

【论著】

放射性核素内照射诱发的 DNA 损伤效应

崔凤梅, 赵经涌, 洪承皎, 劳勤华, 王六一, 杨淑琴

中图分类号: R818.03 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2004)04-0243-02

【摘要】目的 研究晚期混合裂变产物内照射对大鼠外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) DNA 的损伤作用。方法 雄性 Wistar 大鼠经不同累积剂量和不同剂量率的晚期混合裂变产物内照射后, 获得 PBMC 单细胞悬液, 采用单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis, SCGE)技术, 检测细胞 DNA 链的断裂改变。结果 经晚期混合裂变产物作用后, 各照射组 PBMC DNA 链断裂的迁移长度增加($P < 0.05$), 显示良好的剂量效应关系和剂量率效应关系, 均符合直线模型。结论 在本实验的内照射剂量下, 晚期混合裂变产物能引起 PBMC 的 DNA 损伤, 且呈现良好的剂量效应关系和剂量率效应关系。

【关键词】内照射; 单细胞凝胶电泳; 外周血单个核细胞; DNA 损伤

DNA Damage Induced by Radionuclide Internal Irradiation. CUI Feng-mei, ZHAO Jing-yong, HONG Cheng-jiao, et al. School of Radiation Medicine and Public Health, Suzhou University, Suzhou, 215007, China.

【Abstract】Objective To study the DNA damage of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) in rats exposed to radionuclide internal irradiation. Methods The radionuclides were injected into the rats and single cell gel electrophoresis(SCGE) was performed to detect the length of DNA migration in the rat PBMC. Results DNA migration in the rat PBMC increased with accumulative dose or dose-rate. It showed good relationship of dose vs. response and of dose-rate vs. response both relationship could be described as linear models. Conclusion Radionuclide internal irradiation could cause DNA damage in rat PBMC.

【Key words】Internal Irradiation; SCGE; PBMC; DNA Damage

机体受到电离辐射照射后, 可以使很多生物活性物质特别是生物大分子受到损伤, 其中最重要的是细胞核中的 DNA, 损伤的 DNA 如不能完全修复则可能引起相关的基因突变。单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis, SCGE)技术是一种快速检测单细胞 DNA 损伤的实验方法, 能够灵敏地检测 DNA 断裂。本实验采用单细胞凝胶电泳(SCGE)技术, 检测大鼠经不同累积剂量和不同剂量率的晚期混合裂变产物内照射后外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的 DNA 损伤情况, 为 SCGE 作为低剂量核辐射的生物剂量计提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 放射性核素 晚期混合裂变产物原液放射性比活度为 1.82×10^7 Bq/ml, 其主要组分及放射性活度比例分别为 ^{90}Sr 26.82%; ^{137}Cs 73.15%; ^{144}Ce — ^{144}Pr 0.002%; ^{106}Ru — ^{106}Rh 0.02%; ^{95}Zr — ^{95}Nb 极微量。

1.2 实验动物分组及处理 实验动物为健康雄性 Wistar 大鼠, 体重(141.5 ± 12.99) g, 共 48 只。随机分成 1 个对照组, 4 个不同累积剂量实验组和 4 个不同剂量率组(其中 1 个剂量率组与累积剂量组重叠), 每组 6

只。①对照组: 大鼠尾静脉注入生理盐水(pH3.0), 注射量为 0.5 ml/100 g 体重。注入后 1 d 断尾取血。②不同累积剂量实验组: 大鼠尾静脉注入放射性活度浓度为 3.4023×10^5 Bq/ml 的晚期混合裂变产物, 注射量同①, 注入后 3, 9, 15, 21 d 断尾取血。③不同剂量率组: 4 组大鼠尾静脉分别注入放射性活度浓度为 13.6090×10^5 Bq/ml, 6.8045×10^5 Bq/ml, 3.4023×10^5 Bq/ml, 1.7017×10^5 Bq/ml 的晚期混合裂变产物, 注射量同①, 当达到相似的累积剂量后, 即注入后 2, 4, 3, 9, 21.9 d 断尾取血。

1.3 SCGE 检测

1.3.1 单细胞悬液制备 取肝素抗凝的外周血 100 μl 作为 SCGE 检测的 PBMC(包括淋巴细胞和单核细胞)。

1.3.2 制片 采用“三明治”凝胶法, 先将铺在磨砂载玻片上的 0.5% 正常熔点凝胶 85 μl 刮掉, 再在玻片上铺第 1 层即 5% 正常熔点凝胶 85 μl , 然后将 75 μl 0.7% 低熔点凝胶与等体积细胞悬液混匀铺第 2 层, 最后用 0.7% 低熔点凝胶 85 μl 铺第 3 层。

1.3.3 细胞裂解 将玻片浸于新鲜配制的碱性裂解液(含 10% DMSO, 1% Triton X-100 等)中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 2 h。

1.3.4 电泳 将玻片取出放入电泳槽平板上, 先置于新配制的电泳液(含 1 mmol/L $\text{Na}_3\text{—EDTA}$, 0.3 mmol/L NaOH)中解螺旋 20 min, 然后在 300 mA, 25 V 条件下电泳 20 min。

作者单位: 苏州大学放射医学与公共卫生学院, 江苏 苏州 215007

作者简介: 崔凤梅(1975—), 女, 河南南阳人, 医学博士在读, 助教, 主要从事放射毒理学研究。

测量径向剂量分布。

参考文献:

[1] Landzberg BR, Frishman WH, Lenick K. Pathophysiology and pharmacological approaches for prevention of coronary artery restenosis following coronary artery balloon angioplasty and related procedures[J]. Prog cardiovasc Dis, 1997, 39: 361—398.

[2] Nath R, Amols H, Coffey G, et al. Intravascular brachytherapy physics: report of the AAPM radiation therapy committee task group No. 60[J]. Med phys, 1999, 26(2): 199—152.

[3] 徐志勇, 王明席, 张良安, 等. 放射性球囊内气泡在治疗冠状动脉再狭窄时对剂量分布的影响[J]. 中华核医学杂志, 2002, 22(6): 374—375.

(收稿日期: 2003—12—21)

1.3.5 中性化 用 Tris—HCl 缓冲液(pH=7.5)中性化 3 次,每次间隔 5 min。

1.3.6 染色 每张片子用 2 μg/ml 的 EB 染液 100 μL 染色,封片后立即阅片。

1.3.7 图像分析 在 Olympus 荧光显微镜下,观察单细胞电泳图像。每张片子至少观察 40 个细胞,用目镜测微尺测量核 DNA 的长度(精确度为 0.1 μm)。

1.4 统计分析 用 SAS 6.12 软件对各不同累积剂量组和各不同剂量率组之间的差异进行分析。

2 结果

2.1 不同累积剂量晚期混合裂变产物对大鼠 PBMC 细胞 DNA 的损伤效应 大鼠经不同累积剂量晚期混合裂变产物作用后,PBMC DNA 链断裂的迁移情况见

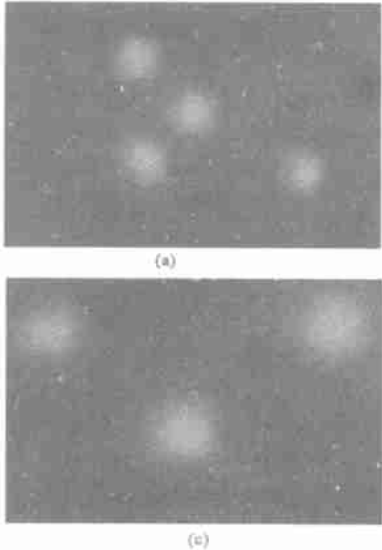


图 1 (a) 对照组
(c) 32.705 mGy/d 剂量率组

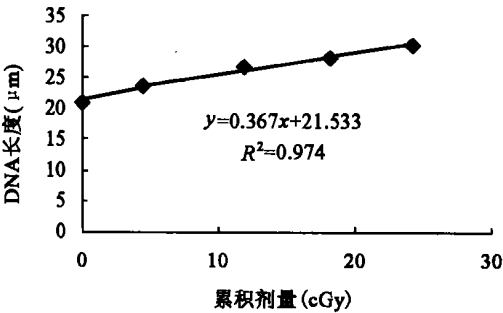


图 2 核 DNA 长度与累积剂量之间的关系

2.2 晚期混合裂变产物不同剂量率对大鼠 PBMC 细胞 DNA 的损伤效应 不同剂量率的晚期混合裂变产物作用于大鼠后,检测到的 PBMC DNA 的损伤情况见表 2 和图 1。除 8.176 4 mGy/d 剂量率组,其余各剂量率组 PBMC DNA 的迁移距离均高于对照组 ($P < 0.05$),且随着剂量率的增加,迁移长度也增加,有良好的剂量率效应关系。进行相关分析,相关系数 r 为 0.932 ($P < 0.05$),直线拟合后,求得回归方程为 $y = 0.138x + 22.07$, $R^2 = 0.870$ (见图 3)。

3 讨论

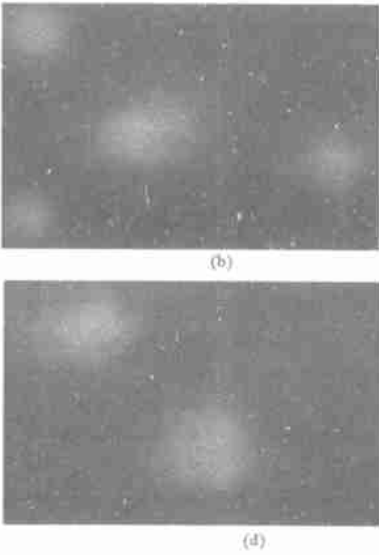
单细胞凝胶电泳(SCGE)即彗星试验是近几十年发展起来的一种灵敏、快速、高效的检测 DNA 断裂的

表 1 和图 1。结果可见,PBMC DNA 的迁移距离在各个累积剂量组均高于对照组 ($P < 0.05$),且随着累积剂量的增加,迁移长度也增加,显示良好的剂量效应关系。进行相关分析,相关系数 r 为 0.987 ($P < 0.05$),拟合的剂量效应模型符合直线方程为 $y = 0.367x + 21.533$, $R^2 = 0.974$ (见图 2)。

表 1 累积剂量对核 DNA 长度的影响

累积剂量(cGy)	剂量率(mGy/d)	核 DNA 长度(μm)
0	32.705 5	20.85±0.57
4.556 6	32.705 5	23.61±1.94 ¹⁾
11.830 1	32.705 5	26.66±0.92 ¹⁾
18.175 0	32.705 5	28.00±1.02 ¹⁾
24.133 4	32.705 5	30.07±2.29 ¹⁾

注: 1) $P < 0.05$, 与对照组比较。



(b) 11.830 cGy 累积剂量组
(d) 65.4110 mGy/d 剂量率组

技术,已广泛的应用于检测诱变剂、射线等对 DNA 的损伤、监测环境污染对机体的遗传损害、研究毒物致癌机制等方面^[1]。如果细胞未受损伤,电泳时,核 DNA 因其分子量大停留在核基质中,荧光染色后呈现

表 2 不同剂量率对核 DNA 长度的影响

累积剂量(cGy)	剂量率(mGy/d)	核 DNA 长度(μm)
0	0	20.85±0.57
12.501 5	8.176 4	22.55±1.96
12.545 9	16.352 8	25.57±1.57 ¹⁾
12.554 0	32.705 5	28.32±0.94 ¹⁾
12.581 0	65.411 0	30.01±2.32 ¹⁾

注: 1) $P < 0.05$, 于对照组比较。

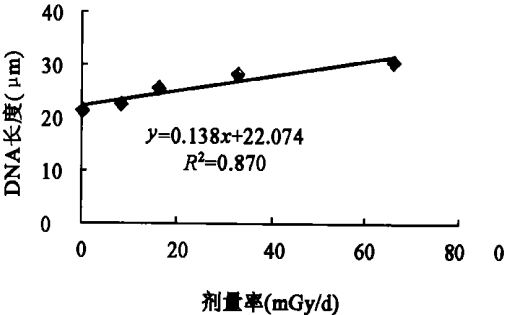


图 3 核 DNA 长度与剂量率之间的关系

^{137}Cs γ 射线亚致死剂量照射小鼠生物学效应的研究

沈 秀, 张荷清, 吴美羔, 宋永良

中图分类号: R818.03 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2004)04-0245-03

【摘要】 目的 通过不同剂量 ^{137}Cs γ 射线照射小鼠, 观察不同剂量在不同时间相对机体的损伤情况, 对辐射损伤基础研究的生理指标提供本底数据, 为抗辐射功能性保健食品的研究提供参考指标。方法 以 2, 3, 4, 5 Gy ^{137}Cs γ 射线照射 KM 小鼠, 在照射后 3, 5, 7, 14, 21 d 分别取样对其血液、造血系统、免疫及遗传系统等生理指标的变化情况进行测试研究, 包括白细胞、微核率、骨髓 DNA 含量、胸腺指数及脾指数等。结果 研究表明, 白细胞、微核率、骨髓 DNA 含量、胸腺指数及脾指数等指标与照射强度和时间呈现一定的剂量-时效关系。以照射后 3~5 d 机体损伤最严重, 而后进入恢复期, 21 d 基本恢复正常。部分指标与未照射对照组比较差异有显著性。结论 对亚致死剂量 γ 射线照射下各种生理指标测试的结果是合理的、可靠的; 各种指标用于辐射损伤的研究是可行的, 同样可以用于辐射防护药物的研究。

【关键词】 照射; 白细胞; 骨髓 DNA; 微核率; 脾指数; 胸腺指数

Study on Biological Response of Mice with ^{137}Cs γ -Rays Radiation at Sub-lethal Dosage. SHEN Xiu, ZHANG He-qing, WU Meigao, et al. *Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China.*

【Abstract】 **Objective** This paper reports the research results of sub-lethal ^{137}Cs γ -rays irradiation on Kunming species mice, and the damage degree of different irradiation dosages and stages in mice were determined. The aim is to provide background data for the basic research of physiological indexes about radiation damage, and thus offer reference data for functional health-food of anti-irradiation, as well. **Methods** The Kunming species mice were irradiated by 2, 3, 4, 5 Gy of ^{137}Cs γ -rays, and the samples of blood, hematopoietic system, immune system and genetic system were taken and determined, respectively, at 3, 5, 7, 14 and 21 day after irradiation. The varieties of biological indexes at different time were obtained, including the white blood cells (WBC), micro-kernel rate, DNA content of marrow, thymus index and spleen index, and so forth. **Results** The research manifested that all kinds of the biological indexes showed a relationship between dosage-time response and the irradiation intensity. The damage showed the most severe stage was at 3~5 days after irradiation, and then entered the recovery stage began. It did not get normal until after 21 days. By statistics treatment, some indexes of irradiated mice were of the evident differences compared with the control ones without irradiation. **Conclusion** After sub-lethal dosages of γ -rays irradiation, the determined results of the various biological indexes in mice were reasonable and reliable. All indexes are available to the research of irradiation damage, and can be applied to the drug research of irradiation protection as well.

【Key words】 Irradiation; WBC; Marrow DNA; Micro-kernel Rate; Spleen Index; Thymus Index

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 300192

作者简介: 沈秀(1960~), 女, 主管技师。主要研究方向: 辐射生物学及抗辐射药物的研究。

保健食品中多含有抗辐射作用的成分如多糖、生物碱类等。目前, 抗辐射功能类保健食品的研究多沿用抗辐射药物指标, 动物模型也用致死剂量照射, 然

圆形的荧光团, 无拖尾现象。若细胞受损, 在碱性电泳液中, DNA 双链解螺旋且碱变性为单链, 由于单链断裂的碎片分子量小, 电泳时断链或碎片离开核 DNA 向阳极迁移, 形成拖尾, 即彗星图像。细胞 DNA 受损愈重, 产生的断链或断片就愈多, 其断链或断片也就愈小, 在相同电泳条件下 DNA 迁移的距离就愈长。因此, 通过测定 DNA 迁移长度可定量的测定 DNA 损伤程度, 确定电离辐射剂量或剂量率与 DNA 损伤效应之间的关系。

Kent^[2] 等用 SCGE 检测了 CHO-K1 细胞的 DNA 损伤情况, 发现彗星长度与照射剂量间有良好的线性关系。另有研究表明, 0.05 Gy ~ 5.0 Gy 离体照射条件下, 淋巴细胞彗星长度随照射剂量增加而增大, 符合线性平方模型^[3,4]。在本实验中, 可见到典型的彗星图像, 如图 1(b), 但大部分是呈球形膨胀的图像, 如图 1(c)、(d), 故测量的是核 DNA 长度而不是核 DNA 拖尾的距离。出现这种情况可能与内照射的复杂性及持续性有关。本研究发现不同累积剂量组和不同剂量率组 PBMC 的 DNA 迁移长度增加, 且随累积剂量或剂量率的增大而增加, 显示良好的剂量效应关系和剂

量率效应关系, 符合直线模型。在探讨 SCGE 检测 PBMC 的 DNA 损伤作为早期生物学效应的分子生物标志物时, 由于内照射的特殊性, 研究较少, 本实验在放射性核素内照射条件下, 得出了良好的剂量效应关系和剂量率效应关系, 为 SCGE 作为低剂量辐射的生物剂量计提供了实验基础。

参考文献:

- [1] 夏世钧, 吴中亮. 分子毒理学基础[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2001, 310-312.
- [2] Kent CR, Eady JJ, Ross GM, et al. The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay[J]. *Int J Radiat Biol*, 1995, 67: 655-660.
- [3] Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, et al. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. Strand damage[J]. *Mutat Res*, 1998, 416: 21-35.
- [4] Kruszewski M, Wojewodzka M, Iwanenko T, et al. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. II. Base damage[J]. *Mutat Res*, 1998, 416: 37-57.

(收稿日期: 2004-02-23)