

文章编号: 1007-4627(2005)02-0208-04

人肝癌 SMMC-7721 细胞对低剂量 γ 射线 辐射超敏感性的研究*

金晓东^{1,2}, 李 强¹, 李文建¹, 王菊芳¹, 郭传玲^{1,2}, 郝冀芳¹

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要: 研究了人肝癌细胞 SMMC-7721 在低剂量 γ 射线照射下超敏感性和增强的辐射抗性响应。选用对数生长期细胞接受 0—6 Gy 不同剂量的 ^{60}Co γ 射线的照射。利用流式细胞仪对细胞进行分选计数, 并用克隆形成法检测细胞存活率。发现 SMMC-7721 细胞存在低剂量辐射超敏感性和增强的辐射抗性响应, 即在 0—0.3 Gy 之间细胞表现出单位剂量杀伤增强现象, 在 0.3—1 Gy 细胞表现一定的辐射抗性, 在 1 Gy 以上, 细胞的存活符合线性平方模型。

关键词: 辐射超敏感性; 增强的辐射抗性; 细胞克隆形成率; 细胞存活分数

中图分类号: R730; Q691

文献标识码: A

1 引言

自从常规克隆形成法^[1]提出以来, 人们对受较大剂量(大于 1 Gy)照射哺乳动物细胞的存活效应进行了广泛的研究, 然而将这种常规方法用于测量接受剂量小于 1 Gy 辐照后的细胞存活时, 由于细胞稀释、计数和接种等过程中的随机误差, 使得该法并不能准确测量细胞较高存活水平下的存活率。因而低剂量(小于 1 Gy)下哺乳动物细胞存活曲线通常由较高剂量下得到的细胞存活实验数据外推来确定。这样得到的低剂量下细胞存活规律与在较高剂量时对实验数据拟合的线性平方(LQ)模型有关, 因而它的有效性常被人们所质疑。

越来越多的事实说明, 哺乳动物细胞的低剂量辐照存活响应远比人们想象的复杂。近年来发展的新技术, 如动态显微扫描成像技术(DMIPS)^[2]和流式细胞术(FCM)^[3]等, 提高了细胞存活测量的精度, 使得直接测定小剂量(小于 1 Gy)辐照下的存活规律成为可能。用前一种方法, 1993 年 Marples 和 Joiner^[4]在用 X 射线照射中国仓鼠 V79-379A 细胞时, 发现当剂量低于 0.6 Gy 时, 细胞存活低于 LQ 模型由 1 Gy 以上辐照时得到的数据的外推值, 而

且剂量在 0.6—1.0 Gy 时, 细胞表现出辐射抗性的增加, 当剂量大于 1 Gy 时其存活符合 LQ 模型。随后研究者又在 HT29 细胞^[3]和 T98G 细胞^[5]等细胞系中发现了类似的现象。

随着研究的深入, Marples 等^[4]将剂量低于 1 Gy 时, 单位剂量细胞杀伤增强的现象定义为低剂量辐射超敏感性(HRS), 将随后出现的抗性增强的现象定义为增加的辐射抗性(IRR)。

到目前为止, 在不同的实验室有超过 40 种细胞系用不同种类的射线照射时, 用上述两种分析方法都证实了 HRS/IRR 的存在^[6]。

本文采用流式细胞仪对照射后的 SMMC-7721 细胞进行分选, 以达到精确计数的目的, 从而测量 SMMC-7721 细胞的低剂量反应。

2 材料与方法

实验所用的人肝癌 SMMC-7721 细胞购自北京肿瘤研究所, 培养基为含 10% 胎牛血清(杭州四季青)的 RPMI-1640(GIBCO)培养液, 置于 37℃, 5% CO_2 培养箱中培养。

细胞在照前 24 h 接种于培养瓶中。用兰州大学

收稿日期: 2004 - 11 - 01; 修改日期: 2004 - 12 - 20

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10205021)

作者简介: 金晓东(1976—), 男(汉族), 陕西蓝田人, 硕士研究生, 从事放射性生物研究; E-mail: jinxd@impcas.ac.cn

第一医院放疗科的 ^{60}Co 源进行 γ 射线辐照。 γ 射线直接照射培养瓶。剂量率为 17.98 cGy/min 。设 $0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5$ 和 6 Gy 共14个剂量点。照射时细胞浓度大约为 $8 \times 10^6\text{ cells/ml}$, 实验重复三次。

细胞照射后, 经胰蛋白酶消化, 利用流式细胞仪的前向光和侧向光设定分选门, 对细胞进行精确计数, 以100个细胞/皿的浓度接种于 $\phi 60$ 培养皿中, 放置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\%\text{CO}_2$ 培养箱。培养7天后, 用PBS冲洗, 经甲醇/醋酸固定液固定, 用Giemse进行染色, 统计细胞数大于50个的克隆。

3 结果与讨论

图1给出了非同步化的SMMC-7721细胞经 γ 照射后的存活曲线。

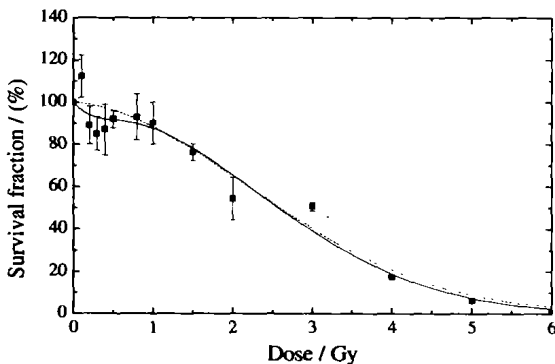


图1 γ 射线照射后SMMC-7721细胞的剂量存活曲线
—表示线性平方模型的拟合曲线, -表示修正的诱导修复模型的拟合曲线。

可以看到, 剂量在 $0.1-0.3\text{ Gy}$ 之间, 细胞存活率下降的很快, 0.3 Gy 时单位剂量杀伤率为 0.5 Gy^{-1} , 随着剂量的增加曲线变得平滑, 这说明细胞的辐射抗性增加, 而在 1 Gy 时抗性达到最大, 单位剂量杀伤率为 0.1 Gy^{-1} 。随着剂量的继续增加, 细胞表现出高剂量存活特征, 曲线出现明显的肩区, 符合LQ模型。这与Marple等^[4]报道的V79细胞受低剂量照射的情况相类似, V79细胞单位剂量失活率在 1 Gy 时为 0.19 Gy^{-1} , 而在 0.1 Gy 时为 0.37 Gy^{-1} 。这些实验现象说明SMMC-7721细胞和V79细胞一样, 也存在HRS和IRR。另外, 需指出是 0.1 Gy 处存活率升高可能是超低剂量的兴奋效应所致。

图1同时也给出了根据不同公式拟合出的存活

曲线。其存活在高剂量区($1-6\text{ Gy}$)符合LQ模型, 方程为

$$SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2)^{[7]}, \quad (1)$$

其中, α 为起始斜率, 决定低剂量照射下损伤的程度, β 为效应的超线性部分, 它的贡献随照射剂量的增加而加大, D 为照射剂量。

然而当剂量低于 1 Gy 时, SMMC-7721细胞的存活与LQ模型由高剂量得到的低剂量外推值相差很大, 我们运用Marple和Joiner^[8]于1995年提出的修正的诱导修复模型(MIRM)来拟合细胞存活曲线。他们给出的公式是:

$$SF = \exp(-\alpha^* D - \beta D^2),$$

$$\alpha^* = \alpha_{\text{res}} \left[1 + \left(\frac{\alpha_{\text{sen}}}{\alpha_{\text{res}}} - 1 \right) \exp\left(-\frac{D}{D_c}\right) \right], \quad (2)$$

式中, α_{res} 是在较高剂量照射下存活的剂量响应值, α_{sen} 是在低剂量实验中实际获得的剂量响应值。在低剂量时, $\alpha_{\text{sen}} > \alpha_{\text{res}}$, 这意味着在低剂量下敏感性的增加, 并且 $\alpha_{\text{sen}}/\alpha_{\text{res}}$ 的比值表征细胞HRS的强弱。 D_c 是转变剂量点, 在这一点上实现了HRS向IRR的转变。对于具有HRS/IRR性状的细胞, D_c 是大于零的, 且随着射线LET的增大而减小^[9]。

拟合的各个参数值见表1, 其中V79的数据是由Tsoulou等^[10]实验得到的。由表1中的数据可以计算出SMMC-7721细胞的 $\alpha_{\text{sen}}/\alpha_{\text{res}} = 16.5$, 而V79细胞的 $\alpha_{\text{sen}}/\alpha_{\text{res}} = 6.8$, 这说明SMMC-7721细胞的超敏感性响应比V79的明显。

表1 SMMC-7721和V79细胞用MIRM模型拟合的存活曲线的参数

细胞	$\alpha_{\text{res}}/\text{Gy}^{-1}$	$\alpha_{\text{sen}}/\text{Gy}^{-1}$	D_c/Gy	β/Gy^{-2}
SMMC-7721	0.034	0.56	0.33	0.09
V79	0.27	1.83	0.44	0.02

还有一点令人感兴趣, 就是 $\alpha_{\text{sen}}/\alpha_{\text{res}}$ 的比值与 2 Gy 分次照射的存活有着微弱的联系, 即对于 2 Gy 照射表现出抗性的细胞, 有非常明显的低剂量HRS效应, 而缺乏HRS响应的细胞 2 Gy 照射时表现出高的辐射敏感性^[8]。如果将这个特征应用到治疗中, 有可能取得很好的效果。

自从HRS/IRR发现以来, 人们提出各种各样的假说来解释这一现象。目前比较一致的看法是认

为低于一定剂量所引起的 DNA 双链断裂 (DNA DSBs) 损伤不像在高剂量下一样能被细胞识别和修复, 因此在此剂量区间表现出辐射的敏感性表型 (HRS)。也就是说, 细胞固有的修复机理在此剂量以下照射时尚不活跃或效率低下, 而高于此剂量则细胞启动 DNA-PK 依赖型非同源末端加入 (NHEJ) 途径, 对 DNA DSBs 进行修复, 此时细胞表现出辐射的抗性 (IRR)^[11]。

在此次实验中 SMMC-7721 细胞的这一阈值剂量为 0.33 Gy, 而文献[10]中 V79 细胞为 0.44 Gy, 这说明与 V79 细胞相比, SMMC-7721 细胞的损伤确认途径比较灵敏, 较小剂量引起的 DNA DSBs 就可以启动某些分子途径, 从而对损伤进行修复。损伤确认灵敏性的差异跟细胞本身的特性有关, 具体过程还有待进一步的研究。

当然, 这一假说还存在许多不完善的地方, 例如对于损伤确认分子就有聚 ADP 核糖聚合酶

(PARP)^[12] 和毛细血管扩张共济失调突变 (ATM) 激酶^[13] 两种不同的看法。还有一些实验表明, γ -H2AX (一种磷酸化的组蛋白)^[14] 在损伤确认过程中也可能起了一定的作用。还有人发现, 在 HRS/IRR 中有轻微的 G2/M 期阻滞^[15], 但是还没有得到确认。因此还需要对这一现象的机理进行深入的探讨。

4 结束语

恶性肿瘤是当前危害人类健康的主要疾病之一。HRS/IRR 这一实验现象的发现为国内外学者在肿瘤治疗方面提供了一条新的思路。本工作表明, 在低剂量电离辐射作用后, 人肝癌细胞 SMMC-7721 有较明显的 HRS 响应, 该研究为这种肿瘤的放疗提供了一定的科学依据。

参 考 文 献:

- [1] Puck T T, Marcus P I. *J Exp Med*, 1956, **103**: 653.
- [2] Padinger I S, Palcic B. *Int J Radiat Biol*, 1993, **63**: 183.
- [3] Wouters B G, Skarsgard L D. *Radiat Res*, 1994, **138**: S76.
- [4] Marples B, Joiner M C. *Radiat Res*, 1993, **133**: 41.
- [5] Short S, Mayes C, Woodcock M, *et al.* *Int J Radiat Boil*, 1999, **75**: 847.
- [6] Short S, Woodcock M, Marples B, *et al.* *Int J Radiat Boil*, 2003, **79**: 99.
- [7] 夏寿萱主编. 放射生物学. 北京: 军事医学科学出版社, 1998, 60.
- [8] Joiner M C, Marples B, Lambin P, *et al.* *Int J Radiat Boil*, 2001, **49**: 379.
- [9] Marples B, Joiner M C. *Radiat Res*, 1995, **141**: 160.
- [10] Tsoulou E, Baggio L, Cherubini R, *et al.* *Int J Radiat Boil*, 2001, **77**: 1 133.
- [11] Marples B, Wouters G B, Collis S J, *et al.* *Radiat Res*, 2004, **161**: 247.
- [12] Herceg Z, Wang Z Q. *Mutat Res*, 2001, **477**: 97.
- [13] Bakkenist C J, Kastan M B. *Nature*, 2003, **421**: 99.
- [14] Rothkamm K, Lobrich M. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2003, **100**: 5 057.
- [15] Marples B, Wouters B G, Joiner M C. *Radiat Res*, 2003, **160**: 38.

Study on Hyper-radiosensitivity Effect of Human Hepatoma SMMC-7721 Cells Exposed to Low Dose γ -rays*

JIN Xiao-dong^{1, 2}, LI Qiang¹, LI Wen-jian¹, WANG Ju-fang¹, GUO Chuan-ling^{1, 2}, HAO Ji-Fang¹

(1 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The low-dose responses such as hypersensitivity and increased radio-resistance of human hepatoma SMMC-7721 cells were studied in this work. Exponentially growing SMMC-7721 cells were irradiated

* Foundation item: National Natural Science Foundation of China(10205021)

with ^{60}Co γ -rays at doses of 0—6 Gy. Together with flow cytometer for precise cell sorting, cell survival fractions were measured by means of conventional colony-formation assay. It has been found that the SMMC-7721 cells showed hyper-radiosensitivity response at low doses and increased radio-resistance at larger single doses. There was an excessive cell killing per unit dose when the doses were below about 0.3 Gy, and the cells exhibited more resistant response at the doses between 0.3 and 1.0 Gy. When the single dose was beyond 1.0 Gy, the cell survival agreed well with the prediction of the commonly accepted linear-quadratic model.

Key words: hypersensitivity; increased radio-resistance; colony-formation assays; survival fraction

(上接第 199 页)

- [8] ICRP Publication 74, Conversion Coefficients for Use in Radiological Protection Against External Radiation, Edited by ICRP, 1996.

MCNPx Calculation of Neutron Response for an Extended Range Neutron Rem Meter

SU You-wu, ZHU Xiao-long, Li Wu-yuan

(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The responses of two extended neutron rem counters as function of neutron energy was calculated. Monte Carlo code, MCNPx, was applied in the calculations. Isotropic neutron incidence was employed. The results show that the neutron response is independent on thickness of lead layer at low energies, and it is clearly increased with thickness of lead layer at high energies. Although the shape of the response curve does not completely agree with the $H^*(10)$ curve in ICRP 74 report, the results obtained give good bases for the practical use of the new instrument in high-energy neutron fields.

Key words: MCNPx; high energy neutron; rem counter