

低剂量电离辐射预处理对高剂量辐射诱导的肝癌 细胞 hepG2 细胞周期阻滞的影响

夏景光^{1,2} 李文建¹ 王菊芳¹ 郭传玲¹ 金晓东^{1,2} 高清祥³

¹(中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

²(中国科学院研究生院 北京 100049)

³(兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

摘要 以人肝癌细胞 hepG2 为研究对象,用流式细胞术测定并分析了低剂量 γ 射线 (5cGy) 预照射对高剂量照射 (3Gy) 诱导的细胞周期阻滞的影响。结果显示:(1) 低剂量照射可引起 hepG2 细胞在 G₂/M 期短暂累积(至照射后 4h);(2) 低剂量照射促进 hepG2 细胞的生长;(3) 高剂量照射后,hepG2 细胞的 G₂ 期发生阻滞,而 S 期只发生短暂延迟;(4) 与单纯高剂量照射相比,低剂量照射预处理后 4h 给予高剂量照射可进一步促进 hepG2 细胞在 G₂/M 期累积,但预处理后 8h 给予高剂量可促进细胞通过 G₂/M 期。实验结果表明,低剂量照射预处理对高剂量照射诱导的细胞周期阻滞的影响,取决于两次照射的时间间隔。

关键词 低剂量辐射,细胞周期阻滞,肝癌细胞

中图分类号 Q691

电离辐射等 DNA 损伤剂引发细胞产生多种反应,如细胞凋亡、细胞周期延迟、DNA 修复等,其中细胞周期延迟可为细胞提供更多的修复时间,避免将损伤带入子代细胞。电离辐射照射后,细胞可发生 G₁ 期、S 期和 G₂ 期阻滞。G₁ 期阻滞的发生需要细胞具有野生型 p53 基因,而 G₂ 期阻滞对 p53 的功能状态没有要求^[1]。目前,DNA 损伤所致的细胞周期阻滞的机理已比较清楚,即细胞首先感受 DNA 损伤,然后由 ATM 或 ATR 等蛋白激酶将损伤信号传至检查点激酶 Chk1 和 Chk2,检查点激酶磷酸化 CDC25 家族成员,使后者不能激活 Cyclins/CDKs,最终导致细胞周期阻滞^[2]。在 DNA 损伤信号转导途径中,同时启动 DNA 的修复过程,如在 G₁ 期阻滞过程中伴随着碱基切除修复、核苷酸切除修复和非同源末端连接,在 S 期和 G₂ 期阻滞过程中伴随有借助同源染色体的同源重组修复^[3]。因此,作为 DNA 损伤反应,细胞周期阻滞和 DNA 修复具有相关性。实验证实,DNA 错配修复体系能调节 G₂/M 检查点,缺失 hMLH 等错配修复基因减弱电离辐射导致的 G₂/M 期阻滞^[4]。

现在普遍认为低剂量电离辐射能诱导辐射适应

性反应,即低剂量 (<10cGy) 预照射可减轻随后的高剂量照射造成的细胞遗传损伤,如降低染色体畸变程度和基因突变频率等^[5]。低剂量诱导照射适应性反应的机理涉及到一些蛋白激酶如蛋白激酶 PKC 和有丝分裂原激活的蛋白激酶 MAPK 等的表达,这些蛋白激酶调节许多相互关联的反应如细胞生长、凋亡和 DNA 修复等^[6,7],所以低剂量预照射可以改变高剂量照射后细胞的修复能力和细胞周期进程。文献[8]报道,0.075Gy X 射线照射能诱导胸腺淋巴细胞及 EL-4 淋巴瘤细胞 G₁ 期阻滞的适应性反应,即低剂量预照射可减轻高剂量所导致的细胞周期阻滞。本实验以指数生长期的肿瘤细胞为研究对象,研究了低剂量 γ 射线照射对人肝癌细胞 hepG2 细胞周期的影响以及低剂量 γ 射线预照射对高剂量电离辐射诱导的细胞周期阻滞的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和 γ 射线照射

人肝癌细胞系 hepG2 购自中国典型培养物保藏中心(武汉)。细胞培养基为 RPMI1640 (含 10%

国家自然科学基金(10335050)重点资助;国家重大基础研究前期研究专项(2003CCB00200)资助

第一作者:夏景光,男,1972年12月出生,2000年在兰州大学生命科学学院获植物学硕士学位,现为中国科学院近代物理研究所博士研究生,从事辐射生物学研究

收稿日期:初稿 2004-07-21,修回 2004-09-02

新生牛血清, 100U/mL 青霉素和 100U/mL 硫酸链霉素), 接种于培养瓶中的细胞置于 37°C、含 5% CO₂ 的饱和湿度条件下培养。用指数生长期的细胞在兰州医学院第一附属医院进行 ⁶⁰Co γ 射线照射, 剂量率为 0.30Gy/min, 各照射组为: 低剂量 (5cGy)、剂量 (3Gy), 5cGy 照射 4h 后 3Gy 照射以及 5cGy 照射 8h 后 3Gy 照射, 同时设对照组 (未照射)。照射后一定时间取样, 每组的每一时间点取两个样品, 每个实验至少重复一次。

1.2 细胞周期的测定

照射后一定时间收集细胞, 取含 (1-2) × 10⁶ 细胞的悬液, 离心, PBS 洗一次, 75% 冰冷乙醇固定, -20°C 保存待用。已固定的细胞, 离心, 吸弃乙醇, 用 500μL PI 溶液 (50μg/mL) 重悬沉淀, 加 RNAase (1mg/mL) 2μL, 37°C 暗处 30min 或 4°C 暗处过夜, 用美国贝克曼库尔特公司的流式细胞仪 (Coulter® Epics XL™) 测定 DNA 含量, 数据分析软件为 Muticycle。实验结果用 *t* 检验进行统计学分析。

2 实验结果

2.1 低剂量照射对肿瘤细胞周期及生长的影响

图 1 为 5cGy γ 射线照射后, hepG2 细胞的 G₂/M 期百分比随时间的变化。照射后 4h, G₂/M 期细胞有比较明显的累积, 与对照组相比, 增加 25.7%。照射后 10h、16h 和 22h, G₂/M 期细胞分别为对照组的 103.4%、99.1% 和 101.0%, 表明低剂量照射能导致肿瘤细胞 hepG2 在 G₂/M 期发生短暂延迟。这一结果说明, 低至 5cGy 的照射对细胞造成的损伤即可改变细胞周期进程, 也说明 G₂/M 期检查点对辐射损伤非常敏感。为进一步研究低剂量照射对肿瘤细胞生长的影响, 对 hepG2 细胞作了 5cGy 照射, 24h 和 48h 后测定细胞数目, 发现 5cGy γ 射线照射能明显促进细胞的增殖 (见图 2)。上述结果说明, 低剂量照射后, hepG2 细胞经过一个短暂的延迟阶段 (约 4h) 后增殖速度加快。

2.2 高剂量电离辐射对肿瘤细胞 hepG2 细胞周期的影响

由图 3 可见, 3Gy 照射后 hepG2 细胞在 G₂/M 期明显累积, 照后 12h 达最大值, 为对照组的 291.2%。照后 6h, S 期细胞明显增加, 为对照的 136.6%, 尔后下降。这表明, γ 射线照射后 hepG2 细胞的 S 期发生短暂延迟, 而 G₂/M 期发生较长时

间的延迟, 说明电离辐射所导致的 DNA 损伤可能主要在 G₂ 期修复。

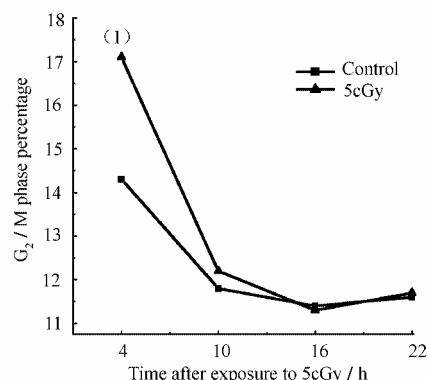


Fig.1 Percentage changes of the hepG2 cells in G₂/M phase after 5cGy exposure to ⁶⁰Co γ-rays, in comparison with the control (⁽¹⁾*p*<0.05)

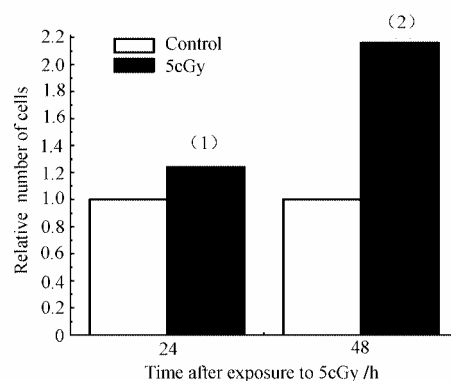


Fig.2 Effect of 5cGy γ-ray irradiation on growth of the hepG2 cells. About 1×10⁵ cells were plated in culture flasks, incubated for 24h at 37°C, and irradiated by the γ-rays to 5cGy. The cells were counted 24h or 48h after the irradiation. The cell number of the control was designated to be 1.0, and relative number of the cells after irradiation was calculated and compared with the control (⁽¹⁾*p*<0.05, ⁽²⁾*p*<0.01)

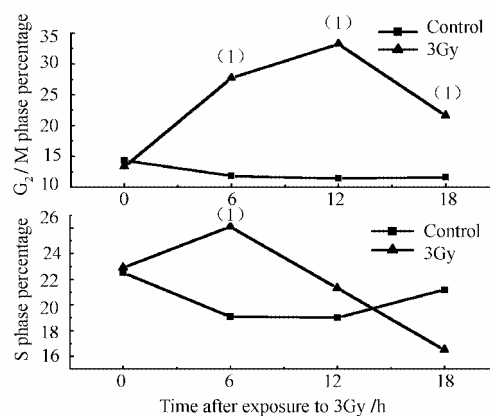


Fig.3 Effects of 3Gy irradiation on cell cycle of the hepG2 cells, in comparison with the control (⁽¹⁾*p*<0.01)

2.3 低剂量照射预处理对高剂量诱导的细胞周期阻滞的影响

指数生长期的 hepG2 细胞进行 5cGy γ 射线照射后, 37°C 放置 4h, 然后作 3Gy 照射, 12h 后测定细胞周期。结果显示, 低剂量预照射后 G_2/M 期细胞的百分比为单纯高剂量照射后的 124.2% (见图 4A)。上文的实验表明, 低剂量照射对细胞造成的损伤需数小时的修复时间, 因此推测在损伤完全修复之前和修复后给予高剂量照射, 细胞周期的变化可能不同。基于这样的考虑, 我们将低剂量和高剂量照射的时间间隔增加到 8h, 测定结果表明, hepG2 细胞的周期变化与间隔 4h 的结果刚好相反: 与单纯高剂量照射相比, 预照射可减少 G_2/M 期百分比 (见图 4B)。上述结果说明, 这两次照射的时间间隔不同, 预照射对细胞周期的影响也不同。

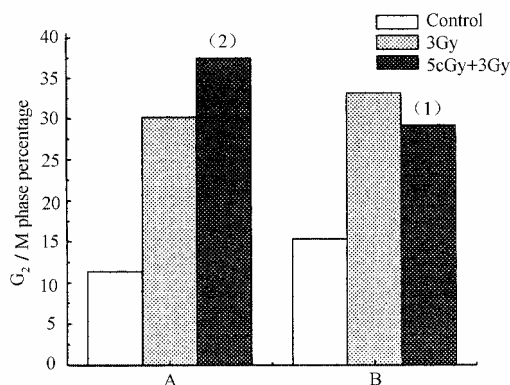


Fig.4 Effects of pretreatment with 5cGy γ -irradiation on cell cycle arrest caused by high dose γ -irradiation (3Gy) A, 4h interval between the two irradiations B, 8h interval between the two irradiations. The cell cycle was tested 12h after the 3Gy irradiation, and compared with the cells without the pretreatments (⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$)

3 讨论

本实验结果表明, 5cGy γ 射线能引起 hepG2 的 G_2 期短暂延迟 (照射后 4h), 说明低至 5cGy 的照射对细胞造成的损伤足以改变细胞周期进程, 唯其引起较轻损伤, 容易修复, 故只能短暂延缓周期进程。经过短暂的延迟之后, hepG2 细胞的增殖速度加快, 24h 和 48h 后的细胞数目明显高于对照组。细胞生长加快的原因, 可能与低剂量照射激活了 PKC 和 MAPK 等与生长和修复相关的激酶有关^[5,6]。已有实验表明^[9], 很低剂量 (2—5cGy) 的 X 射线激活 MAPK 信号传导途径, 促进细胞的增殖。

实验结果还表明, 低剂量预照射对细胞周期进

程的改变与低剂量和高剂量照射间的间隔时间长短有关, 间隔 4h 对细胞周期的阻滞具有协同效应, 间隔 8h 促进细胞通过 G_2/M 期。产生这一现象的原因可能是, 低剂量照射后 4h, hepG2 细胞的损伤尚未完全修复, 低剂量辐射诱导体系可能还未充分表达, 如果这时给予高剂量辐射可促进细胞周期的进一步阻滞。而照后 8h, 损伤可能已被完全修复, 低剂量诱导体系已充分表达, 因而使细胞更容易从 G_2 期阻滞中恢复。低剂量电离辐射可诱导细胞产生 PKC 和 MAPK 等蛋白激酶, 以及其他与生长和修复有关的其他因子, 我们推测, 正是这些低剂量诱导物质, 增强了细胞修复损伤和从细胞周期阻滞中恢复的能力。

本文的实验结果对肿瘤的放射治疗有一定的启示, 那就是对肿瘤进行分次照射, 在肿瘤细胞从上一次辐射造成的细胞周期阻滞中恢复之前, 实施下一次照射, 从而起到破坏细胞周期杀死肿瘤细胞的目的。当然, 分次照射的剂量大小和时间间隔应根据肿瘤细胞的体外实验和临床实践来确定, 这一方面还有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 Hwang A, Muschel R J. Radiat Res, 1998, **150** (5Suppl): S52-59
- 2 Zhou B B, Elledge S J. Nature, 2000, **408**(6811): 433-439
- 3 Bodnarchuk I A. Radiats Biol Radioecol, 2003, **43**(1): 19-28
- 4 Yan T, Schupp J E, Hwang H S, *et al.* Cancer Research, 2001, **61**(22): 8290-8297
- 5 Stecca C, Gerber G B. Biochemical Pharmacology, 1998, **5**(7): 941-951
- 6 Shimizu T, Kato T, Tachibana A, *et al.* Experimental Cell Research, 1999, **251**(2): 424-432
- 7 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 2003, **23**(6): 393-398
LIU Shuzheng. Chin J Radiol Med Prot, 2003, **23**(6): 393-398
- 8 鞠桂芝, 苏旭, 范冰, 等. 中华放射医学与防护杂志, 1998, **18**(3): 148-150
JU Guizhi, SU Xu, FAN Bing, *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 1998, **18**(3): 148-150
- 9 Suzuki K, Kodama S, Watanabi M. Cancer Research, 2001, **61**(14): 5396-5401

Effects of low priming dose irradiation on cell cycle arrest of HepG2 cells caused by high dose irradiation

XIA Jingguang^{1,2} LI Wenjian¹ WANG Jufang¹ GUO Chuanling¹
JIN Xiaodong^{1,2} GAO Qingxiang³

¹ (Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

² (Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

³ (School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

ABSTRACT Human hepatoma cells hepG2 were irradiated twice by ⁶⁰Co γ -rays with a priming dose of 5cGy and a higher dose of 3Gy performed 4h or 8h after the low dose irradiation. Effects of the priming dose irradiation on cell cycle arrest caused by high dose were examined with flow cytometry. Cells in G₂/M phase accumulated temporarily after the 5cGy irradiation, and proliferation of tumor cells was promoted significantly by the low dose irradiation. After the 3Gy irradiation, G₂ phase arrest occurred, and S phase delayed temporally. In comparison with 3kGy irradiation only, the priming dose delivered 4h prior to the high dose irradiation facilitated accumulation of hepG2 cells in G₂/M phase, whereas the priming dose delivered 8h prior to the high dose irradiation helped the cells to overcome G₂ arrest. It was concluded that effects of the priming dose treatment on cell cycle arrest caused by high dose irradiation were dependent on time interval between the two irradiations.

KEYWORDS Low dose radiation, Cell cycle arrest, Hepatoma cells

CLC Q691