

3T3 细胞受照后微核及双核细胞的形成与细胞存活率的氧效应

张 鹏 郑秀龙

(第二军医大学, 上海)

摘要 本文观察和比较了有氧及乏氧条件下, 经 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射后 3T3 细胞微核及双核细胞的形成及其与细胞存活率之间的关系。结果表明, 在一定剂量范围内, 有氧及乏氧照射后, 3T3 细胞的微核率、微核细胞百分率及双核细胞百分率均与照射剂量呈线性关系。微核率、微核细胞百分率、双核细胞百分率及细胞存活率的氧增比分别为: 2.02、1.96、1.87、及1.83。微核细胞百分率、双核细胞百分率及微核细胞与双核细胞之和的百分率均与细胞存活率之间有较好的相关性。本文还就 3T3 细胞辐射反应中的氧效应机制及微核及双核细胞形成的意义作了讨论。

关键词 3T3 细胞, 微核, 双核细胞, 氧效应

在先前的工作中, 发现 3T3 细胞 DNA 链断裂的氧增比(OER)值为 1.0—1.37^[1], 乏氧条件下照射所致的 DNA 链断裂较易重接。这与其它多数细胞株辐射反应中的氧效应不同, 而与谷胱甘肽(GSH)合成酶缺陷型细胞的氧效应表现相符^[2]。为此, 本文又观察和比较了有氧及乏氧条件下 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射后 3T3 细胞微核与双核细胞的形成及细胞存活率的变化, 以探讨 DNA 损伤及其修复与染色体畸变和细胞辐射敏感性之间的关系, 微核及双核细胞形成的意义, 以及 3T3 细胞辐射反应中的氧效应机制。

材料与 方法

3T3 细胞在含 20%新生小牛血清的 DMEM(GIBCO) 培养液中, 于 37℃, 5%CO₂ 条件下贴壁生长。0.25%胰酶消化传代。

3T3 细胞传代后换为含 25 mmol/L Hepes (MERK) 的培养液, 按 2 ml/瓶分装于 25 ml 的培养瓶内, 培养 12 h 后用橡皮帽封口, 经插入两枚 16# 注射针头, 在室温下通纯度大于 99.99% 的氮气 45—50 min, 使 3T3 细胞乏氧。在室温下照射, 照射剂量点分为有氧条件 0、3、6、9 和 12 Gy, 乏氧 0、6、12、18、24 Gy, 每点设 3 个平行样本。剂量率为 5.763 Gy/min。照射后继续培养一定时间后, 经甲醇固定, Giemsa 染色, 在倒置生物显微镜高倍镜(40×10)下, 按 Countryman 的标准^[3]双盲法计数微核及双核细胞。

对数生长期的 3T3 细胞经胰酶消化后, 经含 25 mmol/L Hepes 的培养液稀释成不同浓度的细胞悬液, 在室温下按前述条件通氮及照射。照射后将细胞接种于直径为 60 mm 的玻璃培养皿内。培养 7 d 后, 常规固定、染色, 应用日制克隆计数仪(Colony Data Processor CDP 1000)计数克隆。以相对克隆形成能力作为细胞存活率。

结 果

1: γ 线照射后 3T3 细胞微核及双核细胞形成的动态变化

3T3 细胞经 γ 线照射后, 分别于培养 24、48、72 及 96 h 后固定染色, 计数微核及双核细胞。

胞。结果如表1所示。

Tab 1. Micronucleus frequencies and percentages of binucleate cells in 3T3 cell populations cultured for different times after 7.5 Gy γ -irradiation in air

Endpoints	Hours after irradiation (h)				
	0	24	48	72	96
Micronuclei/100 Cells	0 $\pm$ 0.0	6.5 $\pm$ 2.1	26.6 $\pm$ 3.2	17.9 $\pm$ 0.9	20.2 $\pm$ 3.6
% Binucleate cells	0.8 $\pm$ 0.18	2.3 $\pm$ 0.57	3.7 $\pm$ 1.03	5.0 $\pm$ 0.94	6.3 $\pm$ 1.24
Mean $\pm$ SD					

表1表明3T3细胞经7.5 Gy γ 线照后,微核率升高,以照后第48 h最高,其后又有所下降。双核细胞在照后96 h内随培养时间延长而增多。经统计学处理发现,在照后培养96 h内,双核细胞率与培养时间之间有较好的线性关系。 $BN = 0.58 T + 0.76$,相关系数 $r = 0.9997$ 。 $p < 0.01$,相关系数显著(BN及T分别代表双核细胞的百分率及照后培养时间)。

2. γ 线诱发3T3细胞微核及双核细胞形成的剂量效应关系及其氧效应

由于3T3细胞经7.5 Gy照射后培养第48 h时其微核率相对最高,而照后96 h内各时间点的双核细胞百分率成一定的比例关系(双核细胞率与培养时间之间有线性关系),因此在照后培养第48 h时观察有氧及乏氧条件下不同剂量 γ 线照后3T3细胞微核率、微核细胞百分率及双核细胞百分率。在一定程度上可代表 γ 线诱发3T3细胞微核及双核细胞形成的剂量效应关系及其氧效应。结果见表2。

Tab 2. Micronucleus frequencies, percentages of micronucleus cells and percentages of binucleate cells in 3T3 cell populations cultured for 48h after different doses of γ -irradiation in air and in nitrogen

Endpoints	Irradiation in air (Gy)				Irradiation in nitrogen (Gy)			
	3	6	9	12	6	12	18	24
Micronuclei/100cells	3.4 $\pm$ 2.1	18.7 $\pm$ 1.6	32.8 $\pm$ 4.4	63.1 $\pm$ 3.3	8.5 $\pm$ 2.2	26.0 $\pm$ 2.8	38.2 $\pm$ 4.2	67.4 $\pm$ 3.0
% Micronucleus cells	3.4 $\pm$ 2.1	15.7 $\pm$ 1.2	24.6 $\pm$ 2.4	39.5 $\pm$ 3.1	7.5 $\pm$ 1.8	20.9 $\pm$ 2.1	26.6 $\pm$ 4.9	42.3 $\pm$ 2.0
% Binucleate cells	2.4 $\pm$ 0.88	3.2 $\pm$ 1.01	5.1 $\pm$ 0.64	6.0 $\pm$ 1.20	2.5 $\pm$ 0.80	3.4 $\pm$ 0.65	4.8 $\pm$ 0.75	6.8 $\pm$ 0.97

Tab 3. Equation of dose-response relationship for micronucleus and binucleate cell formation in γ -irradiated 3T3 cell populations

Endpoints($\hat{Y}$)	Equation of dose-response relationship		OER***
	Aerobic irradiation	Anaerobic irradiation	
Micronuclei/100 cells	$\hat{Y} = 6.43 D - 18.75^{**}$	$\hat{Y} = 3.18 D - 12.6^{*}$	2.02
% Micronucleus cells	$\hat{Y} = 3.91 D - 8.40^{**}$	$\hat{Y} = 2.00 D - 4.80^{*}$	1.96
% Binucleate cells	$\hat{Y} = 0.45 D - 0.76^{**}$	$\hat{Y} = 0.24 D - 0.80^{**}$	1.87

D: 照射剂量(Gy)

* 相关显著($p < 0.05$)

** 相关非常显著($p < 0.01$)

*** OER 由有氧照射与乏氧照射后剂量效应关系曲线斜率之比所得。

表 2 结果表明有氧及乏氧条件下, 照射剂量与微核率、微核细胞百分率及双核细胞百分率之间均有较好的线性关系。其照射剂量与生物效应之间关系的回归方程见表 3。

在相同剂量条件下比较, 有氧照射所致微核及双核细胞的产额比乏氧照射的高。说明氧可增强 γ 线对 3T3 细胞微核及双核细胞形成的诱发作用。有氧照后与乏氧照后所得线性关系的斜率之比即为 OER 值。3T3 细胞微核率、微核细胞率及双核细胞率的 OER 值分别为 2.02、1.96 及 1.87。

本文还观察到在微核细胞中, 含两个及两个以上微核细胞的比例随照射剂量的增大而增高, 表现为微核细胞百分率的剂量效应关系的斜率比微核率的低。

3. γ 线照后 3T3 细胞存活率及氧效应

3T3 细胞在有氧及乏氧条件下经不同剂量的 γ 线照射后, 测定其相对克隆形成能力作为细胞存活率。所得结果如图 1。

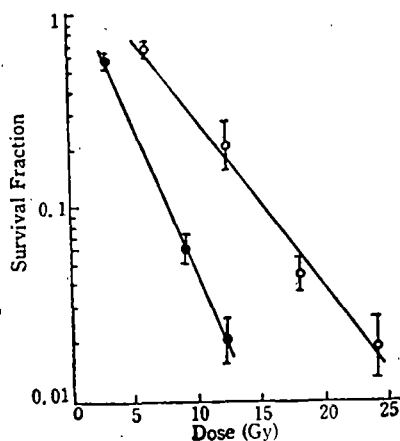


Fig 1. Survival curves of 3T3 cells irradiated in air (●) and in nitrogen (○). Each point represents the mean $\pm$ SD of 3 separate experiments in triplicate

图 1 结果表明, 3T3 细胞的存活曲线符合多靶单击模型。有氧照射 3T3 细胞所得 D_0 值为 2.67 Gy, n 值为 1.8。乏氧照射 3T3 细胞

所得 D_0 值为 4.88 Gy, n 值为 2.2。有氧条件下 3T3 细胞 D_0 值低, 辐射敏感性高, 表明氧具有辐射增敏作用。由于有氧及乏氧条件下照射所得 3T3 细胞的 n 值比较接近, 故其存活率的 OER 值可由两者 D_0 值之比求得为 1.83。

4. γ 线诱发 3T3 细胞微核及双核细胞形成与细胞存活率之间的关系

为比较有氧及乏氧条件下 γ 线照后微核及双核细胞形成与细胞存活率之间的关系, 将微核率、微核细胞百分率、双核细胞百分率及微核细胞与双核细胞之和的百分率与所对应的细胞存活率作图, 结果如图 2。

图 2 结果表明, 照射条件(有氧或乏氧)对微核及双核细胞的形成与细胞存活率的关系影响不大。3T3 细胞微核率与其存活率仅在存活曲线“指数区”的剂量范围内有较好的线性关系。微核细胞百分率、双核细胞百分率及微核细胞与双核细胞之和的百分率与存活率不但在存活曲线的“指

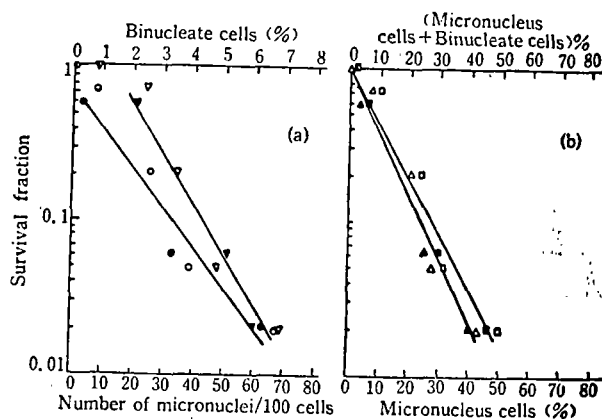


Fig 2. Correlation of (a) micronucleus frequency (●, ○) and percentage of binucleate cells (▲, ▽), and (b) percentage of micronucleus cells (▲, ▽) and percentage of micronucleus cells + binucleate cells (■, □) with cell survival in γ -irradiated 3T3 cell populations.
● ▽ ▲ ■ Irradiation in air
○ ▽ △ □ Irradiation in nitrogen

数区”剂量范围内有较好的线性关系, 还可外推至存活曲线的“肩区”剂量范围内, 均相关非常显著。这说明微核细胞及双核细胞的形成与存活率下降可能密切相关。

讨 论

一般认为微核及双核细胞的形成均源于染色体畸变。微核是染色体无着丝点片段在间期胞浆内所形成的卫星小核。双核细胞是由于分裂后期染色体桥的形成使两个子细胞融合所致。Sasaki等曾报道有氧照后, 双核细胞的形成与存活率下降有相关性^[4]。本结果进一步表明, 3T3细胞经有氧或乏氧照后, 双核细胞百分率与存活率在一定剂量范围内线性相关, 氧对其相关关系无显著影响。Midander曾利用多元回归得出一根据有氧或乏氧照后微核率的剂量效应关系求二倍体细胞 D_0 值的数学模型^[6], 由于3T3细胞的染色体数为72条^[5], 超出其所对应的二倍体细胞染色体数30条之多(3T3细胞源于小鼠胚胎纤维细胞, 二倍体染色体数为42条), 故3T3细胞不适用于应用Midander模型求 D_0 值。Midander认为多倍体细胞死亡所对应的微核产额高于二倍体细胞, 利用其模型会产生较大的误差。本文的结果也证明了这一点。根据其模型所得3T3细胞 D_0 值在有氧条件下为0.6 Gy, 乏氧条件下为2.8 Gy, 明显低于实验所得的 D_0 值。说明染色体倍体数不同, 微核形成与细胞辐射敏感性的相关性可能亦不同。

本文注意到在表3给出的回归方程的常数项(理论上可代表微核本底对照值)皆为负值, 这是由于在较低水平的剂量照射, 微核与剂量并不成直线关系, 而可能与其细胞存活曲线的“肩”相对应。这可能进一步说明照后微核的形成与细胞存活率下降有关。

综合实验结果, 先前得出3T3细胞受照后DNA链断裂的OER值为1.0—1.3, 乏氧照射所致DNA链断裂比有氧照后更易于修复, 这与GSH合成酶缺陷型细胞的辐射反应相似。3T3细胞的GSH合成酶系统是否存在缺陷, 目前尚无直接证据。本文得出3T3细胞存活率的OER值为1.83, 这与文献报道的GSH合成酶缺陷型细胞存活率的OER值一般在1.5—2.0的结果^[7,8]相符。而其它细胞经 γ 线照后DNA链断裂、微核率及细胞存活率的OER值一般在2.5—3.0范围内。本文结果进一步表明3T3细胞可能属GSH合成酶缺陷型细胞。

本文发现照后培养第48 h后所得3T3细胞微核与双核细胞形成及细胞存活率的OER值在1.8—2.0范围内, 与照后即刻所测的DNA链断裂的OER值1.0—1.3有较大差异。这可能主要与有氧和乏氧照后DNA损伤修复的差异有关。DNA链断裂的OER值主要与GSH含量成正相关^[8], GSH合成酶缺陷细胞的GSH水平非常低, 仅为无缺陷细胞的10%以下, 前者DNA链断裂的OER值接近1.0, 后者为3.0。3T3细胞DNA链断裂的OER值亦接近1.0, 加入GSH替代物二硫代苏糖醇后其OER值显著提高^[1]。这是推测3T3细胞可能为GSH合成缺陷的主要依据。尽管有氧与乏氧照后, DNA链断裂数目相同, 但两者性质可能不同。有氧照射过程中, DNA分子链断裂损伤部位可进一步与氧发生作用, 形成过氧化损伤。由于3T3细胞可能缺乏GSH, 这种过氧化损伤不易被GSH过氧化物酶(GSH-Px)所还原后重接。而乏氧照后, DNA的损伤无需通过GSH-Px还原而重接。因此, 乏氧照射所致的DNA断片重接快, 且重接率高。有氧照后所残留未修复的DNA断片较多。未被修复的DNA断裂可造成染色体畸变及细胞增殖死亡。微核及双核细胞的形成均来源于染色体畸变。所以, 有氧照后微核率或微核细胞百分率及双核细胞百分率高, 而细胞存活率低。因此, 微核及双核细胞形成及其细胞存活率的氧效应现象比较明显, 表现在它们的OER值大于照后即刻所测得的DNA链断裂的OER值。

3T3细胞受照后微核及双核细胞的形成与细胞存活率的下降之间具有较好的相关性, 而且它

们的 OER 值也比较接近。这进一步表明它们之间有密切关系。Midander 曾报道一株 GSH 合成酶缺陷型细胞微核率的 OER 值为 1.0, 与其存活率的 OER 值 1.5 有显著差异^[9]。而另外一些作者的结果表明微核率的 OER 值^[10]或相对生物学效应(RBE)值^[11]与细胞存活率所得出的相应的结果一致。这可能与不同的实验室所得结果不同有关。

综上所述, 3T3 细胞受照后所得出的微核细胞百分率、双核细胞百分率或微核细胞与双核细胞之和的百分率与细胞存活率下降之间有较好的相关性。本文认为微核及双核细胞的观察条件要求比较简便, 结果稳定, 重复性好, 可反映细胞辐射敏感性的变化, 所以可作为辐射防护剂或增敏剂筛选的初步判定指标。

参 考 文 献

- [1] 张鹏, 郑秀龙, 辐射研究与辐射工艺学报, 7(3), 54 (1989)。
- [2] M. Edgren, L. Revesz and A. Larsson, Int. J. Radiat. Biol., 40, 355 (1981)。
- [3] P. I. Countryman and J. A. Heddle, Mutat. Res., 41, 321 (1976)。
- [4] H. Sasaki, H. Yoshinaga and S. Kura, Radiat. Res., 108, 348 (1986)。
- [5] 鄂征主编, 组织培养技术, 人民卫生出版社, 1982, p. 214。
- [6] J. Midander and L. Revesz, Int. J. Radiat. Biol., 38, 237 (1980)。
- [7] D. Debieu, P. J. Deschavanne, J. Midander, A. Larsson and E. P. Malaise, Int. J. Radiat. Biol., 48, 525 (1985)。
- [8] M. Edgren, Proceedings of the 8th International Congress of Radiation Research, Edited by E. M. Fielden et al., Vol. 2, (1987) p. 683-688。
- [9] J. Midander, Int. J. Radiat Biol., 42, 195 (1982)。
- [10] W. A. Brock, M. H. Maor and L. J. Peters, Radiat. Res., 104, suppl. 290 (1985)。
- [11] T. Alali, P. Eckl and R. L. Jirtle, Radiat. Res., 119, 562 (1989)。

(稿件收到日期: 1990 年 4 月 2 日)

EFFECT OF OXYGEN ON FORMATION OF MICRONUCLEI AND BINUCLEATE CELLS AND CELL SURVIVAL IN γ -IRRADIATED 3T3 CELLS

Zhang Peng and Zheng Xiulong

(The Second Military Medical College, Shanghai)

ABSTRACT Formation of micronuclei and binucleate cells and their relationships with cell survival were studied in the aerobically- and anaerobically-irradiated 3T3 cells. The results showed that frequency of micronuclei, percentage of micronucleus cells and percentage of binucleate cells increased linearly with the radiation dose in certain range. Oxygen enhancement ratios (OER) of micronucleus frequency, percentage of micronucleus cells, percentage of binucleate cells and cell survival were 2.02, 1.96, 1.87 and 1.83, respectively. The percentage of micronucleus cells or percentage of micronucleus cells plus binucleate cells correlated negatively well with cell survival. The mechanism of oxygen effect in the radiation response of 3T3 cells and the significance of formation of micronuclei and binucleate cells were discussed.

KEYWORDS 3T3 cells, Micronuclei, Binucleate cells, Oxygen effect