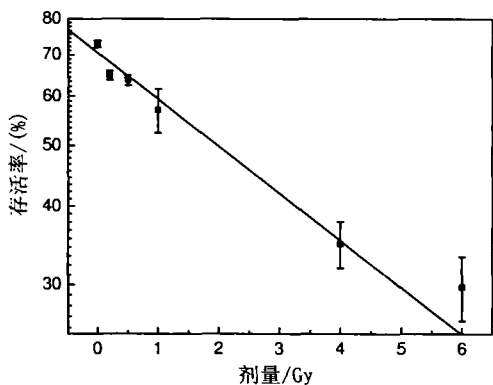


图 1 细胞存活率与剂量的关系

细胞存活率 Y 与剂量 D 之间存在着一定的相关性, 二者的关系符合 $\lg Y = AD + B$ 的线性模型. 根据实验数据, 可得到 $A = -0.07528$, $B = 1.84839$, 即细胞存活率与剂量之间符合回归方程 $\lg Y = -0.07528X + 1.84839$, 其回归系数 $r = -0.93965$, $P < 0.01$. 线性模型中的 $A = (\lg Y - B)/D$, 则 A 为一定剂量条件的细胞存活能力, 即 A 越小细胞存活率与剂量之间的关系越明显. 由回归系数 $r = -0.93965$ 就可以得出: $\lg Y = AD + B$ 的线性模型进行拟合的本次实验结果能很好地反映出 Y 与 D 之间呈显著负相关性. 同时, $P < 0.01$ 也可以证明细胞存活率与剂量的相关性明显.

常用的哺乳动物细胞存活曲线可以用多靶单击模型或线性平方模型拟合^[3]. 一般情况下, 细胞经 X 射线或 γ 射线辐照以后, 存活曲线都带有一个较明显的肩区, 肩区的大小与细胞对损伤的修复能力有关. 本文中的存活曲线呈单一的线性模型, 没有

肩区, 可能与 A127 细胞的修复能力较弱有关, 也可能与所选的检测方法有关.

3.2 细胞微核

细胞受辐照后时微核率和微核细胞率的测量结果表明, 随辐照剂量的增加而升高, 剂量为 1 Gy 时微核率和微核细胞率达到最大值. 此后, 随辐照剂量的增加微核率和微核细胞率迅速下降, 并维持在一定水平(见图 2).

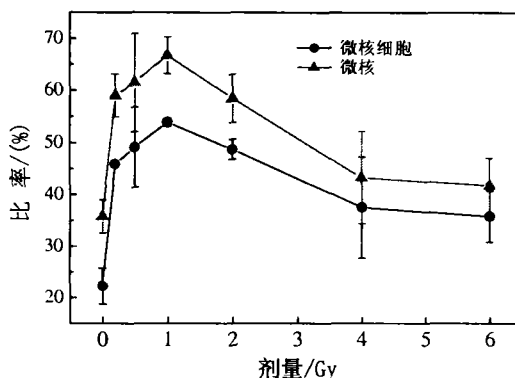


图 2 微核率及微核细胞率随剂量变化趋势

4 讨论

细胞存活率可以反映辐射对细胞的损伤程度. 由本实验结果看出, 细胞存活率与辐照剂量之间存在一定的剂量效应关系.

微核是细胞质中主核外的小核^[4], 可以看作是染色体畸变的一种表现形式, 来源于染色体的无着丝粒断片和细胞分裂后期滞后的染色体^[5]. 实验观察时, 微核必须与主核完全分开, 遇到重叠或相切时必须看清各自的边界, 着色与主核一致或略浅, 大小不超过主核的 1/3^[4].

本次实验结果表明, A127 细胞低剂量照射后可形成较高的微核率和微核细胞率, 并在较大的剂量辐照后缓慢下降, 最后达到一个坪区. 这说明, 低于 1 Gy 剂量时, γ 射线可引起 A127 细胞染色体的损伤, 进而产生的染色体片段使细胞表现出高的微核率和微核细胞率; 在大于 1 Gy 的条件下, 由于染色体严重受损, 细胞分裂延迟^[6], 有些细胞甚至停止分裂, 直至死亡. 从图 1 细胞存活率的结果可以看出, 随着剂量的增加, 存活细胞越来越少, 由对照的 72.91% 下降到 6 Gy 的 29.73%. 虽然大于 1 Gy 时微核率与微核细胞率不再增加, 但这应是由

于未分裂细胞和死细胞的增加造成的结果,因此,活细胞中的受损细胞(即微核细胞)不会无限制地增加。需要指出的是,尽管当剂量达到 6 Gy,仍有一定比例的细胞存活,这是由于在大剂量照射过程中,有些细胞就已经死亡,从瓶壁上脱落,贴壁细胞相对接受辐射较少,从而造成了 6 Gy 照射后,活细胞的比例相对偏高。

实验中,各个剂量点的微核率均比微核细胞率偏高,这个现象可能与细胞本身的特性有关。本实验使用的 A172 神经胶质瘤细胞,自发微核率比较高,与有关文献报道的不太一致^[7]。自发微核率偏高的原因可能是由于癌细胞本身的基因组不稳定,

容易自发突变所致。关于这个推断,将在后续实验中再次进行验证。

低 LET 辐照主要是通过损伤的积累来杀死细胞,细胞必须修复其 DNA 损伤后才能存活,否则不可能无限繁殖以形成克隆。有更多的证据表明 DNA 双链断裂(DSB)与细胞死亡关系最为密切^[8],而不可修复和错误修复的 DSB 损伤导致细胞突变或死亡。因此,电离辐射对细胞除了直接杀灭作用外,还存在后效应。辐照 2 天后统计细胞存活率正是考虑了这个因素而选取的测量时间。对于细胞存活率与辐照剂量、时间的关系将在后续实验中进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] 杨淑琴,杨占山,朱寿彭. ^{147}Pm 诱导血红细胞系对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射的适应性反应[J]. 苏州医学院学报, 1999, 19(2): 1 253.
- [2] 刘志辉,孟庆勇. 海藻多糖对 γ 射线诱发的小鼠微核形成率的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2002, 14(3): 180.
- [3] 夏寿萱主编. 放射性生物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998, 59—60.
- [4] 梁丽燕,郑巧玲,黄建勋等. 人淋巴细胞微核率辐射剂量效应曲线的研究[J]. 中国职业医学, 2000, 27(4): 5.
- [5] 王菊芳,李文建,周光明等. 用 CB 微核法预测癌细胞的放射敏感性[J]. 核技术, 2000, 23(3): 188.
- [6] 周光明. 重离子辐射诱导的 DNA 双链断裂研究[D]. 兰州: 中国科学院近代物理研究所, 2001, 17.
- [7] 雷苏文,苏旭,白玉书等. 重离子束 $^{12}\text{C}^{6+}$ 照射人离体血建立淋巴细胞微核的剂量-效应曲线[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2003, 23(1): 21.
- [8] 李文建,周光明,卫增泉等. 重离子辐射哺乳动物细胞敏感性的分子机理[J]. 原子核物理评论, 2003, 20(1): 42.

Biological Effectiveness in A172 Glioma Cells by γ -ray Irradiation

ZHAO Jing^{1,2}, LI Wen-jian¹, GAO Qing-xiang³, WANG Ju-fang^{1,2},

MAO Shu-hong^{1,2}, XIA Jing-guang^{1,2}, YANG Jian-she^{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 School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To study the biological effectiveness in A172 glioma cells induced by γ -ray irradiation, the survival fraction and the micronucleus frequency of A172 cells was measured. The result showed that the survival fraction was negatively correlated to the radiation dose. At 1.0 Gy, the micronucleus frequency peaked about $(66.75 \pm 3.564)\%$, and the frequency of micronucleus cells peaked about $(53.9 \pm 0.7849)\%$. As the radiation dose increasing, the micronucleus frequency and the frequency of micronucleus cells decreased and finally kept steady about 42% and 37%, respectively.

Key words: γ -ray; A172 glioma cell; survival fraction; micronucleus