

【论著】

单细胞凝胶电泳技术对离体和整体照射致细胞 DNA 断裂的一致性研究

刘 强, 姜恩海, 李 进, 唐卫生, 王知权, 赵永成, 樊飞跃

中图分类号: Q345 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2006)02-0153-02

【摘要】目的 探讨整体照射与离体照射导致小鼠淋巴细胞 DNA 双链断裂的一致性, 作为单细胞凝胶电泳技术应用于辐射生物剂量学的前期研究。方法 采用双层铺胶法进行中性单细胞凝胶电泳, 观察小鼠淋巴细胞整体与离体照射后的 DNA 双链断裂, 用 CASP 软件分析彗星图像, SPSS12.0 进行数据的统计学分析。结果 彗星头部 DNA % (HDNA %)、尾部 DNA % (TDNA %)、彗星全长 (CL)、尾长 (TL)、尾矩 (TM) 和 Olive 尾矩 (OTM) 在整体照射和离体照射组之间的差别均无显著性。结论 离体血 γ 射线照后即刻进行中性单细胞凝胶电泳, 可以客观准确地反映整体照射的淋巴细胞 DNA 双链断裂损伤。

【关键词】单细胞凝胶电泳; DNA 双链断裂; 整体照射; 离体照射

Investigation on Accordance of DNA Double-strand Break of Blood Between in Vivo and in Vitro Irradiation Using Single Cell Gel Electrophoresis. LIU Qiang, JIANG En-hai, LI Jin, et al. *Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical Collage, Tianjin 300192 China.*

【Abstract】Objective To observe the consistency of DNA double-strand break between in vivo and in vitro irradiation, as a prophase study in radiation biodosimetry using single cell gel electrophoresis (SCGE). Methods Detect DNA double-strand break after whole-body and in vitro radiation in mice lymphocytes using neutral single cell gel electrophoresis. The comet images were processed by CASP software and all the data were analysed by SPSS12.0. Results There is no difference between in vivo and in vitro irradiation group in HDNA %, TDNA %, CL, TL, TM and OTM. Conclusion The result of neutral single cell gel electrophoresis shortly after in vitro irradiation can precisely reflect the DNA double-strand break of lymphocytes in whole-body irradiation.

【Key words】Single Cell Gel Electrophoresis; DNA Double-strand Break; Vivo Irradiation; Vitro Irradiation

急性辐射后生物剂量的估算有着不可替代的优越性。国内外研究人员为解决核辐射事故医学应急的生物剂量估算工作中倾注了大量心血。准确估算受照者的吸收剂量, 对于放射损伤的诊断、医疗监督和事故处理等至关重要。这就需要有一个较为准确可靠的生物剂量计。用 SCGE 方法观察照后淋巴细胞 DNA 损伤情况, 进一步拟合剂量-效应曲线, 需要用离体人血进行实验, 但是, 离体血照射是否能够真实准确地反映整体照射的损伤情况呢? 这就需要动物实验来证实。为此, 本部分工作在建立和改良 SCGE 技术的基础上, 研究了 γ 射线对小鼠外周血淋巴细胞离体和整体照射后 DNA 损伤的一致性研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 正常熔点琼脂糖凝胶购自

基金项目: 教育部重点科学内科学(血液学)基金资助; 天津市自然科学基金资助项目(043610011)

作者单位: 中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192

作者简介: 刘强(1974~), 男, 主治医师, 研究方向: 辐射损伤基础与临床。

通讯作者: 姜恩海

不理想, 建议在对乳腺 X 射线摄影剂量现场测量前要对能量响应进行校正。④ TLD 是属无源探测器、组织等效性能好、价格便宜, 建议选灵敏度高, 能量响应优于半导体探测器 (Unfors 除外) 的元件的 LiF (Mg, Cu, P), 不要选用 LiF (Mg, Ti), 因为我们在能响测量中, 这种探测元件给出最差的结果, 在本报告而未予列入。

Biowest 公司, 低熔点琼脂糖凝胶为 Promega 公司产品, Tris-HCl、DMSO 和 TritonX-100 均为 Sigma 公司产品, 中国医学科学院血液学研究所科技公司分装。水平电泳仪为 BIO-RAD 公司产品, 日本产 Nikon 荧光显微镜和数码相机, ^{137}Cs γ 辐射源购自加拿大原子能有限公司。

1.2 实验动物及准备 本所动物室培育的经过鉴定的 IRM-2 近交系小鼠, 6~7 周龄, 体重 $(20 \pm 2)\text{g}$ 。取该种小鼠 6 只, 雌雄各半, 随机分成两个剂量组, 分别为 1 Gy 照射组和 2 Gy 照射组。

采小鼠外周血约 0.2 ml, 肝素抗凝。所取外周血与小鼠对应编号后, 在相同条件下同时照射, 照后立即再次以相同方法取小鼠外周血约 0.2 ml, 肝素抗凝, 备用。

1.3 照射条件 ^{137}Cs γ 射线全身均匀照射, 吸收剂量率: 0.8451Gy/min , 照射剂量分别为 1 Gy 和 2 Gy。

1.4 淋巴细胞分离 预先在 0.5 ml 离心管中加入 4°C 预冷的 0.2 ml 淋巴细胞分离液, 所取外周血沿离心管内壁轻轻加在淋巴细胞分离液面上, 3 500 rpm 离心 2 min, 离心管内可见一层灰白色淋巴细胞层, 转移至 2 ml 离心管中, 加 PBS 至 2 ml, 轻摇混匀后 1 500 rpm

参考文献:

- [1] GB/T19629-2005/IEC 61674-1997 医用电气设备 X 射线断影像中使用的电离室和(或)半导体探测器剂量计[S].
- [2] IEC 61267-2004. Medical Diagnostic X-ray Equipment-Radiation Conditions for use in the Determination of characteristics[R]. 2004, FDIS, IEC, Geneva.
- [3] IAEA No. 16. 辐射防护检测仪器校准[M]. 北京: 原子能出版社, 2002. 8: 30-32.

(收稿日期: 2006-04-03)

离心 6 min, 弃上清。如此重复洗涤细胞 2 次, 再将细胞悬于 PBS, 调整细胞浓度至 2×10^4 /ml, 置 4℃ 冰箱, 备用。

1.5 中性单细胞凝胶电泳实验 参考 Banath 等^[1] 的方法, 并稍加改良。

1.5.1 铺胶 0.75% 正常熔点琼脂糖凝胶煮沸后取 100 μl 迅速均匀铺于自制微电泳槽内, 置于 4℃ 冰箱 1 min 使凝胶固化, 取制好的淋巴细胞悬液 25 μl 与 75 μl 0.75% 低熔点琼脂糖凝胶混匀后均匀铺于第一层凝胶上面, 置于 4℃ 冰箱固化 1 min。

1.5.2 裂解 将微电泳槽置于新鲜配制的中性裂解液中, 4℃ 冰箱中裂解 1.5 h;

1.5.3 电泳 裂解后取出微电泳槽, 用双蒸水漂洗去掉多余的盐分, 置于提前加入 4℃ 0.5% TBE 电泳液的水平电泳仪中静置 20 min, 然后在 20 V, 200 mA 电泳条件下电泳 20 min。

1.5.4 染色和观察 2 μg/ml 溴化乙锭 (EB) 染色, 双蒸水漂洗, 去掉多余染液, 先在荧光显微镜低倍镜下观察彗星, 然后在高倍镜下, 用 Nikon 数码相机随机抓

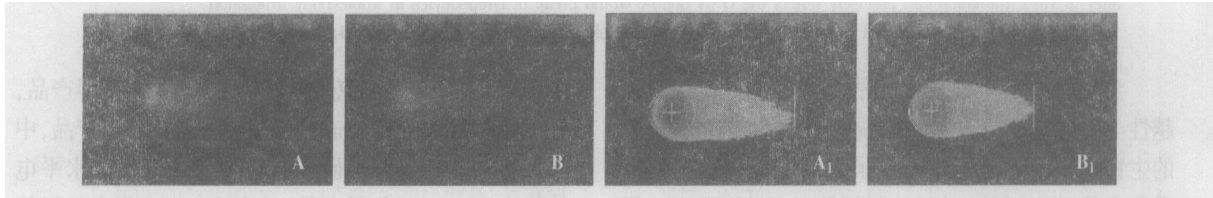
取彗星图像, 每份样品拍摄 200 个彗星图像, 每组累计 600 个细胞。

1.6 彗星图像的分析 每个彗星图像均采用波兰某大学提供的 CASP^[2] 系统自动分析, 分析结果输出保存为文本文件 (.txt), 可以用 SPSS 12.0 统计软件直接读取。

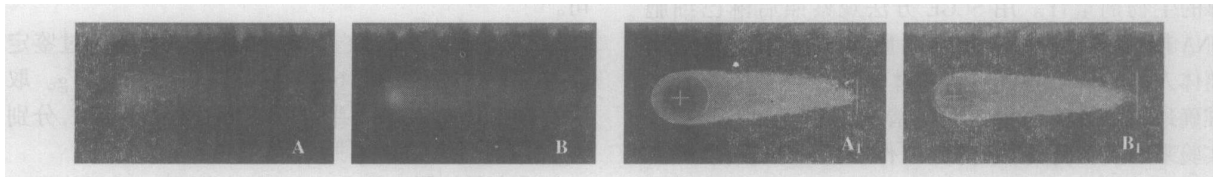
1.7 统计学分析 取彗星尾长、彗星全长、头部 DNA %、尾部 DNA %、尾矩和 Olive 尾矩作为分析指标。采用 SPSS 12.0 统计软件对上述指标进行 *t* 检验, 相关分析采用 SPSS 软件的 Bivariate 相关分析, 计算 Pearson 相关系数。

2 结果

2.1 中性单细胞凝胶电泳图像 小鼠外周血离体照射和整体照射后致细胞 DNA 双链断裂, 经中性裂解液去除核膜和蛋白质, 当细胞核 DNA 在电泳液中充分解旋后, 在电场的作用下, DNA 断片离开细胞核, 向阳极迁移, 形成彗星状拖尾。1Gy 和 2Gy 照射组彗星图像分别见图 1 和图 2。



A: 离体照射的彗星图像 B: 整体照射的彗星图像 A1: A 经 CASP 软件分析的图像 B1: B 经 CASP 软件分析的图像
图 1 1 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照后彗星图像



A: 离体照射的彗星图像 B: 整体照射的彗星图像 A1: A 经 CASP 软件分析的图像 B1: B 经 CASP 软件分析的图像
图 2 2 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照后彗星图像

由图 1 和图 2 均可见, 离体和整体照射后的淋巴细胞均出现明显拖尾现象, 彗星图像经 CASP 软件分析后, 得到头尾清晰可辨的新图像, 更加直观地显示出彗星的头部和尾部, 反映细胞核 DNA 在彗星中的分布情况, 同时给出各项量化指标。肉眼观察 2Gy 照射组的彗星尾长明显大于 1 Gy 照射组的彗星尾长。

2.2 ¹³⁷Cs γ 射线离体、整体外照射致淋巴细胞 DNA 双链断裂 表 1 列出小鼠淋巴细胞分别经 ¹³⁷Cs γ 射线 1 Gy 和 2 Gy 离体和整体照射后诱导 DNA 双链断裂, DNA 断片发生迁移的彗星头部 DNA %、尾部 DNA %、彗星全长、彗星尾长、尾矩和 Olive 尾矩。

表 1 1 Gy、2 Gy 离体和整体照射小鼠后 DNA 迁移的各项指标 ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	1 Gy			n	2 Gy		
		in vivo	in vitro	P		in vivo	in vitro	P
HDNA %	600	50 ± 11.9 ¹⁾	46 ± 10.7 ¹⁾	0.16	600	20 ± 6.6	19 ± 7.8	0.40
TDNA %	600	50 ± 11.9 ¹⁾	54 ± 10.7 ¹⁾	0.16	600	80 ± 6.6	81 ± 7.8	0.40
CL (pix)	600	156.71 ± 42.95 ¹⁾	149.81 ± 33.34 ¹⁾	0.06	600	253.46 ± 33.13	274.11 ± 32.44	0.12
TL (pix)	600	111.09 ± 37.17 ¹⁾	108.12 ± 29.67 ¹⁾	0.36	600	213.21 ± 30.20	224.48 ± 33.75	0.71
TM	600	58.01 ± 29.26 ¹⁾	61.18 ± 25.85 ¹⁾	0.23	600	172.63 ± 35.21	184.77 ± 40.92	0.10
OTM	600	26.69 ± 11.95 ¹⁾	28.42 ± 10.66 ¹⁾	0.11	600	83.70 ± 18.46	89.27 ± 19.16	0.13

注: 1) 1 Gy 照射组与对应的 2 Gy 照射组各项指标比较, *P* < 0.01.

在 1 Gy 和 2 Gy 两个剂量组内部的离体与整体照射比较, $P>0.05$ 。

由表 1 可见, 无论 1 Gy 照射组与 2 Gy 照射组, 其离体和整体照射的各项指标经统计学分析, 差异均未见显著性 ($P>0.05$)。同时, 将 1 Gy 照射组与 2 Gy 照射组的数据进行对比, 2 Gy 照射的各项指标均高于 1 Gy 照射的指标, 相应项进行比较, 差异均具有非常显著性 ($P<0.01$)。随照射剂量的增加, TDNA % 在总的彗星 DNA 中明显升高, 同时, DNA 片段的迁移长度也明显增加。

表 2 列出 1 Gy 照射组与 2 Gy 照射组之间各项指标的相关系数。由表 2 可见, 两组间的 HDNA % 为负相关, 其余指标为正相关, 且均为 $P<0.01$ 。以 TM 和 OTM 的相关性最强。

表 2 1 Gy 照射组与 2 Gy 照射组之间各指标的相关系数(R)

Group	n	HDNA %	TDNA %	CL	TL	TM	OTM
in vivo ¹⁾	1 200	-0.73	0.73	0.67	0.74	0.82	0.86
in vitro ¹⁾	1 200	-0.75	0.75	0.84	0.85	0.87	0.89

注: 经 SPSS Bivariate 相关分析, 各项均为 $P<0.01$ 。

3 讨论

目前应用比较广泛的辐射生物剂量学方法包括染色体畸变法、微核测定法等, 用染色体畸变或微核实验作为生物剂量计, 首先要明确离体照射和整体照射导致畸变率的一致性, 然后在离体条件下, 对健康人外周血样品照射不同剂量, 建立染色体畸变率(或微核率)和剂量之间关系的刻度曲线。目前, 我国已经建立了多种射线照射离体人血的剂量—效应关系刻度曲线, 并在辐射事故的剂量估计中得到应用。但是, 上述方法需要淋巴细胞培养, 至少需要 2~3 d 的时间才能给出结果。越来越多的研究资料表明^[2~3], 用单细胞凝胶电泳技术检测照后淋巴细胞 DNA 链断裂, 得到的尾长等指标具有较好的剂量—效应关系, 为该技术作为辐射生物剂量计打下了良好基础。

SCGE 是上世纪八十年代建立的用于检测 DNA 断裂的新技术^[6,7], 并由 Olive^[8]等建立了用于测定 DNA 双链断裂的中性 SCGE, 在各个相关领域得到广泛应用。国内该技术的发展稍滞后于国外的进展。近几年来, 该技术在国内外生物学、毒理学、肿瘤学、环境医学等领域才得到广泛应用, 而且目前国内外均未见报道以该方法用于辐射生物剂量计。该方法简便、迅速、灵敏, 与其它 DNA 断裂检测技术相比, 具有明显优势: ①从单细胞水平上检测 DNA 原发损伤, 避免了只能对细胞群体的 DNA 改变进行检测的不足; ②适用范围广: 可检测多种类型的组织细胞, 而且对 T 和 B 淋巴细胞均敏感; ③简便、经济、快速: 所需样品数目少(只需 0.2 ml 全血), 无需放射性核素, 检测时间短, 步骤简单, 花费甚少; ④敏感性高: 可检测到 0.05 Gy 的低水

平辐射, 比传统生物剂量学技术具有更高的敏感性。

大量的实验资料已表明: 辐射诱发的人体外周血淋巴细胞的 DNA 损伤与吸收剂量之间有着密切的关系。辐射生物剂量学指标需要具备的前提就是需经实验证明体内与体外一致, 为了对整体受照所诱发的 DNA 损伤进行生物剂量估算, 就必须首先研究离体条件下的辐射效应。本研究旨在检验全身照射和离体照射致 DNA 双链断裂的一致性, 以明确 SCGE 技术作为辐射生物剂量计的可行性。结果显示, 1 Gy 和 2 Gy 两个剂量组的全身照射和离体照射所得彗星头部 DNA %、尾部 DNA %、彗星全长、彗星尾长、尾矩和 Olive 尾矩等指标均有一致性, 说明该技术离体实验可以客观准确地反映整体照射的淋巴细胞 DNA 损伤, 进一步证明 SCGE 技术在辐射生物剂量学中的应用价值。从 1 Gy 照射组和 2 Gy 照射组之间的横向比较来看, 随照射剂量加大, 各项指标的数值均明显升高, 呈显著相关。可以初步判断 SCGE 技术可以用于辐射生物剂量计的研究。SCGE 作为一项新的 DNA 断裂测定技术, 尚处在发展和完善阶段, 相信, 随着该技术的不断优化, 其在辐射生物剂量学中的应用将开拓出一片广阔的天空。

参考文献:

[1] Banath JP, Fushiki M, Olive PL. Rejoining of DNA single and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation[J]. Int J Radiat Biol, 1998, 73(6): 649—660.

[2] Konca K, Lankoff A, Banasik A, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay[J]. Mutat Res, 2003, 534(1~2): 15—20.

[3] Chaubey RC, Bhilwade HN, Rajagopalan R, et al. Gamma ray induced DNA damage in human and mouse leucocytes measured by SCGE-Pro: a software developed for automated image analysis and data processing for Comet assay[J]. Mutat Res, 2001, 490(2): 187—197.

[4] He JL, Chen WL, Jin LF, et al. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation[J]. Mutat Res, 2000, 469(2): 223—231.

[5] Helman B, Vaghef H, Bostrom B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay[J]. Mutat Res, 1995, 336(2): 123—131.

[6] Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984, 123(1): 291—298.

[7] Ejchart A, Sadlej-Sosnowska N. Statistical evaluation and comparison of comet assay results[J]. Mutat Res, 2003, 534(1~2): 85—92.

[8] Olive PL, Wlodek D, Banath JP. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis[J]. Cancer Res, 1991, 51(17): 4671—4677.