

X射线对三株肿瘤细胞辐射敏感性比较

杨宇琴 王丽丽 柯尊晖 玉业英
黎晨 尤培蒙 韩冰 杨田 郭忠 赵晋
(西北民族大学医学院 兰州 730030)

摘要 比较研究X射线对人宫颈癌细胞(HeLa)、人肝癌细胞(HepG2)和人粘液表皮样癌细胞(MEC-1)的辐射敏感性。X射线照射三株细胞至吸收剂量2、4、6、8 Gy后0.5、4和24 h,用克隆形成实验测定细胞增殖,中性彗星电泳法检测DNA双链损伤(DNA double strand breaks, DSB),免疫荧光染色法检测磷酸化组蛋白H2AX (γ H2AX)焦点的形成。结果显示:2、4、6、8 Gy剂量组及照射后不同时间点均以Hela细胞的存活分数(Survival fraction, SF)最高;CASP软件分析显示,DSB增加呈现时间和剂量依赖关系,照射后4 h尾矩(Tail moment, TM)增加最为明显,其中以MEC-1细胞增加最为显著;照射后0.5和4 h, γ H2AX阳性细胞率达到100%,照射后24 h逐渐下降,其中Hela细胞下降最为明显。结果提示,克隆形成实验、中性彗星电泳和 γ H2AX焦点检测法的联合使用能有效预测肿瘤细胞辐射敏感性。

关键词 X射线, 肿瘤细胞, 辐射敏感性

中图分类号 R739.4

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2018.rj.36.030203

Comparison study on X-ray radiosensitivity in three tumor cell lines

YANG Yuqin WANG Lili KE Zunhui YU Yeying LI Chen YOU Peimeng
HAN Bing YANG Tian GUO Zhong ZHAO Jin
(Medical College of Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT The present study was to compare the X-ray sensitivity in human cervical cancer cell line HeLa, human hepatoma cell line HepG2, and human mucoepidermoid carcinoma cell line MEC-1. At 0.5, 4, and 24 h after X-ray irradiation with absorbed doses of 2, 4, 6, and 8 Gy, clonogenic assay, neutral comet electrophoresis, and immunofluorescence staining were used to evaluate the cell proliferation, DNA double-strand breaks (DSBs), and formation of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX) foci. The results showed that HeLa cells had the highest survival fraction (SF) for 2, 4, 6, and 8 Gy group at different time points after irradiation. Comet assay software project (CASP) analysis showed that DSBs increased with irradiation time, and absorbed dose. Tail moment (TM) increased most significantly at 4 h after irradiation, especially in the MEC-1 cells. The γ H2AX phosphorylation level

基金资助: 国家自然科学基金项目(81260442、81560508、31560254)、国家民委领军人才计划([2016]57)和国家级大学生创新创业训练计划项目(201810742137、201710742101)资助

第一作者: 杨宇琴, 女, 1995年8月出生, 现就读于西北民族大学医学检验技术专业, 本科生, E-mail: 1643779267@qq.com

通信作者: 赵晋, 教授, E-mail: gz6768@163.com

收稿日期: 初稿 2018-02-05; 修回 2018-04-02

Supported by National Natural Science Foundation of China (81260442, 81560508, and 31560254), Program for Leading Talent of SEAC ([2016]57), and National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship (201810742137, 201710742101)

First author: YANG Yuqin (female) was born in August 1995. Now she is an undergraduate student at Northwest Minzu University, majoring in medical inspection technology. E-mail: 1643779267@qq.com

Corresponding author: ZHAO Jin, professor, E-mail: gz6768@163.com

Received 5 February 2018; accepted 2 April 2018

in the three cell lines reached 100% at 0.5 and 4 h after irradiation, and then gradually decreased by 24 h, this decline in γ H2AX phosphorylation was the most obvious in HeLa cells. The above mentioned results showed that the combined use of clonogenic assay, neutral comet electrophoresis, and phosphorylated γ H2AX foci detection can effectively predict the radiosensitivity of tumor cells.

KEYWORDS X-rays, Tumor cells, Radiosensitivity

CLC R739.4

放射治疗是目前肿瘤治疗的主要手段之一^[1],但同一治疗剂量对不同组织细胞造成的损伤不同。临床上肿瘤对射线的敏感性不同,放疗效果也存在很大的差异^[2]。本研究对三株肿瘤细胞的X射线放射敏感性进行比较,为临床放射治疗提供辐射敏感性的预测指标和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

人粘液表皮样癌细胞系(MEC-1)购自第四军医大学口腔医学院;人宫颈癌细胞系(Hela)、人肝癌细胞系(HepG2)由本院中心实验室冻存;DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)(美国Gibco公司);MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)(美国Sigma公司);DAPI (4,6-diamino-2-phenyl indole)(美国Molecular Probes公司);碘化丙啶(Propidium iodide, PI)(美国lsbio公司);鼠抗 γ H2AX单克隆抗体(美国Upstate Technology公司);其余试剂均为国产分析纯。

Olympus AX70 荧光显微镜(日本Olympus公司);酶联免疫分析仪(美国Bio-Rad公司);DYY-6C型电泳仪(北京市六一仪器厂)。X射线辐照装置为美国RX-650 Cabinet X-Radiator System: 能量100 kVp (Kilovolt peak, 峰值电压);电流5 mA;吸收剂量率1.38 Gy/min;照射野20 cm×20 cm。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

三株肿瘤细胞均在5% CO₂、37 °C的孵育箱中贴壁培养。培养基为含有10%灭活小牛血清、抗生素(100 μ mL 青霉素和100 μ g/mL 链霉素)的DMEM。每3~4 d传代一次,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 细胞分组设置

X射线照射三株肿瘤细胞,吸收剂量分别是2、4、6、8 Gy,以未照射组作为对照,照射后0.5、4和24 h进行实验。

1.2.3 克隆形成实验测定 X 射线对细胞增殖的影响

将浓度为 $4 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞接种至15个25 mm细胞瓶中,每瓶2 mL,另加DMEM培养基2 mL,37 °C孵育24 h后进行X射线照射,每个剂量组3瓶细胞,照射后37 °C继续培养。0.25%胰酶消化细胞,制成单细胞悬液。将细胞悬液作梯度倍比稀释,接种于直径100 mm培养皿中,每个剂量组4个皿,设两个细胞密度组(对照组除外)(细胞密度:对照组 5×10^2 个/皿;2 Gy组, 8×10^2 个/皿和 4×10^3 个/皿;4 Gy组, 1×10^3 个/皿和 5×10^3 个/皿;6 Gy组, 3×10^3 个/皿和 1.5×10^4 个/皿;8 Gy组, 6×10^3 个/皿和 3×10^4 个/皿),每皿DMEM终体积10 mL。轻轻晃动,使细胞分散,置37 °C,5% CO₂条件下孵育箱培养10~14 d,弃去培养液,磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS)小心浸洗2次,加固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定15 min;弃去固定液,晾干后用0.4%结晶紫染色20 min,流水冲洗,空气干燥。倒置显微镜下计数大于50个细胞所组成的克隆数^[3-4],实验重复3次,按下式计算克隆形成率(Plating efficiency, PE)和细胞存活分数(Survival fraction, SF)。

克隆形成率(PE)=平均克隆数/接种细胞数×100%

细胞存活分数(SF)=照射后细胞形成的克隆数/接种细胞数×未照射细胞克隆形成率×100%

1.2.4 中性彗星电泳检测 DNA 双链损伤

消化并调整细胞浓度为 $4 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$;将50 μ L 1%的低熔点琼脂糖凝胶(Agarose type VII)均匀铺开于毛玻片上,室温下放置备用。将400 μ L的上述细胞和1.2 mL 1%低熔点琼脂糖凝胶40 °C下预热,混匀

后迅速铺到第一层凝胶上(约 1.4 mL), 室温固化 3 min。将载玻片浸没于新配制的预冷裂解液中(含 0.4~0.5 mg/mL 蛋白酶 K, 使用前加入), 4 °C 裂解 1 h, 小心移入 37 °C 孵育箱孵育 18~20 h; TBE 缓冲液(45 mmol/L Tris-硼酸; 1 mmol/L EDTA, pH=8.5)漂洗载玻片 3 次, 每次 30 min。将载玻片静置于电泳槽中 30 min, 注意液面高于载玻片 2 mm, 避光; 调整缓冲液液面高度, 使电压为 16~18 V, 电流约 7 mA, 电泳 25 min。1% H₂O₂ 固定玻片 10 min, 双蒸水充分洗涤。PI (5 µg/mL) 染色 30 min, 置于密闭湿盒中, 4 °C 保存(在 24 h 内观察, 以防止荧光淬灭)。在荧光显微镜(10×40 倍)紫外光(UV)的激发下, DNA 图像呈橘红色。每个载玻片拍摄至少 50 个细胞, 每个药物剂量拍摄 3 张片子, 实验重复 3 次, 图片用 CASP 软件分析, 计算彗星尾长、头部 DNA 百分含量, 尾部 DNA 百分含量、尾矩(Tail moment, TM)和 Olive 尾矩(Olive tail moment, OTM)等指标^[5-7]。TM 定义为迁移的平均距离与彗尾部 DNA 的分数的乘积^[8]。OTM 计算方法: 尾部光密度重心与头光密度重心之间的距离×尾部 DNA 百分含量^[9]。

1.2.5 免疫荧光染色法检测 γH2AX 焦点的形成

将浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞 100 µL 接种至已放有盖玻片的 35 mm×10 mm 培养皿(盖玻片清洁后用 95%乙醇浸泡后过火, 预先放入培养皿)中, 37 °C 孵育 2 h, 加入 DMEM 培养基 2 mL, 培养 24 h。免疫荧光检测参照 Macphail 等^[6]的方法, 稍作改动。将盖玻片取出, 预冷的 TBS 缓冲液(25 mmol/L Tris, 137 mmol/L 氯化钠, 2.7 mmol/L 氯化钾)洗涤 2 次, 4%多聚甲醛固定 20 min; TBS 洗涤, 5 min×3 次; 0.2% Triton-X 100 破膜, 摇床转速 100 r/min, 15 min; TBS 洗涤, 5 min×3 次; TTN 封闭液(TBS 加重量浓度 1%的 BSA, 体积分数 0.2%的 Tween 20)浸泡 10 min, PBS 洗涤 5 min×3 次; 标记 TTN 稀释鼠 γH2AX 单克隆一抗(1: 500), 孵育 2 h; TBS 洗涤, 1 min×2 次, TTN 洗涤 1 min, 标记 TTN 稀释山羊抗鼠 FITC-IgG (1: 200), 孵育 1 h; TBS 洗涤, 5 min×3 次, 注意避光; DAPI (0.05 µg/mL)染色 5 min, TBS 洗涤, 5 min×3 次, 注意避光; 固定液封片, Olympus IX51 荧光显微镜下观察。γH2AX 焦点定量按 Daniel 等的方法^[10], 用 Image Pro Plus 软件进行 γH2AX 焦点定量计数, γH2AX 焦点数量大于 5 为阳性细胞。每张图片至少统计 800 个细胞。

1.2.6 统计分析方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 分析数据, 单因素方差分析检验多组平均数之间的差别, $p < 0.05$ 时, 差别具有统计学意义。

2 结果

2.1 X 射线抑制 MEC-1、HepG2 和 Hela 细胞增殖

克隆形成实验结果显示, X 射线照射 Hela、MEC-1 和 HepG2 细胞至吸收剂量 2、4、6、8 Gy 后 0.5、4 和 24 h, 各组细胞的存活分数均呈现剂量依赖性降低($p < 0.05$), 其中, 各剂量组和时间点均以 Hela 细胞的存活分数最高; 照射后 4 和 24 h, 各剂量组的存活分数均有所回升(图 1)。

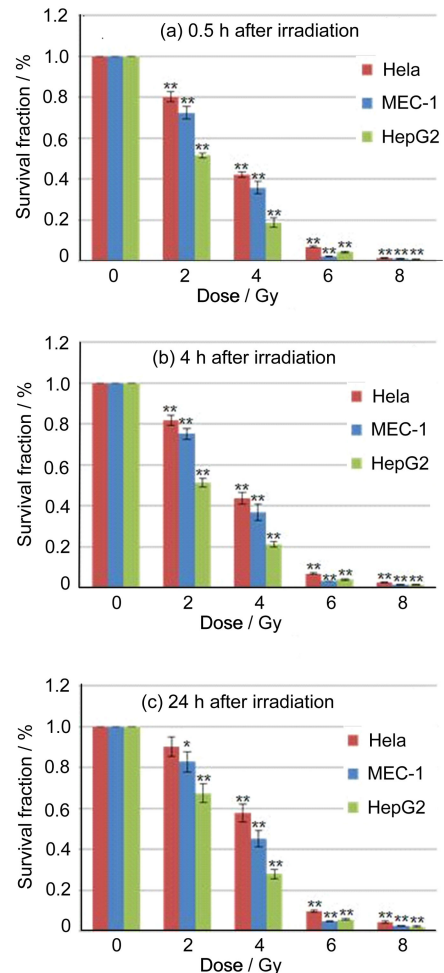


图 1 X 射线对 MEC-1 细胞、HepG2 细胞和 Hela 细胞克隆形成的影响

Fig.1 Effects of X-rays on clone formation of Hela, MEC-1, and HepG2 cell lines
n=4, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control group

2.2 X 射线诱导了 MEC-1、HepG2 和 Hela 细胞的 DNA 双链损伤

中性彗星电泳检测结果显示,X 射线照射 Hela、MEC-1 和 HepG2 细胞至吸收剂量 2、4、6、8 Gy 后 0.5、4 和 24 h,三株细胞均呈现出彗星细胞指标的典型改变。照射后 0.5 h,各剂量组 TM 明显升高,

且以照射后 4 h 组数值最大,其中,MEC-1 细胞在照射后 4 h 的 TM 增加最为明显,6 Gy 照射组达到了 84.56,而 Hela 细胞 TM 增加相对较少,与其它两株细胞比较有显著性差异($p<0.05$);照射后 24 h,各剂量组的 TM 值均有不同程度的回落(图 2、表 1)。

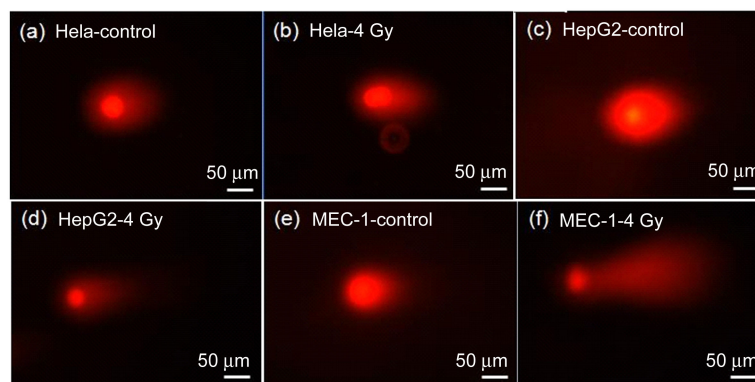


图 2 X 射线照射后 4 h 细胞中性彗星电泳图
Fig. 2 Comet images detected by neutral comet assay at 4 h after X-ray irradiation

表 1 X 射线照射后不同时间点三株细胞 TM 比较
Table 1 Comet tail moment (TM) comparison of three cell lines at different time points after X-ray irradiation

组别 Groups	剂量 Dose / Gy				
	0	2	4	6	8
MEC-1/Hela at 0.5 h	20.13/17.33	20.32/20.10	24.35/22.51	38.38/23.47*	41.32/20.98**
MEC-1/Hela at 4 h	20.13/17.33	54.21/23.37**	68.28/33.41**	84.56/34.89**	81.27/33.56**
MEC-1/Hela at 24 h	20.13/17.33	19.16/20.93	20.85/20.51	31.97/20.27*	30.23/19.70*
MEC-1/HepG2 at 0.5 h	20.13/17.91	20.32/30.59*	24.35/40.20*	38.38/44.18*	41.32/42.49
MEC-1/HepG2 at 4 h	20.13/17.91	54.21/33.53*	68.28/41.70**	84.56/51.77**	81.27/47.40**
MEC-1/HepG2 at 24 h	20.13/17.91	19.16/19.62	20.85/21.85	31.97/23.62*	30.23/22.15*
Hela /HepG2 at 0.5 h	17.33/17.91	20.13/30.59*	22.51/40.20*	23.47/44.18*	20.98/42.49*
Hela /HepG2 at 4 h	17.33/17.91	23.37/33.53*	33.41/41.70**	34.89/51.77*	33.56/47.40*
Hela /HepG2 at 24 h	17.33/17.91	20.93/19.62	20.51/21.85	20.27/23.62**	19.70/22.15

注: 与对照组相比, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

Note: compared with control group, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

2.3 X 射线诱导 γ H2AX 的形成具有时间和剂量效应

免疫荧光染色检测结果显示,X 射线照射 Hela、MEC-1 和 HepG2 细胞至吸收剂量 2、4、6、8 Gy 后 0.5、4 和 24 h, γ H2AX 焦点均有不同程度表达。0.5 h 后,三株细胞细胞核内均出现明显的绿色荧光

焦点(图 3)。与对照组相比,照射后 0.5、4 和 24 h 三株细胞 γ H2AX 阳性细胞率均有明显增加($p<0.05$),其中,2 Gy 组照射后 0.5 h,三株细胞 γ H2AX 阳性细胞率即达到 100%;照射后 24 h 阳性细胞率逐渐下降,但与对照组相比仍有显著性差异($p<0.05$),其中 Hela 细胞 γ H2AX 阳性细胞率下降最为明显(图 4)。

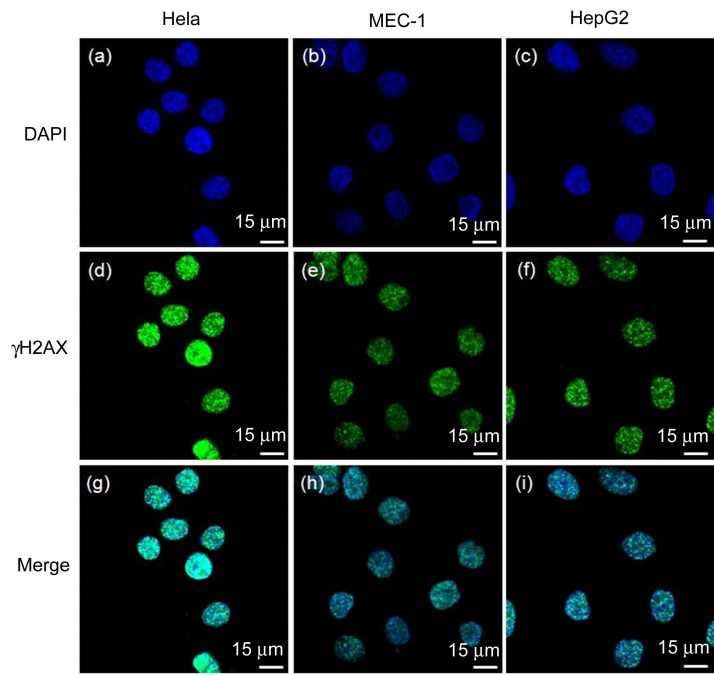


图 3 8 Gy 组 X 射线照射后 0.5 h 三株肿瘤细胞 γ H2AX 焦点形成图像
Fig.3 Digitized images of γ H2AX foci at 0.5 h after X-ray irradiation for 8 Gy group

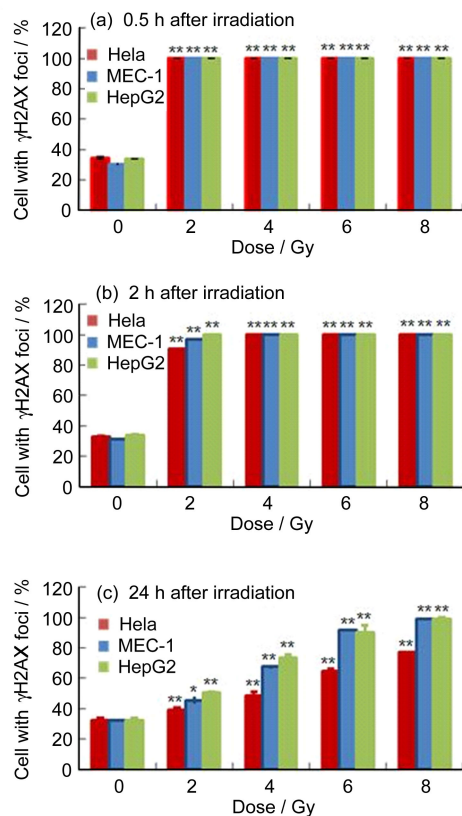


图 4 X 射线照射后三株肿瘤细胞 γ H2AX 焦点形成的时间和剂量效应
Fig.4 Time and dose effects of γ H2AX foci formation in X-ray irradiated HeLa, HepG2, and MEC-1 cell lines
 $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, compared with control group

3 讨论

放射治疗是目前肿瘤治疗的主要手段之一。肿瘤细胞对放射治疗的敏感性受各种因素的影响，其中，肿瘤组织的细胞类型是最主要的因素，而肿瘤细胞的增殖能力也起着很重要的作用^[11]。本研究选用不同组织来源的肿瘤细胞，研究 X 射线对三株肿瘤细胞的辐射敏感性。

克隆形成实验结果显示：各剂量组及照射后不同时间点均以 HeLa 细胞的 SF 最高；随着照射后时间的推移，三株细胞的 SF 均有所升高。该结果说明，与其它两株肿瘤细胞相比，HeLa 细胞对 X 射线具有更强的耐受性（图 1）。

进一步研究显示，肿瘤细胞对射线的敏感性与细胞的 DNA 损伤程度及修复能力密切相关。一般认为，射线可直接导致 DNA 损伤，同时使细胞中以及细胞间的水发生电离，产生大量氧自由基，间接产生 DNA 损伤进而导致细胞死亡^[12]。DNA 损伤类型中最严重的是 DNA 双链断裂(DNA double strand breaks, DSB)，如果修复不及时，可以引起染色体转位、遗传信息缺失，甚至细胞死亡^[13]。DNA 损伤的检测方法包括荧光原位杂交、彗星实验、高效毛细管电泳、序列凝胶电泳等，其中的中性彗星实验被广泛用于 DSB 检测^[6]。本实验以 TM 为彗星

实验的检测指标, 研究显示, X 射线诱导三株肿瘤细胞 DSB 呈现时间和剂量依赖关系, 均以照射后 4 h TM 变化最为明显。其中, 6 Gy 组的 X 射线照射 MEC-1 细胞后 4 h, TM 值高达 84.56, 说明相比于 HepG2 和 HeLa 细胞, MEC-1 细胞对 X 射线照射最为敏感($p < 0.05$); 就 HepG2 和 HeLa 细胞而言, 照射后 4 h HepG2 的 TM 值大于 HeLa 细胞($p < 0.05$), 这与上述克隆形成实验结果一致, 即 Hela 细胞对 X 射线具有更强的耐受性 (表 1)。

DNA 损伤应答(DNA damage response, DDR)是一个异常复杂的调控系统。当发生电离辐射造成 DSB 时, 磷脂酰肌醇-3-激酶样激酶家族(Phosphate-dyl-inositol-3-kinase-like protein kinases, PIKKs)成员: ATM(Ataxia telangiectasia mutated gene)、ATR(Ataxia-telangiectasia and Rad-3 related) 和 DNA-PK(DNA-dependent protein kinase)被激活, 动员一系列磷酸化级联反应, 启动应激系统, 活化 DDR 信号途径的下游分子, 如 γ H2AX、MRN、Chk2 和 p53 等, 进行 DNA 修复, 产生细胞周期阻滞或者启动凋亡程序^[14]。研究表明, 磷酸化组蛋白 H2AX (γ H2AX)是反映 DSB 的敏感性指标^[15], 且 γ H2AX 焦点与 DSB 的数量关系呈一一对应关系, γ H2AX 荧光染色是检测 DSB 存在的金标准^[16]。本课题组开展了一系列 γ H2AX 作为辐射和化疗敏感性指标的研究工作, 证实了 γ H2AX 是预测放化疗敏感性的有效研究参数^[17-18]。

本研究采用免疫荧光染色法对 γ H2AX 的表达进行检测。该方法可对 γ H2AX 形成的焦点数进行直观计数, 比传统的 DSB 检测方法操作更简便、灵敏度更高^[19-20]。实验结果显示: 照射后仅 0.5 h, γ H2AX 阳性细胞率在各照射剂量组均达到 100%, 且 100% 的高表达率持续到照射后 4 h; 照射后 24 h, 三株细胞 γ H2AX 阳性细胞率逐渐下降, 但是与对照组相比仍有显著性差异, 与其它两株细胞相比, Hela 细胞下降最为明显 ($p < 0.05$, 图 3), 说明 Hela 细胞对 DSB 修复最快, 证实了 Hela 细胞对 X 射线照射具有更强的耐受性。

综上所述, 克隆形成实验、中性彗星电泳和 γ H2AX 焦点检测法的联合使用能有效预测肿瘤细胞辐射敏感性。该研究为临床肿瘤的放射治疗提供了有益的参考依据。

参考文献

- 1 李国权, 谢冰冰, 陈英海, 等. β -榄香烯对人肺腺癌裸鼠移植瘤放疗增敏作用与 HIF-1 α CA IX 的相关性研究[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(6): 312-315. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2011.06.004.
LI Guoquan, XIE Bingbing, CHEN Yinghai, *et al.* Radiosensitization by β -elemene of transplanted lung adenocarcinoma cells in nude mice is related to the expression of HIF-1 α and CAIX[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2011, 38(6): 312-315. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2011.06.004.
- 2 钟军, 熊戴群, 罗辉, 等. 肿瘤细胞放射敏感性与放射诱导凋亡关系的研究[J]. 实用癌症杂志, 2007, 22(6): 560-564, 568.
ZHONG Jun, XIONG Daiqun, LUO Hui, *et al.* A primary investigation on relationship between radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in three tumor cell lines[J]. Practical Journal of Cancer, 2007, 22(6): 560-564, 568.
- 3 孙国贵, 王雅棣, 郑明民, 等. 锰超氧化物歧化酶过表达对食管癌 TE-1 细胞增殖及移植瘤生长的双向影响[J]. 肿瘤, 2011, 31(2): 99-105. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2011.02.002.
SUN Guogui, WANG Yadi, ZHENG Mingmin, *et al.* A two-way effect of MnSOD overexpression on proliferation of esophageal cancer cell line TE-1 and xenograft tumor growth[J]. Tumor, 2011, 31(2): 99-105. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2011.02.002.
- 4 Zhao J, Guo Z, Pei S, *et al.* pATM and γ H2AX are effective radiation biomarkers in assessing the radiosensitivity of $^{12}\text{C}^{6+}$ in human tumor cells[J]. Cancer Cell International, 2017, 17: 49. DOI: 10.1186/s12935-017-0419-5.
- 5 Zhao J, Guo Z, Zhang H, *et al.* The potential value of the neutral comet and γ H2AX foci assays in assessing radiosensitivity to carbon ion beams radiation therapy in human tumor cell lines[J]. Radiology and Oncology, 2013, 47(3): 247-257. DOI: 10.2478/raon-2013-0045.
- 6 Macphail S H, Banáth J P, Yu Y, *et al.* Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells[J]. Radiation Research, 2003, 159(6): 759-767. DOI: 10.1667/RR3003.
- 7 Yang J, Hooper W C, Phillips D J, *et al.* Regulation of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells

- infected with mycoplasma pneumoniae[J]. Infection and Immunity, 2002, **70**(7): 3649-3655. DOI: 10.1128/iai.70.7.3649-3655.2002.
- 8 张玉晶, 闫洁, 高远红, 等. 中性彗星分析法检测肿瘤细胞的放射敏感性[J]. 中国肿瘤, 2004, **13**(11): 731-734.
ZHANG Yujing, YAN Jie, GAO Yuanhong, *et al.* Neutral comet assay in detecting the intrinsic radiosensitivity of tumor cells[J]. China Cancer, 2004, **13**(11): 731-734.
- 9 刘秀玲, 王俐, 姜春花, 等. 硫胺素和核黄素对 H₂O₂ 诱导的 DNA 氧化损伤的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2009, **29**(9): 1049-1052.
LIU Xiuling, WANG Li, JIANG Chunhua, *et al.* Effects of thiamine and riboflavin on H₂O₂-induced DNA oxidative damage[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science), 2009, **29**(9): 1049-1052.
- 10 Daniel R, Ramcharan J, Rogakou E, *et al.* Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, **279**(44): 45810-45814. DOI: 10.1074/jbc.M407886200.
- 11 郭传玲, 王菊芳, 李文建, 等. 三种肿瘤细胞对γ射线辐射敏感性的比较[J]. 同位素, 2005, **18**(3): 164-166. DOI: 1000-7512(2005)03-0164-03.
GUO Chuanling, WANG Jufang, LI Wenjian, *et al.* Comparison of the radiosensitivity among three kinds of tumor cells irradiated with γ rays[J]. Journal of Isotopes, 2005, **18**(3): 164-166. DOI: 1000-7512(2005)03-0164-03.
- 12 畅磊, 周光明. 核仁的细胞辐射应激功能研究进展[J]. 原子核物理评论, 2011, **28**(1): 126-129.
CHANG Lei, ZHOU Guangming. Progress in studies on nucleolus functions[J]. Nuclear Physics Review, 2011, **28**(1): 126-129.
- 13 沈筱筠, 闫春兰, 杨军. DNA 双链断裂诱导的细胞损伤应答反应研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, **24**(6): 539-542. DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2010.06.018.
SHEN Xiaoyun, YAN Chunlan, YANG Jun. Progress in cellular responses to DNA double strands breaks[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2010, **24**(6): 539-542. DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2010.06.018.
- 14 赵晋, 郭忠, 马建秀. γH2AX 和 ATM 与内源性氧化剂所致 DNA 损伤关系的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2010, **30**(4): 437-441. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2010.04.035.
ZHAO Jin, GUO Zhong, MA Jianxiu. Progress in the research of relationship between γH2AX, ATM and DNA damage by endogenous oxidants[J]. Basic & Clinical Medicine, 2010, **30**(4): 437-441. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2010.04.035.
- 15 Rogakou E P, Pilch D R, Orr A H, *et al.* DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, **273**(10): 5858-68. DOI: 10.1074/jbc.273.10.5858.
- 16 Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, **100**(9): 5057-5062. DOI: 10.1073/pnas.0830918100.
- 17 郭忠, 赵晋, 薛同敏, 等. 醋酸棉酚诱导人粘液表皮样癌 MEC-1 细胞 DNA 双链断裂[J]. 生理学报, 2011, **63**(2): 164-170. DOI: 10.13294/j.aps.2011.02.014.
GUO Zhong, ZHAO Jin, XUE Tongmin, *et al.* Gossypol acetic acid induces DNA double-strand breaks in human mucoepidermoid carcinoma cell MEC-1[J]. Acta Physiologica Sinica, 2011, **63**(2): 164-170. DOI: 10.13294/j.aps.2011.02.014.
- 18 裴淑艳, 赵晋, 马影, 等. X 射线辐照诱导人神经胶质瘤细胞 DNA 双链损伤研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2017, **35**(4): 040201. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2017.rrj.35.040201.
PEI Shuyan, ZHAO Jin, MA Ying, *et al.* DNA double-strand breaks induced by X-ray irradiation in human glioma cells[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2017, **35**(4): 040201. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2017.rrj.35.040201.
- 19 Sedelnikova O A, Bonner W M. Gamma H2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence[J]. Cell Cycle, 2006, **5**(24): 2909-2913. DOI: 10.4161/cc.5.24.3569.
- 20 蒋超, 裴淑艳, 李上标, 等. γH2AX 分析技术研究应用进展[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2012, **33**(2): 83-86. DOI: DOI: 10.3969/j.issn.1009-2102.2012.02.018.
JIANG Chao, PEI Shuyan, LI Shangbiao, *et al.* Research and application progress of γH2AX analysis technology[J]. Journal of Northwest University for Nationalities (Natural Science), 2012, **33**(2): 83-86. DOI: 10.3969/j.issn.1009-2102.2012.02.018.