

冈田酸诱导早熟染色体凝聚的辐射剂量效应关系研究

朱巍 刘芬菊 曹建平 朱财英 樊赛军

(苏州大学放射医学与公共卫生学院 苏州 215123)

摘要 为研究冈田酸 (Okadaic acid) 诱导的染色体凝聚与辐射剂量之间的剂量效应关系, 采用不同剂量 (0、0.5、1.0、2.0、3.0 和 5.0Gy) 的 X 射线照射离体人外周血, 培养 48h, 终止培养前 2 h 加入 Okadaic acid 诱导早熟染色体的凝聚, 观察分析其诱导的早熟凝聚染色体 (Premature condensed chromosome, PCC) 的断片率, 并与常规染色体畸变分析法进行比较。结果表明, 冈田酸诱导的早熟染色体凝聚方法与常规染色体法相比可获得更高的分裂指数, 冈田酸法染色体凝聚断片率与外照射剂量之间存在良好的线性关系。

关键词 冈田酸, 早熟染色体凝聚, 电离辐射, 生物剂量

中图分类号 Q691.8, Q243, Q274

人外周血淋巴细胞染色体畸变作为生物剂量估计指标已有 40 多年的历史, 大量的研究证明, 外周血淋巴细胞染色体畸变分析是估算急性均匀性事故照射剂量可靠的生物学方法, 但作为一种生物剂量计, 也具有一定的局限性, 如有丝分裂指数较低, 有时难以达到分析要求。早熟凝聚染色体 (Premature condensed chromosome, PCC) 技术出现于 1983 年^[1], 采用细胞融合技术使间期细胞 (多数为 G0 期) 提前进入分裂期, 通过计数间期染色体断片数, 来估算受照剂量。1996 年 Gotoh 等^[2]用 Okadaic acid 诱导染色体发生凝聚, Okadaic acid 是一种蛋白磷酸酯合成酶抑制剂, 它可诱导外周血淋巴细胞在 G1、G2 及 M 期发生染色体凝聚。

本研究目的是选择不同 X 射线照射来研究 Okadaic acid 诱导染色体凝聚的方法估算辐射生物剂量的可行性, 并拟合剂量效应曲线, 同时与常规染色体检测法进行比较, 寻求其剂量效应的相关性。

1 材料与方法

1.1 试剂

冈田酸 (Okadaic acid) 系 Sigma 公司产品, RPMI1640 培养基由 Gibco 公司生产, 植物血凝素 (Phytohemagglutinin, PHA) 为上海伊华医学科技公司产品, 新生牛血清为杭州四季青产品。

1.2 标本采集及照射

实验用肝素抗凝人外周静脉血来自 4 例的健康成年人, 男女各 2 人, 年龄为 20~30 岁, 要求: 身体健康, 无慢性病史, 无烟酒嗜好, 半年内无受照及接触细胞毒药物史。每人各采血 20mL, 分装于 6 个小瓶, 在 37℃±0.5℃ 条件下分别接受 X 射线照射 0、0.5、1.0、2.0、3.0 和 5.0Gy, 剂量率为 105cGy/min, 照射距离为 70cm, 照射后的血样在 37℃ 恒温培养箱内放置 2 h 后接种。

1.3 培养

培养体系采用含 20% 新生牛血清及 0.025% PHA 的 RPMI1640 液 4.5mL + 抗凝血 0.5mL。每个剂量点各接种 4 瓶, 37℃ 恒温培养。

第 1、2 瓶于培养 44h 后, 加入秋水仙素, 使其终浓度达 400ng/mL 培养基, 继续培养 2h, 加入 Okadaic acid, 使其终浓度达 500nmol/mL 培养基, 再继续培养 2h; 第 3、第 4 瓶于培养 44h 后, 加入秋水仙素, 使其终末浓度达 400ng/mL 培养基, 再继续培养 4h。

1.4 收获制片

收获细胞时, 0.075mol/L KCl 低渗 20min, 预固定后立即离心, 3:1 甲醇: 冰乙酸固定两次, 冰玻片滴片。10% Giemsa (pH7.4) 染色。

国家自然科学基金 (30672435)、(苏州大学放射医学与防护重点实验室) 资助

第一作者: 朱巍, 男, 1970 年 9 月出生, 1993 年毕业于苏州医学院, 现为苏州大学放射医学与公共卫生学院讲师, 硕士, 研究方向: 肿瘤细胞放射生物学, 辐射遗传学

通讯联系人: 樊赛军

收稿日期: 初稿 2008-03-24, 修回 2008-04-11

1.5 阅片

计算 0Gy 组各样本的分裂指数，第 1、第 2 瓶分别计数 G1，S，G2/M 期的分裂相，第 3、第 4 瓶计数 M 期的分裂相，分裂指数通过计算各期分裂相数目与观察的细胞数（包括进入分裂期和未进入分裂期的细胞）的比值得出；计数各剂量组的染色体畸变数，第 1、第 2 瓶计数 G1，G2/M 期的断片数，典型的 G1 期分裂相为 46 条染色单体，数目超过 46 的部分计为断片数，典型的 G2/M 期分裂相为 46 条染色体，因均在 S 期后，DNA 已完成复制，故每条染色体有两条染色单体组成，G2 期与 M 期

分裂相很难明确区分，判断断片的标准与常规染色体畸变分析法相同；第 3、第 4 瓶计数 M 期的双着丝粒体+着丝粒环数。

2 结果

从表 1 中可看出：Okadaic acid 法的有丝分裂指数明显高于常规染色体培养法，经过 Okadaic acid 处理后，42.1%~54.5% 的外周血淋巴细胞发生明显的染色体凝聚。虽处于 S 期的细胞不能用于生物剂量估算，但能用于分析的细胞分裂相数目（31.4%~42.2%）仍远高于常规法的 12%~18.3%。

Table 1 The mitotic indexes of the PCC induced by okadaic acid or conventional chromosome / 0Gy

Sample	Sex	Cell numbers	PCC induced by Okadaic acid			Conventional chromosome
			G1/ %	S / %	G2 /M / %	M / %
A	M	1000	12.2	10.7	19.2	16.1
B	M	1000	17.4	12.3	24.8	18.3
C	F	1000	15.9	8.6	22.7	15.7
D	F	1000	18.6	10.6	16.3	12.0

不同剂量 X 线诱发 Okadaic acid 法 PCC 断片及常规法染色体畸变的情况见表 2。由表 2 从中可见，随着受照剂量的增加，Okadaic acid 法 PCC 断片率也逐渐增加，断片率与受照剂量之间的关系可用直

线回归方程表示： $y=2.6186+0.3817X$ ，相关系数 $r=0.9816$ ，其中 X 为 X 射线外照射剂量（cGy），y 为 Okadaic acid 法 PCC 断片率（%），（见图 1）。

Table 2 The chromosome aberrations of the PCC induced by Okadaic acid or conventional chromosome irradiated by X-rays at different doses

Dose / cGy	PCC induced by Okadaic acid			Conventional chromosome		
	Cell numbers	Fragment	Fragment /100 cells±s	Cells number	dic+r	dic+r /100 cells±s
0	500	34	6.8±0.23	2000	1	0.05±0.06
50	500	113	22.6± 3.17	2000	40	2.0±0.083
100	500	247	49.4± 3.64	2000	139	6.95±0.26
200	500	334	66.8±9.30	2000	394	19.70±1.83
300	406	429	105.7±12.72	1625	602	37.05±3.64
500	326	663	203.4±11.35	1062	1049	98.78±5.28

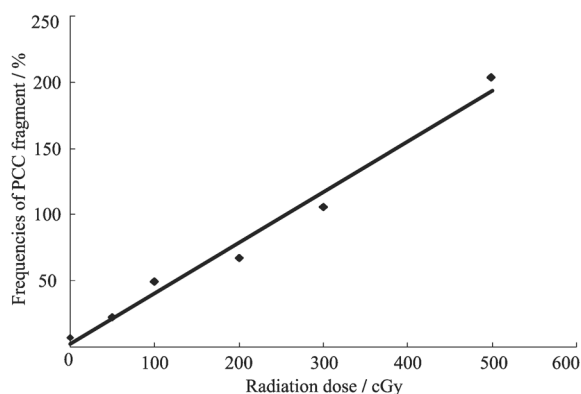


Fig.1 Relationships between the frequencies of PCC fragment and radiation doses

随着受照剂量的增加,在常规染色体分析法中,“双着丝粒体+着丝粒环”率也逐渐升高,“双+环”率与受照剂量之间的关系可用二次多项式表示: $y = 0.3953 + 0.0224X + 0.0003X^2$, 其中 X 为 X 射线外照射剂量 (cGy), y 为“双+环”率(%), 相关系数 $r = 0.9995$, 高度相关 (见图 2)。

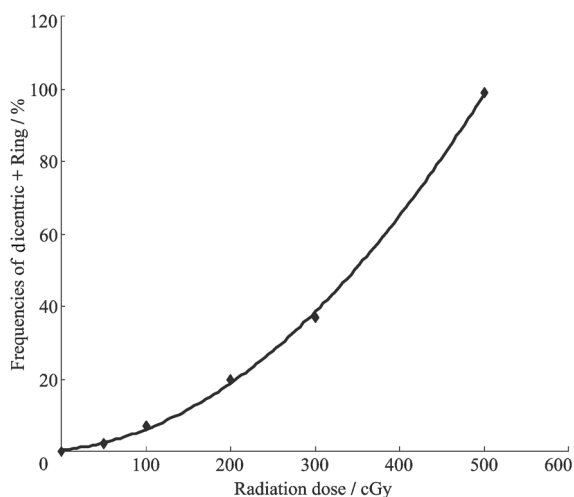


Fig.2 Relationships between the frequencies of dicentric + Ring and radiation doses

3 讨论

辐射生物剂量计是辐射剂量监测与防护的重要手段。人外周血淋巴细胞染色体畸变(双着丝粒体和着丝粒环)是国际公认的辐射生物剂量计^[3], 但还存在一些不足, 首先, 其有丝分裂指数较低, 有时难以达到分析要求; 其次, 因所分析的是进入分裂中期的细胞, 其估算的结果与实际受照剂量会有一定偏差。

1983 年, Pantelias 等^[1] PCC 分析应用于辐射生物剂量计领域。采用 PCC 技术可直接观察细胞间期(主要为 G0 期)染色体损伤, 它与常规染色体方法相比有快速、灵敏、准确、简便等优点。其不

足之处: 细胞融合技术要求较高, 不适合基层推广; PCC 指数一般比有丝分裂指数更低。

Gotoh 等^[2]用 Okadaic acid 诱导染色体发生凝聚, Okadaic acid 是一种蛋白磷酸酯合成酶抑制剂, 它可诱导外周血淋巴细胞在细胞周期的任一阶段(G0 期除外)发生染色体凝聚。本实验应用 Okadaic acid 诱导染色体凝聚的方法检测不同剂量 X 射线诱发的染色体畸变率拟合剂量效应曲线; 与常规染色体检测法进行比较研究。实验表明, Okadaic acid 法的有丝分裂指数远高于常规染色体方法, 这就克服了常规染色体畸变分析中有丝分裂指数较低的不足, 对部分个体如年老者、免疫力低下者及受到大剂量辐照者, 此法尤为适用。

常规染色体分析法只能分析进入分裂中期的染色体, 染色体畸变在进入分裂中期之前就有可能丢失或被修复; 而 Okadaic acid 法以观察到的 G1 期, G2 期及 M 期断片作为生物指标, 降低了染色体畸变修复或丢失的机会; 因此它对电离辐射的灵敏度要高于常规染色体分析法。在剂量为 50cGy 时, 断片数比零剂量对照组已有明显增加, 并随着剂量的增加, 断片数相应增加, 两者之间呈良好的线性关系, 拟合方程为: $y = 2.6186 + 0.3817X$, 相关系数 $r = 0.9816$ 。表明 Okadaic acid 诱导染色体凝聚的方法可作为辐射生物剂量估算, 且在小剂量范围内比常规染色体分析更为灵敏。

国外研究表明^[4-7], Okadaic acid 诱导染色体凝聚方法与染色体常规秋水仙素阻滞法(只观察 M 期分裂相)相比, 前者可观察到更高的由辐射诱发的染色体断片。虽然 Okadaic acid 不能诱导 G0 期淋巴细胞发生染色体凝聚; 但由于该法具有非常高的染色体凝聚指数; 可同时观察细胞周期不同阶段的染色体分裂相; 方法简便可靠, 与荧光原位杂交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术结合, 在辐射生物剂量, 肿瘤辐射敏感性等研究领域都有广泛用途。

参考文献

- 1 Pantelias G E, Maillie H D. Somatic Cell Genet, 1983, 9(5): 533-47
- 2 Gotoh E, Asakawa Y. Int J Radiat Biol, 1996, 70(5): 517-520
- 3 International Atomic Energy Agency (IAEA). Biological dosimetry IAEA. Technical Reports. Vienna: IAEA, 1986, 260: 2-7
- 4 Kanda R, Hayata I, Lloyd D C. Int J Radiat Biol, 1999, 75(4): 441-6

- 5 Kanda R, Eguchi-Kasai K, Hayata I. Somat Cell Mol Genet, 1999, **25**(1): 1-8
- 6 Prasanna P G, Escalada N D, Blakely W F. Mutat Res, 2000, 23; 466(2): 131-41
- 7 Prasanna P G, Blakely W F. Methods Mol Biol, 2005, **291**: 49-57

Study on the dose-response relation of premature chromosome condensation induced by Okadaic acid

ZHU Wei LIU Fenju CAO Jianping ZHU Caiying FAN Saijun

(School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT In order to study the effect-dosage relationship between the PCC induced by Okadaic acid and the IR dosages, human peripheral blood in vitro was irradiated by X-rays at different doses (0、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0Gy) cultivated for 48 hours and added with Okadaic acid two hours before the end of culture. Chromosome aberrations frequencies was analyzed and compared with that induced by the conventional chromosome assay and their dose-response curves were fitted. The results show that the mitotic index of the PCC induced by Okadaic acid is higher than that of the conventional chromosome assay. And the fragment rate of chromosome condensation induced by Okadaic acid has a favorable linearity relationship with external radiation doses.

KEYWORDS Okadaic acid, Premature condensed chromosome (PCC), Ionization radiation, Biological dose

CLC Q691.8, Q243, Q274