

文章编号: 1007-4627(2013)04-0494-09

辐照诱导人正常肝细胞系 HL-7702 细胞远后的微卫星不稳定性

赵婷^{1, 2, 3}, 叶飞^{1, 2, 3}, 贺鹏博^{1, 2, 3}, 刘雄雄^{1, 2, 3}, 李强^{1, 2}

(1. 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2. 中国科学院重离子束辐射生物医学重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 采用高传能线密度(LET)的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束和低LET的X射线辐照人正常肝细胞系HL-7702细胞, 利用微卫星不稳定性(MSI)检测来分析直接受照射细胞和通过转移培养基方式旁细胞传代八代子细胞以MSI表征的远后效应。实验结果表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束诱导的远后效应较X射线的低; 旁细胞的远后效应较直接受照射细胞的高; 辐射引起的MSI与杂合性丢失(LOH)的发生率具有位点特异性。结果提示, 重离子放射治疗较X射线放射治疗对正常组织引发的辐射风险要小, 可通过对MSI高发位点的筛选来评估放疗后患者长期生存状况和二次癌症发生风险。

关键词: 重离子; 放射治疗; 远后效应; 微卫星不稳定性; 杂合性丢失

中图分类号: R730; Q691 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.30.04.494

1 引言

自19世纪末发现X射线和Ra以来, 电离辐射(IR)已发展成为一种非常重要的肿瘤诊断和治疗的工具。但同时, IR也是一种有力的基因毒性剂, 会导致基因组不稳定和癌变^[1], 这就使得放射治疗的安全性受到很大的关注。IR诱导的远后效应被认为是辐射损伤累积以及诱导癌变的主要原因之一。所谓辐射诱导的细胞远后效应, 是指受照射存活细胞经多次传代后表现出来的基因不稳定性^[2]。它广泛存在于受到损伤的细胞或机体中, 可能是多级致癌理论中至关重要的一步。远后效应在受损细胞后代中的传递和表达的最终结果将会使细胞内稳定性突变不断得到积累, 从而可能导致细胞癌变^[3]。重离子由于其倒转的深度剂量分布和高的相对生物学效应(RBE), 在高效杀死肿瘤细胞的同时可有效保护正常组织, 因此重离子成为迄今为止最为理想用于放射治疗的射线^[4-5]。迄今为止, 人们对重离子辐射对正常组织细胞造成的远后基因组不稳定性研究还不够详尽和深入。

微卫星(Microsatellite, 简称MS)是由2~6个核苷酸组成, 表现为高度多态性的简单串联排列而成的核苷酸重复序列, 其数量大约占哺乳动物基因组的30%, 特点为序列短和数目大, 分布在所有染色体中, 自发突变率很低并且按孟德尔共显性方式稳定遗传^[6]。长期以来, 有96%的MS被认为位于无功能的非编码区。然而, 越来越多的证据表明这些非随机分布^[7]的非编码重复序列可以通过其独有的结构性质来影响基因的表达^[8-9]。短片段重复序列在复制过程中常常由于DNA聚合酶的滑链而引起插入或缺失突变。在错配修复系统缺失的细胞中, 这种突变往往得不到修复, 从而造成了长度的改变, 即形成了所谓的微卫星不稳定性(Microsatellite Instability, 简称MSI)^[10]。位于某些基因启动子区或编码区的MS长度的变化会改变开放阅读框的构成, 从而影响基因的表达。然而更值得注意的是, 经证实MSI是由基因错配修复系统的缺陷造成的, 这种缺陷会使整个基因组陷入一种不稳定的状态。这种原发性基因组不稳定状态会引

收稿日期: 2012-12-30; 修改日期: 2013-04-13

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973计划)(2010CB834203); 国家自然科学基金委员会-中国科学院大科学装置联合基金资助项目(U1232207); 国家自然科学基金资助项目(10905080, 11075191)

作者简介: 赵婷(1987-), 女, 陕西西安人, 硕士研究生, 从事放射生物学研究; E-mail: zhaoting@impcas.ac.cn

通信作者: 李强, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>

起随机突变的增加和积累, 从而导致原癌基因、抑癌基因以及细胞生长调控基因的异常表达或沉默, 致使细胞生长失控以及肿瘤的最终发生。MSI 最早发现于遗传性非息肉性结直肠癌 (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, 简称 HNPCC), 表现为 D2S123 基因组上 (CA)_n 双核苷酸电泳迁移率的改变。目前已证实, 人体中胃癌、胰腺癌、子宫内膜癌和卵巢癌等几乎每一类型的肿瘤都存在不同程度的 MSI^[11], 并且发现 MSI 发生的频率与其重复结构和所在位置密切相关^[12]。在辐射致癌的相关研究中也发现, 日本原子弹爆炸幸存者中急性粒细胞白血病患者^[13]和高 LET 铁离子照射的乳腺上皮细胞^[14]都出现了高频的 MSI。

因此, 在辐射诱导的远后效应研究中, 可以认为 MSI 发生率是一种很好地反映基因组不稳定性的指标。与此同时, MSI 检测过程中出现重复片段的缺失表现为等位基因的杂合性丢失 (Loss of Heterozygosity, 简称 LOH)。认为 LOH 是抑癌基因失活的主要原因^[15]。当抑癌基因某一等位基因缺失或突变时, 将导致机体细胞癌变的易感性增加, 因此 LOH 发生率也可成为辐射损伤远后效应的评价指标之一。本文采用 MSI 和 LOH 作为生物学终点来研究高传能线密度 (LET) 重离子和低 LET X 射线两种不同品质辐射诱导远后效应的差异, 进而对重离子治疗进行风险评估。

2 材料与方法

2.1 细胞培养

实验采用中国科学院重离子辐射生物学重点实验室冻存的人正常肝细胞系 HL-7702 细胞(以下简称 L02 细胞)。此细胞的群体倍增时间约为 20 h。将 L02 细胞培养于含有 10% 胎牛血清(兰州民海公司)、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素(GIBCO 公司)的 RPMI-1640 培养基(赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司)中, 培养条件为 37 °C、饱和湿度以及 CO₂ 浓度为 5% 的环境中, 每 4~5 d 传代 1 次。

2.2 辐照

(1) ¹²C⁶⁺ 离子束照射

¹²C⁶⁺ 离子束由兰州重离子研究装置(HIRFL)提供, 在 HIRFL 的重离子深部肿瘤治疗终端实施照射。HIRFL 提供 ¹²C⁶⁺ 离子束的初始能量为 165 MeV/u,

通过束流线上的射程移位器调节束流能量使得 ¹²C⁶⁺ 离子束照射到细胞样品的 LET 值为 30 keV/μm, 这时细胞样品仍处于束流的坪区, 为重离子治疗当中重离子贯穿正常组织期间所具有的典型 LET 值。照射前 24 h 将细胞接种于 12 孔板内。照射前吸干培养基, 然后加入少量磷酸盐缓冲液(PBS), 以防止细胞干涸死亡。由于 HIRFL 的重离子深部肿瘤治疗终端提供的是水平束流, 所以将 12 孔板侧立起放置于辐照平台上, 辐照时剂量率为 0.2 Gy/min, 照射剂量分别为 0, 0.5, 1, 3 和 5 Gy。每次照射设两个平行样, 重复两次。

(2) X 射线照射

X 射线由中国科学院近代物理研究所的 X 射线生物辐照系统(FAXITRON-650)提供, X 射线能量为 130 kVp。照射前 24 h 将细胞接种于 φ60 培养皿中。辐照时剂量率为 1.5 Gy/min, 样品水平摆放, 其他照射方法和剂量与 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照时的相同。每次设两个平行样, 重复 3 次。

2.3 照射后细胞处理

¹²C⁶⁺ 离子束照射后向 12 孔板内加入 4 mL 新鲜培养基; X 射线照射后向 φ60 培养皿中加入 8 mL 新鲜培养基。2 h 后将直接受照细胞(ZJ 组)中一半培养基转入未受照细胞(TA 组)中, 通过转移培养基方式研究旁细胞中的远后效应。旁细胞的接种条件和培养条件完全与各自对应的直接受照细胞相同。各组所剩培养基的量与其日常培养量相近, 最大程度地减少培养方法的改变与培养基内直接受照细胞分泌的信号分子稀释比例不同对实验结果造成的影响。

2.4 DNA 提取

细胞传 8 代(约 40 d, 倍增次数为 48 次)以后, 用 sigma 公司的 DNA 提取试剂盒(G1N350)提取细胞 DNA。方法简述如下: 将 5×10⁶ 个细胞消化、离心和重悬, 向重悬液中加入 RNaseA, 室温孵育 2 min。接下来先后加入蛋白酶 K 和裂解液 C, 70 °C 孵育 10 min 后加入无水乙醇, 并转移至已活化的结合柱中离心, 让 DNA 与柱子结合。最后用洗脱液洗脱得到 DNA 样本。所得 DNA 的 OD 值在 1.8 左右, 质量为 70~100 ng/μL。

2.5 MSI 检测

随机选取 14 个已报道的肝癌细胞中常发生的 MSI 位点(D1S170, D1S2843, D4S395, D4S407,

D4S1572, D6S299, D8S277, D9S161, D13S268, D13S260, D16S402, D16S520, D17S926 和 UT18), 将传代至第 2 代和第 4 代未照射的 L02 细胞基因组 DNA 送检, 对上述 14 个位点进行测序(生工生物工程(上海)股份有限公司)。

由于 MSI 的发生率与其重复结构和所在位点密切相关, 所以本实验选取已报道的 5 个原发性肝癌(Hepatocellular Carcinoma, 简称 HCC) 中高发的 MSI 位点(D8S277, D8S298, D16S402, D16S520 和 D17S

926)^[16-18], 就这 5 个位点分别对直接受照射细胞和转移培养基方式旁细胞传代八代的子细胞进行荧光标记 PCR 结合毛细管电泳分析。将所得 DNA 样品进行 PCR 扩增, 引物序列如表 1 所列。PCR 体系为 25 μL , 包括模板 1 μL , 引物 F 0.5 μL , 引物 R 0.5 μL , 10 mM 的 dNTP 0.5 μL , Taq Buffer 2.5 μL , 25 mM MgCl_2 2.0 μL , Taq 酶 0.2 μL , 水 17.8 μL 。PCR 反应条件如表 2 所列。在 96 孔板中将 50 μg PCR 产物与 10 μL HIDI 和 ROX500 或 LIZ500 的混合物充分混匀, 98 $^\circ\text{C}$ 加热变性 5 min, 冰上骤冷, 离心。最后使用 ABI 3730 xl(美国 ABI 公司) 设备检测样本。

表 1 各位点 PCR 引物信息

Primer 名称	序列 (5' to 3')	碱基数	修饰
D8S298	F: TTGCTGTGACCAGGATTCTTAT	22	5'端 ROX
	R: TTTTCCCGTTCCTTTTCTGC	20	
D8S277	F: CTTGGGGCTCTGTTGCTTT	19	5'端 6-FAM
	R: TGTTATGTTTGAGAGGTCTGAGTG	24	
D17S926	F: GCTGAAGTGGGAAGATTGC	19	5'端 HEX
	R: TCTGACCTTTTCCTCGTGTTTC	21	
D16S402	F: ATTCAGATTGCTCATCGTGC	20	5'端 FAM
	R: ATAGGGCCATGACCAGTATTT	21	
D16S520	F: AGCTTAGTCATACGAGCGGTATTAG	25	5'端 HEX
	R: TACCAACCTCCACAGCCAT	19	

表 2 PCR 反应条件

预变性	前 10 个循环			后 20 个循环			修复延伸
	变性	退火	延伸	变性	退火	延伸	
95 $^\circ\text{C}$ 8 min	95 $^\circ\text{C}$ 30 s	60 $^\circ\text{C}$ 30 s	72 $^\circ\text{C}$ 30 s	95 $^\circ\text{C}$ 30 s	55 $^\circ\text{C}$ 30 s	72 $^\circ\text{C}$ 30 s	72 $^\circ\text{C}$ 6 min

所得结果用专业 DNA 片段分析软件 GeneMarker V1.91 进行分析, 分析方法如图 1 所示。其中, MSI 分析,

判定方式为两样本比较值取对数, 其值 < -2 或 > 2 , 则判定为 MSI; LOH 分析, 判定方式为对照峰和样本

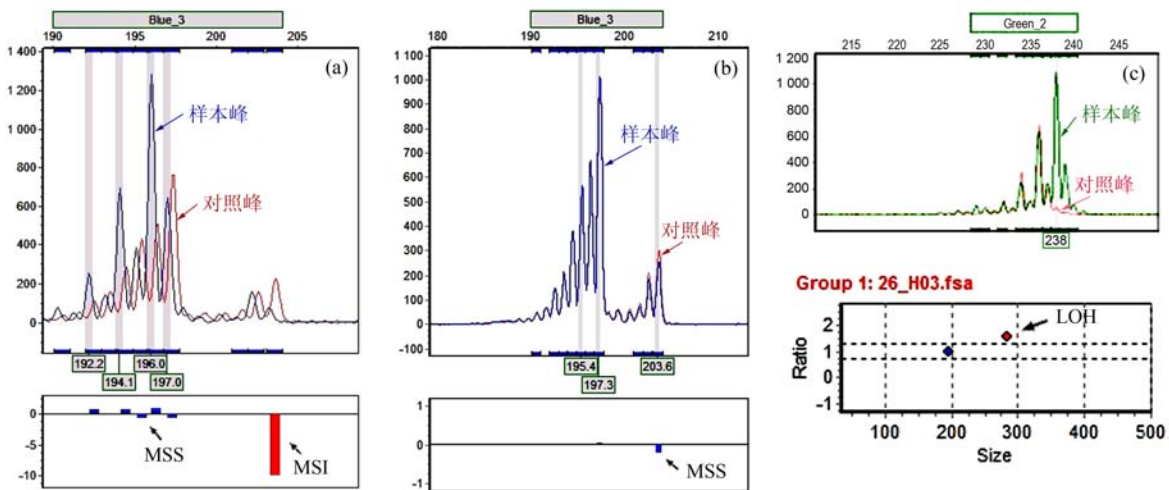


图 1 (在线彩图) GeneMarker 软件分析图

(a) MSI, (b) MSS, (c) LOH; 上半部分为实测峰图, 下半部分为分析结果。

峰的面积比率, 其值 < 0.7 或 > 1.3, 则判定为 LOH。

3 结果

3.1 未受照 L02 细胞的 MS 稳定性

本实验选择肝癌细胞中 14 个 MSI 高发的位点, 对正常肝细胞系 L02 细胞中这些位点进行测序, 图 2

给出了以 D1S170 位点为例展示的测序结果。所有位点测序结果表明, 不同代数的未照射细胞所有的这些 MS 位点均未出现长度的改变, 也未发生自发突变, 证明 L02 细胞为 MSS 的细胞系。由于本实验以 MSI 的发生作为远后效应的检测指标, 此结果消除了实验中所用细胞样本本身可能带来假阳性结果的可能。

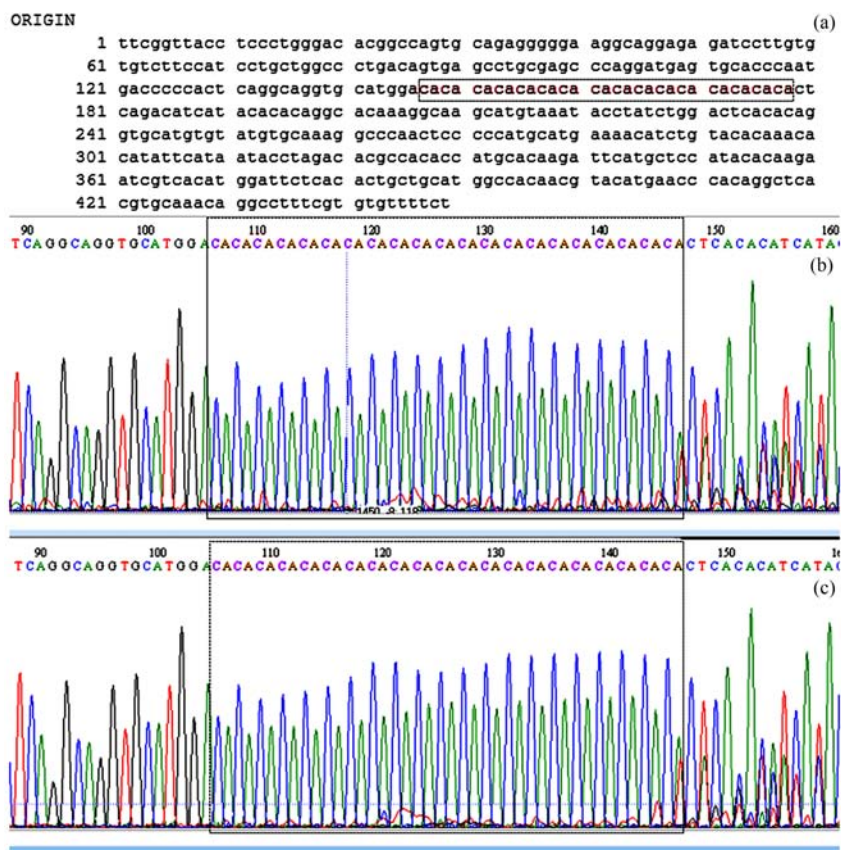


图 2 (在线彩图) 所选位点的测序结果 (以 D1S170 为例)

(a) 为 Genebank 收录的序列信息, (b) 和 (c) 分别为传代第 2 代和第 4 代为照射 L02 细胞的测序结果; 框出的部分为所测位点的 MS 序列。

3.2 MSI 发生率

X 射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照 L02 细胞后, 经传代八代后子细胞的 MSI 发生率分别如表 3 和表 4 所列。可以看出, 无论是 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子还是 X 射线均可引发受照射细胞普遍的远后 MSI, 并且除了 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子直接照射组的细胞 (MSI-H: 25%) 外, 其它处理组 (MSI-H: 54.2% ~ 87.5%) 普遍以 MSI 发生率高于 40% (MSI-H) 的形式出现。对表 3 和表 4 的统计结果见图 3。可以看出, 直接照射组 MSI 的发生率随照射剂量的增大而增加, 而转培养基组的剂量依赖效应并不明显, 但是其 MSI 发生率却总是明显高于直接照射组, 说明

就 MSI 发生率而言, 旁细胞的辐射风险要高于直接受照射细胞。此外, 无论是直接照射组还是转培养基组, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子造成的 MSI 都小于 X 射线, 说明远后基因组不稳定的产生与射线的品质有关, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对正常组织的二次致癌风险小于 X 射线。

此外, 值得注意的是图 3(a) 中重离子照射组中, 受照剂量为 0.5 Gy 的细胞 MSI 发生率反而高于高剂量组。推测可能是由于低剂量超敏感性 (low-dose hypersensitivity, 简称 HRS)^[20] 造成的。所谓 HRS 是指细胞对很低剂量照射 (约 < 0.5 Gy) 较敏感及对其后的剂量区域 (0.5 ~ 1.0 Gy) 敏感性下降的现象。该现象最早发

表 3 X射线辐照后细胞传代八代子细胞的MS检测结果统计*

分组	样品编号	D8S277	D8S298	D16S402	D16S520	D17S926	分类
直接照射组							
0.5 Gy	1	-	-	-	-*	-	MSS
	2	-*	-	+*	+	-	MSI-H
	3	-*	+	+*	-	-	MSI-H
	4	nd	-*	-*	-	-	MSS
	5	nd	-*	nd	-	-	MSS
	6	-*	-	+*	-	-	MSI-L
1 Gy	1	-	-	-	-	-	MSS
	2	+	-*	-	-	-	MSI-L
	3	-	-*	+*	+	-	MSI-H
	4	-*	-	+	+	-	MSI-H
	5	-*	-*	+*	-	-	MSI-L
	6	-	+	nd	-	-	MSI-L
3 Gy	1	-	-	+	-	-	MSI-L
	2	-*	+	-	-	-	MSI-L
	3	+*	-*	+	+	-	MSI-H
	4	nd	+*	+	+	-	MSI-H
	5	-*	-	+	-	-	MSI-L
	6	-*	+*	-	+	-	MSI-H
5Gy	1	+	+*	+	-	+	MSI-H
	2	-*	-	+	-	-	MSI-L
	3	-	+*	+	+	-	MSI-H
	4	-*	+*	+*	+	-	MSI-H
	5	-*	nd	+*	-	-	MSI-L
	6	-	+*	+*	-	-	MSI-H
转培养基组							
0.5 Gy	1	-	-	+*	+	-	MSI-H
	2	+	-	+*	+	-	MSI-H
	3	+	+	+	-	-	MSI-H
	4	-	+*	+*	-	-	MSI-H
	5	+*	-*	nd	+	-	MSI-H
	6	-	-	+*	-	-	MSI-L
1 Gy	1	+*	-	+	+	+	MSI-H
	2	-	-*	+*	+	-	MSI-H
	3	+*	+*	+*	+	-	MSI-H
	4	-*	+*	+	-	+	MSI-H
	5	+*	-	+*	-	-	MSI-H
	6	+*	-	+*	+	-	MSI-H
3 Gy	1	+	+*	+	+	+	MSI-H
	2	+*	-	+*	+	+	MSI-H
	3	-*	+*	+	+	-	MSI-H
	4	-	+*	+	+	-	MSI-H
	5	-	-	+*	-	-	MSI-L
	6	+*	-	+*	-	-	MSI-H
5 Gy	1	+	+*	+	+	-	MSI-H
	2	+	+	+*	+	-	MSI-H
	3	-	+	+*	-	-	MSI-H
	4	+*	+*	+*	+	-	MSI-H
	5	-*	-	nd	-	+	MSI-L
	6	+	-	+	+	-	MSI-H

* - 为 MSS, + 为 MSI, * 为 LOH, nd 表示未检测到信号; 将同一样本的 MS 发生率按照美国国立癌症研究所 (NCI) 制定的贝塞斯达标准 (Bethesda criteria)^[19] 分成 MSI-H (MSI 发生率高于 40%) 和 MSI-L (MSI 发生率低于 40%)。

表 4 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后细胞传代八代子细胞的 MS 检测结果统计*

分组	样品编号	D8S277	D8S298	D16S402	D16S520	D17S926	分类
直接照射组							
0.5 Gy	1	-	+	-	-	-*	MSI-L
	2	-	+	+	+	-	MSI-H
	3	-	-	+	-	-	MSI-L
	4	-	-	-	-	-	MSS
1 Gy	1	-	-	nd	-	-	MSS
	2	nd	-	+	-	-*	MSI-L
	3	-	-	-	-	+	MSI-L
	4	-	-	-	-	-	MSS
3 Gy	1	-	-	-	-	-	MSS
	2	-	+	+	-	-	MSI-H
	3	-	-	+	-	-	MSI-L
	4	-	-	+	-	-	MSI-L
5 Gy	1	-	-	+	-	-	MSI-L
	2	-	+	-	+	-	MSI-H
	3	+*	+	+	-	+*	MSI-H
	4	-	-	+	-	-*	MSI-L
转培养基组							
0.5 Gy	1	-	+*	+	-	+*	MSI-H
	2	-	-	+	-	+*	MSI-H
	3	+*	+	+*	-	-	MSI-H
	4	-	+	+	-	+	MSI-H
1 Gy	1	+*	-	+	-	+	MSI-H
	2	+*	-*	-	-	-	MSI-L
	3	-	-	-	+	+*	MSI-H
	4	-	+	+	-	+	MSI-H
3 Gy	1	-	+	+	-	-*	MSI-H
	2	-*	-	+	+*	+	MSI-H
	3	+*	-*	-	-	+	MSI-H
	4	-	-*	-	-	-*	MSS
5 Gy	1	+	-	+	-	-	MSI-H
	2	-*	-*	+*	-	+	MSI-H
	3	-*	+	-	+	+	MSI-H
	4	-*	-	+*	-	+	MSI-H

* 各标注同表 3。

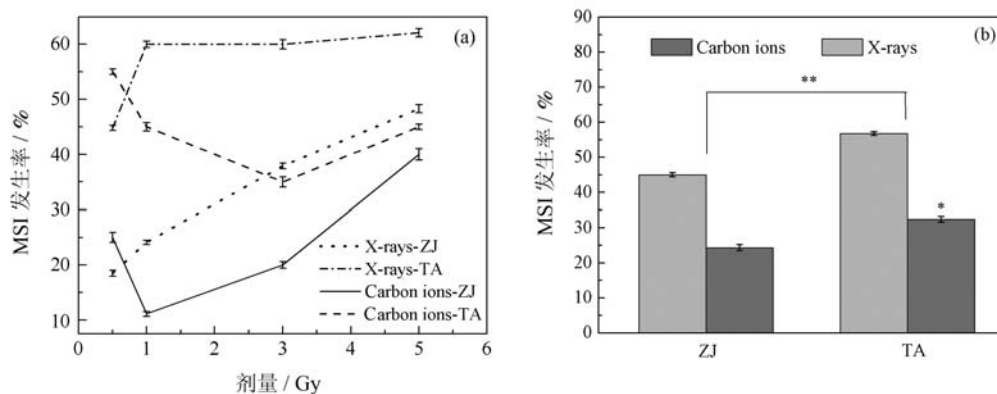


图 3 MSI 统计结果

(a) 为各组别 MSI 发生率随照射剂量的变化; (b) 表示不同组别与不同射线类型间 MSI 发生率的变化, 其中 * 表示 TA 组中 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子和 X 射线引起的 MSI 具有显著性差异 ($p < 0.05$), ** 表示辐射引起的直接照射细胞组 (ZJ) 和转培养基细胞组 (TA) 间的 MSI 具有极显著性差异 ($p < 0.01$)。

现于 20 世纪 60 年代, 在用低剂量的 γ 射线照射玉米类植物时, 剂量小于 0.5 Gy 时诱导的花粉突变及致死性均比高剂量时敏感^[21]。在脯乳类细胞的研究中, Marples 等首先确定仓鼠纤维母细胞 V79 在小于 1 Gy 存在放射超敏。到目前为止, 已有超过 40 种细胞系在不同的实验室, 不同的照射及生长条件, 并通过不同技术证实了 HRS 现象。已知超过 26 种人类细胞具有 HRS, 但并不是所有的细胞都存在这一现象^[22]。本实验在重离子照射组出现了 HRS 现象, 而 X 射线照射组没有, 推测可能与所选细胞系有关, 要得到确切的结论还需更深入的研究。

3.3 LOH 发生率

X 射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照 L02 细胞后, 经传代八代后子细胞的 LOH 发生率如图 4 所示, 这些结果也是由表 2 和表 3 中 MS 检测结果统计得到的。可以看到, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射组的 LOH 发生率低于 X 射线照射组, 且在 X 射线照射组有 D8S277, D8S298 和 D16S402 3 个易感位点。其中, D8S277 和 D8S298 位于 PinX1 基因^[23], 该基因特异存在于正常组织, 它的表达下调会增强端粒酶活性, 被认为在癌症发生过的过程中起很重要的作用; D16S402 位于 CDH13 和 WFDC1 等基因附近^[24], 它们分别起细胞间交互和生长抑制的作用, 这些基因的杂合性丢失会造成整个细胞的肿瘤易感。

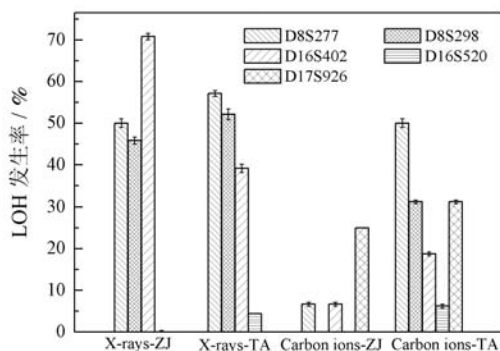


图 4 LOH 统计结果

4 讨论

电离辐射可以引起基因组不稳定, 并且被广泛认为是多步致癌的中心环节, 但引起基因组不稳定这种远后效应的机理却众说纷纭, 难以统一。Huang 等^[25]认为, 辐射导致的受损细胞阻断了胞内 DNA 损伤反应的通路, 并且分泌自我维持的持久性因子, 在这种不正常的胞内微环境下, 子代细胞

不稳定显型得以保存, 从而造成了远后的基因组不稳定性。Suzuki 等^[2]认为, 细胞在修复双链断裂过程中会产生一些“潜在不稳定染色体区域”(potentially unstable chromosome regions, 简称 PUCR), 这些 PUCR 是非致命的, 并且可以通过细胞分裂传给子代细胞。然而, PUCR 很容易被各种刺激激活, 因此在后代细胞中多表现出基因组不稳定。另外, 他们还发现辐射造成 P53 的功能缺失也可导致远后基因组的不稳定性。此外, 表观遗传的改变在远后效应中的研究也持续升温。虽然现有的实验结果并不完全统一, 但主流的结论是辐射会诱导远后细胞中的特殊位点高甲基化和整体水平上的低甲基化, 这种松弛的染色体结构会使其对外界刺激的抗性大大减小。已有实验表明, 抑制甲基转移酶的表达可有效地减少 DNA 断裂和姊妹染色体交换的发生^[26]。在本文论述的实验中, 发现 MSI 普遍发生在直接照射细胞和旁细胞的后代中, 而 MSI 产生的主要机制是错配修复系统缺陷, 因此推测错配修复系统缺陷可能是辐射诱导的远后效应的形成机制之一。越来越多的证据表明, 电离辐射对细胞的损伤作用以及远后效应的产生是多因素共同作用的结果。其中, 错配修复系统作为保证遗传真实性的重要关卡, 它不仅能通过矫正在 DNA 重组和复制过程中产生的碱基错配, 还能通过诱导 DNA 受损细胞的凋亡而消除由突变细胞的增殖而造成的癌变。因此, 错配修复系统的功能异常对辐射损伤累积以及二次肿瘤发生的评估有重要意义。值得注意的是, MSI 只能间接反映错配修复系统的总体情况, 而不能反映出它是如何失活的。因此, 要更深入地理解错配修复系统与远后效应的关系, 还需对辐射诱导的错配修复系统缺陷形成机制进行进一步的研究。

本实验结果还表明, 直接受照细胞的远后 MSI 发生率与射线的品质有关, 说明远后基因组不稳定发生的情况与原代细胞最初受到的损伤类型有关, 并且旁细胞更容易发生远后的基因组不稳定。X 射线属于低 LET 射线, 靠电离水分子形成自由基与细胞相互作用, 造成的损伤往往是散布的 DNA 单链或双链断裂。而 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束属于高 LET 射线, 导致难以修复的 DNA 团簇损伤, 并且会改变细胞的亚显微结构。在以转移培养基方式研究旁效应中, 旁细胞受到的损伤是由直接受照射细胞向培养基中分泌的一些信号分子(如 TGF- β 1 和 NO 等)而引起的一系列胞内生化

变化。从本实验结果来看, 细胞所受伤害的致死性越强, 那么存活下来的细胞中, 其子代产生基因组不稳定性的可能性就越小。这可能是由于受到伤害的致死性越小, 细胞就越倾向于牺牲正常的生存状态来保证自己的存活, 这就表示高LET射线更适合作为放疗用的射线。然而, 值得关注的是旁细胞似乎成了远后效应的主要发生群体, 这就为放疗时对正常组织的保护提出了更高的要求。

此外, 本实验还发现, 人正常肝细胞系 L02 细胞受到X射线辐照后有 D8S277, D8S298 和 D16S402 3 个 LOH 高发位点。它们所属的基因分别与端粒酶活化、细胞交互和生长抑制等功能有关, 而这些事件通常与癌症发展息息相关。由于 MSI 和 LOH 已被确认与癌症的早期发生和分级有关, 故本实验结果提示, MSI 和 LOH 可作为放射治疗后患者长期生存状况和二次肿瘤发生风险检测的参考指标。

参考文献(References):

- [1] PRISE K M, O'SULLIVAN J M. *Nat Rev Cancer*, 2009, **9**(5): 351.
- [2] SUZUKI K, OJIMA M, KODAMA S, *et al.* *Oncogene*, 2003, **22**(45): 6988.
- [3] TAO Jiajun, LI Qiang, WU Qingfeng. *Nuclear Physics Review*, 2009, **26**(3): 248. (in Chinese)
(陶家军, 李强, 吴庆丰. 原子核物理评论, 2009, **26**(3): 248.)
- [4] LI Qiang. *Acta Laser Biology Sinica*, 2003, **12**(5): 386. (in Chinese)
(李强. 激光生物学报, 2003, **12**(5): 386.)
- [5] KRAFT G. *Prog Part Nucl Phys*, 2000, **45**: S473.
- [6] LI Honggang. *Journal of Practical Training of Medicine*, 2005, **33**(4): 199. (in Chinese)
(李红钢. 实用医学进修杂志, 2005, **33**(4): 199.)
- [7] HANS Ellegren. *Nature Review Genetics*, 2004, **5**: 435.
- [8] GREGORY A P. *Genome Biology*, 2003, **4**(2): 104.
- [9] WOERNER S M, KLOOR M, von KNEBEL D M, *et al.* *Cancer Biomarkers*, 2006, **2**(1/2): 69.
- [10] KARRAN P. *Cancer Biology*, 1996, **7**: 15.
- [11] DONG Reizeng, CAI Hong, MO Shanjing, *et al.* *Journal of Oncology*, 2005, **11**(5): 363. (in Chinese)
(董锐增, 蔡宏, 莫善兢, 等. 肿瘤学杂志, 2005, **11**(5): 363.)
- [12] DIETMAIER W, WALLINGER S, BOCKER T, *et al.* *Cancer Res*, 1997, **57**(21): 4749.
- [13] NAKANISHI M, TANAKA K, TAKAHASHI T, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 2001, **77**: 687.
- [14] YAMDA S, YANG T C, GEORGE K, *et al.* *Adv Space Res*, 1998, **22**(12): 1709.
- [15] de SCHUTTER H, SPAEPEN M, mc BRIDE W H, *et al.* *Eur J Hum Genet*, 2007, **15**(7): 734.
- [16] PANG J Z, QIN L X, WANG Q Q, *et al.* *Chinese Journal of Hepatology*, 2007, **15**(12): 906.
- [17] RIOU P, SAFFROY R, COMOY J, *et al.* *Clin Cancer Res*, 2002, **8**(10): 3178.
- [18] ZHAO X, LI J, He Y, *et al.* *Cancer Res*, 2001, **61**(20): 7383.
- [19] BOLAND C R, THIBODEAU S N, HAMILTON S R, *et al.* *Cancer Res*, 1998, **58**(22): 5248.
- [20] MARPLES B, JOINER M C. *Radiat Res*, 1993, **133**(1): 41.
- [21] ERIKSSON G. *Hereditas*, 1963, **50**(2/3): 161.
- [22] PENG Qian, FENG Mei. *Journal of Cancer Control and Treatment*, 2009, **22**(1): 104. (in Chinese)
(彭倩, 冯梅. 肿瘤预防与治疗, 2009, **22**(1): 104.)
- [23] MA Y, WU L, LIU C, *et al.* *Cancer Res Clin Oncol*, 2009, **135**(3): 431.
- [24] RIOU P, SAFFROY R, COMOY J, *et al.* *Clin Cancer Res*, 2002, **8**(10): 3178.
- [25] HUANG L, SNYDER A R, MORGAN W F. *Oncogene*, 2003, **22**(37): 5848.
- [26] RUGO R E, MUTAMBA J T, MOHAN K N, *et al.* *Oncogene*, 2011, **30**(6): 751.

Radiation-induced Delayed Microsatellite Instability in Human Normal Liver HL-7702 Cells

ZHAO Ting^{1, 2, 3}, YE Fei^{1, 2, 3}, HE Pengbo^{1, 2, 3}, LIU Xiongxiang^{1, 2, 3}, LI Qiang^{1, 2}

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

2. Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Human normal liver cell line HL-7702 cells were irradiated with high linear energy transfer (LET) $^{12}\text{C}^{6+}$ ions and low-LET X-rays, respectively. Delayed effect in terms of microsatellite instability (MSI) in progenies of the directly irradiated cells and bystander cells, obtained in the way of medium transfer at the 8th passage postirradiation, were examined. The delayed effect induced by the high-LET $^{12}\text{C}^{6+}$ ions was different from that induced by the low-LET X-rays, and a higher incidence of MSI was observed in the progenies of the cells after exposure to the X-rays than to the $^{12}\text{C}^{6+}$ ions. We also found that the delayed effect in the progenies of the bystander cells was much more severe than those of directly irradiated cells. Furthermore, the events of MSI and loss of heterozygosity (LOH) induced by the ionizing radiations were not randomly distributed throughout the genome and specific loci existed indeed. These results imply that the radiation risk to normal tissues is lower in heavy ion therapy than in conventional X-ray radiotherapy, and the analysis of microsatellite loci with MSI high frequency occurrence can be applied to access long-term survival condition and second cancer risk for the patients after radiotherapy.

Key words: heavy ion; radiotherapy; delayed effect; microsatellite instability; loss of heterozygosity

Received date: 30 Dec. 2012; **Revised date:** 13 Apr. 2013

Foundation item: National Basic Research Program of China (973 Program)(2010CB834203); NSFC-CAS Joint Fund for Research based on Large-scale Scientific Facilities(U1232207); National Natural Science Foundation of China(10905080, 11075191)

Corresponding author: LI Qiang, E-mail: liqiang@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>