

⁶⁰Co γ 射线合并苯并芘致细胞 HPRT基因突变损伤效应

樊飞跃 杨素霞 李 煜

曹珍山 周淑珍 涂开成 刘国康

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 ⁶⁰Co γ 射线和苯并芘作用后,人胚肺细胞 HPRT基因突变频率明显增加,表明⁶⁰Co γ 射线和苯并芘均造成了人胚肺细胞 HPRT基因突变位点的突变损伤。HPRT基因突变与⁶⁰Co γ 射线和苯并芘作用剂量之间存在着良好的线性正相关的剂量效应关系,线性相关系数分别为 0.9984和 0.9793,显著性检验 *P* 值均小于 0.01。 γ 射线合并苯并芘复合作用后,人胚肺细胞 HPRT变异系数明显地高于对照组的同时,与单纯 γ 射线或苯并芘作用组比较,亦显著性地增高。复合作用组细胞 HPRT变异系数高于单纯 γ 射线及苯并芘作用组细胞 HPRT变异系数之和,表明⁶⁰Co γ 射线合并苯并芘诱发人胚肺细胞 HPRT基因突变具有复合加强作用。

关键词 γ 射线 苯并芘 HPRT 复合作用

Combined effect of ⁶⁰Co γ - ray and B(a)P on HPRT mutation of human embryo lung cells Fan Feiyue, et al (Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

Abstract HPRT mutation of human embryo lung cells induced by ⁶⁰Co γ - ray and benzo(a)pyrene was observed in order to study combined effect of radiation and B(a)P on HPRT mutation of human embryo lung cells. HPRT mutation of the cells occurred after exposed to a different doses of γ - irradiation and B(a)P. Frequencies of HPRT mutations of the cells increased gradually with increase of doses of γ - irradiation and B(a)P. Relationship between HPRT mutation and doses of γ - ray or B(a)P was fit into the positive linear correlation. Variants of HPRT mutation of the cells increased from 0.0 ± 0.02 of control to 0.20 ± 0.02 of 1Gy γ - irradiation and to 0.18 ± 0.03 of $1 \mu\text{g/ml}$ B(a)P separately. The variant of the cells exposed to 1Gy γ - ray and $1 \mu\text{g/ml}$ B(a)P reached 0.40 ± 0.04 , which was not only higher than control's, but also higher than that of γ - ray or B(a)P. The result showed there was the potentate effect of combined exposure to ⁶⁰Co γ - irradiation and B(a)P on HPRT mutation of human embryo lung cells.

Key words γ - ray B(a)P HPRT

定位于人类细胞 X 染色体上的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hprt),对于电离辐射及环境化学诱变剂较为敏感,实验研究已经证实辐射和环境化学诱变剂单一作用于生物机体均可造成细胞 hpert 基因突变^[1,2]。但是在人类实际生活环境中,辐射和化学致癌物质常常同时存在并复合作用于人体。因此,开展电离辐射和环境化学致癌物质复合效应研究不仅具有理论意义,而且具有实际应用价值。本文应用细胞质分裂阻滞法(CB法),检测了⁶⁰Co γ 射线和苯并芘对人胚肺细胞 hpert 基因突变损伤效应,以期阐明⁶⁰Co γ 射线合并苯并芘所致 hpert 基因突变损伤复合效应的规律和特点。

1 材料与方法

1.1 人胚肺细胞 为本实验室建立的 HEL-9402 细胞系。细胞取自水囊引产的 6 个月女性胎儿。染色体核型分析为正常二倍体核型(2n=46) 37℃、5% CO₂ 条件下,贴壁培养于含 15% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中。

1.2 作用因子 ⁶⁰Co γ 射线细胞吸收剂量率为 $2.44\text{Gy} \cdot \text{min}^{-1}$,剂量分组分别为 0.25 0.5 1 3 5Gy。苯并芘剂量分组为 0.25 0.5 1 3 $\mu\text{g/ml}$ (作用 24 小时)。复合作用组为 1Gy ⁶⁰Co γ 射线复合 $1 \mu\text{g/ml}$ 苯并芘。

1.3 人胚肺细胞 hpert 基因突变检测 本实验采用细胞质分裂阻滞法(CB法)^[3],检测人胚肺细胞 hpert 基因突变。⁶⁰Co γ 射线和苯并芘处理后第 4 代的人胚肺细胞分为两组,其

中一组加入终浓度为 0.1mM 的 6- TG(6-thioguanine), 37℃ 培养 30h,同时向两组中加入终浓度为 6^μg/ml 的细胞松弛素- B(Cyt-B),继续培养 42h 醋酸甲醇固定,细胞悬液制片, Giemsa 染色。显微镜下计数双核或多核细胞数

1.4 hpert 基因突变变异系数 变异系数定义为,含 6- TG 培养的 1000 个细胞中双核或多核细胞数除以不含 6- TG 培养的 1000 个细胞中双核或多核细胞数。

2 结果

2.1 ⁶⁰Coγ 射线致人胚肺细胞 hpert 基因突变

人胚肺细胞经不同剂量 ⁶⁰Coγ 射线作用后第 4 代,反映细胞 hpert 基因突变损伤的细胞变异系数,除 0.25Gy 剂量组外,在各剂量作用组均明显增加,经统计学检验差别显著(表 1)。

表 1 辐射致人胚肺细胞 hpert 基因突变

剂量 (Gy)	双核或多核细胞数 /1000细胞		变异系数	
	未加 6- TG	加 6- TG		
0.0	208.20± 10.11	21.00± 3.16	0.1009±	0.0159
0.25	211.00± 11.22	30.40± 4.59	0.144±	0.0231
0.5	204.60± 11.94	34.80± 3.76	0.170±	0.0209*
1.0	200.00± 14.56	39.60± 3.61	0.1980±	0.0231*
3.0	192.60± 13.41	73.60± 5.46	0.382±	0.0389**
5.0	195.20± 14.84	114.60± 9.39	0.587±	0.0656**

* P < 0.05,* * P < 0.01

表 2 苯并芘致 HEL- 9402 细胞 hpert 基因突变

剂量 (^μ g/ml)	双核或多核细胞数 /1000细胞		变异系数	
	未加 6- TG	加 6- TG		
0.0	208.20± 10.11	21.00± 3.16	0.1009±	0.0159
0.25	196.60± 7.28	24.60± 3.72	0.125±	0.0195
0.5	186.40± 7.55	27.60± 3.26	0.148±	0.0185
1.0	179.80± 11.16	32.40± 4.22	0.1806±	0.0260*
3.0	174.00± 9.65	64.20± 6.67	0.3690±	0.0434**
5.0	161.40± 5.43	92.80± 7.00	0.4224±	0.0490**

* P < 0.05,* * P < 0.01

2.2 苯并芘致人胚肺细胞 hpert 基因突变
经不同剂量苯并芘作用后第 4 代的人胚

表 3 ⁶⁰Coγ 合并苯并芘致细胞 hpert 基因突变复合效应

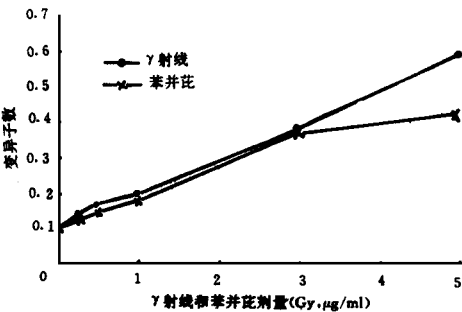
γ 线剂量 (Gy)	苯并芘剂量 (^μ g/ml)	双核或多核细胞数 /1000细胞		变异系数
		未加 6- TG	加 6- TG	
0	0	208.20± 10.11	21.00± 3.16	0.1009± 0.0159
1	0	200.00± 14.56	39.60± 3.61	0.1980± 0.0231*
0	1	179.00± 11.16	32.40± 4.22	0.1806± 0.0260*
1	1	178.20± 7.46	71.40± 6.25	0.4007± 0.0389*

* : 与对照组比较 P < 0.05;# : 与单纯照射组或苯并芘作用组比较 P < 0.01

肺细胞, hpert 基因突变变异系数,在 0.25 和 0.5^μg/ml 剂量组虽然有所增加,但无统计学意义。当剂量增加到 1^μg/ml 以上时,各剂量作用组 hpert 变异系数均明显增加,经统计学经验差别显著(表 2)

2.3 人胚肺细胞 hpert 基因突变与辐射及苯并芘作用 剂量间的关系

人胚肺细胞 hpert 基因突变变异系数,随 ⁶⁰Coγ 射线照射剂量及苯并芘作用剂量变化的量效关系,均表现为随着剂量的增加而逐渐增加(附图)。



附图 ⁶⁰Coγ 射线和苯并芘致
HEL- 9402h prt 基因突变

对不同剂量 ⁶⁰Coγ 射线和苯并芘作用后的人胚肺细胞 hpert 变异系数与作用剂量之间的关系进行回归分析。结果表明, hpert 变异系数与 γ 射线和苯并芘的剂量效应关系分别满足如下方程:

Y= 0.11+ 0.09X₁ r= 0.9984 (1)

Y= 0.11+ 0.07X₂ r= 0.9793 (2)

式中, Y 为变异系数; X₁: ⁶⁰Coγ 射线剂量 (Gy); X₂ 苯并芘剂量 (^μg/ml)。

2.4 ⁶⁰Coγ 射线合并苯并芘致细胞 hpert 基因突变复合效应

接受 1Gy ⁶⁰Coγ 射线合并 1^μg/ml 苯并芘复合作用的人胚肺细胞, hpert 变异系数不仅明显的高于对照组,与单纯 γ 射线作用组及苯并芘作用组比较,亦显著性地增高(表 3)。

3 讨论

3.1 本实验应用细胞质分裂阻滞法检测辐射及苯并芘对人胚肺细胞 *hprt* 基因突变损伤效应。当细胞培养体系存在嘌呤类似物 (6-TG) 时,野生型细胞因摄取嘌呤类似物而死亡,*hprt* 突变型的细胞对培养体系中的嘌呤类似物表现出抗性。因此,当细胞 *hprt* 基因突变时,通过检测细胞对嘌呤类似物抗性出现的频率,即可确定细胞 *hprt* 基因突变位点的突变频率。CB法利用细胞松弛素 B 阻止细胞质分裂而不影响细胞核分裂这一特性,检测对嘌呤类似物出现抗性的突变细胞 *hprt* 基因突变细胞在含 6-TG 培养体系中继续存活分裂,由于胞质分裂被抑制,因而出现双核或多核细胞。检测双核或多核细胞出现的频率,即可确定细胞 *hprt* 基因位点的突变频率^[3]。本实验观察到,人胚肺细胞经不同剂量 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线和苯并芘作用后,反映细胞 *hprt* 基因突变频率的变异系数,在各剂量作用组均明显增加,表明 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线和苯并芘均造成了人胚肺细胞 *hprt* 基因突变位点的突变损伤。

3.2 体细胞 *hprt* 基因突变损伤对于电离辐射和化学致癌物较为敏感。许多研究工作者,致力于不同 LET 辐射^[4,5] 和不同剂量率照射^[6,7] 及不同环境化学物质^[8,9] 诱发 *hprt* 基因突变的量效关系变化规律和特点的研究。也有部分研究工作者,应用分子生物学的实验手段,开展了辐射及化学诱变剂诱发细胞 *hprt* 基因突变谱的分析^[10,11]。本实验对 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线和苯并芘作用后,人胚肺细胞 *hprt* 基因突变与作用因子作用剂量之间的关系进行了研究。结果表明,*hprt* 基因突变与 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线和苯并芘作用剂量之间存在着良好的线性正相关的剂量效应关系,线性相关系数分别为 0.9984 和 0.9793,显著性检验 *P* 值均小于 0.01。证明 *hprt* 基因突变可以作为电离辐射和环境化学物质致突效应及量效关系研究的观察指标。

3.3 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线合并苯并芘复合作用后,人胚肺细胞 *hprt* 变异系数明显地高于对照组的同时,与单纯 γ 射线或苯并芘作用组比较,亦显著性地增高。复合作用组细胞 *hprt* 变异系数高于单纯 γ 射线及苯并芘作用组细胞 *hprt* 变异系数之和,表明 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线合并苯并芘诱发人胚肺细胞 *hprt* 基因突变具有复合加强作用。

参考文献

- 1 Suzuki K, Hei TK. Mutation induction in gamma-irradiated primary human bronchial epithelial cells and molecular analysis of the HPRT-mutation. *Mutat Res*, 1996, 347(1): 33-41.
- 2 Mittelstaedt RA, Smith BA, Heflich RH. Analysis of in vivo mutation induced by N-ethyl-N-nitrosourea in the *hprt* gene of rat lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 1995, 26(4): 261-9.
- 3 Norman A, Mitchell JC, Iwamoto KS. A sensitive assay for 6-thioguanine-resistant lymphocytes. *Mutat Res*, 1988, 208: 17-19.
- 4 Amundson SA, Chen DJ, Okinaka RT. Alpha particle mutagenesis of human lymphoblastoid cell line. *Int J Radiat Biol*, 1996, 70(2): 219-26.
- 5 Kataoka Y, Perrin J, Grdina DJ. Induction of *hprt* mutations in mice after exposure to fission-spectrum neutrons of ^{60}Co gamma rays. *Radiat Res*, 1993, 136(2): 289-92.
- 6 Furuno-Fukushi I, Tatsumi K, Takahagi M et al. Quantitative and qualitative effect of gamma-ray dose-rate on mutagenesis in human lymphoblastoid cells. *Int J Radiat Biol*, 1996, 70(2): 209-17.
- 7 Amundson SA, Chen DJ. Inverse dose-rate effect for mutation induction by gamma-rays in human lymphoblasts. *Int J Radiat Biol*, 1996, 69(5): 555-63.
- 8 Jansson K, Hyttinen JM. Induction of gene mutation in mammalian cells by 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX), a chlorine disinfection by-product in drinking water. *Mutat Res*, 1994 Aug, 322(2): 129-32.
- 9 Jansen JG, Vrieling H, van Teijlingen CM, et al. Marked differences in the role of O⁶-alkylguanine in *hprt* mutagenesis in T-lymphocytes of rats exposed in vivo to ethylmethanesulfonate, N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea, or N-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Res*, 1995 May 1, 55(9): 1875-82.
- 10 Phillips EN, Xia F, Kelsey KT et al. Spectra of spontaneous and X-ray-induced mutations at the *hprt* locus in related human lymphoblast cell lines that express wild-type or mutant P53. *Radiat Res*, 1995, 143(3): 255-62.
- 11 Chen J, Thilly WG. Mutational Spectrum of chromium (VI) in human cells. *Mutat Res*, 1994, 323(1-2): 21-7.

(1997年 3月 16日收稿)