

● 简报 ●

^{60}Co γ 射线诱发的 MCF-7 细胞周期阻滞

杨业鹏¹ 陈冠英¹ 管增伟² 周梅¹ 沈钦剑¹ 沈磊¹

¹北京大学医学部放射医学基础教研室 北京 100083)

²北京大学医学部医药卫生分析中心 北京 100083)

摘要 以 ^{60}Co γ 射线照射体外培养的人乳腺癌 MCF-7 细胞,运用流式细胞术探讨了受照射后细胞周期进程的变化规律。结果表明, MCF-7 细胞受 5.0Gy γ 照射后呈现短暂的 S 期阻滞(持续约 6h),主要为 G₂ 期阻滞(持续约 63h)。S 期和 G₂ 期阻滞高峰分别出现在照射后 9h 和 18h,阻滞峰值分别达正常值的 1.6 倍和 6.2 倍。照射后 9h 和照射后 18h 的剂量-一效应曲线截然不同。照射后 9h S 期阻滞和照射后 18h G₂ 期阻滞均与照射剂量呈现明显剂量-一效应关系。

关键词 电离辐射, MCF-7 细胞, 细胞周期

中图分类号 R811.5, R730

电离辐射可诱发肿瘤细胞发生细胞周期阻滞,包括 G₁ 期阻滞、G₂ 期阻滞和 S 期阻滞^[1-2]。受照射肿瘤细胞可因细胞种类不同、细胞受照射时的周期时相不同以及射线种类不同等,而在细胞周期阻滞时相、阻滞峰值出现时间、阻滞程度和阻滞过程等方面呈现显著差异,其效应规律及其机理的深入研究具有重要的生物学意义,可为临床肿瘤放疗提供有益的启示。为此,本研究应用流式细胞术对 ^{60}Co γ 射线照射后人乳腺癌 MCF-7 细胞周期阻滞的规律进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和照射条件

选用人乳腺癌 MCF-7 细胞,在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,37°C、5% CO₂ 条件下培养,用胰酶-EDTA 溶液消化传代。处于指数生长期的细胞以本教研室钴源 ^{60}Co γ 射线照射,剂量率为 211.3-218.3cGy/min。

1.2 细胞周期的检测

采用流式细胞术分析法。照射后按实验设计时间收集细胞,以磷酸缓冲盐水(PBS)清洗,70%乙醇、-20°C 固定 18h 以上。固定细胞清洗后以 PBS 悬起,加入终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RNase 在 37°C 水浴 30min 去 RNA,以孔径 50 μm 的尼龙网过滤,再以终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碘化丙啶(PI)染液(含 0.03% Triton X-100)染色 10min。用 BD·FACScan 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)、Cellfit 软件进行测量,以 PI 荧光强度(代表 DNA 含量)为横坐标、相对细胞数量为纵坐标进行单因素直方图分析,检测 G₁、S、G₂+M 各时相细胞的百分比。每个样品分析 1 $\times 10^4$ 个细胞。实验重复 1 次,2 次结果趋势相同,本文数据为 2 次实验的均值。

北京大学基础医学院凯华基金资助

第一作者:杨业鹏,男,1955 年 1 月出生,1983 年毕业于北京医学院(现称北京大学医学部),医学硕士,副教授,硕士生导师,放射医学专业

收稿日期:初稿 2001-08-20, 修回 2002-03-12

2 结果

2.1 5.0Gy γ 照射后细胞周期阻滞的时间进程

MCF-7 细胞受 5.0Gy γ 照射后,主要表现为 G_2 期阻滞和短暂的 S 期阻滞(见图 1)。照射后 6h, S 期细胞数量开始增多,至 9h 达顶峰(为正常值的 1.6 倍),照射后 12h 降至正常值以下,阻滞持续约 6h。照射后 72h, S 期细胞数恢复稳定,但仍略低于正常值。照射后 9h, $G_2 + M$ 期细胞开始增多,至 18h 达顶峰(为正常值的 6.2 倍),之后持续下降,至照射后 72h 恢复稳定,但仍略高于正常值。 G_2 期阻滞持续约 63h。 G_1 期细胞于照射后持续减少,至照射后 18h 达低谷(为正常值的 1/16),而后逐渐回升,至照射后 72h 恢复至正常水平。

2.2 γ 辐射诱发细胞周期阻滞的剂量-效应关系

照射后 9h 检测和照射后 18h 检测所获得的剂量-效应曲线显著不同。照射后 9h 剂量-效应曲线(见图 2)显示, S 期细胞随照射剂量增加而增多, G_1 期细胞随照射剂量增加而减少,而 $G_2 + M$ 期细胞变化不明显。照射后 18h 剂量-效应曲线(见图 3)表明, $G_2 + M$ 期细胞的增多和 G_1 期细胞的减少均与照射剂量呈现明显剂量-效应关系,而 S 期细胞变化不大。

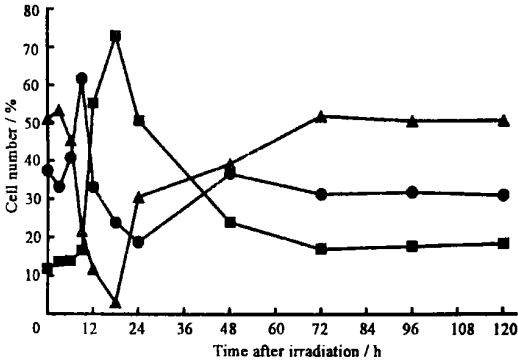


Fig. 1 Time course of cell cycle arrest in MCF-7 cells irradiated with 5.0Gy γ rays
 \blacktriangle . G_1 , \circ . S, \blacksquare . $G_2 + M$

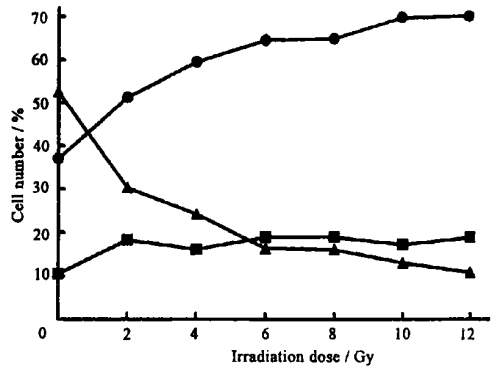


Fig. 2 Dose effect curve of cell cycle arrest in MCF-7 cells 9h after irradiation
 \blacktriangle . G_1 , \circ . S, \blacksquare . $G_2 + M$

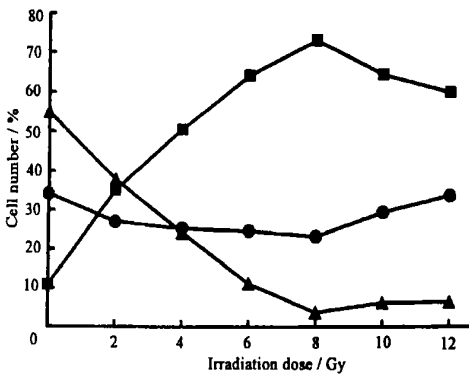


Fig. 3 Dose effect curve of cell cycle arrest in MCF-7 cells 18h after irradiation
 \blacktriangle . G_1 , \circ . S, \blacksquare . $G_2 + M$

3 讨论

本研究结果显示, MCF-7 细胞受 ^{60}Co γ 射线照射后,主要发生 G_2 期阻滞,这符合多数哺乳动物肿瘤细胞照射后反应的普遍规律^[1,2]并与 Vavrova 等^[3]用 γ 射线照射 HL-60 细胞所得结果一致。目前认为^[1,2,4],电离辐射所致的 DNA 损伤可被细胞内特定的感受器(Sensors)如 ATM 蛋白、DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-PK)所感知,并通过多个基因及分子参与的信号传导网络传递到细胞周期 $G_1 \rightarrow S$ 、 $S \rightarrow G_2$ 、 $G_2 \rightarrow M$ 3 个检查点(Cell-cycle checkpoints),引发检查点调控因子反应,导致相应周期时相阻滞,其生物学意义在于利于 DNA 损伤修复,保证基因组的遗传稳定性。多数报道认为,野生型

p53 基因在细胞 G₁ 期阻滞中起关键性调控作用^[1,4,5], 由于哺乳动物肿瘤细胞大多发生了 p53 基因突变, 故受照射后往往不呈现明显的 G₁ 期阻滞。而细胞周期蛋白 Cyclin B₁ 和激酶 CDC2(P34^{cdc2}) 结合形成的复合物—有丝分裂促进因子(MPF)被认为是促使细胞由 G₂ 期进入 M 期的主要调控因子。受照射细胞 Cyclin B₁ 表达延迟, CDC2 氨基酸残基过度磷酸化, 导致 MPF 失活, 细胞不能进入有丝分裂而引起 G₂ 期细胞堆积^[1,2]。

本研究结果还表明, 照射后肿瘤细胞各时相的细胞比率随时间进程此消彼长, 呈动态变化; 照射后不同时间可呈现不同的阻滞时相, 主要阻滞时相有可能出现较晚且持续较长时间; 细胞周期阻滞的剂量—效应曲线可因照射后检测时间点的不同而截然不同。这些结果提示, 在辐射诱发细胞周期阻滞研究中须注意观察照射后周期阻滞的全程变化, 在观察其剂量—效应关系时要选择好适当的检测时间点, 即照射后某时相阻滞的峰值时间, 否则有可能得出片面的甚至是错误的结论。

参 考 文 献

- 1 Teyssier F, Bay J O, Dionet C *et al.* Bull Cancer, 1999, **86**(4): 345—357
 - 2 Hwang A, Muschel R J. Radiat Res, 1998, **150** (Suppl): S52—S59
 - 3 Vavrova J, Marekova M, Vokurkova D. Neoplasma, 2001, **48**(1): 26—33
 - 4 Daniel D, Stephen P J. Current Opinion in Cell Biology, 2001, **13**: 225—231
 - 5 鞠桂芝, 傅海青, 罗灿等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2001, **19**(1): 67—70
- JU G Z, FU H Q, LUO C *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2001, **19**(1): 67—70

EFFECTS OF ⁶⁰Co γ RAYS ON THE CELL CYCLE PROGRESS OF MCF-7 CELLS

YANG Yepeng¹ CHEN Guanying¹ GUAN Zengwei² ZHOU Mei¹
SHEN Qinjian¹ SHEN Lei¹

¹ (Department of Radiation Medicine, Peking University Health Science Center, Beijing 100083)

² (Medical and Pharmaceutical Analysis Center, Peking University Health Science Center, Beijing 100083)

ABSTRACT To investigate the effects of ionizing radiation on cell cycle progress of tumor cell lines, the human breast cancer MCF-7 cell line cultured in vitro was exposed to ⁶⁰Co γ rays and the alterations in cell cycle progress after irradiation were measured by flow cytometry. The results indicated that the MCF-7 cells showed a transient S arrest continuing for about 6h and an obvious G₂ arrest continuing for about 63h after irradiation with 5.0Gy γ rays. S and G₂ arrest culminated at 9h and 18h respectively after irradiation and the peak values of S and G₂ arrest reached respectively 1.6 times and 6.2 times as many as normal value. The dose—effect curve examined 9h after irradiation was quite different from that examined 18h after irradiation. Both of the S arrest at 9h after irradiation and the G₂ arrest at 18h after irradiation presented significant relationship with irradiation dose.

KEYWORDS Ionizing radiation, MCF-7 cell line, Cell cycle

CLC R811.5, R730