

人成纤维细胞株辐射诱导凋亡与辐射敏感性相关性研究

朱涵能 孙达人 罗伟华 史剑慧 程文英

(上海医科大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 为探讨不同放射敏感性人成纤维细胞株经辐射诱导后的凋亡情况,应用 Tunel 法及流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡,以⁶⁰Co γ 射线处理细胞。结果表明(1)⁶⁰Co γ 射线照射后,集落形成实验表明,6号细胞株辐射敏感性高于8号细胞株。(2)Tunel法和流式细胞术检测结果表明,凋亡率与辐射敏感性成正比,同样反映出6号细胞株辐射敏感性高于8号细胞株。(3)检测还发现,凋亡率与辐射剂量和辐射后时间成正比。说明凋亡率的变化能够反映细胞株的辐射敏感性水平;凋亡率与辐射剂量和时间呈依赖关系,有可能成为推断辐射敏感性的重要指标之一。

关键词 人成纤维细胞株, 凋亡, 辐射敏感性

电离辐射可诱导辐射敏感性细胞和不敏感性细胞发生凋亡^[1],而细胞凋亡作为生物体的一种自然现象,在生长、发育和变异方面有着重要的意义。近年来对电离辐射影响细胞凋亡的报道较多,已深入到凋亡相关基因的表达和信息传递通路的研究^[2],但关于辐射敏感性与细胞凋亡关系的研究尚不多见,本研究利用流式细胞术(FCM, flowcytometry)和TUNEL法观察了二株人成纤维细胞株,在辐射后凋亡率与时间和剂量的相关关系,以为辐射敏感性判断提供新的指标。

1 材料和 方法

1.1 细胞培养与照射条件

6号,8号人成纤维细胞株由美国引进,取处于指数生长期的细胞,细胞浓度为 1×10^6 /mL,接种于细胞培养瓶中,每3~5d换培养液,待细胞生长汇合后,用胰酶消化传代。指数生长期的细胞用于实验,辐射源为铯¹³⁷Cs,为Gammacell-40型,中心最大剂量率为1.12Gy/min。

1.2 细胞集落形成实验

取指数生长期细胞,消化,计数,稀释,按照剂量大小将不同数目细胞接种于培养瓶内,每个剂量3瓶,培养12~14d后倾去培养液,用无水乙醇龙胆紫液固定染色1h,⁰Gy组用于计算PE。计数大于等于50个细胞的集落。数据按多靶单击方程 $S = 1 - (1 - e^{-d/d_0})^n$,用sigma plo+41软件拟合作图,计算出Do及N值,并按 $D_g = D_0 \ln(N)$ 计算Dg值。

1.3 细胞凋亡检测

1.3.1 流式细胞术检测 样品细胞消化后离心, PBS 洗涤2次,用2mL冷无水乙醇固定,每

个样品细胞数均大于 1×10^6 ，离心去上皮，PBS 洗 2 次，加 1mL 1% Triton 静置 10min，PBS 洗涤，加 100 μ L Nase(0.1mg/ml) 37 $^{\circ}$ C 水溶 30min，PBS 洗 2 次。加 1mL 0.5% PI 染色，4 $^{\circ}$ C 避光反应 30min，流式细胞仪检测，分析用 Modfit 软件，组间比较用卡方检验。

1.3.2 TUNEL 染色法检测 指数生长期细胞按设计剂量照射后孵育 12h，收集贴壁和悬浮细胞，PBS 洗涤制悬液，滴片法涂片，以 10% 中性福尔马林室温下固定 15min，PBS 洗涤后风干，以 50 μ L/片浓度加蛋白酶 K(20 μ g/mL)，室温 15min，DDW 洗 3 次，每次 3min。样品片浸入新鲜配制的 0.3% 过氧化氢水溶液中，室温 20min，DDW 洗涤 2 次，每次 3min，样品片加标记缓冲液 10 μ L/片，室温 1min 后吸除，在冰上取 TdT 和 Biotin-11-dUTP 各 1 μ L，加入 8 μ L 标记缓冲液中，混匀后加样品片上，10 μ L/片。置样品于湿盒中，37 $^{\circ}$ C 标记 60min。样品片入 0.01mol/LPBS(pH7.4)中洗 3 次，每次 3min。样品片加封闭液 50 μ L/片，室温 10min，之后吸除封闭液。用封闭液按 1:50 的比例稀释 Avidin-HRP 为工作液，加样品片上，50 μ L/片，37 $^{\circ}$ C 湿盒中反应 30min。样品片在 0.01mol/LPBS 中洗 4 次，每次 3min。加过氧化氢 0.5mg/mL，DAB 显色液显色 10min 左右。苏木素复染，常规封片。加 DNA 酶 I 作阳性对照，不加 TdT 酶为阴性对照。涂片置高倍镜下观察，选择细胞均匀，染色良好的区域，以细胞核中有棕色颗粒者为阳性，计数 500 个细胞中染色阳性细胞数，由以下公式计算凋亡百分率：

$$\text{凋亡百分率} = \frac{\text{阳性细胞数}}{\text{受检细胞数}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 成活率与剂量关系

如图 1 所示，成纤维细胞株的集落形成实验表明，6 号细胞辐射敏感性高于 8 号细胞株，二株细胞的存活率随辐射剂量的增加而减少，但减少的幅度逐渐变小。6 号细胞 D_0 为 1.385， N 为 2.715。8 号细胞 D_0 为 2.016， N 为 1.655。两者存在显著差异。

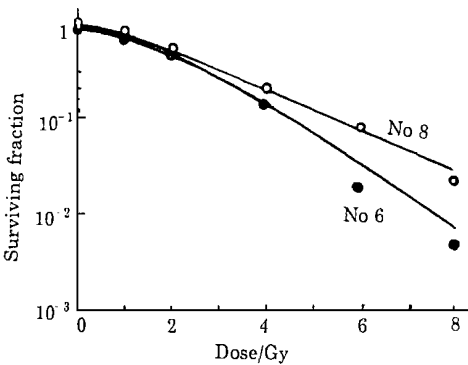


Fig.1 The surviving fraction line of No 6 and No 8 human fibroblast cells after different dosage of radiation

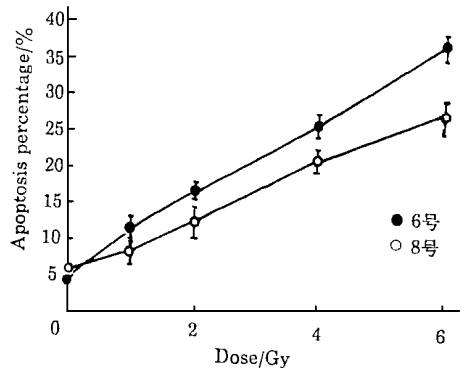


Fig.2 Human fibroblast cells apoptosis rate line after different dosage radiation (TUNEL)

2.2 凋亡与剂量的关系

图 2 为运用 TUNEL 法检测不同剂量照射后细胞株凋亡曲线, 同样表明 6 号成纤维细胞辐射敏感性高于 8 号细胞株, 细胞株的凋亡百分率随辐射剂量的增加而增大, 成正比。未照射细胞有一定的自发凋亡。

2.3 辐射敏感性与剂量的关系

图 3 为流式细胞术测定成纤维细胞株在不同剂量照射 48h 后的凋亡(M1)情况, 在 1Gy 时 8 号细胞的辐射敏感性大于 6 号细胞, 但在随后的剂量照射中, 凋亡(M1)随剂量的增加而增大, 2Gy 以后各剂量照射下, 6 号成纤维细胞株的辐射敏感性均高于 8 号细胞株。图中可见未照射细胞有自发凋亡发生。

2.4 辐射时间一效应关系

图 4 表明在 6Gy 照射后不同时间变化与凋亡(M1)的时间一效应曲线, 可见在照射后 36h 内两个细胞株的凋亡情况基本一致, 但在 48h 时, 6 号细胞凋亡(M1)显著高于 8 号细胞株。

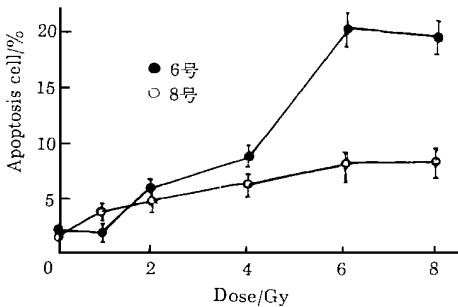


Fig. 3 Human fibroblast cells apoptosis rate line after different dosage radiation (FCN)

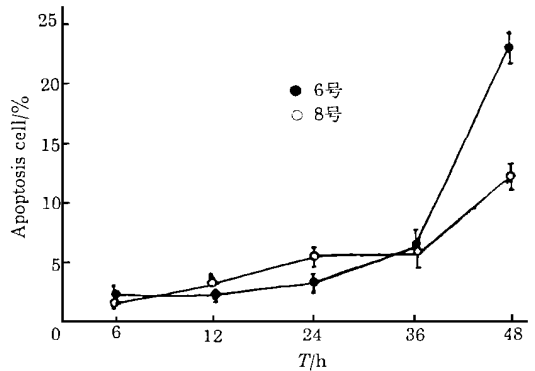


Fig. 4 Human fibroblast cells time—effection line after radiated by 6Gy y rays (FCN)

3 讨论

对辐射敏感性的估算主要有细胞存活曲线, 细胞微核测定和早熟染色体分析等, 虽然在辐射敏感性的预测过程中起着重要作用, 然而均存在着各自的弱点, 人们一直试图寻找新的辐射敏感性检测方法, 凋亡受到普遍关注。

细胞凋亡是细胞针对所处环境因素的特定改变所产生的应答, 在组织更新和细胞发育, 以及维持机体内环境的预定方面承担着重要的调控作用^[3], 近年文献表明, 照射引起的细胞死亡, 除增殖性死亡外, 有一部分属于凋亡, 其发生程度, 与照射剂量、照射后时间及放射敏感性有关^[4]。在肿瘤细胞凋亡实验中发现, 同等剂量照射后, 放射敏感的人淋巴细胞 TK6 有 90% 细胞发生凋亡, 放射中度敏感的鼠卵巢细胞凋亡峰值为 20% 左右, 而放射耐受的中国仓鼠卵巢癌细胞只有不到 3% 的细胞发生凋亡。

本文通过细胞存活曲线判定二株人成纤维细胞的辐射敏感性, 运用流式细胞术和 TUNEL 法检测凋亡与辐射敏感性之间的相关性, 发现: 人成纤维细胞株的凋亡率随辐射剂量的升高而升高, 并与辐射后时间成正比, 用凋亡的检测方法验证了细胞存活曲线测定的辐射敏感性

结果,两者保持一致。实验还表明,人成纤维细胞在照射前,其本身具有一定程度的自发凋亡,6号、8号细胞株具有相近的自发凋亡率,而在照射后6号细胞株的凋亡率明显高于8号细胞株,表明前者辐射敏感性高于后者。这与Stephens^[5]所做的动物移植性肿瘤实验结果:照射前凋亡水平高者,照射后增加明显者,放射敏感性高的结论保持一致。图4结果表明,6Gy照射后的最初36h,6号和8号细胞凋亡率基本一致,均低于6%,而在48h相关,凋亡呈显著上升,原因在于在最初的这段时间里无明显细胞分裂,由凋亡所导致的增殖完整性丧失也只占很少的一部分,主要是与分裂有关的细胞死亡。Olive^[4]和Stephens^[6]的实验证实了这一点。图2.3表示运用Tunel和FCM检测细胞凋亡率,除1Gy外,均表现出相似的大趋势,提示两种方法均可表示放射敏感性。

凋亡与辐射敏感性的相关性研究刚处于起步阶段,深入研究凋亡的机理,以及辐射分子生物学技术运用,凋亡极有可能成为测定辐射敏感性,估算临床辐射剂量的有效方法。

参 考 文 献

- 1 Szumiel I. *Int J Radiation Biology*, 1994, **66**:329~341
- 2 Bernhard E J, Mckema W G, Meschel R J *et al.* *Radiation Research*, 1994, **138**:564~567
- 3 Jacobson M D, Burne J F, Roff M C *et al.* *Cell*, 1997, **88**:347~354
- 4 Olive P L, Frazer G, Banath J P *et al.* *Radiation Research*, 1993, **136**:130~136
- 5 Stephens L C, Ang K K, Timothy E *et al.* *Radiation Research*, 1991, **127**:308~316
- 6 Stephens L C, Hunter N R, Ang K K *et al.* *Radiation Research*, 1993, **135**:75~80

THE STUDY OF RELATIONSHIP BETWEEN RADIATION—INDUCED APOPTOSIS OF HUMAN FIBROBLAST AND ITS RADIOSENSITIVITY

ZHU Hanneng SUN Daren LUO Weihua SHI Jianhui CHENG Wenying
(*Shanghai Institute of Radiation Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200032*)

ABSTRACT To investigate the radiation—induced apoptosis of human fibroblasts with different radiosensitivity, the methods of TUNEL and FCM were employed to test the apoptosis of cells treated with ^{60}Co γ -rays. The results of experiments indicated that: (1) Surviving fraction experiment identified the No 6 fibroblast cells have a high radiosensitivity than that of No 8 cells after exposed to ^{60}Co γ -rays; (2) Apoptosis rate has a positive relationship with radiosensitivity by the methods of TUNEL and FCM, in accordance with the result made by the surviving fraction experiment; (3) Both apoptosis rate and radiosensitivity increased within the 48 hours after radiation. In this conclusion is that: The changing of apoptosis rate can reflect the radiosensitivity level of cell line; the changing of cellular apoptosis rate and radiosensitivity were time—dependant after radiation. it is possible that apoptosis may be an important marker for judging cellular radiosensitivity.

KEYWORDS Human fibroblast, Apoptosis, Radiosensitivity