

CB法微核检测技术应用于诱导基因组不稳定性的研究

沈波¹ 沈冰²

¹ (吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物重点实验室 长春 130021)

² (中国辐射防护研究院科技信息中心 太原 030006)

摘要 对 γ 射线诱导中国仓鼠成纤维(CHL)细胞基因组不稳定性进行了研究。利用CB法微核检测技术对一次照射、二次照射的CHL细胞进行微核测定,观察DNA损伤程度的变化情况。结果显示,微核发生率与细胞受照剂量呈相关关系,并随培养时间延长呈下降趋势。细胞再次受照后,其微核发生率与一次受照剂量呈相关关系。表明微核发生率与染色体损伤程度存在剂量相关性,微核检测技术可以用于生物效应表现为染色体损伤的辐射诱导基因组不稳定性的研究。

关键词 基因组不稳定性, CB法微核检测技术

中图分类号 R811.5

基因组不稳定性是近年来辐射效应研究过程中提出的新课题。它使受照细胞处于损伤易感态:细胞表型虽然正常,但当再次接受损伤因素刺激后会表现出较高的辐射敏感性。辐射诱导的基因组不稳定性可以随着细胞增殖而发生传递,并经多次传代后加强子代细胞基因组不稳定性发生率^[1]。基因组不稳定性近年来被认为是辐射致癌过程中的早期事件^[2]。文献[1]提出损伤累积的致癌理论,作者在实验中发现鼠10T1/2细胞恶性肿瘤的发生有赖于同一基因位点上的6—8个独立的突变损伤的累积。受照细胞首发损伤的发生率很高,达20%—30%,并且它可提高原本发生率,仅 10^{-6} 的同一位点的二次损伤的发生率,即基因组不稳定性可提高二次损伤发生的可能性,从而促进损伤的累积,提高癌症产生的危险度。

基因组不稳定性在生物体内表现为多种形式的延迟效应,如延迟突变、延迟的染色体畸变、延迟的细胞凋亡和细胞增殖性死亡等^[3]。Jamali等^[4]对经X射线照射的V79细胞进行微核及集落形成率的测定,发现受照后的存活细胞子代出现增殖性死亡现象时常伴有微核发生率的升高。Abend等^[5]对微核与增殖性死亡相互关系的研究发现:虽然不是所有可能会发生增殖性死亡的细胞都产生微核,但微核的发生是诱导受照细胞发生增殖性死亡的致死性损伤的早期标志之一。微核还是辐射诱导基因组发生不稳定性改变时的一个重要生物学效应^[6]。因为辐

射诱导基因组损伤的主要类型以DNA链断裂为主,微核是DNA双链断裂所产生的染色体片断,而DNA双链断裂是诱导基因组不稳定性发生的重要因素之一^[7]。本实验利用CB法微核检测技术通过检测不同培养时间的受照细胞及其子代,对 γ 射线诱导发生的基因组不稳定性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

中国仓鼠肺成纤维细胞(CHL)为本室传代培养细胞。用含15%小牛血清,青霉素、链霉素各100U/mL的RPMI1640培养基, pH值为7.2—7.4,在37℃、5% CO₂的恒温培养箱中培养,隔3d传代一次。

1.2 照射条件

取对数生长期的CHL细胞,计数后按 1×10^5 浓度接种于25mL培养瓶中,分为不同剂量受照组与对照组,每组三个平行样,在冰浴条件下进行 γ 射线照射(照射源为中国核动力研究设计院制造的6WGP80型⁶⁰Co远距离治疗机)。吸收剂量率为0.759Gy/min,照射视野为20cm×20cm,源皮距为80cm,照射剂量分别为0、2、4、6、8、10Gy。受照24h后进行CB法微核测定。受照后形态正常的细胞经单克隆化继续培养至33代再进行二次照射,

第一作者:沈波,女,1974年4月出生,2003年在中国辐射防护研究院获硕士学位,现在吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物重点实验室攻读博士学位

通讯联系人:沈冰

收稿日期:初稿2004-04-19,修回2004-09-07

照射剂量为 2Gy。该剂量的选取由预试验确定,为引起细胞发生明显损伤的最小剂量。

1.3 细胞克隆化培养

经相同照射条件作用后的细胞,培养 24h 后进行有限稀释并按一定细胞数目接种于培养皿中培养,7—10d 后长出细胞克隆,挑取细胞形态正常的单克隆接种于 96 孔板,之后依次将细胞接种于 24 孔板、6 孔板、培养瓶中逐级扩增培养。以取得单克隆细胞。

1.4 CB 法微核检测技术

我们采用文献[8]所报道的 CB 法微核检测技术(Cytokinesis-block MN analysis)对细胞进行分析。具体方法概括如下:受照细胞于收获前 18h 加入胞松素(美国 Sigma 公司产品),终浓度为 $4\mu\text{g/mL}$,使细胞滞于中期分裂相。收获细胞经固定及 Giemsa 染色处理后,镜下观察并记录不同剂量点,每 1000 个双核细胞中微核的发生率,实验重复三次,以 $\bar{x} \pm s$ 为实验结果。实验数据采用 Origin 4.1 数据处理软件进行统计分析。

2 结果与讨论

微核是胞质中存在的直径大约为 $2-4\mu\text{m}$ 的独立于染色体的由完整的核膜包绕的染色质类物质。在正常细胞中微核的自发发生率极低,低于 4‰,而当细胞受到损伤因素刺激,微核发生率与剂量表现为较明显的剂量效应关系,是较易被观察到并显示特定损伤类型的染色体损伤指标。图 1 为典型的微核照片。

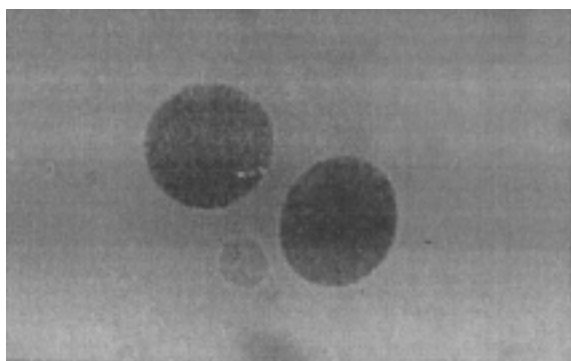


Fig.1 The typical photo of micronucleus

细胞经过 ^{60}Co γ 射线照射后产生损伤效应,图 2 为受照的 CHL 细胞 24h 后进行的微核测定。其发生率与剂量呈线性平方关系,符合方程: $Y=1.986+1.071X+0.180X^2$, 相关系数 $r=0.983$ ($p=0.0001$)。

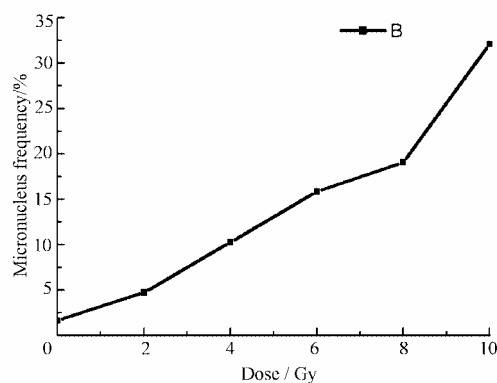


Fig.2 The micronucleus frequency of the CHL cells after ^{60}Co γ -ray irradiation

微核是 DNA 双链断裂产生的没有着丝粒的 DNA 片断,本身不具有自我复制能力,会随细胞增殖发生丢失。同时,发生微核的细胞数也会随细胞增殖性死亡而减少。本实验对 0、4、6Gy 三个剂量点的受照细胞经过不同培养时间(6h、2d、4d、6d)的微核发生率进行测定(见图 3)。由图 3 可见,接受照射的细胞微核发生率随细胞培养时间的延长而下降。CHL 细胞的倍增时间为 16—18h,2、4、6d 相当于细胞传至 3、6、9 代。微核发生率在辐射损伤发生后的一周内会迅速下降,并逐渐恢复于对照组水平。因为辐射所致的直接损伤会诱导细胞启动一系列的 DNA 损伤修复机制对其进行修复以保证细胞种系的延续。

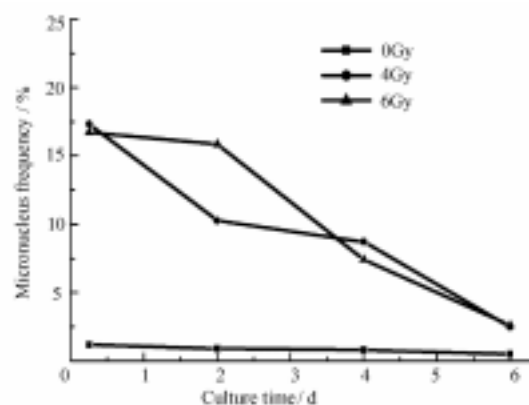


Fig.3 The micronucleus frequency of the CHL cells at the different culture time after ^{60}Co γ -ray irradiation

从图 4 中可以看出,当受照细胞继续培养传至 25 代时,微核发生率在各剂量组之间基本没有显著性差异,基本恢复于正常水平(小于 4‰)。但基因组是否也完全恢复正常,还是以不稳定状态存在于细胞中呢?由于基因组不稳定性是以自发突变的形式表现出来的,故所需观察时间较长,而且由于基因组不稳定性的终点生物效应多样性,在常规的实

验条件下难以检测到。根据损伤累积的致癌效应理论,为使损伤效应放大以便于观察,再次给予克隆化的传至33代的一次受照细胞2Gy的相同剂量的照射。

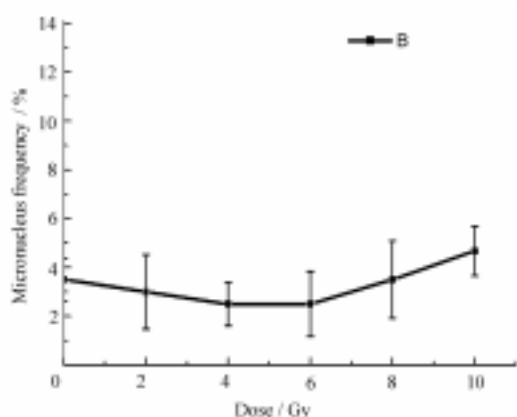


Fig.4 The micronucleus frequency of the CHL cells 25th population doubling after the initial irradiation.

从图5中可以看出,二次受照细胞的微核发生率并不因接受相同剂量照射而表现为无显著差异的微核发生率。各组的微核发生率因一次受照剂量的不同而不同:一次受照时给予的剂量越大,二次受照后微核发生率越高。说明一次照射使某些基因位点对辐射的敏感性增高,当再次受到照射后极易发生损伤,造成DNA链的断裂。Phillips等^[9]在研究辐射敏感性时发现用 γ 射线照射CHO(中国仓鼠卵

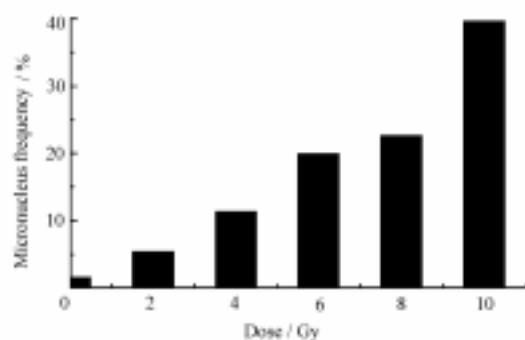


Fig. 5 The micronucleus frequency of CHL cells 33th population doubling after irradiation with different initial doses, induced by 2Gy ^{60}Co γ -ray irradiation.

巢细胞),经过一定时间修复后,当细胞再次接受照射则极易发生损伤。也就是说,处于基因组不稳定状态的受照细胞对损伤因素的敏感性提高,可以加速与加强其它损伤的累积。

3 结论

基因组不稳定性本身并不是以某种特定畸变形式存在于细胞中的,而是以基因突变形式隐藏于看似正常的受照细胞中,其发生、发展的机理及存在形式还不清楚,有待我们进行进一步研究与探讨。基因组不稳定性使细胞基因组处于辐射敏感态,当再次受照后极易发生损伤。但由于其终点生物效应多样,基因水平的变化各异,目前还没有对其进行分析的有效的存在。微核发生率与染色体损伤程度存在剂量相关性,且是经典的检测染色体非稳定性畸变的技术,并且现在被认为它也是基因组不稳定性的生物学效应。因此,微核检测技术对于我们进行生物效应表现为染色体损伤的辐射诱导基因组不稳定性的研究有着重要意义。

参考文献

- 1 Little J B. *Int J Radiat Biol*, 1998, **74**(6): 663-671
- 2 Orr-weaver T L, Weinberg R A. *Nature*, 1998, **392**(6673): 223-224
- 3 Simons J W I M. *Int J Radiat Biol*, 2000, **76**(11): 1533-1543
- 4 Jamali M, Trott K R. *Int J Radiat Biol*, 1996, **69**(3): 301-307
- 5 Abend M, Rhein A, Gilbertz K P, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 1995, **67**(3): 315-326
- 6 Smith L E, Nagar S, Kim G J, *et al.* *Health Phys*, 2003, **85**(1): 23-29
- 7 沈波. *中华放射医学与防护杂志*, 2003, **23**(6): 474-476
SHEN Bo. *Chin J Radiol Med Prot*, 2003, **23**(6): 474-476
- 8 Fenech M, Morley A. *Cytobios*, 1985, **43**(172-173): 233-246
- 9 Phillips J W, Morgan W F. *Mol Cell Biol*, 1994, **14**(9): 5794-5803

Genomic instability induced by γ -ray irradiation analyzed by cytokinesis-block MN assay in CHL cell line

SHEN Bo¹ SHEN Bing²

¹(Jilin University Radiobiology Unit of Public Health School, Changchun 130021)

²(Center of Scientific Information of China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006)

ABSTRACT To analyze the genomic instability induced by γ -rays, cytokinesis-block MN assay was employed to investigate the gene damage of cells and their progeny cells exposed to radiation. The micronucleus frequency were related to the irradiation dose and decreased as the culture time lengthened. There was a correlation between the micronucleus frequency and the initial dose after the second irradiation. The micronucleus frequency may be causally related to radiation-induced genomic instability which is expressed as chromosomal damage leading to micronuclei.

KEYWORDS Genomic instability, Cytokinesis-block MN assay

CLC R811.5