

## 【综述】

## 早熟染色体凝集(PCC)在辐射生物剂量估算中的研究进展

信亚周, 马 娅, 刘 伟

中图分类号: T144.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2012)02-0251-02

随着核能的迅速发展和核技术在工农业生产和医学领域的广泛应用,它对促进国民经济的发展已发挥着及其重要的作用。然而核能不同于其他能源,它存在有一定潜在的危险性。另一方面,恐怖袭击特别是核恐怖袭击日益成为世界各国重点关注的反恐问题之一。核(放射)突发事件的医学应急救援是突发事件的应急处置工作的重要组成部分,而如何快速、准确、有效地救治大批伤员又是问题的关键所在。对于辐射损伤伤员来说,受照剂量大小是制定治疗方案的重要依据,也是伤员存活的决定因素<sup>[1]</sup>。因此,估计个人受照剂量对于救治辐射损伤伤员有十分重要的意义。对于受照剂量的估算通常采用物理剂量估算和生物剂量估算,在比较复杂的情况下(切尔诺贝利核事故等),生物学检测更优于物理学检测,能够比较准确地估算照射剂量。其中以染色体畸变分析和淋巴细胞微核技术较为成熟。然而用常规的细胞遗传学方法,染色体仅在细胞有丝分裂中期才能见到,人血淋巴细胞要用 PHA 刺激培养 2 天,才能进行畸变观察。因此,当在事故情况下,无法在短时间内提供剂量。早熟染色体凝集技术克服了常规技术的不足成为辐射生物剂量学研究的新方向。目前又以 calyculinA 诱导法和 Okadaic acid 诱导法的研究最为广泛。

## 1 早熟凝集染色体及早熟染色体凝集技术的特点

当一个分裂期细胞和一个间期细胞融合后,间期细胞核被诱导提前进入有丝分裂期,这时,间期细胞核膜溶解,核内极度分散状态的染色质凝缩成染色体样的结构,这种细纤维的染色体称之为早熟凝集染色体(简称 PCC)。由于 G1 期、S 期、G2 期的 DNA 复制状态不同,早熟凝集染色体的形态各异,如与 M 期细胞融合的 G1 期的染色体为单线状, PCC 的长度反映细胞所处周期的不同,早 G1 期的染色体相对较短,而晚 G1 期的染色体则明显延长。S 期细胞与另一个 M 期细胞融合时, PCC 表现为大量不规则的“粉碎状”染色体。随着 S 期的进展,具有两条染色单体的较粗染色体片段逐渐增多。G2 期早熟凝集染色体为双线状,并随 G2 进程而不断凝缩变短至 G2 期末,染色体形态已近似于高度凝缩的 M 期染色体<sup>[2]</sup>。PCC 现象的发现开辟了细胞生物学的一个新领域,使人们有可能在细胞周期各时相观察到染色体结构。因此,研究各种射线或化学诱变剂对细胞染色体的损伤,可用 PCC 技术对间期细胞直接作细胞遗传学分析,以确定细胞内染色体的损伤程度,在获得标本 2~3h 之后即可分析染色体损伤情况,得出结果。其次用 PCC 技术仅需血样 0.5 ml,分析 100 个细胞即可显示低剂量照射情况下辐射损伤,而常规染色体畸变分析法需分析数百个甚至上千个中期分裂相。可见, PCC 技术是研究生物剂量计有希望的技术<sup>[3]</sup>。尤其是 calyculin A(一种磷酸酶抑制剂)能快速诱导间期染色体凝集<sup>[4]</sup>并排除了诱导细胞的影响,更有利于研究射线对间期细胞的作用。

## 2 早熟染色体凝集的诱导方法及其原理研究进展

目前诱导 PCC 的方法主要有两种:有丝分裂细胞融合法和化学诱导法。1970 年 Johnson 和 Rao 首先用 Hela 细胞在紫外线灭活的仙台病毒介导下融合时,处于分裂期的细胞可诱导处于间期的细胞染色质浓缩,呈现细长的染色体状的 PCC 现象,但是用病毒的方法很难普及推广。1983 年 Pantelias 等用聚乙二醇代替仙台病毒作促融剂,不仅简化了 PCC 实验方法,而且还成功地应用于人鼠的体细胞诱导。同年 cornforth 用溴脱氧尿苷加入到诱导细胞的培养中,加大了分辨率。然而有丝分裂细胞融合法诱导 PCC 作为生物剂量评估方法存在许多不足,如细胞制备比染色体分析费时,技术要求更高, PCC 产额低、不稳定等,导致所评估的剂量可靠性较差而未能被普遍接受<sup>[5]</sup>。1998 年, Durante 等<sup>[6]</sup>提出用 calyculinA 诱导细胞周期中各时相 PCC 方法。这种物质可以使外周血淋巴细胞在任何一个周期时相都能产生早熟凝集染色体。1999 年, Kanda 等<sup>[7]</sup>用一种特殊抑制蛋白磷酸酶的药物 Okadaic acid 诱导 PCC,用这种方法仅计数 PCC-环,可以较快地对受照者作出剂量估计。用该方法 PCC-环估计剂量可达 20Gy,由于大剂量照射后 PCC-环数较高,易于得出结果,因此被认为是一种适合大剂量照射的生物剂量估算方法。Okadaic acid 和 calyculinA 的发现和应取代了过去传统 PCC 中的细胞融合技术,但它们在单独使用时并不能诱导分化的和非增殖的细胞 PCC,如静止的外周血淋巴细胞,若在含 Okadaic acid 和三磷酸腺苷的培养上清液中加入 cyclinB 激酶(丝裂促进因子的基本成分之一),则可高产额地诱导静止的外周血淋巴细胞 PCC<sup>[8]</sup>。与细胞融合法相比,化学诱导法如 CalyculinA 更能有效地诱导 PCC 的生成,诱导时间更短,操作简单。研究表明 CalyculinA 加入细胞培养液(终浓度为 50nmol/L) 5min 后,染色质开始凝集,在 15~30min 内染色质充分凝集,适用于染色体畸变动力学的研究。而细胞融合法不能及时分析畸变随时间的变化情况,而且细胞融合法是用有丝分裂细胞来诱导的,诱导细胞的存在可能干扰受照细胞染色体的分析。比较而言, CalyculinA 诱导法则能比较精确地研究任意时间内染色体的断裂情况,因此 CalyculinA 这一磷酸酶抑制剂的发现为研究畸变染色体的修复提供了便利的手段,而研究畸变染色体的修复有助于了解细胞的辐射敏感性<sup>[9]</sup>。传统 PCC 中的细胞融合技术利用的是外源性 MPF,从分裂细胞中转移到间期时相的细胞。而药物诱导的 PCC 利用蛋白磷酸酶抑制剂,它可以激活内源性细胞内成熟促进因子。这种方法比融合诱导 PCC 简单得多,并且在不同的领域已经被证明是有益的<sup>[10]</sup>。所谓的 MPF 被称作卵细胞促进成熟因子,或细胞分裂促进因子。在成熟的卵母细胞、分裂期粘菌、酵母等中可提取到这种促细胞分裂因子。由两个亚基组成,一个是细胞周期蛋白,一个是依赖周期蛋白起作用的蛋白激酶,其中周期蛋白为调节亚基。能够促使染色体凝集,使细胞由 G2 期进入 M 期的因子。

## 3 早熟染色体凝集(PCC)作为辐射生物剂量计的研究进展

3.1 动力学研究进展 Metzger L 等<sup>[11]</sup>用 X 射线照射 CHO 细胞后用 AFICE 技术分析显示整个细胞周期中 DNA 双链断裂修复呈现一快和一慢组合的双向动力学。快的部分 CHO 细胞修

基金项目:山东省自然科学基金(项目编号 ZR2010HQ061)

作者单位:山东省医学科学院放射医学研究所,济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院,山东 济南 250062

作者简介:信亚周(1983~),硕士研究生,研究方向:辐射效应。

通讯作者:刘伟,男,硕士生导师,研究员。

复达半数的时间拟合数据的最小二次方为 7~14min,慢的部分修复达半数的时间为 60~90 min,慢的部分所需时间与用早熟染色体凝集技术观测到的染色体片段半数重接的时间差不多。

Greiner R 等<sup>[12]</sup>用 X 射线照射人体淋巴细胞后与处于分裂期的 CHO 细胞融合,并用 C 显带方法染色观察早熟凝集染色体。发现当辐射剂量为 4Gy 时,早期双着丝粒体产量稳定时的融合延迟时间达到 2h,之后呈现 S 型上升,当其产量最终再次达到稳定时融合延迟时间大约为 8~10 h。

Sipi P 等<sup>[13]</sup>使用 PCC 法研究在低传能线密度照射人类淋巴细胞后 G0 期和 G2 期染色单体断片的重接动力学发现,在 G0-PCC 的实验中染色单体完全交换的频率随时间的延长而逐渐增加,但是不完全交换的频率却表现出更多的变化并且随着时间的延长而普遍下降。对于 G0-PCC 的研究发现:与两个低的辐射剂量相比辐射剂量为 8Gy 时染色体断片重接的比率更高。G0 期和 G2 期总畸变频率比相应的中期畸变频率更高。

Brvant PE 等<sup>[14]</sup>应用 CalyculinA 诱导法与传统的辐射诱导染色单体片段实验相比较研究细胞周期延迟对于细胞进入有丝分裂期的可能影响。结果发现,两种染色体凝集的方法之间的辐射后染色单体片段随时间延长成指数顺次减少的动力学相似。然而 CalyculinA 诱导的 PCC 技术导致染色单体片段消失的频率稍微增加。最终的结论是,辐射后细胞周期延迟可能是决定 G2 期细胞在不同时期染色单体断裂绝对频率的因素之一。

Liu C 等<sup>[15]</sup>应用病毒介导的早熟染色体凝集的技术结合荧光原位杂交研究间期时相的染色体畸变,通过对照射后人类成纤维细胞染色单体断片重接和错接的分析研究其潜在致死损伤和修复。研究发现大部分修复过程发生在 G1 期,在 G0 期每个细胞染色体易位错修复达 0.55,而 G1 期错修复达高达 1.1。由于大多数发生在 G(0)/G(1) 期的修复是通过非同源末端连接(NHEJ)的过程,潜在致死损伤(PLD)修复的增加可能会导致改善 NHEJ 途径细胞周期特异性重接的保真度。在辐射 12h 之后,G1 期复杂型易位比 G0 期复杂型易位的 7 倍还要多。

3.2 剂量与效应关系研究进展 冯嘉林等<sup>[16]</sup>用有丝分裂细胞融合的方法探讨了低剂量<sup>60</sup>Co γ 射线诱发人外周血淋巴细胞早熟凝集染色体的剂量-效应关系,建立了 0~1 Gy 和 0~7 Gy 剂效曲线。在低剂量照射时 G1-PCC 与剂量成线性关系,且 G1-PCC 断片检出率高于常规染色体方法的断片率。大剂量照射时,G1-PCC 的断片率与受照剂量之间仍呈线性定量关系。

Pantelias 等<sup>[17]</sup>用不同剂量 X 射线照射人外周血 PCC 和常规染色体均用 C 显带染色检查 dic 和 r 的发生率,结果表明,淋巴细胞间期与中期 dic 及 r 计数获得的剂量效应关系类似,不论 PCC 还是常规染色体中,dic 和 r 均随着剂量的增加呈线性二次方关系。PCC 法将会对电离辐射剂量估算提供有价值的信息,尤其是在极端紧急的情况下更是如此。

2003 年 George K 等<sup>[18]</sup>研究采用 calyculinA 法,用碳离子、铁离子、X 射线照射人离体淋巴细胞的畸变产量的剂量效应曲线发现,所有的试验中,G2 期细胞比 M 期细胞有更高的畸变(断片)产量,整个间期畸变片段产量是 M 期的四倍。显而易见,受损的细胞遭受了一个过长的 G2 期静止。

2007 年江波等<sup>[19]</sup>用 calyculinA 诱导 PCC 并用 C 显带方法染色探讨 calyculinA 诱导的 PCC 与辐射剂量之间的剂量效应关系,结果发现,随着照射剂量的增大,PCC 总畸变数、PCC 断片数、双着丝粒体加环状染色体数量逐渐增加并呈良好的二次方程关系。

陆雪等<sup>[20]</sup>以 Calyculin A 诱导早熟染色体凝聚(PCC)方法,探索 G2/M-PCC 细胞中 PCC 环用于分析电离辐射损伤程度的可行性。结果发现,用 Calyculin A 可成功诱导人外周血淋巴细胞产生 PCC,且 G2/M-PCC 指数随着剂量水平的提高而

降低。除 20 Gy 剂量外 0~16 Gy 各剂量点样品中 PCC 环的分布符合泊松分布。PCC 环率随着剂量增加而增加,剂量-效应曲线可以拟合直线方程  $Y = 0.0128X + 0.0104$ ,测得  $R^2 = 0.9898$ (为 PCC-R 率,为剂量);二次多项式方程  $Y = 0.00002X^2 + 0.0085X + 0.0011$ ,为  $R^2 = 0.9996$ 。由此可见,Calyculin A 诱导淋巴细胞 G2/M-PCC 中的 PCC 环率可用于生物体电离辐射损伤程度测定。

BaLakrishnan S 等<sup>[21]</sup>采用 Okadaic acid 法研究用不同剂量射线(6.2~24.5 Gy)照射并用 PHA 培养两天后的淋巴细胞 PCC 片断和 PCC 环数量。结果发现:在 6.2~18Gy PCC 指数变化范围为 12%~18%,之后随着剂量的增加降到 6~8%。PCC 片断和 PCC 环的剂量效应曲线都是直线的。有丝分裂延迟和较低的有丝分裂指数使得双着丝粒分析不适用于高剂量辐射的迅速剂量评估,并且 PCC 技术能够在 50 个小时之内完成对急性放射损伤的剂量估计。

#### 4 结束语

核能与核技术被广泛应用于医学工业农业和研究,但由于操作失误管理不善等原因,核辐射事故仍时有发生。电离辐射可能带来的危害也成为不容忽视的问题。特别是近年来核恐怖袭击及突发放射性事故的发生,使得事故后损伤程度的判断及救治极为重要。当发生电离辐射意外事故时,对受照者进行早期生物剂量估算是急性放射病早期诊断和分类诊断的主要依据之一,这样快速、简便、适用剂量范围宽的理想生物剂量计成为放射生物学研究的重要课题。

PCC 技术做为生物剂量计本身有很多优点,其最大的优点是不需长时间培养,避免了间期细胞周期延长和死亡,以及分裂过程中畸变细胞的丢失等因素,从而提高了畸变的检出率。然而 PCC 技术作为成熟的生物技术估算方法应用还有许多工作要做。最近,利用化学诱导 PCC 与 FISH 探针涂染技术相结合以缩短分析时间、改善分析质量,增加使用的分析剂量范围。使用 PCC 与 FISH 相结合,不但可以被用于预测肿瘤组织的放射敏感性,还可以预测不同类型的辐射效应<sup>[22]</sup>,展现出了用于生物剂量学的广泛前景。

#### 参考文献:

- [1] Friesecke I, Beyrer K, Flidner TM. How to cope with radiation accidents the medical management [J]. Br J Radiol 2001, 74 (878): 121-122.
- [2] Hanks SK, Golin SM, Rao PN, et al. Cell cycle-specific changes in the ultrastructural organization of Prematurely condensed chromosomes [J]. Chromosoma, 1983, 88(5): 333-342.
- [3] Pantelias GE, Maillie HD. The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biology dosimetry [J]. Radiat Res, 1984, 99: 140.
- [4] Begg AC, Sprong D, Balm A, et al. Premature chromosome condensation and cell separation studies in biopsies from head and neck tumors for radiosensitivity prediction [J]. Radiotherapy and Oncology, 2002, 62(3): 335-343.
- [5] Gotoh E, Durante M. Chromosome condensation outside of mitosis mechanisms and new tools [J]. Jcell physiol, 2006, 209(2): 297-304.
- [6] Durante M, Furusawa Y, Gotoh E. A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry [J]. Int J Radiat Biol, 1998, 74(4): 457-462.
- [7] Kanda R, Hayata I, Lloyd DC. Easy biodosimetry for high-dose radiation exposures using durg-induced PCC [J]. Int J Radiat Biol, 1999, 75(4): 441-446.

## 【综述】

## 乳腺癌放射治疗的心脏损伤

樊伶俐<sup>1</sup>, 侯 玥<sup>1</sup>, 陈 博<sup>1</sup>, 殷立亮<sup>1</sup>, 王 捷<sup>2</sup>, 文 浩<sup>2</sup>

中图分类号: R816.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2012)02-0253-04

心脏一直被认为是放射不敏感器官,放射治疗中往往忽视了对它的防护。但近年的研究揭示心脏的放射损伤不容忽视。乳腺癌患者术后放射治疗会致心脏放射损伤,尤其是缺血性心脏疾病的危险,从而影响患者的长期生存率和生活质量<sup>[1]</sup>。本文归纳了国内外乳腺癌放射治疗中有关放射性心脏损伤研究资料,希望对乳腺癌放疗中的心脏防护工作有所帮助。

## 1 研究现状

1.1 病理表现及机制 国内文献报道,标准剂量(NSD)大于 20 Gy 或由于重复照射,心脏总剂量大于 60 Gy 时,50% 患者将发生心脏损伤<sup>[2]</sup>。乳腺癌放疗引起的心脏损伤,一般见于心肌、血管组织。Prosnitz RG 等<sup>[3]</sup>对 19 582 例乳腺癌患者的大样本研究发现,放疗会使乳腺癌死亡率每年降低 13%,但每年其他原因造成的死亡率增加 21%,这种增加主要是由于血管因

素造成的超额死亡。Caya 等<sup>[4]</sup>报告放疗损伤可能会影响到心包、心肌及冠脉管系统,导致纤维化或小血管损坏,从而导致心包炎、心绞痛、心肌梗死、心律失常等。其中,冠状动脉损伤引起的心肌梗死是最普遍的死亡原因。冠状动脉损伤中又以左前降支的损伤最常见。Correa cR 等<sup>[5]</sup>研究发现放疗所致的冠状动脉损伤中,左前降支(LAD)占 88%,左旋支占 4%,右冠状动脉占 4%,左旋支+右冠状动脉占 4%。

放疗后冠状动脉病变以复杂病变为主,与普通心绞痛相比,其钙化病变、多支病变、血栓病变以及 PCI 术中夹层发生率明显升高。室壁运动指数、新发心功能不全及再发心绞痛、再次血运重建的比例增加<sup>[6]</sup>。放疗诱导的冠心病发病机制主要有毛细血管渗透性增加、微血管增生、血管内膜增厚、脂质沉积及外膜瘢痕形成,与自发性冠脉粥样硬化机制解释相同,然而与其相比,放疗诱导的粥样斑块更易纤维化。可能与血管内皮细胞对放疗敏感,放疗后内皮细胞损伤,导致毛细血管血流阻滞甚或闭塞有关。

1.2 观察和评价心脏损伤的指标 最准确诊断心肌损伤的方法是组织学检查,但由于创伤和难度均较大,现在多通过各种实验室检查和影像学检查等手段间接反应心脏受辐射的损伤

作者单位:1 广西医科大学,广西 南宁 530021;2 四川省肿瘤医院放疗科,四川 成都 610041

作者简介:樊伶俐(1985~),女,重庆长寿人,在读硕士研究生,主要从事肿瘤的放射治疗及综合治疗研究。

通讯作者:王捷,教授,硕士研究生导师。

- [8] Prasanna PG, Escalada ND, Blake Ly WF. Induction of Premature chromosome condensation by a phosphates inhibitor and a protein kinase in unstimulated human PBL: a simple and rapid technique to study chromosome aberration using specific whole chromosome DNA hybridization probes for biological dosimetry [J]. *Mutat Res* 2000, 466(2): 131-141.
- [9] 王转子, 李文建, 苏旭, 等.  $\gamma$  射线诱导人卵巢癌细胞 G2-染色单体断裂与修复 [J]. *核技术*, 2006, 29(8): 597-600.
- [10] Okayas R, Iliakis G. Mitotic metaphase cells from different cell line cause different levels of expression of the alpha form of interphase chromosome breaks in irradiated CHO cells [J]. *Mutat Res*. 1994, 310(1): 65-71.
- [11] Metzger L, Iliakis G. Kinetics of DNA double-strand break repair throughout the cell cycle as assayed by pulsed field gel electrophoresis in CHO cells [J]. *Int J Radiat Biol*, 1991, 59(6): 1325-1339.
- [12] Greiner R, Detzler E, Volkmer B, et al. Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human Lymphocytes: analysis by Premature chromosome condensation with delayed fusion [J]. *Radiat Res*, 1995, 144(2): 190-197.
- [13] Sipi P, Lindholm C, Salomaa S. Kinetics of formation of exchanges and rejoining of breaks in human G0 and G2 Lymphocytes after Low-LET radiation [J]. *Int J Radiat Biol*, 2000, 76(6): 823-830.
- [14] Brvant PE, Mozdarani H. A comparison of G2 Phase radiation-induced chromatid break kinetics using calyculin-PCC with those obtained using colcemid block [J]. *Mutagenesis* vol 2007, 22(5): 359-362.

- [15] Liu C, Kawata T, Shigematsu N. A comparison of chromosome repair kinetics in G(0) and G(1) reveals that enhanced repair fidelity under noncycling conditions accounts for increased potentially lethal damage repair [J]. *Radiat Res* 2010, 174(5): 566-573.
- [16] 冯嘉林, 邵松生, 林亚萍, 等. 低剂量<sup>60</sup>Co  $\gamma$  线诱发人血淋巴细胞早熟凝集染色体畸变的剂量效应曲线的研究 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1990, 8: 105-110.
- [17] Pantelias GE, Iliakis GE, Sambani CD, et al. Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in Peripheral blood Lymphocytes [J]. *Int J Radiat Biol*, 1993, 63: 349-354.
- [18] George K, Wu H, Willingham V, et al. Biological effectiveness of accelerated Particles for the induction of chromosome damage measure in metaphase human Lymphocytes [J]. *Radiat Res* 2003, 160(5): 425-435.
- [19] 江波, 刘强, 姜恩海, 等. 早熟染色体与辐射剂量-效应的关系 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2007, 25(12): 714-717.
- [20] 陆雪, 赵骅, 陈德清, 等. CA 诱导早熟染色体凝集的电离辐射剂量效应曲线 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2010, 6: 363-367.
- [21] BaLa Krishnan S, Shirsath K, Bhat N, et al. Biodosimetry for high dose accidental exposures by drug induced premature chromosome condensation (PCC) assay [J]. *Radiological Physics* 2010, 699(1-2): 11-16.
- [22] Suzuki M. The PCC assay can be used to Predict radiosensitivity in biopsy cultures irradiated with different types of radiation [J]. *Oncol Rep* 2006, 16: 1293-1299.

(收稿日期: 2011-09-05)