

# 细胞质受照射的遗传损伤效应

吴李君<sup>1</sup> 黑国庆<sup>2</sup> 许安<sup>1</sup> 余增亮<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国科学院等离子体物理研究所 合肥 230031)

<sup>2</sup>(美国哥伦比亚大学辐射研究中心 纽约 10032)

**摘要** 通过使用精确单粒子微束装置照射人与中国仓鼠杂交 A<sub>L</sub> 细胞细胞质,显示 α 粒子照射细胞质只有轻微的致死率,照射 16 个 α 粒子后仍有 76% 的细胞可以存活。诱变试验结果发现,尽管单个 α 粒子照射细胞质在 CD59 基因位点诱变频率较低,但 8 个或多于 8 个 α 粒子可诱导出高于未受照射对照 3 倍的诱变频率聚合酶链式反应(PCR)分析发现,照射细胞质诱导的 CD59<sup>-</sup> 基因突变子其 11 号染色体上 Wilms 肿瘤(WT)、过氧化氢酶(CAT)、(H-rasRAS)、甲状旁腺激素(PTH)、(脱脂蛋白-A1 APO-A1)等基因缺失率很小,其突变谱类似于自发突变子的突变谱。DMSO 或 BSO 处理细胞的研究显示,自由基清除剂 DMSO 可降低照射细胞质所诱发的 CD59 基因突变频率;与此相反,能与细胞内的谷胱甘肽结合的 BSO 可增加突变频率。结果表明,自由基很可能是照射细胞质诱发突变的主要原因之一。此外,用 IF7 单克隆抗体进行的 8-羟基脱氧鸟苷免疫过氧化物酶染色反应发现照射细胞质可在核内引起 DNA 的氧化损伤。

**关键词** α 粒子,细胞质,CD59 基因,突变,自由基

**中图分类号** Q691

文献[1-3]的研究发现,用极低剂量的 α 粒子照射生长中的细胞,粒子在组织中的辐射效应可能并不仅仅局限于照射细胞核,辐射粒子可能会通过核外的作用介导它们对 DNA 损伤效应。为了获取存在有核外遗传损伤目标的直接证据,本研究利用哥伦比亚大学新近发展的单粒子微束装置,用精确数量的 α 粒子辐照人与中国仓鼠杂交 A<sub>L</sub> 细胞的细胞质,研究了细胞质受照射后 11 号染色体上 CD59 基因位点的突变频率、基因突变谱以及突变产生的机理。A<sub>L</sub> 细胞含有全套的中国仓鼠染色体和单拷贝的人 11 号染色体(见图 1),CD59 基因位于 11 号染色体的 11p13 位点,可编码人的细胞表面抗原(S1),在补体和 S1 抗体的共同作用下,正常编码 S1 表面抗原的细胞裂解死亡,只有 CD59 基因突变的细胞可存活下来。由于 11 号染色体上只有很小的片断(11p15.5)对杂交细胞的存活至关重要,因此该细胞系对辐射等诱变剂诱发的突变,特别是大片断缺失非常敏感,易于检测<sup>[4-6]</sup>。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 装置

4.25 MeV 的单粒子微束装置,用于微束实验的 α 粒子 LET 为 90 keV/μm。

### 1.2 材料

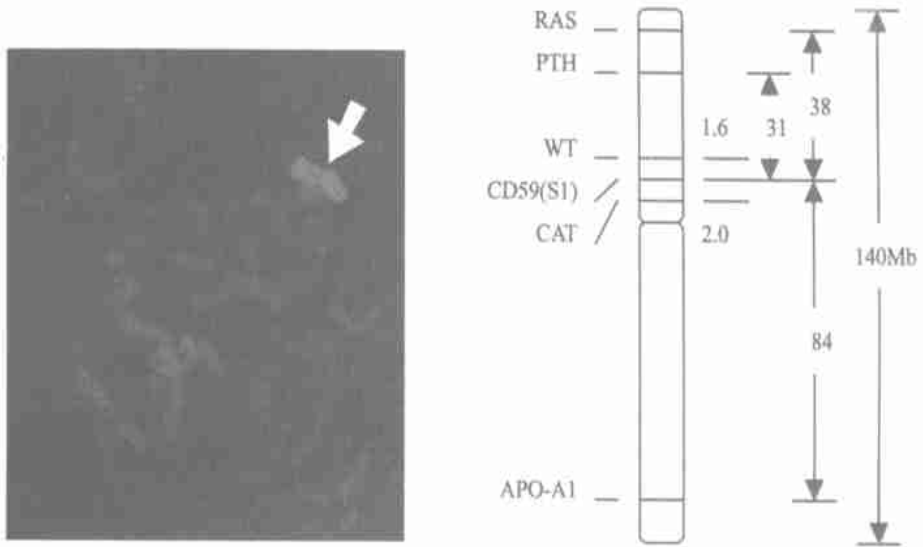
微束照射培养皿<sup>[7]</sup>(microbeam dishes),兔血清补体(HPR Inc. Denver, PA),S1 抗体(制于 E7.1 杂交瘤细胞上清液),二甲基亚砷(DMSO, Sigma),Buthionine S-R-Sulfoximine(BSO,

美国 NIH 项目(CA49062, CA75384)资助

第一作者:吴李君,男,1963 年 2 月出生,1998 年毕业于中国科学院等离子体物理研究所,副教授,核能科学与工程专业,博士

收稿日期:初稿 2000-05-17, 修回 2000-06-28

Sigma), 双丁酰环腺苷酸(DcAMP, Sigma), IF<sup>7</sup> 单克隆抗体(由哥伦比亚大学 Regina Santella 博士惠赠)。



**Fig. 1** Fluorescent image of  $A_L$  cell chromosomes which contains a single copy of human chromosome 11 (pointed by triangle)  
Right hand panel represents a schematic diagram of human chromosome 11, showing the relative positions of the markers

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养**  $A_L$  细胞在含 8% 胎牛血清(FBS), 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硫酸庆大霉素,  $2 \times 10^{-4}$  mol 甘氨酸的 Ham F12(GIBCO) 培养液中, 在 37°C 饱和湿度, 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。 $A_L$  细胞 CD59 基因自发突变频率为  $43 \pm 15/10^5$  活细胞<sup>[8]</sup>。

**1.3.2 细胞图像分析和微束定点照射**<sup>[7]</sup> 将  $A_L$  细胞接种到用于微束照射的培养皿里培养过夜, 在细胞培养液中同时加入 1m mol 浓度的双丁酰环腺苷酸(DcAMP)以强化细胞的伸展。照射前, 细胞用 50m mol Hoechst 33342 染色 30min, 细胞核的图像经显微镜输入计算机进行胞质照射位点的定位分析, 照射区域选择在距核长轴两端 8  $\mu\text{m}$  处, 设定数量的粒子将一分为二地射入这两个位点。根据 Mote Carlo 计算, 在此两胞质位点进行照射, 击中核可能性为 0.4%。计算机同时记录下每一个受照射过位点的位置, 以防重复照射。用于细胞扩展和定位的双丁酰环腺苷酸(DcAMP)和 Hoechst 33342 在试验浓度下, 无论是单独或配合在一起经测试对于细胞的存活、突变没有影响, 不会增加细胞的辐射敏感性。

**1.3.3 CD59 基因突变细胞的筛选和 11 号染色体上基因突变谱的 PCR 分析** 照射完所有胞质位点后, 用猪胰蛋白酶将细胞从微束照射培养皿中酶介, 进行存活率、CD59 基因突变频率检测; 提取经克隆、扩增后的 CD59<sup>-</sup> 基因突变子的 DNA 进行 WT (Wilms tumor)、CAT (Catalase)、RAS (H-ras)、PTH (Parathyroid Hormone)、APO-A1 (Apolipoprotein A1) 等基因缺失率的 PCR 分析, 方法参照文献[7, 8]。

**1.3.4 二甲基亚砜(DMSO)处理** 在 4 个  $\alpha$  粒子照射胞质前、后分别用 8% 的 DMSO 处理 10min, 照射后的细胞用猪胰蛋白酶酶解进行 CD59 基因突变频率分析, 方法参照文献[7, 8]。

1.3.5 BSO 清除细胞内非蛋白巯基(NPSH)试验 在 4 个  $\alpha$  粒子照射细胞质前,用  $10\mu\text{M}$  BSO 处理 18h,这一处理可降低细胞内源自由基清除剂非蛋白巯基(NPSH)水平至 5% 以下<sup>[9,10]</sup>。照射后的细胞用猪胰蛋白酶酶介进行 CD59 基因突变频率分析,方法参照文献[7, 8]。

1.3.6 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)免疫过氧化物酶检测 在 8 个  $\alpha$  粒子照射细胞质后,分别在 5、15、60min 对细胞进行冰醋酸固定,用单克隆抗体 IF7 和免疫过氧化物酶染色法检测 DNA 上 8-羟基脱氧鸟苷的产生情况,方法参照文献[11]。细胞的相对染色强度由计算机每组随机选取 150—200 个细胞进行统计分析。

## 2 结果 和 分 析

细胞质是否是引发核 DNA 损伤的目标一直是生物学家和遗传学家感兴趣的研究方向。Monro 和 Puck 的早期研究认为照射细胞质是无害的,并指出电离辐射所致生物效应的目标是核 DNA<sup>[12,13]</sup>。然而,新近的一些证据显示辐射粒子可能会通过核外的作用介导它们对核 DNA 损伤效应<sup>[1-3]</sup>。精确的定点定量照射结果表明,4 个  $\alpha$  粒子照射细胞质的致死率仅为 12%,76% 的细胞在胞质受到 16 个  $\alpha$  粒子照射后仍能存活下来形成集落。此外,通过使用抗体与补体检测 CD59 基因在细胞质受照射后的突变频率,我们发现,虽然照射细胞质致死率轻微,但它的确能诱发核内基因改变,受照射细胞 CD59 基因位点突变频率最高约达到自发突变频率的 3 倍(见表 1);同时,我们还注意到突变频率在照射粒子多于 8 个后达到饱和状态,不再随粒子数的增加而增加(见表 1),这可能是由于我们在照射方法上,每个细胞仅选择两个胞质位点进行照射以致突变介导物的产生量处于一种饱和状态,Nagayanan 等最近的研究为这一推测提供了直接的证据,他们发现细胞内的自由基  $\text{O}_2^-$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的产生并不与照射剂量的增加成正相关<sup>[14]</sup>。此外,存在这种诱变饱和效应的原因也可能是由于照射细胞质诱导了细胞内的修复保护效应,从而限制了对细胞的损伤和突变频率的提高<sup>[15-17]</sup>。类似的饱和效应在低剂量  $\alpha$  粒子对姊妹染色体的诱导上也曾报道过<sup>[2]</sup>。

Tab.1 Survival fraction and CD59<sup>-</sup> mutation frequencies (Mf) for  $\alpha$  particle irradiation through the cytoplasm of A<sub>L</sub> cells

| Number of $\alpha$ particles | Survival fraction/% | Mf(total) <sup>(1)</sup> |
|------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 0                            | 100.0               | 43±15                    |
| 1                            | 93.9                | 78±26                    |
| 4                            | 88.0                | 139±50                   |
| 8                            | 79.0                | 167.7±73                 |
| 16                           | 76.0                | 158±60                   |

<sup>(1)</sup> Mf = Mutant / 10<sup>5</sup> survivors

用 PCR 分析来源于未受照射细胞的自发突变子和来源于不同粒子数照射细胞质所致的 CD59<sup>-</sup> 基因突变子 11 号染色体上 WT、CAT、RAS、PTH、APO-A1 基因变化缺失情况,表 2 显示绝大多数受照射组的 CD59<sup>-</sup> 基因突变子仅仅丢失了 CD59 基因,其突变谱类似于 CD59<sup>-</sup> 基因自发突变子的突变谱,与我们先前用  $\alpha$  粒子照射细胞核时的发现受照射组基因缺失率随照射粒子数增加而增加有很大的差别<sup>[7]</sup>,显示照射细胞质与照射细胞核可能存在着不同的诱变机理。

为了研究自由基是否参与了细胞质受照射中诱发 CD59 基因突变的作用,我们选用了两种作用性能相反的化学物质 DMSO 和 BSO。研究后发现,在胞质受照射前、后分别用 8% 自由

基清除剂 DMSO<sup>[18-20]</sup> 处理细胞各 10min 可显著地降低受照射后 CD59 基因突变频率(见图 2);与此相反,10<sup>-6</sup>mol 巯基结合剂 BSO 照射前处理细胞 18h,通过结合从而降低细胞内源自由基清除剂非蛋白巯基(NPSH)、谷胱甘肽(GSH)的水平<sup>[21,22]</sup>,使 CD59 基因的突变频率提高 4—5 倍(见图 3)。这些发现首次直接证实了自由基在胞质受照射所致基因突变的重要作用。用于试验浓度的 DMSO 和 BSO 经测试对细胞无杀伤性和诱变性。

Tab.2 Mutation frequencies of CD59 genotypes

| Number of $\alpha$ particles | Number of mutnats analyzed | Mutant class           |              |   |              |
|------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------|---|--------------|
|                              |                            | CD59 <sup>-</sup> only |              | Number of mutants losing at least one marker besides CD59 |              |
|                              |                            | Number                 | Percentage/% | Number  | Percentage/% |
| Control                      | 37                         | 34                     | 92           | 3   | 8            |
| 1                            | 29                         | 28                     | 97           | 1   | 3            |
| 4                            | 32                         | 32                     | 100          | 0   | 0            |
| 8                            | 28                         | 26                     | 93           | 2   | 7            |

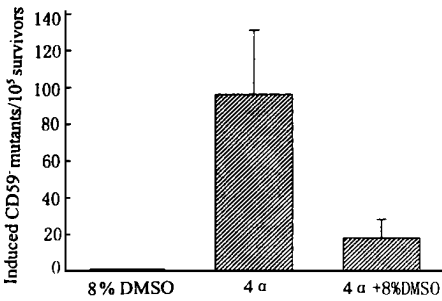


Fig.2 Effects of DMSO on induced mutation frequencies in A<sub>L</sub> cells treated with  $\alpha$  particles through the cytoplasm  
Data was pooled from 3 - 6 independent experiments Bar represent  $\bar{x} \pm s$

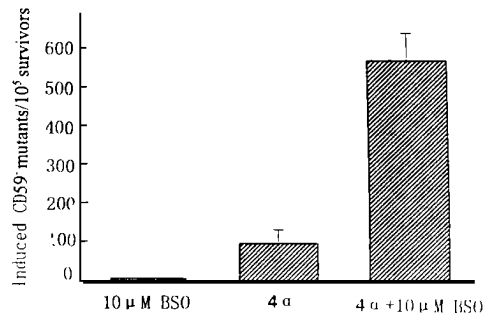


Fig.3 Effects of BSO on induced mutation frequencies in A<sub>L</sub> cells treated with 4  $\alpha$  particles through the cytoplasm  
Data was pooled from 3 independent experiments Bar represent  $\bar{x} \pm s$

此外,用 IF7 单克隆抗体进行的免疫过氧化物酶染色反应发现,照射后 5min 对细胞进行固定染色,其染色的相对强度为  $0.096 \pm 0.012$ ,是未受照射细胞的 1.9 倍( $0.051 \pm 0.01$ ),而照射后 15min 和 60min 进行的固定染色,8-羟基脱氧鸟苷的相对染色强度降至对照水平(见图 4),其降低的原因尚不清楚。由于 8-羟基脱氧鸟苷是核 DNA 受氧化损伤的重要标记<sup>[11,23]</sup>,结果显示,对核 DNA 的氧化损伤可能是照射细胞质引起核基因突变的方式之一。

我们目前还不清楚是哪种或哪些自由基及相关自由基的损伤信号是如何传至核内的。根据 DMSO 可有效地清除细胞内的 OH<sup>·</sup> 自由基<sup>[24]</sup> 以及大多数自由基的存在时间和扩散距离极短<sup>[25]</sup>,我们认为可能的途径之一是由于包括 OH<sup>·</sup> 自由基在

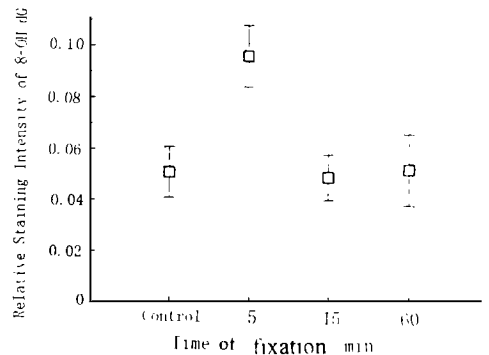


Fig.4 Relative immunoperoxidase staining intensity for 8-OH-dG in control and A<sub>L</sub> cells irradiated with 8  $\alpha$  particles through cytoplasm  
Cells were fixed at different time points of 5, 15 or 60 minutes after irradiation  
Bar represent  $\bar{x} \pm s$

内的几种自由基间的相互作用,即  $\text{OH}^{\cdot}$  自由基可通过胞质氧化等途径介导另一种自由基的产生,这一过程就象一个串联的结构不断地进行,直到被作用底物所限制。途径之二,损伤信号可能通过  $\alpha$  粒子直接或通过自由基间接地损伤细胞质中的线粒体 DNA (MtDNA) 引起包括产生生长寿自由基<sup>[26-27]</sup>,如  $\text{NOS}$ ,  $\text{NO}^{\cdot}$ ,  $\text{ONOO}^{\cdot}$  等途径将信号传至核内,已有资料显示 mtDNA 的损伤可能会进一步引起核 DNA 的损伤<sup>[28]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 Nagasawa H, Little J B. *Cancer Res*, 1992, **52**:6394—6396
- 2 Deshpande A, Goodwin E H, Bailey S M. *Radiat Res*, 1996, **45**:260—267
- 3 Hickman A W, Jaramillo R J, Lechner J F *et al*. *Cancer Res*, 1994, **54**:5797—5800
- 4 Puck T T, Wuchier P, Jones C *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68**:3102—3106
- 5 Hei T K, Hall E, Waldren C A. *Radiat Res*, 1988, **115**:281—291
- 6 Hei T K, Piao C Q, He Z Y *et al*. *Cancer Res*, 1992, **52**:6305—6309
- 7 Hei T K, Wu L J, Liu S X *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:3765—3770
- 8 Zhu L X, Waldren C A, Vannais D *et al*. *Radiat Res*, 1996, **145**:251—259
- 9 Hei T K, Geard C R, Hall E J. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1984, **10**(8):1255—1258
- 10 Tietze F. *Anal Biochem*, 1969, **27**:505—509
- 11 Yarborough A, Zhang Y J, Hsu T M *et al*. *Cancer Res*, 1996, **56**:683—688
- 12 Mounro T R. *Radiat Res*. 1970, **44**:748—757
- 13 Puck T T. *In the Mammalian Cell as a Microorganism*. San Francisco:Holden—Day, 1972,102—130
- 14 Narayanan P K, Goodwin E H, Lehnert B E. *Cancer Res*, 1997, **57**:3963—3971
- 15 Samson L, Schwartz J L. *Nature*, 1980, **286**:861—863
- 16 Lindquist S. *An Rev Biochem*, 1986, **55**:1151—1191
- 17 Gupta S S, Bhattacharjee S B. *Int J Radiat Biol*, 1988, **53**:935—942
- 18 Chapman J D, Doern S D, Peuvers A P *et al*. *Radiat Environ Biophys*, 1979, **162**:29—41
- 19 Okada S, Nakamura N, Sakai K. *Radioprotection of Intracellular Genetic Material*. In: Nygaard O F, Simic M G Eds, *Radioprotectors and Anticarcinogens*. New York:Academic Press, 1983, 339—356
- 20 Littlefield L G, Joiner E E, Colyer S P *et al*. *Int Radiat Biol*, 1988, **53**:875—890
- 21 Gdina D J, Dale P, Weichselbaum R. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1992, **22**(4):813—815
- 22 Hill C K, Nagy B, Peraino C *et al*. *Carcinogenesis*, 1986, **7**:665—668
- 23 Ames B M. *Free Radical Res Commun*, 1989, **7**:121—128
- 24 Kennedy A, Symons M C R. *Carcinogenesis*, 1987, **8**:683—688
- 25 Roots R, Okada S. *Int J Radiat Biol*, 1972, **21**:329—342
- 26 Wei Y H. *Proc Soc Exp Biol, Med*, 1998, **217**:53—63
- 27 Lenaz G. *Biochem et al. Biophys Acta*, 1998, **1366**:53—67
- 28 Cavalli L R, Liang B C. *Mut Res*, 1998, **398**:19—26

**GENOTOXIC EFFECTS OF CYTOPLASMIC IRRADIATION**WU Lijun<sup>1</sup> Tom K HEI<sup>2</sup> XU An<sup>1</sup> YU Zengliang<sup>1</sup><sup>1</sup>*Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)*<sup>2</sup>*Center for Radiological Research, Columbia University, Newyork 10032)*

**ABSTRACT** Abstract: Using a charged particle microbeam whereby individual cell's cytoplasm could be irradiated with a single or an exact number of  $\alpha$  particles, cell lethality, mutation induction and the functional role of reactive oxygen species in mediating the mutagenic response in the human-hamster hybrid ( $A_L$ ) cell assay system were assayed. The results showed that cytoplasm irradiation induced very little toxicity such that traversal through the cytoplasm with 16  $\alpha$  particles resulted in a cell survival fraction of  $\sim 0.76$ . While cytoplasmic traversal with one particles induced relatively few  $CD59^-$  mutant cells, those irradiated with 8 or more particles had an induced mutant frequency that was  $\sim 3$  fold higher than the background incidence. PCR analysis showed that  $CD59^-$  mutation induced by cytoplasmic radiation involved almost exclusively small alterations similar to those of spontaneous origin. Treatment of cells with dimethyl sulfoxide (DMSO) suppressed the mutant frequency induced by cytoplasmic irradiation, whereas buthionine S-R-sulfoximine (BSO) treatment which reduces intracellular glutathione level, increased the mutation frequency. These novel findings showed that the mechanism of mutation by cytoplasmic irradiation was heavily dependent on oxyradicals. Moreover, using IF 7 monoclonal antibody to detect 8-OHdG induction, the data indicated that cytoplasmic irradiation generate oxidative DNA damage in the nuclei of the target cells.

**KEYWORDS**  $\alpha$  particles, Cytoplasm,  $CD59$  gene, Mutation, Reactive oxygen species

**CLC** Q691