文章编号：1007－4627(2005)02－0216－03

低剂量辐射诱导 hep G2 细胞克隆存活和细胞周期适应性反应*

夏景光[1,2]，李文建[1]，王菊芳[1]，郭传玲[1]，魏　巍[1,2]，杨建设[1,2]

(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：以低剂量 γ 射线(0.05 Gy)预照射人肝癌细胞 hep G2，8 h 后再用高剂量(3 Gy)照射，测定了细胞的克隆存活率和细胞周期。结果表明，低剂量辐射预处理可诱导 hep G2 细胞产生克隆存活适应性反应、并且有助于细胞通过 G_2/M 期阻滞；低剂量辐射诱导的克隆存活适应性反应与增强的通过细胞周期阻滞的能力之间有一定的相关性。

关 键 词：低剂量辐射；细胞周期阻滞；适应性反应

中图分类号：Q691　　**文献标识码**：A

1　引言

低剂量电离辐射可诱导辐射适应性反应，即低剂量辐射预处理可以增强细胞对单纯高剂量照射的抵抗能力、如降低染色体畸变程度和基因突变频率、增强免疫反应能力、提高细胞的克隆存活率等[1,2]。适应性反应的产生涉及到清除辐射敏感的细胞亚群、激活 DNA 修复活性以及增强细胞通过细胞周期阻滞的能力[3]。有实验表明，低剂量 X 射线(0.075 Gy)预照射淋巴瘤细胞 EL-4 可减轻攻击剂量导致的凋亡和 G1 期阻滞[4,5]。也有实验表明，适应性反应与细胞周期的改变没有必然的联系。在酵母细胞中，适应性反应的产生主要依赖细胞重组修复能力的提高，而不一定需要细胞周期发生改变[6]。本实验用 0.05 Gy γ 射线预照射人肝癌细胞 hep G2，然后用 3 Gy γ 射线照射，进一步探讨克隆存活适应性反应与细胞周期阻滞之间的相关性。

2　材料和方法

2.1　细胞培养和 γ 射线照射

人肝癌细胞系 hep G2 购自中国典型培养物保藏中心(中国武汉)。细胞培养基为 RPMI1640(含 10%新生牛血清，100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 硫酸链霉素)，接种于培养瓶中的细胞置于 37 ℃，在含 5% CO_2 的湿润气体环境下培养。采用兰州大学医学院第一附属医院的 ^{60}Co γ 射线(剂量率为 0.30 Gy/min)对指数生长期的细胞进行如下照射：低剂量(0.05 Gy)照射，高剂量(3 Gy)照射以及 0.05 Gy照射后 8 h 再用 3 Gy 照射，同时设未照射的对照组。照射后一定时间取样，每种处理每一时间点取两个样品，每个实验至少重复一次。

2.2　细胞克隆存活率测定

电离辐射后，消化细胞并记数。取一定数目的细胞接种于 60 mm 培养皿中，置于 37 ℃培养 10 d 左右，弃掉培养基，PBS 小心清洗，甲醇固定，8% Giemsa 染色，记数大于 50 个细胞的集落数。

2.3　细胞周期的测定

照射后一定时间，收集细胞，取含 1×10^6—2×10^6 个细胞的悬液，离心，用 PBS 溶液将其清洗一次，75%冰冷乙醇固定，在－20 ℃下保存待用。已固定的细胞，离心，吸弃乙醇，沉淀用 500 μl PI 溶液(50 μg/ml)重悬，加 RNAase(1 mg/ml) 2 μl，在 37 ℃暗处存放 30 min 或 4 ℃暗处过夜，DNA 含

收稿日期：2004－09－01；**修改日期**：2004－11－03

* **基金项目**：国家自然科学基金资助项目(10335050)；国家重大基础研究专项资助项目(2003CCB00200)

作者简介：夏景光(1972－)，男(汉族)，湖南岳阳人，博士研究生，从事辐射生物学研究；
E-mail：xiajingguang@hotmail.com

量用美国贝克曼库尔特公司的流式细胞仪(Coulter Epics XL™)测定，数据分析软件为 Muticycle。

3 结果

3.1 低剂量辐射预处理促进 hep G2 细胞通过 G_2/M 期阻滞

指数生长期的细胞用 0.05 Gy γ 射线照射后，在 37 ℃放置 8 h，然后用 3 Gy 高剂量照射，高剂量照射后 12 h 测定细胞周期。单纯高剂量照射后，hep G2 细胞在 G_2/M 期明显累积，其百分比为 33.1%，但经过 0.05 Gy 预照射的细胞其 G_2/M 期细胞百分比为 29.2%，有一定程度的下降，两者之间的差异显示度 $p<0.05$。结果说明，低剂量辐射预处理有助于细胞通过 G_2/M 期阻滞。

3.2 低剂量 γ 射线诱导 hep G2 细胞产生克隆存活适应性反应

存活分数是处理组的细胞克隆存活率与对照组的细胞克隆存活率的比值。在 3 Gy γ 射线单独照射组和 0.05 Gy 预照射组中，hep G2 细胞的克隆存活分数分别是 24.7 %和 30 %，两者之间的差异显示度 $p<0.01$，说明低剂量辐射预处理可以明显提高细胞的克隆存活率。

3.3 低剂量 γ 射线对 hep G2 细胞周期和生长的影响

图 1 显示的是 0.05 Gy γ 射线辐射后，hep G2 细胞的 G_2/M 期百分比随时间的变化。与对照处理相比，辐射后 4 h 其 G_2/M 期细胞有比较明显的累积，增加了 25.7%，之后与对照处理基本没有差别。这表明低剂量辐射能导致肿瘤细胞 hep G2 在 G_2/M 期发生短暂延迟，这一结果说明小至 0.05 Gy 的辐射对细胞造成的损伤即可改变细胞周期进程，也说明 G_2/M 期检查点对辐射损伤非常敏感。

我们还进一步研究了低剂量电离辐射对肿瘤细胞生长的影响。将约 1×10^5 个细胞接种于培养皿中，在 37 ℃下培养 24 h，然后用 0.05 Gy γ 射线照射，照射后一定时间测定细胞数目，对照的细胞数规定为 1，得出辐照后 24 和 48 h 的相对细胞数分别为 1.24 和 2.16。结果说明，0.05 Gy γ 射线照射能明显促进细胞的增殖。上述结果说明，低剂量电离辐射后，hep G2 细胞经过一个短暂的延迟阶段(约 4 h)后增殖速度加快。

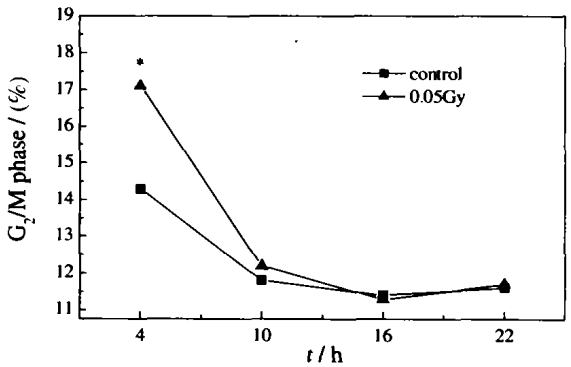

图 1　0.05 Gy γ 射线辐射后 hep G2 细胞的 G_2/M 期百分比随辐照后时间的变化(与对照相比，* $p<0.05$)

4 讨论

低剂量辐射能激活 PKC 和 MAPK 等蛋白激酶，而这些蛋白激酶介导的信号传导通路参与 DNA 损伤的修复、细胞的增殖和凋亡，被认为是适应性反应产生的主要机制[3,7]。有实验表明，很低剂量的 X 射线(0.02—0.05 Gy)激活 MAPK 途径，促进细胞的增殖[8]. 本实验结果显示，低剂量电离辐射能引起 hep G2 细胞周期短暂延迟(辐射后 4 h)，然后促进细胞生长。这可能说明，低剂量辐射对细胞造成的损伤较轻，容易被修复，而低剂量辐射激活的信号传导途径刺激了细胞的生长。有实验[9]表明，电离辐射激活有丝分裂原激活的蛋白激酶 2(MEK2)，且 MEK2 是电离辐射后细胞通过 G_2/M 检查点阻滞所必需的，显性负突变的 MEK2 增加细胞对电离辐射的敏感性，降低细胞从 G_2/M 检查点阻滞中恢复的能力. 因此推测，正是由于低剂量辐射诱导体系的表达提高了细胞修复损伤的能力，使细胞更容易通过高剂量辐射导致的细胞周期阻滞，从而提高了细胞的克隆存活率。

参 考 文 献：

[1] Stecca C, Gerber G B. Biochemical Pharmacology, 1998, 5: 941.

[2] 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 2003, **23**(6): 393.
[3] Bodnarchuk I A. Radiats Biol Radioecol, 2003, **43**: 19.
[4] 鞠桂芝, 苏 旭, 范 冰等. 中华放射医学与防护杂志, 1998, **18**(3): 148.
[5] 鞠桂芝, 范 冰, 苏 旭等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1997, **15**(3): 183.
[6] Dolling J A, Boreham D R, Bahen M E, *et al*. Int J Radiat Biol, 2000, **76**(9): 1 273.
[7] Shimizu T, Kato T, Tachibana A, *et al*. Experimental Cell Research, 1999, **251**: 424.
[8] Suzuki K, Kodama S, Watanabi M. Cancer Research, 2001, **61**: 5 396.
[9] Abbott D W, Holt J T. Journal of Biological Chemistry, 1999, **274**(5): 2 732.

Adaptive Response for Survival and Cell Cycle Arrest Induced by Pre-irradiation with Low Dose of γ-ray to hep G2 Cells*

XIA Jing-guang[1,2], LI Wen-jian[1], WANG Ju-fang[1], GUO Chuan-ling[1], WEI Wei[1,2], YANG Jian-she[1,2]

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou* 730000, *China*;
2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*)

Abstract: Human hepatoma cells hep G2 were irradiated with 3 Gy of γ-ray 8 hours after primed with 0.05 Gy of γ-ray, thereafter, cell survival and cell cycle were determined. The results indicated that both survival adaptive response and the enhanced ability to overcome G_2/M arrest could be induced by pre-irradiation with low dose of γ-ray. It is suggested that there is a certain correlation between the survival adaptive response and the enhanced ability to overcome cell cycle arrest.

Key words: low dose radiation; cell cycle arrest; adaptive response

* **Foundation item**: Major Subject of National Natural Science Foundation of China(10335050); Early Phase Study for Key Basic Research Project of China(2003CCB00200)

重要更正:

(1)第 22 卷第 1 期中文目次 ii 页的第一行前应加"$LaFeO_3$ 纳米材料电四极超精细相互作用 TDPAC 测量……杜恩鹏,葛智刚, 郑永男, 周冬梅,"。

(2)第 22 卷第 1 期第 44 页第 4 行作者单位中的"甘肃 北京"应改为"甘肃 兰州"。