

电离辐射及超氧阴离子基对人血淋巴细胞姐妹染色单体交换的诱发作用

罗黎明¹ 金一尊² 林念芸³ 郑荣梁¹

¹(兰州大学生物系, 兰州 730000)

²(上海医科大学放射医学研究所, 上海 200032)

³(中国科学院辐射化学开放研究实验室, 上海原子核研究所, 上海 201800)

摘要 用姐妹染色单体交换(SCE)作为指标, 研究了⁶⁰Co γ 射线辐照及NADH-PMS(吩嗪硫酸甲酯)系统中产生的超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)对胎儿脐血淋巴细胞染色体的损伤作用, 及活性氧清除剂SOD和甘露醇的保护作用。结果显示 γ 射线及 $O_2^{\cdot-}$ 都能诱发细胞SCE频率显著升高, 且存在一定的剂量-效应关系。SOD及甘露醇对 $O_2^{\cdot-}$ 诱发的损伤有明显的保护作用。

关键词 姐妹染色单体交换(SCE), 电离辐射, 超氧阴离子基, 氧自由基清除剂, 淋巴细胞

SCE是70年代发展起来的一种灵敏的检测染色体损伤的技术。它与DNA损伤、基因突变之间存在着相关性。

关于电离辐射对细胞SCE的诱发作用, 有的认为电离辐射能够诱发SCE频率的显著增高^[1,2], 有的则认为根本无诱发作用^[3,4]。已知电离辐射对机体造成的损伤, 包括对遗传物质的损伤作用, 主要是辐照时产生的自由基, 尤其是活性氧自由基引起的。而其它途径产生的活性氧自由基对离体淋巴细胞SCE的诱发作用研究得较少。炎症患者的细胞往往产生过量的 $O_2^{\cdot-}$, 这些病人离体培养的淋巴细胞SCE频率都比正常人高^[5]。

电离辐射和其它途径产生的活性氧自由基对染色体的损伤作用应存在一定的关系。本实验将在同一条件下观察它们分别对淋巴细胞SCE的诱发作用, 并对它们之间的关系进行探讨。

1 材料和方法

1.1 细胞

胎儿脐血淋巴细胞。

1.2 细胞培养与制片

采用微量全血培养法。RPMI 1640培养基含20%小牛血清, 抗菌素, PHA(广州医药工业研究所), 终浓度为8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的5-溴脱氧尿苷(FLUKA)。5 ml上述培养液中加入0.25 ml抗凝血, 37℃恒温下培养72 h, 在培养结束前4 h加入终浓度为0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的秋水仙素。细胞经低渗和固定后, 以火焰干燥法制片。Giemsa加吖啶橙法差别染色。选择分散良好、色差清晰的第二周期中期分裂相细胞, 计数SCE频率, 计数细胞每组不少于20个。

1.3 电离辐射对SCE的诱发

将抗凝血分装于血培养瓶中, 每瓶5 ml, 一管作对照, 其余各管接受⁶⁰Co γ 射线辐照。实验

收稿日期: 1992-09-01

分两组进行: (1) 剂量率为 1.19 Gy/min, 分别照射 0.5、1、2、3 及 4 min。(2) 剂量率为 1.19 Gy/min, 照射 2 min; 2.31 Gy/min 剂量率照射 1 min; 4.77 Gy/min 剂量率照射 0.5 min。均在室温下进行。照后立即取 0.25 ml 血样加入到上述培养基中, 如上法培养制片。

1.4 活性氧自由基对 SCE 的诱发

采用 NADH-吩嗪硫酸甲酯(PMS)系统中产生 $O_2^{\cdot-}$ [7]。培养液中加入终浓度为 0.016 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH7.4。加入 0.25 ml 抗凝血, 一瓶用作对照, 其余各瓶加入终浓度为 78 μ mol/L 的 NADH, 再加入不同浓度的 PMS(0.14—8.7 μ mol/L)。摇匀, 照上法培养制片。

1.5 活性氧清除剂的保护作用

将含有抗凝血的培养液分成若干瓶, 一管空白, 其余各管加入自由基清除剂, SOD(上海东风生化技术公司)终浓度分别为 167 u/ml 及 333 u/ml, 甘露醇(北京化工厂)终浓度为 5.5 mmol/L 37℃下温育 30 min。按步骤 4 加入药品, 其中 PMS 浓度为 3.0 μ mol/L。实验结果均采用团体 t-test 分析。

2 实验结果

2.1 ^{60}Co γ 射线对 SCE 的诱发作用

当剂量率为 1.19 Gy/min 时, 随着照射剂量的增加, SCE 频率也增加。剂量高于 1.19 Gy 后, SCE 频率与对照组相比差异极显著($p < 0.001$)。但镜检时发现, 随着剂量的增大, 细胞生长变缓, 第 2 周期中期分裂相细胞减少。大于 5 Gy 后, SCE 的计数已非常困难。本实验所用最大剂量 4.76 Gy 时的 SCE 频率为对照组的 1.7 倍(见表 1)

当剂量相近时, 剂量率即使成倍增大, SCE 频率变化却无明显差异($p > 0.05$)(见表 2)。

Tab 1. The effects of different doses of γ -Irradiation on SCE frequencies of human lymphocytes

Dose/Gy	No. of cells analysed	SCE/Cell (S. D)
0(control)	86	5.7(1.3)
0.60	71	6.7(1.3)
1.19	70	7.7(1.4)***
2.38	67	8.5(1.5)***
3.57	20	9.4(1.8)***
4.76	44	10.0(2.1)***

*** $p < 0.001$

Tab 2. The effects of different dose rate of γ -irradiation on SCE frequencies of human lymphocytes

Dose/Gy	Dose-rate/Gy.min ⁻¹	No. of cells analyzed	SCE/Cell (S. D)
0		46	5.8(1.2)
2.38	1.19	27	8.7(1.5)
2.31	2.31	25	8.2(1.4)
2.38	4.77	23	8.4(1.7)

2.2 $O_2^{\cdot-}$ 对 SCE 的诱发作用

随着 PMS 浓度的增大(即 $O_2^{\cdot-}$ 产率增大), 细胞 SCE 频率也增加。PMS 浓度达到 1.5 μ mol/L 后, SCE 频率与对照组相比差异极显著($p < 0.001$)。PMS 浓度为 4.5 μ mol/L 时, SCE 频率为对照组的 1.6 倍(见表 3)

Tab 3. The effects of the superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) on SCE frequencies of human lymphocytes

NADH + PMS/mol·L ⁻¹	No. of cells analyzed	SCE/Cell (S. D)
0	68	5.2(1.3)
0.75	63	6.0(1.4)
1.50	63	6.9(1.4)***
3.00	66	7.6(1.6)***
4.50	42	8.4(1.5)***

*** $P < 0.001$

2.3 活性氧清除剂的保护作用

SOD 及甘露醇都能使细胞 SCE 频率降低, 与不加任何保护剂的组相比, 差异显著($p < 0.01$) (见表 4)

Tab 4. The effects of free radical scavengers on SCE in lymphocytes treated with NADH-PMS system

Subject	No. of cells analyzed	SCE/Cell (S. D)
0	25	4.8(1.4)
PMS + NADH	40	7.9(2.1)
PMS + NADH + SOD ^a	25	6.5(2.1)
PMS + NADH + SOD ^b	25	6.1(2.7)
PMS + NADH + Mannitol ^c	25	6.4(1.6)

(a) The concn. is 167 u/ml. (b) The concn. is 333 u/ml. (c) The concn. is 5.5 mmol/L

3 讨 论

本实验证明, 电离辐射在一定的剂量范围内可诱发淋巴细胞 SCE 频率显著增高, 但没有达到对照组的 2 倍以上, 是弱的 SCE 诱发剂。而提高剂量率并未使 SCE 频率增高。目前关于 SCE 形成的机理还不清楚, 但一般认为 SCE 的形成涉及 DNA 的损伤与修复, 是 DNA 的错误修复造成的。降低剂量率有利于 DNA 链断裂的重接, 也许 SCE 频率反而会高。但 Littlefield^[8] 等用 0.5 Gy/min, Stenstrand^[9] 用 0.12 Gy/min 的剂量率照射人淋巴细胞均未见 SCE 频率有显著增加。

同电离辐射结果类似, 活性氧自由基能够显著诱发细胞 SCE 频率的增高, 但也是弱的诱发剂。这一结果与 Emerit^[6] 的是一致的, 而 Philips^[9] 用黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统产生的 $O_2^{\cdot-}$ 能够诱发 CHO 细胞 SCE 频率达到对照组的 3 倍以上, 有较强的诱发作用。这种差异可能是因为细胞株不同, 它们的自由基清除系统如 SOD、过氧化物酶等的含量会有差异, 导致对自由基损伤的不同的耐受力。

已知 SOD 是 $O_2^{\cdot-}$ 的清除剂, 而甘露醇是 $OH^{\cdot}$ 清除剂。实验表明 SOD 和甘露醇都有效地降低了 $O_2^{\cdot-}$ 对细胞 SCE 的诱发作用。可见不仅是 $O_2^{\cdot-}$, 而且 $OH^{\cdot}$ 在 SCE 的诱发中也起了重要的作用。 $O_2^{\cdot-}$ 在金属离子的催化下通过 Haber-Weiss 反应可以生成 $OH^{\cdot}$ 。有研究表明, SOD 及甘露醇对电离辐射造成的 DNA 及染色体损伤也有保护作用。

可以看出, 电离辐射和化学方法产生的活性氧自由基对 SCE 的诱发作用是很相似的。电离辐射作用于水会产生 $H^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$ 及 $e_{aq}^{\cdot-}$ 等自由基, 而生物含水体系中有氧存在, 还会产生 $O_2^{\cdot-}$ 。其中活性氧自由基 $O_2^{\cdot-}$ 和 $OH^{\cdot}$ 毒性是最大的。本实验从另一个方面说明了活性氧自由基在电离辐射导致染色体损伤中所起的重要作用。活性氧自由基是非常活泼的, 能够到达核酸与核酸直接起作用的量有限, 其损伤作用也有可能是它们的次级产物造成的。这个假设已有了一些实验支持。

在研究电离辐射的间接作用中观察到了一种叫做断裂因子(“breakage factors” or “clastogenic factors”)的物质^[9], 这一因子能在遗传性的染色体断裂症状(Bloom's 综合症)中, 及伴随有自发的染色体不稳定的慢性炎症疾病中观察到。有关断裂因子的特性, 只知它们是一类低分子量的物质, 它们的形成与起作用的机制是与活性氧自由基密切有关的, 尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Solomon E, Bobrow M. *Mutat. Res.*, 1975, 30: 273
- 2 Abramovsky I, Vorsanger G, Hirschhorn K. *Mutat. Res.*, 1978, 50: 93
- 3 Stenstrand K. *Hereditas*, 1985, 102: 71
- 4 Mohamed H, Samia M, Gamel E L et al. *Cancer*, 1986, 57: 1937
- 5 秦世真. 国外医学遗传分册, 1984, 3: 116
- 6 Emerit I, Keck M, Levy A et al. *Mutat. Res.*, 1982, 103: 165
- 7 Morimitsu Nishikimi, N. Appaji Bao, Kunio Yagi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46(2): 849
- 8 Littlefield L G, Colyer S P, Joiner E F et al. *Radiat. Res.*, 1979, 78: 154
- 9 Philips B J, James T E B, Anderson D. *Mutat Res.*, 1984, 126: 265

SISTER CHROMATID EXCHANGE IN HUMAN LYMPHOCYTES INDUCED BY IONIZING IRRADIATION AND SUPEROXIDE ANIONS

Luo Liming¹ Jin Yizun² Lin Nianyun³ Zheng Rongliang¹

1 (Laboratory of Biophysics, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

2 (Shanghai Institute of Radiation Medicine, Shanghai 200032)

3 (Shanghai Institute of Nuclear Research, Academia Sinica, Shanghai 201800)

ABSTRACT SCE was studied in human lymphocytes exposed to ⁶⁰Co-γ ray and superoxide radical. Both γ-ray and superoxide radical produced a statistically significant increase in SCE over baseline. Dose-response relationships were observed. But a 2-fold increment of SCE wasn't reached in both agents. SOD and mannitol have preventive effect on the damage caused by active oxygen species.

KEYWORDS Sister chromatid exchange, Ionizing irradiation, Superoxide anions, Free radical scavenger, Lymphocytes