论著

文章编号:1000-5404(2005)08-0700-03

低氧对大鼠小肠上皮细胞辐射损伤修复的影响

王富友,高京生 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨低氧对辐射损伤修复的影响及其可能机制。**方法** 以大鼠空肠上皮细胞(IEC-6细胞株)为研究对象,分正常对照组、单纯照射组和照后低氧组;^{60}Co-γ射线12 Gy一次性照射,低氧为5%氧处理6 h。MTT法检测细胞存活率;^{3}H-TdR掺入法检测细胞增殖;UDS和SCGE实验测定DNA损伤和修复情况;流式细胞仪检测细胞周期。**结果** 与单纯照射组比,照后低氧组细胞修复加快、增殖明显、存活率提高约10%($P<0.01$);G_1、G_2期阻滞延长($P<0.01$)。**结论** 适当低氧能够促进细胞修复,提高存活率,其机制可能与细胞周期阻滞延长有关。

关键词: 辐射损伤;低氧;修复;细胞周期

中图法分类号: R322.45; R364.4; R818.74 **文献标识码:** A

Effects of hypoxia on repair of rat small intestine epithelium cell damaged by γ- irradiation

WANG Fu-you, GAO Jing-sheng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of hypoxia on repair of radiation damage and the possible mechanism. **Methods** Rat jejunal epithelium cell was taken as study object and divided into control group, irradiation group and irradiation-hypoxia group. The irradiation group was irradiated only once by ^{60}Co-γ ray at the dose of 12 Gy and the irradiation-hypoxia group was treated with hypoxia (5% oxygen) for 6 h after irradiation. MTT was used to detect the survival rate of the irradiated cells, ^{3}H-TdR incorporation was used to detect cell proliferation, and unscheduled DNA synthesis and single cell gel electrophoresis were used to detect DNA repair and flow cytometry was used to detect cell cycle. **Results** As compared with the irradiation group, the cells in the irradiation-hypoxia group repaired rapidly, proliferated obviously and the survival rate was increased about 10% ($P<0.01$). G_1 phase and G_2 phase were prolonged. **Conclusion** Hypoxia can increase the cellular survival rate of IEC-6 after γ irradiation, which mechanism is possibly related to the regulation of cell cycle.

Key words: irradiation; hypoxia; DNA repair; cell cycle

随着科技的发展,核能与核技术被广泛应用于医学、工业、农业和研究,核辐射事故发生几率明显上升。环境因素对辐射损伤及修复的影响是放射医学研究的热点问题之一。以往的研究主要集中在环境因素对辐射损伤的影响,而环境因素对辐射损伤修复的研究资料较少。本研究旨在对大鼠空肠上皮IEC-6细胞进行照射,然后给予低氧处理,观察低氧对辐射损伤修复的影响,并从细胞分子变化角度探讨其可能的机制,从而揭示辐射损伤修复与低氧环境的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

DMEM培养基(Gibco公司产品);MTT试剂购于北京原平皓生物技术公司;^{3}H-TdR购自中科院原子核研究所;羟基脲(Sigma公司产品)。DG-3022A型酶联检测仪(华东电子集团产品),Coulter-ELITEESP流式细胞仪(美国Coulter公司产品)。

作者简介:王富友(1973-),男,内蒙古自治区赤峰市人,硕士研究生,主治医师,主要从事辐射损伤与防护方面的研究。电话:(023)68752355

收稿日期:2004-11-09;修回日期:2005-01-19

1.2 细胞培养

大鼠空肠上皮来源细胞株IEC-6细胞(本室保存),使用含10%小牛血清的DMEM培养基、100 U/ml青霉素+100 μg/ml链霉素、5%CO_2-95%空气、饱和湿度37 ℃孵箱培养。

1.3 实验分组

分为3组:①正常对照组;②单纯照射组:待细胞完全贴壁后,^{60}Co-γ射线一次性照射12 Gy,照距152 cm,剂量率1 Gy/min,时间12 min;③照后低氧组:照射后将细胞放入自制低氧箱,充入低氧混合气(5% O_2 + 5% CO_2 + 90% N_2),1 L/min,30 min,关闭阀门封闭低氧箱37 ℃孵箱培养,每隔3 h充气1次。

1.4 MTT法检测细胞存活率

将处于对数生长期的IEC-6细胞经0.25%胰酶消化后离心收集,用含10%小牛血清的DMEM培养基调整细胞数为2×10^4/ml,接种于96孔培养板150 μl/孔,另设不加细胞的培养液为本底。待细胞完全贴壁后,给予^{60}Co-γ射线12 Gy一次性照射,低氧组给予低氧处理6 h,每组设5个复孔。于照后1~5 d,每孔分别加入MTT(5 mg/ml)20 μl,37 ℃孵育4 h终止培养;吸弃上清,每孔加入150 μl二甲基亚砜(DMSO)振荡10 min,使结晶充分溶解。在酶联免疫检测仪上490 nm波长处测定吸光度值(D值)[1]。细胞存活率(%)=(实验组D值-本底D值)/

（正常对照组 D 值 - 本底 D 值）× 100%。

1.5 ^{3}H-TdR 掺入法测定 DNA 合成[2]

细胞培养、照射及低氧同 MTT 实验，照后即刻和 6 h 加入 ^{3}H-TdR 3.7×10^4 Bq/孔，每组用多头细胞收集仪将细胞收集于 49 型玻璃纤维膜上，50 ℃烤箱烤干后浸入 5 ml 闪烁液内，自动液体闪烁计数仪测定闪液计数值，照后 ^{3}H-TdR 掺入（6 h）率（%）=（实验组闪液计数值 - 本底闪液计数值）/（正常对照组闪液计数值 - 本底闪液计数值）× 100%。

1.6 程序外 DNA 合成（UDS）实验[3]测定 DNA 修复

细胞培养、照射及低氧同前，照后即刻和 6 h 加入羟基脲（HU）终浓度 10 mmol/L 和 ^{3}H-TdR 3.7×10^4 Bq/孔，每组设 5 个复孔，余同 ^{3}H-TdR 掺入实验。

1.7 中性单细胞凝胶电泳（SCGE）实验测定 DNA 损伤和修复情况

参照 Mohankumar 等[4]的方法，简述如下：①正常熔点琼脂糖（1%）100 μl 均匀铺在磨砂载玻片上，4 ℃固化 10 min 后将 37 ℃ 预热的 0.625% 低熔点琼脂糖 75 μl 与 10 μl 单细胞悬液（含细胞 10^4 个）的混合液均匀铺在第 1 层胶上，4℃固化 15 min 再铺 1 层低熔点琼脂凝胶 4 ℃固化 15 min。②将载玻片水平浸入新配的中性裂解液（2 mmol/L NaCl，30 mmol/L Na_2EDTA，1% 肌氨酸钠，10 mmol/L Tris，用前加 Triton X-100 和 DMSO 至终浓度分别为 1% 和 10%，pH 为 8.2 ~ 8.5）中于 4 ℃裂解 2 h。③取出载玻片，蒸馏水冲洗两次，水平置于 0.5% TBE 中性电泳液（2 mmol/L Na_2EDTA，90 mmol/L Tris，90 mmol/L 硼酸，pH 8.2 ~ 8.5）中 4 ℃展开 30 min。④将载玻片放于中性电泳液中，在 25 V、300 mA 电泳件下电泳 30 min。⑤取出载玻片，用 100 μl 中和液（0.4 mmol/L Tris，pH 7.5）滴片 3 次，除去会对 EB 染色造成干扰的碱和去污剂。晾干载玻片，在胶面上滴加 100 μl 溴乙锭（2 ~ 5 μg/ml）染色，盖上盖玻片。⑥在激光共聚焦显微镜 20 × 10 倍数下，观察结果（G 激发）并拍照。用 Photoshop 7.0 和 SPSS 统计软件进行统计分析，计算托尾率和托尾长度，按系统给定的标尺换算成实际长度，计算出各组的平均尾长，作为 DNA 损伤程度的指标。

1.8 流式细胞仪检测细胞周期

细胞处理收集同 MTT 法，重悬于照后 6、12、18、24 h 终止培养，PBS 缓冲液冲洗 3 次，0.25% 胰酶消化完全，收集细胞悬浮于预冷的 PBS 缓冲液中，缓慢加入 - 20 ℃预冷 95% 乙醇，使其终浓度为 75%，4 ℃过夜。离心重悬于 PBS 缓冲液，调整细胞浓度为 1×10^6/ml，取适量细胞悬液加 RNA 酶 37 ℃水浴 30 min 除去 RNA，加入碘化丙啶染液使其终浓度为 20 μg/ml，避光冰浴 30 min 显色，行流式细胞仪检测。

1.9 统计学处理

数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析，组间差异采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 IEC-6 细胞的增殖情况

MTT 实验结果（表 1）表明，照射后 1 ~ 5 d，细胞存活率呈现递减趋势。照后低氧组的细胞存活率下降缓慢且明显高于单纯照射组，约提高 10%（$P<0.01$）；单纯低氧组的细胞存活率不变（未列出），因此，在以后的研究中对单纯低氧组的细胞不进行讨论。

表 1　照后 IEC-6 细胞的存活率［$n=5$，$(\bar{x}\pm s)$%］

Tab 1　Survival rate of IEC-6 cell after irradiation［$n=5$，$(\bar{x}\pm s)$%］

Group	Time after irradiation				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
Irradiation	78.5 ± 0.1	55.7 ± 0.2	42.4 ± 0.3	28.9 ± 0.1	17.5 ± 0.3
Irradiation/Hypoxia	89.7 ± 0.2*	71.7 ± 0.3*	59.9 ± 0.2*	39.7 ± 0.3*	26.4 ± 0.2*

*：$P<0.01$，*vs* irradiation

^{3}H-TdR 掺入实验结果（表 2）表明，照后 24 h 内 ^{3}H-TdR 掺入率呈现递增趋势。与单纯照射组比，照后低氧组各时间段的掺入率均明显提高约 12%（$P<0.01$）；并且于 12 h 内接近正常对照组，而单纯照射组的掺入率却降至 85%。

表 2　照后 IEC-6 细胞的 ^{3}H-TdR 掺入率［$n=5$，$(\bar{x}\pm s)$%］

Tab 2　^{3}H-TdR incorporation rate of IEC-6 after irradiation［$n=5$，$(\bar{x}\pm s)$%］

Group	Time after irradiation			
	0 - 6 h	6 - 12 h	12 - 18 h	18 - 24 h
Irradiation	80.9 ± 0.1	85.3 ± 0.3	100.2 ± 0.1	123.1 ± 0.2
Irradiation/Hypoxia	102.6 ± 0.2*	109.4 ± 0.1*	113.8 ± 0.2*	135.3 ± 0.1*

*：$P<0.01$，*vs* irradiation

2.2 IEC-6 细胞辐射损伤修复情况

UDS 实验结果（表 3）表明，照后 24 h 内两组的 ^{3}H-TdR 修复掺入率均呈现早期的快修复（0 ~ 6 h）和随后的慢修复（6 ~ 24 h）。照后低氧组在快修复期内修复掺入率明显高于单纯照射组，提高 15%（$P<0.01$）；在随后的慢修复期，接近单纯照射组，而 18 ~ 24 h 却明显低于单纯照射组降低 25%（$P<0.01$）。

表 3　照后 IEC-6 细胞的 ^{3}H-TdR 修复掺入率［$n=5$，$(\bar{x}\pm s)$%］

Tab 3　^{3}H-TdR repair incorporation rate of IEC-6 after irradiation（UDS）［$n=5$，$(\bar{x}\pm s)$%］

Group	Time after irradiation			
	0 - 6 h	6 - 12 h	12 - 18 h	18 - 24 h
Irradiation	107.7 ± 0.2	84.9 ± 0.1	98.4 ± 0.1	123.2 ± 0.2
Irradiation/Hypoxia	122.2 ± 0.1*	83.2 ± 0.2	109.8 ± 0.2	96.6 ± 0.1*

*：$P<0.01$，*vs* irradiation

SCGE 实验结果（表 4），细胞 DNA 经 EB 染色后呈红色荧光，正常细胞呈圆形，是未受损的核 DNA；照射后的细胞似彗星，损伤的 DNA 片段在电泳时由未受损的核区（头部）向阳极迁移，形成彗尾，托尾率越高、尾部越长，表明 DNA 损伤越重[4]。照后 24 h 内两组的托尾率和尾长均呈现先增后降趋势，于照后 12 h 达到高峰（表 4）。与单纯照射组比，照后低氧组的托尾率和尾长均降低，照后 6 h 和 24 h 最明显（$P<0.01$）。

表 4　照后 IEC-6 细胞的 DSB 修复情况（SCGE）（$n=100$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 4　DSB repair of IEC-6 after irradiation（SCGE）（$n=100$，$\bar{x}\pm s$）

Time after irradiation (h)	Irradiation		Irradiation/Hypoxia	
	Drag tail rate(%)	Tail length(μm)	Drag tail rate(%)	Tail length(μm)
6	44.9 ± 0.2	91 ± 25	14.3 ± 0.4*	76 ± 17▲
12	81.5 ± 0.3	21 ± 66	73.2 ± 0.2▲	116 ± 39
24	56.8 ± 0.5	100 ± 37	12.4 ± 0.6	81 ± 28▲

*：$P<0.01$，▲：$P<0.05$，*vs* irradiation

2.3 IEC-6 细胞增殖周期的变化情况

细胞周期结果(表5)表明:照后24 h内两组的周期改变主要表现为G_1、G_2期阻滞(细胞比例增加)和S期延迟(细胞比例减少)($P<0.05$);细胞周期于照后6 h已发生明显改变,单纯照射组于24 h基本恢复正常,而照后低氧组改变仍显著。与单纯照射组比,照后低氧组周期改变主要在G_2/M期。单纯照射组G_2期阻滞于照后6 h达到高峰,随后快速下降并于照后24 h接近正常;照后低氧组G_2期阻滞于照后6 h也达到高峰,虽然低于单纯照射组($P<0.05$)但此高峰延续致照后12 h,然后缓慢下降,并且于照后12~24 h内细胞比例高于单纯照射组($P<0.05$)。

表5 照后IEC-6细胞增殖周期的改变($n=3$, %)

Tab 5 Cell cycle change of IEC-6 after irradiation ($n=3$, %)

Time (h)	Control			Irradiation			Irradiation/hypoxia		
	G_1	S	G_2	G_1	S	G_2	G_1	S	G_2
6	52.8	31.6	15.6	48.3*	28.4*	23.3*	54.4▲	25.2▲	20.4▲
12	53.4	31.0	15.6	62.1*	20.3*	17.6*	56.4▲	23.1▲	20.5▲
18	55.4	29.3	15.3	61.3*	23.4*	15.3*	66.1▲	15.5▲	18.4▲
24	56.3	29.6	14.1	57.4	28.2	14.4	59.5▲	24.0▲	16.5▲

*: $P<0.05$, *vs* control; ▲: $P<0.05$, *vs* irradiation

3 讨论

正常细胞的DNA受到射线损伤后,细胞将通过启动细胞周期检测点的信号传导通路,使细胞停滞于G_1、S、G_2/M期各个细胞周期检测点,进行损伤后修复[5]。细胞DNA受损后有3种转归:①为经损伤后修复,重新进入正常蹬细胞周期;②为DNA损伤过于严重,细胞无法予以修复从而走向凋亡;③为细胞携带受损而无法修复的DNA重新进入细胞周期,这一类型细胞易造成癌变。

G_2期阻滞是电离辐射引起细胞周期紊乱最常见类型,细胞受损时G_2/M期检查点阻止细胞在其DNA损伤得到修复前进行分裂,这样可避免错误的遗传信息进入子代细胞。因此,G_2期阻滞有利于DNA损伤修复、保持基因组的稳定、减少突变和提高存活率[6]。

DNA辐射损伤修复受环境因素的影响,如果环境因素不利于细胞的增殖但又不影响细胞对辐射损伤的修复,那么,该因素将有利于细胞的存活。基于此设想,本研究以大鼠空肠上皮细胞(IEC-6细胞株)为研究对象,^{60}Co-γ射线12 Gy一次性照射,然后给予5%低氧处理6 h(此条件经预实验筛选确定),观察低氧对辐射损伤修复的影响,从而揭示辐射损伤修复与低氧环境的关系。

单纯照射组G_2期阻滞现象表现出一种有趣的"弹簧"效应,即它的自我保护机制在照后0~6h激活程度呈时间依赖性增强于照后6 h达到高峰,随后迅速"崩溃和释放"(即细胞由停滞修复转变为凋亡或者进入下一个新的细胞周期,表现为阻滞峰骤然塌陷,下一个细胞周期细胞比率激增同时凋亡率猛增)并于照后24 h接近正常。而照后低氧组所表现的细胞G_2期阻滞于照后6 h也达到高峰,但明显低于单纯照射组,且此高峰延续致照后12 h,然后缓慢下降,于照后24 h仍阻滞显著,结果表明照后低氧降低了细胞G_2阻滞的峰值、延长了阻滞时间。研究表明随着照射剂量的增加G_2期阻滞"崩溃和释放"变得迅速,导致凋亡增加存活降低[7]。本研究结果与其一致,提示照后低氧相当于减少了照射剂量。

实验采用两种不同的检测DNA损伤修复方法检测照后DNA的修复情况,结果均表明照后低氧可以促进细胞对DNA损伤的修复。与单纯照射组比,照后低氧组在0~6 h内修复掺入率明显增加,提高15%;托尾率和尾长均降低显著,照后6 h和24 h最明显,说明照后低氧可以提高细胞对DNA辐射损伤的修复能力。^{3}H-TdR掺入实验结果表明,照后低氧组在照后24 h内各时间段的掺入率均明显高于单纯照射组提高12%。同时,MTT实验结果表明,照后1~5 d,照后低氧组的细胞存活率下降缓慢且明显高于单纯照射组,提高10%。两种实验结果明确地显示,照后低氧的确可以提高细胞的增殖和存活率,统计学分析相差显著。

本研究结果表明,照后低氧降低了细胞G_2阻滞的峰值、延长了阻滞时间;促进了细胞对辐射损伤的修复,提高了细胞存活率。但低氧对细胞周期的影响和促修复机制如何,有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Turrziani M, Di Giacomo A M, Cardillo A, *et al*. Residual telomerase activity: a marker of cell survival after exposure to gamma radiation *in vitro* [J]. Anticancer Res, 2003, 23(6C): 4561-4569.

[2] Yanagie H, Kobayashi H, Takeda Y, *et al*. Inhibition of growth of human breast cancer cells in culture by neutron capture using liposomes containing 10B[J]. Biomed Pharmacother, 2002, 56(2): 93-99.

[3] Vincent F, Cerline J, Goldblum S, *et al*. A new flow cytometric method to follow DNA gap filling during nucleotide excision repair of UVc-induced damage[J]. Cytometry, 2001, 45(2): 96-101.

[4] Mohankumar M N, Janani S, Prabhu B K, *et al*. DNA damage and integrity of UV-induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay[J]. Mutat Res, 2002, 520(1-2): 179-187.

[5] Hagiwara S, Takahashi M, Yanmagishi A, *et al*. Novel findings regarding photoinduced commitments of G_1-, S- and G_2-phase cells to cell-cycle transitions in darkness and dark-induced G_1-, S- and G_2-phase arrests in Euglena[J]. Photochem Photobiol, 2001, 74(5): 726-733.

[6] Ree A H, Bratland A, Solberg Landsverk K, *et al*. Ionizing radiation inhibits the PLK cell cycle gene in a G_2 checkpoint-dependent manner[J]. Anticancer Res, 2004, 24(2B): 555-562.

[7] Concin N, Stimpfl M, Zeillinger C, *et al*. Role of p53 in G_2/M cell cycle arrest and apoptosis in response to gamma-irradiation in ovarian carcinoma cell lines[J]. Int J Oncol, 2003, 22(1): 51-57.

(编辑 薛国文)