

文章编号: 1001-098X(2004)01-0030-04

AL 杂交细胞在放射生物学研究中的应用

李蓉

摘要 AL 杂交细胞是近年来研究负荷粒子致突变效应较理想的一种分析体系, 可用于直接检测低剂量突变因子的效应。用此体系研究某些人类基因之间的连锁非常方便, 体系灵敏度高, 具有其他体系细胞所不具备的优势, 在放射生物学中可作为研究致突变效应的一种很好的工具。

关键词 AL 杂交细胞; 突变; 染色体; 基因

中图分类号 Q345⁺.2 文献标识码 A

The application of AL hybrid cells in radiobiology study

LI Rong

(Institute of Combined Injuries, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract The AL cell assay employs a human-hamster hybrid cell lines which contains a sin-gle human chromosome, number 11. AL cells are convenient for studying linkage between selected human genes, and detecting effect of low-dose mutant. AL cells will aid in the understanding of the mutagenic effects of different types of ionizing radiation.

Key words human-hamster hybrid AL cell; mutation; chromosome; gene

AL (human lethal antigen)杂交细胞是人淋巴细胞或人羊水成纤维细胞与仓鼠卵巢细胞融合而成的人-仓鼠杂交细胞, 是近年来研究负荷粒子致突变效应较理想的一种分析体系。除了含仓鼠卵巢细胞的一套染色体, AL 杂交细胞还包含一个人类 11 号染色体, 即保留了一个细胞增殖不需要的人类染色体, 可表达人类细胞表面抗原。

1 遗传学背景

AL 杂交细胞表面有特殊抗原标记物如 S1 (Sall-1, 曾称 a₁, 现已查明 S1 即人类表面抗原 CD59, 以下统称 S1)、S2 和 S3, S1 和 S3 基因位于 11 号染色体的短臂(11pter→11p13); S2 位于长臂 (11qter→11p13), 范围比 S1 位点更大。S1 分布于人类红细胞、成纤维细胞和淋巴细胞, S2 分布于成纤维细胞和淋巴细胞。目前, AL 杂交细胞表面抗原如 S1、S2 和 S3 等已经分离鉴别并定位。

AL 杂交细胞和正常仓鼠细胞、人类细胞一样, 具有辐射敏感性。对 X 射线、紫外线诱发的 DNA 损伤, AL 杂交细胞与人类细胞的修复水平一样。

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学全军复合伤研究所 (现为北京放射医学研究所博士研究生)

2 AL 体系的特点

2.1 AL 杂交细胞用于突变研究的优势在于几乎整条人类 11 号染色体均可充当突变的靶子

AL 杂交细胞表达人类细胞表面抗原与否, 依赖于 11 号染色体的存在。AL 杂交细胞用于突变研究的优势在于几乎整条人类 11 号染色体均可充当突变的靶子。对杂交细胞的存活来说, 除了位于短臂顶端 ras 基因(11p15.5)附近的小片段, 这条染色体大部分都是不必要的。用 AL 分析的优点在于 11 号染色体上大的碱基对的缺失不是致死性的, 很多 DNA 探针已定位于这条染色体上。尽管 AL 杂交细胞中的人类 11 号染色体位于仓鼠细胞中, 但无证据表明它的功能或结构与它在人类细胞环境中有何不同, 这说明作为正常人类染色体仍具有一定的完整性。

2.2 受辐射作用后, AL 体系能较易地反映另一复合因素对量效关系的影响

受辐射作用后, AL 体系中 S1⁻ 突变频率与受照射剂量关系的曲线斜率要比 hgprt⁺ 的曲线斜率大得多, 能较易地反映另一复合因素对斜率的影响。

Gustafson DL 等^[1]研究发现, 香草醛能抑制过氧

化氢、N-甲基-N-亚硝基胍和丝裂霉素 C 诱发的突变,也能增加这些试剂的毒性,但对 ^{137}Cs γ 射线诱发的突变或毒性没有效应,显示香草醛能抑制 S1 位点的突变和以特异方式改变毒性。

Zhou H 等^[2]研究发现,低剂量 NNK(4-甲基亚硝胺-1,3-吡啶基-1-丁酮)复合 α 粒子时,AL 杂交细胞产生的复合突变效应与相加模型一致;NNK 剂量较高时,则低于相加模型;NNK 除了诱发 CD59 突变,至少还会失去一个标记物,当复合 α 粒子时,其他标记物突变丢失几率随 NNK 剂量增加而增加。这为环境水平的 NNK 与 α 粒子的复合遗传毒性效应提供了体外评价方法,作为一个多因子相互作用的结果,有助于弄清突变过程的分子机制。

2.3 AL 杂交细胞用于研究旁观者效应非常方便

最近的研究^[3]表明,细胞外或核外的靶在介导 α 粒子引起的旁观者遗传毒性效应时是重要的。将 AL 细胞先种植在单或双面的两层聚脂薄膜的皿中培育 24d,一面(有或无细胞)用直线加速器(4MeV)照射 0.1~100Gy 后,细胞在皿中放置 1 或 48h,然后收集未照射细胞用于存活率和突变分析。当有细胞的一面用 α 粒子照射(1, 10 和 100Gy)时,48h 共培养的未照射细胞存活分数显著低于对照组。然而这种变化在共培养 1h 后或培养基单独受照时并未检测到,且与受照细胞共培养对从两层聚脂薄膜的皿中收集的未照射细胞的自发突变未产生明显的影响。结果表明,受照细胞释放某些毒性因子进入培养基,而杀死未受照细胞。

旁观者效应和适应性反应在低剂量辐射的生物学效应中非常明显,并可能影响剂量效应曲线的形状。用带电粒子微束和 AL 细胞分析体系,发现未照射的细胞是通过与 α 粒子贯穿胞核的细胞直接接触来获得突变。在 α 粒子照射前将细胞用 0.1Gy 的 X 射线预处理 4h,可显著降低这些旁观者的突变效应^[4]。

2.4 不采取有争议的外推法,可用 AL 杂交细胞直接检测低剂量突变因子的效应

某些突变对筛选环境因素造成的癌症和遗传性疾病是有用的。用传统方法分析哺乳细胞突变,低估了环境因子所致基因突变,对癌症和遗传性疾病发生的估计严重错误。使用 AL 杂交细胞和低剂量突变因子(<1Gy 的 X 射线,使细胞死亡率降到很低,

在剂量-存活曲线中代表细胞死亡区域的初始“肩”已降到最小)可纠正这种错误。这种方法可直接测量低剂量辐射和其他致突变剂的效应,而不必采取有争议的外推法。Wedemeyer N 等^[5]预先通过磁珠细胞分离仪消除自发性突变,用 100kV 的 X 射线照射 AL 杂交细胞 0.1~5Gy,荧光免疫标记后,用流式细胞仪定量测量诱发的 CD59 突变比例,结果发现 0.2~5Gy 时,CD59 的突变量与剂量呈线性方程,对 CD59 突变克隆分析发现,受 1、3 和 5Gy X 射线照射后,大片段(>6Mbp)缺失呈剂量依赖的线性增加,且点突变仅在自发性 CD59 突变或低剂量照射($\leq 1\text{Gy}$)中发生。结果说明,AL 分析体系经改进可检测低剂量电离辐射诱发的非致死性 DNA 损伤,并可定量测量。

2.5 AL 杂交细胞是一个很好的研究毒物对哺乳动物细胞的致突变机制的工具

为了确定氧自由基在介导青石棉纤维致突变的作用,Xu A 等^[6]研究了青石棉纤维诱发 AL 杂交细胞 buthionine sulfoximine (BSO)的突变频率和 8-羟基脱氧鸟苷的形成,结果证实青石棉纤维对 AL 细胞诱发的氧化 DNA 损伤呈剂量依赖增加;给予二甲基亚砷,可大大抑制 8-羟基脱氧鸟苷,说明活性氧作为介质以浓度依赖的方式可调节纤维诱发 AL 细胞的 DNA 损伤突变。为评价活性氧对石棉致突变过程的作用,他们将石棉纤维诱导 AL 的突变类型与 H_2O_2 产生的突变类型进行比较,突变谱分析显示,石棉纤维诱导 CD59 突变类型与同等毒性剂量的 H_2O_2 诱导的类型相似。这些结果提供了直接的证据,说明石棉对哺乳动物细胞的突变机制是由活性氧介导的^[7]。AL 细胞突变分析系统对检测多位点丢失为主的致突变剂较敏感,Kessel M^[8]用 AL 细胞研究了自由基清除酶对细胞的毒性和砷致突变潜力:将细胞用超氧化物歧化酶或氯霉素乙酰基转移酶处理,可使砷的细胞毒性和致突变性平均降低 2~3 倍。用 8-羟基脱氧鸟苷的特殊单克隆抗体进行免疫组化染色,证实了砷可诱导 AL 细胞的氧化 DNA 损伤,抗氧化酶可显著抑制这种作用。降低胞内非蛋白质水平的巯基(主要是谷胱甘肽),可使总突变率增加 3 倍,突变比例与多位点缺失一样。这说明活性氧在砷对哺乳动物的遗传毒性方面发挥着重要的作用。

传统的理论认为,电离辐射的遗传毒性如突

变和癌变,多是由于直接对核的损伤。尽管显示 α 粒子穿过细胞质是无害的,但对其全面的影响还不知道。Wu LJ^[9]等通过使用双重荧光染料染色分别定位于细胞核和细胞质,从而避免核的移动,发现细胞质受照可致AL细胞CD59发生突变,最小限度减轻细胞毒性。诱发突变的主要类型与自发性突变的区域相似,与细胞核受照产生的突变完全不同。此外,加入自由基清除剂和细胞内谷胱甘肽抑制剂发现,细胞质受照的致突变效应依赖于产生的活性氧种类。这些研究表明,细胞质是电离辐射遗传效应的重要靶器官, α 粒子穿过细胞质可能比穿过细胞核更危险,因为这种致突变很少或没有杀死靶细胞。

3 AL杂交细胞的其他变型

1974年, Jones C等通过突变分析和适当抗血清、补体的选择,获得了AL-JI杂交细胞(人羊水成纤维细胞和中国仓鼠卵巢细胞的K1克隆,即CHO-K1融合而成),它可以表达S1、S2和S3抗原的各种复合型。AL-JI及其S1⁻变型是hgprt⁺Trans⁻(Trans,支链氨基酸转移酶),S1⁻变型是以隐性方式作用的(或cis-显性)。AL-JI杂交细胞提供了一个生化免疫活性的模型体系,它包括局部基因定位、突变筛选鉴别和细胞表面分子学特征,这在控制人类细胞的生长、分化、发展和相互关系中发挥关键作用。

将AL杂交细胞与CHO(中国仓鼠卵巢细胞)融合,形成了新型细胞——ALC杂交细胞,它含2套CHO染色体和1条人类11号染色体,其中的11号染色体在决定突变量上发挥重要作用,如缺失基因位于11(11p15.5)短臂顶端,这对AL杂交细胞的存活是致命性的,失去了整条11号染色体的CD59突变细胞就会因死亡而检测不到。相反,11p15.5区域缺失对杂交ALC细胞不是致命性的,可以检测染色体的丢失或其他涉及11p15.5的染色体突变。这种细胞为研究突变机制、遗传不稳定性和突变之间的机制提供了一个有用的工具^[10]。Kraemer SM等^[11]用AL和ALC细胞评价了55 MeV质子和32 MeV氮核离子产生的突变效应,两种离子每单位剂量所致ALC细胞CD59位点的突变是AL杂交细胞的10余倍。氮核离子照射时,ALC主要突变是染色体丢失事件或11p缺失,端着丝

粒常有一断端。质子照射时,ALC细胞CD59突变分数增加,与11q部分移位到一个仓鼠细胞染色体上,或发生散在性突变。说明ALC细胞是一个有力的工具,有助于弄清不同类型电离辐射的突变效应。

Vannais D等^[12]研究了¹³⁷Cs和HZE⁻⁵⁶Fe(600 MeV, LET = 190keV/ μ m)诱发AL杂交细胞和一个新变种AL-179的突变量和突变类型,发现¹³⁷Cs射线在AL-179诱发的S1和hgprt突变是AL杂交细胞的2倍,前者的90%是复合型的,可能是不稳定突变类型。

4 总结

由于受辐射作用后,AL体系能较易地反映另一复合因素对量效关系直线部分斜率的影响,故不采取有争议的外推法,即可用AL杂交细胞直接检测到低剂量突变因子的效应。用AL杂交细胞研究某些人类基因之间的连锁非常方便,S1位点的突变频率远高于相应浓度hgprt⁻突变频率,所以,AL杂交细胞具有很多其他体系细胞所不具备的优势,在放射生物学中可作为研究致突变效应一个很好的工具。

参 考 文 献

- [1] Gustafson DL, Franz HR, Tom SM, et al. Vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) inhibits mutation induced by hydrogen peroxide, N-methyl-N-nitrosoguanidine and mitomycin C but not (¹³⁷)Cs gamma-radiation at the CD59 locus in human-hamster hybrid AL cells [J]. *Mutagenesis*, 2000, 15(3): 207-213.
- [2] Zhou H, Zhu LX, Li K, et al. Radon, tobacco-specific nitrosamine and mutagenesis in mammalian cells [J]. *Mutat Res*, 1999, 430(1): 145-153.
- [3] Zhou HN, Masao Suzuki, Charles RG, et al. Effects of irradiated medium with or without cells on bystander cell responses[J]. *Mutat Res /Fundament Mol Mechanisms of Mutagenesis*, 2002, 499(2): 135-141.
- [4] Zhou HN, Xu A, Masao Suzuki, et al. The Yin and Yan of bystander versus adaptive response: lessons from the microbeam studies [J]. *Int congress series radiat and homeostasis*. 2002, 1236: 241-247.
- [5] Wedemeyer N, Greve B, Uthe D, et al. Frequency of CD59 mutations induced in human-hamster hybrid AL cells by low-dose X-irradiation[J]. *Mutat Res*, 2001, 473(1):73-84.
- [6] Wu LJ, Santella RM, Hei TK. Role of oxyradicals in mutagenicity and DNA damage induced by crocidolite asbestos

in mammalian cells [J]. *Cancer Res*, 1999, 59 (23): 5922-5926.

[7] Xu A, Zhou H, Yu DZ, et al. Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species [J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 110(10): 1003-1008.

[8] Kessel M, Liu SX, Xu A, et al. Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells[J]. *Mol Cell Biochem* 2002, 234(1-2): 301-308.

[9] Wu LJ, Randers-pehrson G, Xu A, et al. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96(9): 4959-4964.

[10] Kraemer SM, Vannais DB, Kronenberg A, et al. Gamma-ray

mutagenesis studies in a new human-hamster hybrid, AL-CD59(+/-), which has two human chromosomes 11 but is hemizygous for the CD59 gene [J]. *Radiat Res*, 2001, 156 (1):10-19.

[11] Kraemer SM, Kronenberg A, Ueno A, et al. Measuring the spectrum of mutation induced by nitrogen ions and protons in the human-hamster hybrid cell line ALC [J]. *Radiat Res*, 2000, 153(6): 743-751.

[12] Vannais D, Drabek R, Gustafson D, et al. Analysis of mutant quantity and quality in human-hamster hybrid AL and AL-179 cells exposed to ¹³⁷Cs-gamma or HZE-Fe ions [J]. *Adv Space Res*, 1998, 22(4): 579-585.

(收稿日期:2000-09-12)

文章编号: 1001-098X(2004)01-0033-04

辐射损伤与细胞周期

姚莉

摘要 辐射后的细胞可能发生恶性转化,可能死亡,另有一些细胞对辐射却产生适应性或抗性,最终长期存活下来。近年来研究发现,此差异与辐射对细胞周期的影响密切相关。辐射可阻断细胞周期活动及延长细胞周期,其中G₁期、S期和G₂/M期等细胞周期检查点(checkpoint)起决定作用,它们分别通过不同的信号途径对辐射所致的损伤进行调控,产生不同的辐射生物学效应。对该领域的深入研究不仅为进一步阐释辐射致癌提供一定的理论依据,而且为临床放疗增敏剂的研制提供新的思路。

关键词 辐射;细胞周期;调控;检查点

中图分类号 Q253, R811.5 文献标识码 A

Radiation injury and cell cycle

YAO Li

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract Some may be malignant transformation, some may die immediately, and the other may be alive which produce radioadaptive responses and radioresistance. Recently, it has been reported that there is close relationship between cell cycle alterations and different injury effects caused by radiation. Cell cycle may be arrested and delayed by irradiation in which G₁-phase, S-phase and G₂/M-phase checkpoints may play a major role. Therefore different signal transduction pathways and moleculars are involved in the checkpoints responses. Furthermore, studies on the cell cycle checkpoints responses to radiation are quite important in radiation biology, because it could not only provide the theoretical basis for the elucidation of cancer caused by radiation, but also gain further insight into investigation and developing radiosensitive drugs for clinical radiotherapy.

Key words radiation; cell cycle; regulation; checkpoints

近年来研究证实,辐射可引起细胞发生恶性转

化,可能死亡,另有一些细胞对辐射却产生适应性或抗性,最终长期存活下来。此差异与辐射对细胞周期的影响密切相关,其中细胞周期检查点