

CB 法微核实验检测细胞 DNA 损伤修复能力

程学美¹, 秦小梅², 刘 昆³, 张天亮¹, 单宝德¹

中图分类号:X591 文献标识码:B 文章编号:1004-714X(2011)04-0436-03

【摘要】 目的 探讨一定剂量的 x 射线照射后双核淋巴细胞微核率作为检测细胞 DNA 损伤修复能力生物学指标的可行性。方法 采用 CB 法微核实验,检测人外周血离体培养 24h 后以 0.5~4 Gy 剂量 X 射线照射后的微核率,计算修复能力指数(DRC),建立以公认的辐射损伤模型和双核微核为观察终点的检测细胞 DNA 损伤修复能力的一种新方法。结果 CB 法微核实验结果显示照射剂量和淋巴细胞微核率存在较紧密的相关性。随着辐射剂量增加,细胞微核率增大,细胞内微核个数增多,细胞死亡数亦增加。0.5 Gy 剂量 x 射线照射后微核率明显增大,与 0 Gy 剂量组(对照组)相比,差异有统计学意义($t=2.64$ $P=0.03$)。阅片结果显示,两组实验的细胞死亡数较少,差异不明显。结论 从微核率、微核个数、死亡细胞数综合考虑,在实例验证基础上,本实验条件下,可选择 0.5 Gy 剂量 X 射线照射以检测细胞 DNA 损伤修复能力大小。

【关键词】 CB 法微核实验; X 射线; DNA 修复能力

1985 年, Fenech 等首先建立了胞质分裂阻滞微核法(cytokinesis-block micronucleus method),简称 CB(细胞松弛素 B)微核法^[1]。随后国内外一些实验室相继建立和改进了此方法,与与传统微核实验相区别,研究者称之为 CB 微核法或 CB 法微核实验,通俗称为双核微核实验。目前此项实验技术已比较成熟,并已广泛用于辐射损伤、遗传毒理、药物筛选、职业人群检测及毒性评价等领域。CB 是一种能抑制细胞质分裂而不影响细胞核分裂的试剂,CB 法微核实验只计数一次核分裂后双核淋巴细胞中的微核数,所观察到的双核中的微核就是第一次有丝分裂细胞中的微核,因此它克服了常规培养微核法不能识别一次核分裂后的细胞所造成的实验结果不准确,难以重复

基金项目:山东省自然科学基金青年基金(ZR2010HQ042),山东省医药卫生研究项目(2009HZ050)

作者单位:1 山东省疾病预防控制中心,山东 济南 25000;2 淄博市职业病医院;3 千佛山医院

作者简介:程学美(1975~),女,汉族,博士在读,研究方向:职业分子流行病学。

通讯作者:单宝德 程学美 Email: cdcbaodesh@163.com

以及李贞^[7]等报道 21.3% 的混浊率比较接近,但和南京市放射工作人员眼晶状体混浊率 82.41%^[8]、菏泽市放射工作人员眼晶状体混浊率 48.35%^[9]等相比较,分析其原因可能与以下因素有直接关系:其一,近年来随着放射卫生法律、法规以及相关标准的日益完善和加强,职业病危害因素放射防护评价工作和工作人员个人防护逐步得到重视,从而降低了确定性效应的发生和随机性效应的发生率;其二,用人单位相关人员的安全文化素养和辐射防护意识的提高,使得放射工作人员受到的职业照射剂量越来越小。

从本次调查结果看,随放射工龄的增加,放射工作人员的眼晶状体混浊率有明显增高的趋势,此结果与陈正其等^[10]的报道一致。这可能表明随着放射工龄的增长,机体受到照射的累积剂量愈大,其生物效应也就愈明显。

综上所述,低剂量的电离辐射对放射工作人员的眼晶状体混浊有一定的影响,而且这种影响随着放射工龄的增加有明显的增高趋势。因此我们必须重视放射工作人员的健康监护工作,完善工作场所的辐射防护设施,加强工作人员个人防护措施,不断提高人们的辐射安全文化素养,防止放射性损伤或将损伤降低到合理的最低水平,以达到保护工作人员健康的最终目的。

等缺陷,实验的敏感性、准确性和重复性均得到提高。

本研究通过公认的辐射损伤模型,以双核淋巴细胞微核率为观察终点,采用 CB 法微核实验,比较不同剂量 X 射线照射的离体全血的微核率,来建立一种新的方便的检测细胞 DNA 损伤修复能力的实验方法,用于职业人群的流行病学调查。

1 材料与方法

1.1 照射条件 照射剂量由省直某医院放疗科提供,总剂量为 0.5Gy,照射源为 PRIMUS-H 直线加速器(SIEMENS),6MV-X 速调管(驻波)。照射野为 20cm×30cm,中心距(照射样离源中心距离)100cm。照射样品在该条件下在该点的剂量率是 200cGy/min。对照样本(即 0 剂量)除未照射外,所有条件同照射组。

1.2 血样 血样取自笔者本人,女,36 岁,身高 157cm,体重 51kg,平素健康,近期内从事职业毒理学工作,无菌条件下抽取静脉血 20ml,注入无菌肝素真空抗凝管内,立即送到实验室培养。

1.3 CB 法微核实验 参考 Fenech 方法并略加改进。

- [1] GB18871-2002 电离辐射防护与辐射源安全基本标准[S].
- [2] 吴德昌主编.放射医学[M].北京:军事医学科学出版社,2001:233.
- [3] 刘树舒.放射生物学[M].2 版.北京:原子能出版社,1998:347-348.
- [4] 张利平,孙培芝.2008 年嘉兴市放射工作人员眼晶体调查与分析[J].中国辐射卫生,2010,19(3):33-36.
- [5] 梁梅,朱林平,葛宪民.广西医疗机构放射工作人员眼晶状体混浊的调查[J].中国职业医学,2009,36(4):292-295.
- [6] 李坪,黄文胜,张华东,等.429 名放射工作者眼晶状体状况调查[J].中国辐射卫生,2000,9(3):179-180.
- [7] 李贞,刘伟,李全太,等.低剂量医用电离辐射对工作人员健康的影响[J].中国辐射卫生,2009,18(3):11-12.
- [8] 夏思泉,宋海燕,吴鸣,等.放射线工作人员晶体和免疫功能改变分析[J].江苏预防医学,2004,15(4):39-40.
- [9] 王洪勋,牛玉坤.菏泽市放射作业人员眼晶状体调查分析[J].中国辐射卫生,2004,13(1):58.
- [10] 陈正其,姚洪章,刘定理,等.低剂量电离辐射对放射工作人员健康影响的调查[J].中国辐射卫生,2005,14(2):124-126.

(收稿日期:2011-04-14)

1.3.1 主要仪器和试剂 含 PHA 的 RPMI 1640 培养基的细胞培养瓶(中国协和医科大学);吉姆萨氏染液、细胞松弛素 B (Sigma 公司);CO₂ 培养箱(REVC O HABITAT TM),显微镜(O- LYMPUS 日本),PRIMUS-H 直线加速器(SIEMENS)。

1.3.2 操作步骤 取 0.5ml 肝素抗凝静脉血,分别加入 30 个含 PHA 的 RPMI1640 培养基的细胞培养瓶中(含 5ml 培养基),随机平均分为六组,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养 24h 在室温下,按组别用不同剂量的 X 射线照射细胞,X 射线剂量分别为 0.5 0.75 1.2 4 Gy,剂量率为 2 Mu/min;继续培养至 44h 加细胞松弛素 B 应用液 100μl,终浓度为 6μg/ml;培养至 72h 收获,然后低渗、固定、涂片、染色和镜检分析。

1.3.3 镜检分析方法 盲法阅片,低倍镜下寻找细胞分散均匀的视野,转油镜下观察。选择胞浆完整的双核淋巴细胞,微核位于细胞质中,与细胞核相切或完全分开,边缘光滑,嗜色性与细胞核完全一致,大小为主核的 1/15 至 1/3,不与主核接触^[2]。计数 1 000 个双核淋巴细胞中含一个、两个或多于两个微核的细胞数,以计算双核微核细胞率(以下简称微核率)。微核率(%) = 含微核的双核细胞数/1 000 个双核细胞 × 1 000‰。正常单核淋巴细胞见图 1,正常双核淋巴细胞见图 2,含有 1 个微核的双核淋巴细胞见图 3,含 2 个微核的双核淋巴细胞见图 4,含 3 个微核的双核淋巴细胞见图 5,含 4 个微核的双核淋巴细胞见图 6;图中箭头所指为微核。

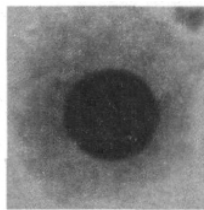


图 1 正常单核淋巴细胞

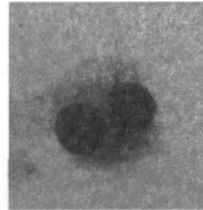


图 2 正常双核淋巴细胞

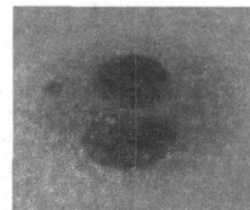


图 3 含 1 微核的双核淋巴细胞

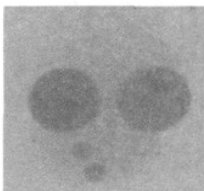


图 4 含 2 个微核的双核淋巴细胞

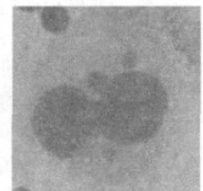


图 5 含 3 个微核的双核淋巴细胞

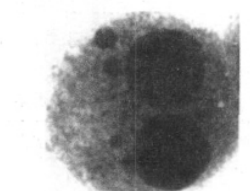


图 6 含 4 个微核的双核淋巴细胞

1.4 个体 DNA 损伤修复能力检测实例 实例 1: 选取 5 名正常人作为研究对象,分别编号甲、乙、丙、丁、戊,取每名研究对象肝素化全血分别接种于两个含 PHA 的 RPMI1640 培养基的细胞培养瓶中(含 5ml 培养基,0.5ml 全血/瓶),于 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养 24h。在室温下,其中一份用 0.5 Gy 剂量的 X 射线照射细胞,剂量率为 2 Mu/min,另外一份未被 X 射线照射(0 剂量组);余操作同上面所述 3.2 和 3.3。以 DRC 代表细胞 DNA 损伤修复指数: DRC 指数 = (1 - X 射线照射的微核率) / (1 - 未被 X 射线照射的微核率)。

实例 2: 选取某橡胶厂 10 名丁二烯接触工人及 10 名非丁二烯接触锅炉工作为研究对象,全为汉族男性,年龄在 25~35 岁之间。无菌条件下,抽取肘静脉血 2ml,置于 5ml 肝素抗凝管内,立即在冷藏条件下运送至实验室,按照以上步骤操作,检测 DRC 指数。根据往年检测资料,获得接触工人丁二烯的暴露剂量,10 名工人的暴露剂量平均为 0.3mg/m³(8h 时间加权平均浓度, TWA),低于国家职业接触限值的要求(PC-TWA 为 5 mg/m³)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件对所得数据进行分析,微核率的比较用两样本率比较的 T 检验,照射剂量与微核率两者的关系采用相关性分析。

2 实验结果

表 1 各剂量点微核率($p \pm s_p$, %)

剂量(Gy)	例数	微核率(%)	统计值 ¹⁾	P 值	DRC 指数
0	5	10.6 ± 1.2	-	-	-
0.5	5	17.4 ± 2.3	2.64	0.020	0.993
0.75	5	26.8 ± 3.4	4.56	0.002	0.984
1.0	5	71.6 ± 6.4	9.34	0.000	0.938
2.0	5	118.6 ± 15.1	7.12	0.000	0.891
4.0	5	212.6 ± 32.8	6.15	0.000	0.796

注:1) 0.5Gy 剂量照射组与日剂量组的双核细胞微核率的比较, $P = 0.004$, 差异具有统计学意义。

实验共观察了 30 例不同照射剂量下的双核淋巴细胞微核率,结果见表 1,对照组微核率为 10.6‰。

本研究照射剂量范围为 0.5~4.0 Gy,在 0.5 Gy 照射后微核率从正常的 10.6‰ 增至 17.4‰,表明在 0.5 Gy 照射后微核率明显增加,差异具有显著性($t = 2.64$, $\alpha = 0.030$),DRC 指数为 0.993;0.75 至 4 Gy 剂量照射组,微核率都显著高于对照组,由 26.8‰ 增至 212.6‰,DRC 指数却明显降低,由 0.984 降为 0.796,见表 1。0 Gy 剂量组微核率为 10.6 ± 1.2,其中含 2 个微核的细胞率为 0.8 ± 0.2,未发现含 3 个或 4 个微核的双核细胞;4.0 Gy 剂量组微核率为 212.6 ± 32.8,其中含 2 个微核的细胞率为 64.8 ± 15.3,含 3 个微核的细胞率为 23.8 ± 6.4,含 4 个及以上微核的细胞率为 8.2 ± 3.3;与 0 Gy 剂量组比较,微核率及微核个数明显增多,见表 2。将微核率取对数,其与照射剂量的相关系数 R 为 0.924,两者在 0.5~4.0 Gy 范围内呈良好线性相关,随着照射剂量增大,含微核的双核细胞数明显增多,且细胞中含有的微核个数也明显增多,趋势非常明显,这与以往报道一致^[3]。阅片中还发现,在此实验条件下,以小于 0.75 Gy 剂量照射时,死亡细胞数增多并不明显;但大于 0.75 Gy 剂量照射时,随着照射剂量的增加,死亡细胞数显著增加。此现象在 2 和 4 Gy 剂量组非常明显。

表 2 不同微核数的微核细胞率($p \pm s_p$, %)

剂量(Gy)	微核数			
	1	2	3	4 及以上
0	9.8 ± 1.1	0.8 ± 0.2	0	0
0.5	15.4 ± 2.3	1.6 ± 0.5	0.4 ± 0.2	0
0.75	20.6 ± 1.2	4.2 ± 1.4	1 ± 0.3	0
1	60.8 ± 4.7	8.8 ± 2.2	1.6 ± 0.6	0.4 ± 0.2
2	89.6 ± 10.5	24.8 ± 7.1	6.8 ± 2.0	1.4 ± 0.2
4	115.8 ± 8.6	64.8 ± 15.3	23.8 ± 6.4	8.2 ± 3.3

个体 DNA 损伤修复能力检测实例 1 结果见表 3。不同个体 0.5 Gy 剂量 X 射线照射前后微核率差异显著 $P=0.004$ ($\alpha=0.05$)。根据公式, 计算可得 DRC 指数。

表 3 不同个体 DRC 指数

个体	微核率		DRC 指数
	0Gy	0.5Gy	
甲	3‰	9	0.994
乙	0‰	5	0.995
丙	1‰	4	0.997
丁	1‰	7	0.994
戊	2‰	11	0.991

注: 1) 0.5 Gy 剂量照射组与 0 剂量组的双核细胞微核率的比较 $P=0.004$, 差异具有统计学意义。

个体 DNA 损伤修复能力检测实例 2 研究对象的基本特征见表 4。经过非参数检验, 接触组和对照组年龄比较: mann-Whitney U 值为 48.5 P 值为 0.909, 在 0.05 显著性水平上, 年龄在两组间无统计学差异; 两组饮酒和吸烟比较: Kolmogorov-Sminov Z 值均为 0.447 P 值为 0.988, 吸烟、饮酒在两组间亦无统计学差异。丁二烯接触组与对照组比较, 两独立样本非参数检验 mann-Whitney U 值为 32.5 P 值为 0.179, 无明显差异, 结果见表 5。

表 4 研究对象基本情况

组别	年龄 (岁)	饮酒		吸烟	
		不饮	饮	不吸	吸
接触组	31.4 ± 3.1	2	8	3	7
对照组	31.3 ± 2.94	4	6	5	5
统计值	48.5 ¹⁾	0.447 ²⁾		0.447 ²⁾	
P 值	0.909	0.988		0.988	

注: 1) mann-Whitney u 值; 2) Kolmogorov-Sminov Z 值。

表 5 丁二烯接触组与对照组 DRC 指数比较

组别	例数	DRC 平均秩次	Mann-Whitney U	P
对照组	10	12.25	32.5	0.179
接触组	10	8.75		

3 讨论

DNA 损伤修复是机体的一种防御机制, 对于维持细胞 DNA 完整性和细胞周期的正常调控起着重要作用。DNA 损伤修复的缺陷会增加突变易感, 从而导致肿瘤的发生^[4]。不同类型的 DNA 损伤是由不同的途径修复的, 主要有: 核苷酸切除修复 (NER)、碱基切除修复 (BER)、同源重组修复 (HRR)、非同源末端连接 (NHEJ) 和错配修复 (MMR) 等, 评价 DNA 修复能力往往也只是评价个别途径的修复能力^[5]。人外周血淋巴细胞对辐射损伤非常敏感, 是辐射损伤的靶组织。研究发现, 由 X 射线诱导的淋巴细胞的单双链断裂主要是通过 BER、HRR 和 NHEJ 途径修复^[6, 7]。

微核是检测染色体损伤后期的效应标志物, 在染色体损伤后数月甚至数年仍可通过外周血 CBMN 检测到, 其发生率在一定剂量范围内随辐射剂量的增大而增加。CB 法微核实验解决了微核培养的动力学问题, 计数第一次有丝分裂周期中的含微核的双核细胞数, 使微核计数更加准确, 重现性好, 能够通过染色体损伤的动态变化定量分析细胞修复损伤的能力。实验采

用 0.5~4 Gy 剂量范围照射培养 24h 后的离体全血细胞, 结果显示, 随着受照剂量的增大, 微核率明显增加, 且微核的个数也增多。与对照组比较, 0.5 Gy 剂量组微核率变化已有统计学差异 ($\alpha=0.05$); 其他剂量组微核率差异更加明显。阅片显示 0.5Gy 剂量组细胞存活状况与对照组相似; 其他剂量组细胞存活状况较对照组差, 随着受照剂量增加, 细胞死亡数也增大。DRC 指数反映细胞 DNA 损伤修复能力, DRC 指数越大, 则说明细胞修复能力越强。实验中 X 射线照射剂量由 0.5 到 4 Gy, 微核率增高, DRC 指数降低; 说明同一个体, 照射剂量越大, 染色体损伤越严重, 细胞 DNA 修复能力越差。不同个体, 细胞 DNA 修复能力不同, 同一剂量照射, 微核率亦不同, 计算可得 DRC 指数。通过比较有害因素暴露人群与对照人群的 DRC 指数, 以检测职业人群的 DNA 损伤修复能力, 说明暴露因子对人体修复能力的影响作用。实例 2 说明了丁二烯 (一种确定人类致癌物) 的暴露对人体修复能力的影响状况, P 值为 0.179, 在 0.05 水平上无差异, 可以认为丁二烯的暴露不影响人体修复能力, 这可能是由于样本例数太少, 暴露浓度太低造成的, 也可能是丁二烯本身并不损伤人体的修复能力所致。在今后的研究中, 需要增大样本例数, 细化调查内容, 尤其是职业史和疾病状况的调查, 进一步探讨丁二烯对人体修复能力的影响。

本研究提供一种客观地检测、评价机体细胞 DNA 损伤修复能力的方法, 以双核微核作为观察终点, X 射线作为诱变剂来检测职业人群的 DNA 损伤修复能力, 分析职业人群和对照人群之间 DNA 修复能力的差异, 以研究职业有害因素对细胞 DNA 修复能力的影响, 从修复机制上阐明毒物的毒性作用机理^[8]。此方法操作简单、灵敏度高、重现性好, 可适用于大面积职业流行病学调查。

参考文献:

- [1] 彭涛, 宋聚忠, 谢怀江. 用 CB 微核法研究离体血辐射剂量与微核的量效关系 [J]. 沈阳部队医药, 1994, 7(6): 548-550.
- [2] 闫学昆, 杜杰, 金仁喜, 等. CB 法微核实验中双核细胞与微核的识别标准探讨 [J]. 辐射防护通讯, 2010, 30(1): 27-30.
- [3] 陆典瑞, 卢岑, 高彩凤, 等. 淋巴细胞微核试验用于全血 γ 射线辐照效果评价 [J]. 热带医学杂志, 2006, 6(12): 1271-1274.
- [4] 杨玉, 张美辩. 肿瘤病人博来霉素暴露后 DNA 修复能力的检测 [J]. 职业与健康, 2006, 22(7): 491-493.
- [5] 邢彩虹, 纪之莹, 李桂兰, 等. DNA 损伤修复能力与慢性苯中毒关系研究 [J]. 卫生研究, 2006, 35(4): 423-425.
- [6] Claudia Mayer, Odilia Popanda, Otto Zelezny et al. DNA repair capacity after irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes [J]. DNA Repair, 2002, 1(1): 237-250.
- [7] 袁德晓, 潘燕, 赵镁嘉, 等. DNA 损伤修复能力对辐射适应性反应的影响 [J]. 核技术, 2009, 32(5): 366-369.
- [8] Kuricova M, Naccarati A, Kumar R, et al. DNA repair and cyclin D1 polymorphisms and styrene-induced genotoxicity and immunotoxicity [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, 207: S302-S309.

(收稿日期: 2011-08-02)