

文章编号: 1007-4627(2006)03-0322-04

# 呼吸缺陷型酵母菌株的离子束辐射敏感性研究\*

毛淑红<sup>1,2</sup>, 靳根明<sup>1</sup>, 卫增泉<sup>1</sup>, 颀红梅<sup>1</sup>

(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 100049)

**摘要:** 选取一株由离子束辐照诱变获得的呼吸缺陷型酵母菌株, 研究其在不同离子辐照剂量范围的辐射敏感性。结果发现, 呼吸缺陷型酵母菌株因其线粒体及线粒体 DNA 发生突变, 在离子束辐照时, 在低剂量区域表现出较高辐射敏感性, 在高剂量区则表现出对于辐射的抗性。

**关键词:** 呼吸缺陷型; 线粒体 DNA; 细胞凋亡; 辐射敏感性

**中图分类号:** Q937      **文献标识码:** A

## 1 引言

电离辐射诱发细胞的凋亡或坏死是无可争议的事实, 但对其机制有不同的认识, 而且不同种类的细胞对电离辐射的敏感性也有明显的差别。研究表明, 低剂量电离辐射导致细胞死亡的主要机制是细胞凋亡<sup>[1]</sup>。引起凋亡的途径可能有二: 一是电离辐射在细胞质中产生许多自由基, 主要是活性氧自由基(ROS)<sup>[2]</sup>, 它不仅可引起核 DNA 的单链和双链断裂, 导致变异, 而且还可以引起细胞的凋亡; 二是低剂量电离辐射改变了由线粒体介导的细胞凋亡信号通路, 促使细胞色素 c 或其它促凋亡因子释放到细胞质, 从而启动凋亡程序<sup>[3-5]</sup>。高剂量辐射则主要以直接和间接的方式引起细胞坏死。

呼吸缺陷型酵母菌株是一类酵母线粒体 DNA 发生突变的菌株, 其糖酵解酶系和醇脱氢酶系的活性很高, 利用它可提高发酵能力, 增加酒精产量<sup>[6, 7]</sup>, 因此在实际生产中倍受重视。但是, 与正常的酵母菌株相比, 它对电离辐射的敏感性有什么变化, 在不同的剂量区(低剂量区和高剂量区)的表现有何差异? 这些都是需要深入研究的问题。我们选用通过重离子辐照获取的呼吸缺陷型酵母菌株, 再经不同剂量的重离子辐照后测其存活曲线。结果表明, 在低剂量区( $< 1$  Gy), 呼吸缺陷型酵母菌株的存活率明显低于野生菌株, 而在高剂量区( $> 1$  Gy), 呼吸缺陷菌株的存活率则高于野生菌株。这

表明呼吸缺陷型酵母菌株对于重离子束的再次辐照在低剂量区呈现出较高的敏感性, 而在高剂量情况下又呈现一定的抗性<sup>[8]</sup>。

## 2 材料与amp;方法

实验菌株为啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 由兰州黄河啤酒厂提供。利用能量为 5.19 MeV/u 的<sup>22</sup>Ne<sup>5+</sup>辐照啤酒酵母菌株, 采用 2-, 3-, 5-氯化三苯基四氮唑(TTC)筛选培养基快速筛选呼吸缺陷型酵母菌株。通过一种新型而简便的线粒体 DNA 限制性酶切分析手段(mtDNA RFLP), 对候选的呼吸缺陷型酵母菌株进行遗传学快速鉴定。菌株的培养与呼吸缺陷型酵母菌株的筛选及限制性酶切分析实验操作见文献<sup>[9]</sup>。本次实验所选用的呼吸缺陷型酵母菌株是在注量为  $6 \times 10^5$  ion/cm<sup>2</sup> 离子束辐照后筛选获得的。

将对数生长期的细胞(浓度分别为野生型  $2 \times 10^4$  cell/ $\mu$ L, 缺陷型  $1 \times 10^4$  cell/ $\mu$ L)置于 200  $\mu$ L 离心管中, 利用兰州重离子研究装置提供的能量为 80.55 MeV/u 的<sup>12</sup>C<sup>6+</sup>进行辐照, 设 0, 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 2.4, 4.8, 6, 8 和 10 共 14 个剂量点, 剂量率 0.2 Gy/min, 每个注量点 3 个平行样, 分次实施照射。

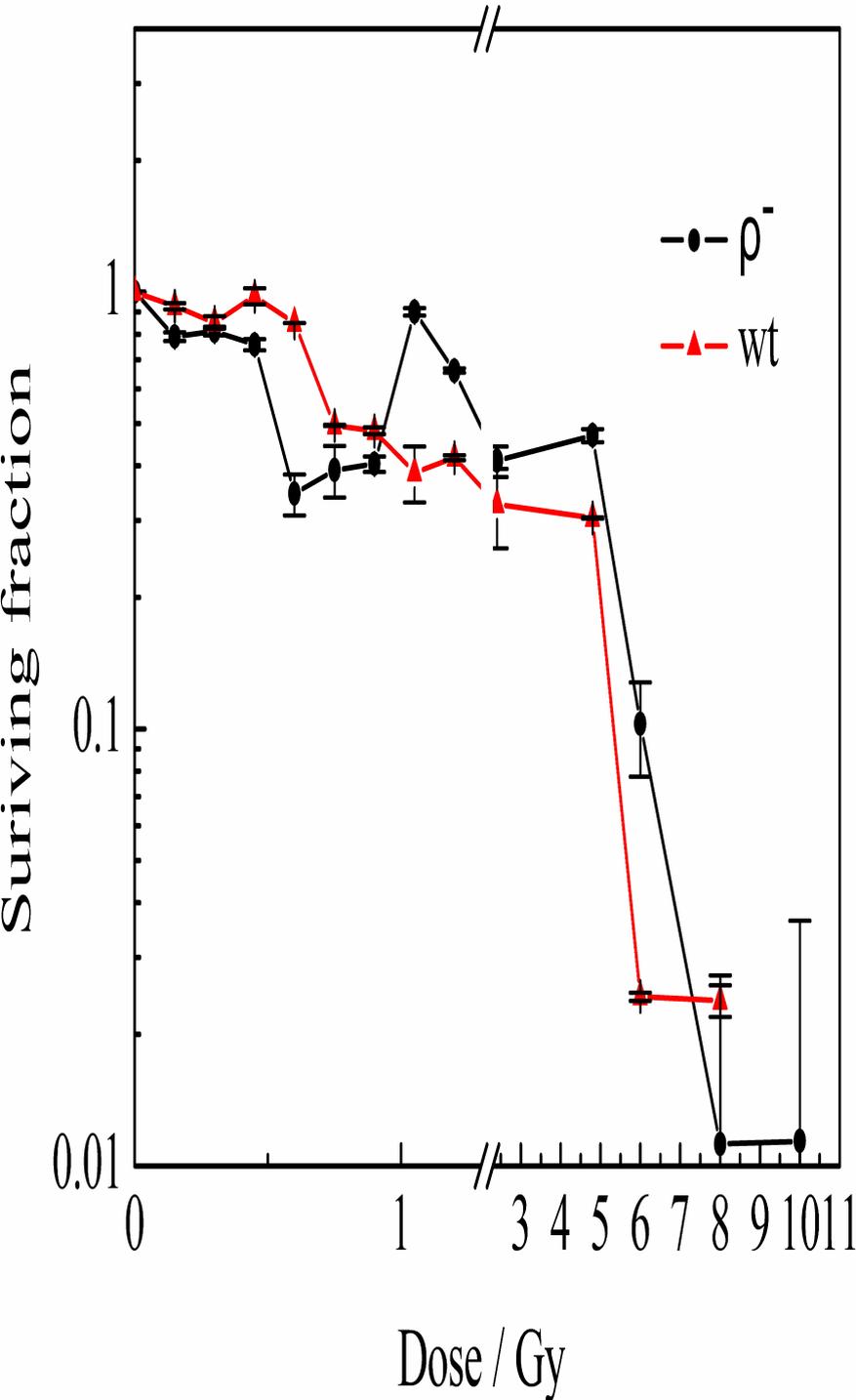
将辐照后的细胞按一定比例稀释, 涂 YPD 平板, 28  $^{\circ}$ C 培养 72 小时, 统计菌落数目并计算两种

\* 收稿日期: 2006-03-17; 修改日期: 2006-06-23

作者简介: 毛淑红(1977-), 女(汉族), 河南新郑人, 博士, 从事放射生物学研究; E-mail: shuhongmao@126.com

酵母细胞辐照后的存活率。

0.023; 1.05 Gy,  $P=0.009$ ; 1.2 Gy,  $P=0.019$ 。



感；在中高剂量范围，其存活率又比野生型菌株高，表现出对离子束辐照的耐受性。本实验数据具有统计学意义：0.6 Gy,  $P=0.028$ ; 0.75 Gy,  $P=$

图 2 呼吸缺陷型和野生型啤酒酵母经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照后的存活曲线

## 4 讨论

重离子束辐射可以引起细胞各种生物学效应并导致细胞死亡<sup>[10-12]</sup>,而凋亡被认为是辐射致死的主要形式之一。线粒体 DNA 的突变可能影响辐射诱导的细胞凋亡,这与线粒体介导的细胞凋亡信号转导途径密切相关。线粒体通过释放细胞色素 c,在 ATP 或 dATP 的协同作用下与凋亡蛋白酶活化因子 I (apoptosis protease activating factor I, 简称 Apaf I) 结合,激活细胞质中的细胞凋亡执行分子 (caspases) 在细胞凋亡中发挥中心调控作用<sup>[4]</sup>。Bcl-2 家族主要包括抑制凋亡成员及促凋亡成员,这些蛋白三维结构的变化对细胞色素 c 的释放起重要的调控作用<sup>[13, 14]</sup>。另有研究表明,电离辐射产生的过量 ROS 可激活线粒体膜上的非特异性转运孔道,使线粒体的通透性增大,释放出细胞色素 c,诱发凋亡<sup>[15]</sup>。

对于呼吸缺陷型和野生型酵母菌株来讲,同一剂量的离子束辐照细胞时产生的自由基(主要是 ROS,来源于对水的辐照)应该基本相同,这些自由基对 caspases 和线粒体 DNA 的作用机制不会因菌株的不同而变化。但由于呼吸缺陷型酵母菌株结构与功能的变化导致它对于自由基的损伤效应反应不同。呼吸缺陷型酵母菌株其线粒体 DNA 发生变化,可能导致线粒体膜功能变化以及 Bcl-2 家族表达异常,从而影响辐射诱导的凋亡。另外,离子束辐照不仅引起酵母细胞线粒体 DNA 的突变,同时也改变了细胞修复损伤的能力<sup>[16]</sup>,使呼吸缺陷型酵母菌株在不同剂量区表现出不同的辐射敏感性。

低剂量离子束辐照下,离子束直接作用于线粒

体膜上,或通过酵母细胞相互作用过程中产生高密度的电离激发事件使线粒体膜电位发生改变,或激活线粒体膜上的非特异性转运孔道使线粒体通透性增大,释放出细胞色素 c,细胞进入凋亡进程。呼吸缺陷型酵母菌株由于线粒体发生变化,其损伤修复系统对于低剂量离子束辐照引起的早期凋亡进程几乎没有响应,而野生型菌株对于离子束的辐照能够很快启动修复表达调节系统,阻止凋亡的进行。因此呼吸缺陷型酵母菌株比野生型菌株对于离子辐射较敏感。

低剂量辐照下细胞凋亡是造成细胞死亡的主要原因,但有实验证明细胞的凋亡随剂量增大将达到饱和。因此,大剂量重离子束辐射造成细胞死亡,在很大程度上归结于 DNA 双链断裂引起细胞坏死。但受到离子束辐照后的呼吸缺陷型酵母菌株,对于中高剂量辐射表现抗性,其原因可能主要与细胞的修复能力有关。呼吸缺陷型酵母菌株是经过电离辐射后完成修复过程的菌株,它的修复能力可能得到了提高。研究表明<sup>[17]</sup>,线粒体 DNA 很容易受到自由基损伤,但受到损伤后的线粒体 DNA 也会对自由基的损伤产生抗性。关于呼吸缺陷型酵母菌株在大剂量辐照作用下的修复机制和修复能力还有待于进一步的研究。

总之,选用离子束辐照后筛选出来的呼吸缺陷型酵母菌株在不同剂量下进行再次辐照,与野生型酵母菌株相比,呼吸缺陷型酵母菌株对于低剂量重离子束辐照比较敏感,而在高剂量情况下又呈现一定的抗性。这主要与线粒体 DNA 的突变而造成线粒体功能的异常及细胞修复能力的变化有关。

## 参 考 文 献:

- [1] Shinomiya N. *J Cell Mol Med*, 2001, **5**: 240.
- [2] Madeo F, Frohlich E, Ligr M, *et al.* *J Cell Biol*, 1999, **145** (4): 757.
- [3] 刘光伟, 龚守良. 国外医学: 放射医学核医学分册, 2003, **27** (2): 90.
- [4] Acehan D, Jiang X, Morgan D G, *et al.* *Mol Cell*, 2002, **9**: 423.
- [5] Wang X D. *Genes Dev*, 2001, **15**: 2 922.
- [6] Lee H C, Yin P H, Yu T N, *et al.* *Mutat Res*, 2001, **493**: 67.
- [7] Ferguson L R, von Borstel R C. *Mutat Res*, 1992, **265**: 103.
- [8] Marples B, Joiner M C. *Radiat Res*, 1993, **133**: 41.
- [9] 毛淑红, 靳根明, 卫增泉等. 核技术, 2005, **11**: 845.
- [10] 杨建设, 李文建, 赵 靖等. 原子核物理评论, 2005, **22**(2): 212.
- [11] 王菊芳, 李文建. 原子核物理评论, 2004, **21**(1): 48.
- [12] 赵 靖, 李文建, 高清祥等. 原子核物理评论, 2004, **21**(1): 53.
- [13] Daniel J C, Smythe W R. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, **16**: 19.
- [14] Antonsson B, Martinon J C. *Exp Cell Res*, 2000, **256**: 50.
- [15] Chen Q, Gong B, Almasan A. *Cell Death Differ*, 2000, **7**

(2): 227.

[16] 夏景光, 李文建, 王菊芳等. 原子核物理评论, 2005, **22**(2): 216.

[17] Darlene D, Marcia M, Judith M, *et al.* Free Radical Biology & Medicine, 2002, **33**(9): 1 209.

## Study on Ionizing Radiosensitivity of Respiratory Deficiency Yeast Mutants

MAO Shu-hong<sup>1,2</sup>, JIN Gen-ming<sup>1</sup>, WEI Zeng-quan<sup>1</sup>, XIE Hong-mei<sup>1</sup>

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

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

**Abstract:** The radiosensitivity of respiratory deficiency yeast mutants has been studied in this work. The mutants which were screened from the yeasts after ionizing irradiation were irradiated with  $^{12}\text{C}^{6+}$  at different doses. Because of the great change in its mitochondria and mitochondrial DNA, the respiratory deficiency yeast mutants show radiosensitivity at dose less than 1 Gy and radioresistance at doses higher than 1 Gy.

**Key words:** respiratory deficiency; mitochondrial DNA; cell apoptosis; radiosensitivity