

α 粒子照射诱发细胞基因突变的旁效应及机理研究

陆颖¹ 杨陟华¹ 曹珍山¹ 樊飞跃¹ 朱茂祥¹ Tom K. Hei²

¹ (军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

² (美国哥伦比亚大学放射生物研究中心 纽约 10032)

摘要 对 α 粒子照射诱发人类11号染色体(Hchr 11)基因突变的旁效应及其可能的机理进行研究。用包含单条Hchr 11的人-中国仓鼠卵巢细胞杂交细胞系(A_L)为靶细胞,经CD59表面抗原抗体在补体存在下筛选突变细胞克隆,测定Hchr 11基因突变率;在 α 粒子照射源与受照射细胞间插入网格,定比例照射细胞,观察 α 粒子照射的细胞对周围未受照射细胞基因突变的影响,即旁效应;通过观察自由基清除剂二甲基亚砜(DMSO)和细胞间通讯阻断剂高丙体六六六(Lindane)对 α 粒子照射诱发Hchr 11基因突变旁效应的抑制作用探讨其可能的机理。单纯 α 子照射细胞诱发的基因突变率与照射剂量存在明确的剂量效应关系;用 α 粒子加网照射的实验模型,仅15%的细胞受到照射时,群体细胞的基因突变率明显高于受照射细胞的预期基因突变率,表明未受照射的细胞中也发生了基因突变;DMSO能显著减少 α 粒子照射细胞诱发的基因突变,但对其诱发的基因突变旁效应无明显抑制作用;与此相反,Lindane对单纯 α 粒子照射细胞诱发的基因突变无明显影响,但能显著降低 α 粒子照射细胞诱发的基因突变旁效应。 α 粒子照射细胞诱发的基因突变存在旁效应;细胞间通讯在 α 粒子照射诱发细胞基因突变旁效应中起重要作用。

关键词 α 粒子照射, 基因突变, 旁效应, 活性氧, 细胞间通讯

中图分类号 Q691.5

长期以来,人们一直认为电离辐射的损伤效应如突变和致癌等,主要是由于DNA的直接损伤。然而最近研究表明,核外或细胞外靶可能在调节辐射遗传毒性方面起着重要作用^[1-4]。人类成纤维细胞受极低剂量 α 粒子照射后,p53的表达水平显著高于被单个 α 粒子击中细胞的表达量^[4]。在受低剂量 α 粒子照射的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞中,只有小于1%的细胞受到照射,结果有大于30%的细胞发生姐妹染色体交换(SCE)^[2]。人们把这种现象称之为“旁效应”(Bystander effect),也称为“旁观者效应”,即通过细胞接触或细胞间通讯,将接触损伤因素原始细胞的应答传递给周围并未直接受到损伤因素作用的其它细胞,使之产生与接触损伤因素原始细胞相同的应答。

辐射诱导的基因组不稳定性与旁效应是目前放射生物学研究领域值得关注的热点,被认为是与辐射所致应激和损伤的炎症反应应答有关^[5]。但国内尚无相关研究的报道,本实验与美国哥伦比亚大学放射生物研究中心合作,采用在细胞与放射源

之间插入自制网格定比照射细胞的实验模型,研究受照射细胞对未受照射细胞基因突变旁效应的影响,并对其机理进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

25cm²培养瓶、60mm培养皿、1.00mL刻度吸管为Corning公司产品;包含单条人类11号染色体的人-中国仓鼠卵巢杂交细胞(A_L细胞)、羊抗小鼠IgM、S1抗体及补体由美国哥伦比亚大学放射生物中心提供;琼脂糖、DMSO、Lindane购于Sigma公司;F-12培养液购于Gibco公司;胎牛血清购自北京元亨圣马生物技术研究所; α 粒子照射源(²³⁸Pu电镀源,活性区直径50mm,放射性活度200MBq,剂量率1.12Gy/min)购自中核总公司404厂; α 照射用玻璃环(ϕ 45mm)在军事医学科学院仪器厂定制;照射网格(ϕ 45mm,每mm²上一个孔,平均孔径(440 $\pm$ 5) μ m,照射比例15%)为在铝箔纸上用打

全军十五指令课题(01L061)资助

第一作者:陆颖,女,1973年10月出生,2002年在军事医学科学院放射医学研究所获硕士学位,卫生毒理学专业,现在307医院血液科工作

通讯联系人:朱茂祥

收稿日期:初稿 2003-06-04,修回 2003-08-11

孔针精确打孔制备;高强度,耐高温的 Mylar 膜(平均厚度为 $1.93\mu\text{m}$, 密度为 $1.39\text{g}/\text{cm}^3$)为德国 Kalle Chemile Witsbaden 公司生产; α 粒子照射装置由军事医学科学院实验室设计,中核总公司 401 厂定做;其余均为市售国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养及处理

A_L 细胞用含 8%胎牛血清和 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 F12 培养液培养在为 37°C 、5% CO_2 、95%湿度的培养箱中。收集细胞时,用含 0.05%胰酶(Sigma)和 0.02% EDTA-4Na 的 d-Hank's 液消化,并用基础 d-Hank's 液洗 2—3 次,计数细胞数。按 1×10^6 接种于 α 粒子照射皿,24h 后用 α 照射装置进行照射^[7]。DMSO(1%)或 Lindane($40\mu\text{mol}/\text{L}$)在 α 粒子照射前 1—2 h 加入。

1.3 低突变本底 A_L 细胞的筛选^[8]

100mm 非组织培养皿中加入 10mL,含 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ IgM 的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液,室温放置 2h,用 PBS 洗涤 IgM 3 次,加入 5 mL 含 1% FBS 的 PBS,保存于 4°C 备用。将指数生长的 A_L 细胞悬浮含 0.2% S1 抗体和 2% FBS 的 PBS 中,冰上放置 30min,离心($1000\text{r}/\text{min}$, 5min)去上清,用含 2% FBS 的 PBS 洗涤细胞 3 次,最后将细胞悬浮于含 2% FBS 的 PBS 中,并调整细胞浓度至 $5\times 10^5/\text{mL}$ 。吸出上述准备好的结合有 IgM 的非组织培养皿中的液体,每皿加入细胞悬液 5mL, 4°C 冰箱放置 2h 后吸出上层溶液中的悬浮细胞(自发突变的 $S1^-$ 细胞),用冷的含 2% FBS 的 PBS 轻轻洗涤培养皿底部与抗体结合的细胞($S1^+$ 细胞)3 次,加入含 8% FBS 的 F12 培养基培养,用于基因突变分析。

1.4 Hchr 11 基因突变分析(A_L 突变试验)^[8-12]

将受试细胞接种到 60mm 培养皿中,不同处理的细胞(单纯 α 粒子照射细胞, α 粒子加网照射细胞, DMSO、Lindane 处理的单纯 α 粒子照射和加网照射细胞)分别接种约 200 个细胞/皿(9 皿)和约 2×10^4 个细胞/皿(5 皿)。200 个细胞/皿的 9 皿分成 3 组,分别作为正常对照(NC)、S1 抗体对照(AC)和补体对照(CC), 2×10^4 个/皿的 5 皿(E)用于突变率测量。2h 细胞贴壁后,在 AC 皿中加入终浓度为 0.3% 的 S1 抗体,在 CC 皿加入终浓度为 1.5% 的补体, E 皿中加入终浓度为 0.3% 的 S1 抗体和终浓度为 1.5% 的补体。培养皿置 37°C 、5% CO_2 和 95%湿度条件下的培养箱中培养,7d 后吸出培养液,用 PBS 洗

涤细胞 3 次,甲醇固定细胞 15min 后,再用 PBS 洗涤细胞 3 次,吉姆萨染色细胞后,镜下计数细胞数多于 50 个的细胞集落数。分别按下式计算自发突变率(M_s)、单纯 α 粒子照射和或加网照射细胞的突变率(M_a)和加网照射的预期突变率(M_e):

$$M(M_s \text{ 或 } M_a) (/10^5 \text{ 活细胞}) = 10^5 \times \frac{C_E}{N_E \times P_E}$$

$$M_e = p \times M_a + (1-p) \times M_s$$

其中,

$$P_E(\%) = 100 \times \frac{C_{CC}}{N_{CC} \times P_{NC}}; P_{NC}(\%) = 100 \times \frac{C_{NC}}{N_{NC}}$$

式中, C_E 、 C_{CC} 和 C_{NC} 分别为 E、CC 和 NC 皿的集落数计数; N_E 、 N_{CC} 和 N_{NC} 分别为 E、CC 和 NC 皿的接种细胞数; P_E 和 P_{NC} 分别为补体存在和不存在时细胞的接种效率(单纯抗体对细胞存活无明显影响,接种效应与正常细胞相同)。 p 为受照细胞比例(本实验中为 15%)。

1.5 统计分析

用统计分析软件(Statistical analysis software, SAS) 进行数据处理。

2 实验结果

2.1 α 粒子照射 A_L 细胞诱发的基因突变

α 粒子照射 A_L 细胞的存活曲线如图 1 所示,剂量效应曲线符合指数模型: $S(\%) = 100e^{-1.3173D}$ (相关系数 $r^2 = 0.9997$), 计算 $LD_{50} = 0.526\text{Gy}$, $LD_{37} = 0.755\text{Gy}$ 。 α 粒子照射诱发 A_L 细胞 Hchr 11 基因突变的剂量效应关系如图 2 所示,呈现良好的线性平方关系: $M(/10^5 \text{ 活细胞}) = -275.6D^2 + 801.9D + 153.35$ (相关系数 $r^2 = 0.9993$)。

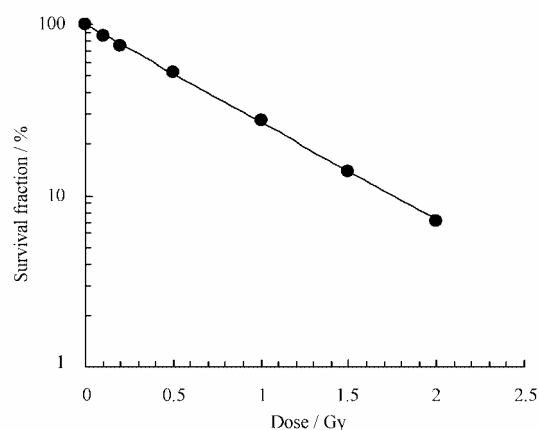


Fig. 1 Survival curve of alpha-particle irradiated A_L cells

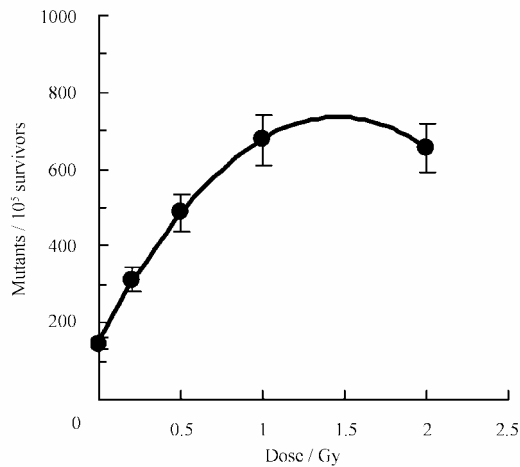


Fig.2 Dose-effect curve of α -particle induced mutation on human chromosome 11 in A_L cells

Table 1 Mutant fraction in A_L cells induced by α -particle irradiation (fixed proportion)

Dose / Gy	$Ma / 10^5$ survivors (without grid) ($n=3\times5=15$)	$M / 10^5$ survivors (with grid)	
		Observed ($n=3\times5=15$)	Expected ($n=3$)
0	146.5±15	140.4±13	146.5±21
0.2	312.4±26	499.0±39 ⁽³⁾	171.4±33
0.5	485.8±28	365.5±33 ⁽²⁾	197.4±27
1.0	676.2±27	336.3±52 ⁽¹⁾	226.0±42
2.0	655.6±35	307.0±71 ⁽¹⁾	222.9±34

⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.05$, ⁽³⁾ $p<0.005$ vs expected value, indicating there are bystander effects induced by alpha particles irradiation

2.3 活性氧在 α 粒子照射诱发细胞基因突变旁效应中的作用

用 0.5Gy α 粒子加网定比照射 A_L 细胞, 观察 DMSO 对 α 粒子照射诱发细胞基因突变的影响, 结

2.2 α 粒子照射 A_L 细胞诱发基因突变的旁效应

在 α 粒子照射源与受照射细胞间插入网格定比照射 A_L 细胞, 检测群体细胞(含 15%照射细胞和 85%未受照射细胞)的基因突变率, 结果如表 1 所示。可以看出, 所有剂量 α 粒子照射的突变率观察结果(O)均明显高于预期值(E), 低剂量 α 粒子照射(<0.5Gy)增高更显著, 提示 α 粒子照射诱发细胞基因突变存在旁效应, 且低剂量 α 粒子照射(<0.5Gy)诱发的旁效应更明显。

果如表 2 所示。可以看出, DMSO 能明显降低 α 粒子照射细胞的基因突变率, 但对其诱发的基因突变旁效应无明显抑制作用。提示活性氧不是 α 粒子照射诱发细胞基因突变旁效应的主要因素。

Table 2 Inhibition of DMSO and Lindane on bystander effect induced by α -particle irradiation (fixed proportion) in A_L cells

Dose / Gy	Treatment	$Ma / 10^5$ survivors (without grid) ($n=3\times5=15$)	$M / 10^5$ survivors (with grid)	
			Observed ($n=3\times5=15$)	Expected ($n=3$)
0	—	146.5±15	140.4±13	146.5±21
	1% DMSO	145.6±21	—	—
	40 μ mol/L Lindane	149.2±28	—	—
0.5	—	485.8±73	365.5±33	197.4±27
	1% DMSO	161.7±16 ⁽¹⁾	362.3±41 ⁽²⁾	148.4±12
	40 μ mol/L Lindane	473.6±26 ⁽³⁾	200.1±21 ⁽⁴⁾	195.1±24

⁽¹⁾ $p<0.001$ vs irradiation (without grid), indicated the protection of DMSO on mutagenicity induced by alpha-particle irradiation.

⁽²⁾ $p>0.05$ vs irradiation (with grid), indicated no effect of DMSO on bystander effects induced by alpha-particle irradiation.

⁽³⁾ $p>0.05$ vs irradiation (without grid), indicated no effect of Lindane on mutagenicity induced by alpha-particle irradiation.

⁽⁴⁾ $p<0.05$ vs irradiation (with grid), indicated obvious reduction of Lindane on bystander effects induced by alpha-particle irradiation.

2.4 细胞间通讯连接在 α 粒子照射诱发细胞基因突变旁效应中的作用

在放射源与 A_L 细胞之间插入照射网格, 用 40 μ mol/L Lindane 处理 1—2 h 后以 0.5Gy 的 α 粒子进

行照射, 观察 Lindane 对 α 粒子照射细胞基因突变的影响, 结果如表 2 所示。40 μ mol/L Lindane 对正常细胞的基因突变率无影响, 但能明显降低 α 粒子照射细胞的基因突变率, 几乎恢复到正常水平, 提示细胞间通讯在 α 粒子照射诱发细胞基因突变旁效

应中起着非常重要的作用。

3 讨论

A_L 细胞在突变研究中具有一定的优势。 A_L 细胞是由 Waldren 及其同事于 1979 年首先建立的^[11]。他们用仙台病毒将中国仓鼠卵巢突变株 ($gI^{-1}A$) 细胞和人的皮肤活检成纤维细胞融合, 建立了 A_L 细胞系 (Human-hamster hybrid cell line), 该细胞含有一套完整的中国仓鼠染色体和单条对细胞生长无影响的人 11 号染色体 (Hchr11)。在有补体存在的情况下, 正常的 A_L 细胞能被特异的抗 S1 的血清杀死, 而 Hchr11 发生突变的 A_L 细胞由于失去了表达 S1 抗原的能力, 因而可以在有补体和特异抗 S1 血清存在下存活, 并形成集落。经过与特定的抗体和补体共培养, 11 号染色体上的突变能被非常容易的检测出来。从突变细胞的集落形成数可以计算出突变频率。对突变细胞集落的 DNA 进行 PCR 扩增分析, 可以获得突变细胞的突变谱。

A_L 细胞含有一条人类 11 号染色体, 它与癌症的关系十分密切, 含有许多与癌症发生、发展和转移相关的基因, 包括癌基因、抑癌基因以及肿瘤转移相关基因等, 因此可以用来研究辐射对人类 11 号染色体上相关基因的影响。由于在 11 号染色体上仅仅很小的一段 (11p15.5) 对这个杂交细胞的存活至关重要^[12,13], 其它位点的突变或片段缺失不影响该细胞的存活。因此, 几乎该条染色体上的所有位点都可作为突变的靶子^[14]。该突变系统对诸如电离辐射和化学致癌物诱发的多基因位点突变、大、小片段缺失特别敏感, 其灵敏度要比普通方法的高出至少 200 倍。石棉纤维具有致突性和致癌性, 经常接触石棉的人易患肺癌、肺部纤维化、胸腹膜间皮瘤等恶性疾病, 但在体外进行的分析石棉致突性的短期实验多得到阴性或模棱两可的结果^[15,16]。Hei 等用 A_L 细胞突变体系检测, 结果发现, 石棉是一种强的致突剂。他们用 HPRT 位点和 S1 位点来检测石棉的致突性, 发现暴露石棉 7—14d 后, A_L 细胞 S1 位点发生突变, $2.5\mu\text{g/mL}$ 的石棉即有明显的致突作用, S1 位点的突变率达 7.8×10^{-4} , $40\mu\text{g/mL}$ 石棉的致 S1 位点突变率高达 3×10^{-3} , 而 HPRT 位点的突变率则较低。进一步分析表明, 石棉导致 HPRT 位点的基因大部分缺失, 从而导致细胞在形成可检测集落前以死亡, 致使 HPRT 突变率较低, 这可能也是其它检测系统得出阴性结果的重要原因^[11]。表明 A_L 细胞是一个比较优越的检测基因突变体系。

本研究中, 我们通过在照射源与细胞之间插入

网格定比照射细胞, 观察细胞的群体基因突变率, 观察到的细胞基因突变率比预期的值高 2—3 倍, 提示 α 粒子除了引起受照细胞基因突变外, 更多的是由于受照细胞周围的未受照射细胞发生了不同程度的基因突变, 即 α 粒子照射后存在着基因突变旁效应。

虽然 α 粒子照射细胞诱发的旁效应已被多项研究证实^[1-5], 但有关旁效应的发生机理尚无明确的结论。已往的研究发现, 活性氧在基因突变中起重要作用^[17], 在 α 粒子照射诱发的细胞增殖死亡旁效应中, 活性氧也是主要因素之一^[18]。但本研究没有观察到活性氧清除剂 DMSO 对 α 粒子照射诱发的细胞基因突变旁效应有抑制效果, 而细胞间通讯阻断剂 Lindane 对 α 粒子照射细胞诱发的基因突变旁效应有明显阻断作用, 提示活性氧不是引起基因突变旁效应的主要因素, 而细胞间通讯连结在辐射诱发的基因突变旁效应中起着非常重要的作用。研究结果对于阐明 α 粒子照射细胞诱发旁效应的机理具有重要意义。

参考文献

- 1 Nagasawa H, Little J B. *Cancer Res*, 1992, **52**(22): 6394-6396
- 2 Deshpande A, Goodwin E H, Bailey S M *et al.* *Radiat Res*, 1996, **145** (3): 260-267
- 3 Mothersill C, Seymour C B. *Radiat Res*, 1998, **149**(3): 256-262
- 4 Hickman A W, Jaramillo R J, Lechner J F *et al.* *Cancer Res*, 1994, **54** (22): 5797-5800
- 5 Lorimore S A, Wright E G. *Int J Radiat Biol*, 2003, **79**(1): 15-25
- 6 张欣, 郑文忠, 李玮博等. 辐射防护, 1996, **16**(3): 192-202
ZHANG Xin, ZHENG Wenzhong, LI Weibo *et al.* *Radiat Prot Bul*, 1996, **16** (3): 192-202
- 7 Azzam E I, de Toledo S M. *Radiat Res*, 1998, **150**(5): 497-504
- 8 Waldren C, Martin J, Sutherland J *et al.* *Cytometry*, 1984, **5**(6): 584-588
- 9 ZHU LX, Waldren C A, Vannias D *et al.* *Radiat Res*, 1996, **145**(3): 251-259
- 10 HEI T K, PIAO C Q, HE Z Y *et al.* *Cancer Res*, 1992, **52** (22): 6305-6309
- 11 Waldren C, Jones C, Puck T T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**(3): 1358-1362
- 12 Lucassen P J, Chung W C J, Vermeulen J P *et al.* *J*

- Histochemistry Cytochemistry, 1995, **43**(11): 1163-1171
- 13 McGuinness S M, Shibuya M L, Ueno A M *et al.* Radiation Research, 1995, **142**(3): 247-255
- 14 Hei T K, Hall E J, Waldren C A. Rad Res, 1988, **115**(2): 281-291
- 15 Chamberlain M, Tarmy E M. Mutat Res, 1977, **43**(2): 159-164
- 16 Huang S L, Saggioro D, Michelmann H *et al.* Mutat Res, 1978, **57**(1): 225-232
- 17 ZHU M X, YANG Z H, GONG Y F *et al.* Chinese J Biochem Mol Biol (China), 2002, **18**(1): 92-98
- 18 LU Y, YANG Z H, CAO Z S *et al.* J Radiat Res Radiat Proc (China), 2003, **21**(1): 69-72

Bystander effect of alpha-particle irradiation on mutagenicity and its associated mechanism

LU Ying¹ YANG Zhihua¹ CAO Zhenshan¹ Fan Feiyue¹ ZHU Maoxiang¹ Tom K. Hei²⁾

¹ (Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medicine Science, Beijing, 100850)

² (Center for Radiological Research, Columbia University, New York, NY 10032, USA)

ABSTRACT The work is to investigate α -particle irradiation-induced bystander effects on the mutagenicity in human chromosome 11 in the human-hamster hybrid (A_L cells) and its possible mechanism. A_L cells were used for assaying mutation rates of human chromosome 11 through screening mutants in the presence of anti-CD59 surface antigen antibody (S1) and complement. A grid was interposed between α -particle source and the cells being irradiated, so as to fix proportion of the irradiated cells (15 %) and the bystander effects on the mutagenicity were detected. Free radical scavenger DMSO and intercellular communication inhibitor Lindane were selected to investigate the potential mechanism of α -particle induced bystander effect. There was clear dose-dependent relationship between mutation rate and the dose of alpha particle radiation. However, the mutant fractions of cell population shielded by the grid in α -particle irradiation system were much higher than the expected levels of irradiated cells. Lindane, but not DMSO, could obviously decrease this bystander effect induced by α -particle irradiation. Alpha-particle irradiation can induce bystander effect on the mutagenicity, in which intercellular communication may play important roles.

KEYWORDS Alpha-particle irradiation, Gene mutation, Bystander effect, Reactive oxygen species, Intercellular communication

CLC Q691.5