

大鼠吸入氡及其子体后的 DNA 损伤效应

李冰燕¹ 童建¹ 洪承皎¹ 张增利¹ 金念祖² 周建伟²

¹(苏州大学核医学院 苏州 215007)

²(南京医科大学公共卫生学院 南京 210029)

摘要 研究氡及其子体对大鼠外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、肺细胞、支气管肺泡灌洗液(Bronchi alveolar lavage fluid, BALF)细胞以及脾和胸腺细胞 DNA 的损伤作用。雄性 SD 大鼠吸入氡及其子体的累积剂量分别为 66、111、174 工作水平月(Working level month, WLM)后,收集 BALF 细胞,制备肺、脾脏和胸腺组织的单细胞悬液,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。结果表明,大鼠吸入氡及其子体后,各照射组 PBMC、BALF 和肺细胞 DNA 链断裂的迁移长度显著增加($p < 0.01$)。其中, PBMC 与肺细胞 DNA 损伤有相关性($r = 0.887$, $p < 0.01$),直线拟合($R^2 = 0.787$)的回归方程为 $Y = 0.978X - 0.12$ 。在本实验的照射剂量下,氡及其子体可引起 PBMC、BALF 和肺细胞的 DNA 链断裂的损伤。

关键词 单细胞凝胶电泳, 外周血单个核细胞, 肺细胞, DNA 损伤

中图分类号 R811

吸入氡及其子体对人体的危害主要是引发肺癌,它是继烟草之后引发肺癌的第二个主要因素。国际癌症研究机构(IARC)早在 1988 年已将氡及其子体划归为 I 类致癌因素^[1]。在外源性物质引起细胞的癌变过程中, DNA 损伤常常在启动阶段发生,损伤的 DNA 如不能完全修复则可能引起相关的基因突变。本实验采用单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis, SCGE)技术,检测氡及其子体对大鼠肺、脾和胸腺等不同脏器细胞 DNA 损伤的影响,了解其与外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) DNA 损伤的相关性,为筛选氡及其子体致损伤效应的早期生物标志物提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 动物照射

1.1.1 动物分组及处理 选用 2 个月龄清洁级 SD 大鼠(由苏州大学实验动物中心提供,许可证号:SYKK[苏]2002-0037)20 只,雄性,体重 150—180g。随机分成 4 组,除对照组外,其余 3 组整体暴露于 HD-3 型多功能生态氡室(华东地质学院制造),每组累积受照剂量分别为 66、111、174 工作水平月

(Working level month, WLM),剂量率为 0.15WLM/h。
1.1.2 照射条件 HD-3 型多功能生态氡室是由电脑控制氡气输送,通过闪烁室、探头和定标仪,由电脑对氡室内氡及其子体浓度进行实时自动监测,可连续长时间保持室内氡浓度稳定在 $\pm 5\%$ 的设定值范围,并可不断地补充新鲜空气。本实验大鼠照射期间氡室浓度控制在 60—100Bq/L。照射期间大鼠可自由活动、进食和饮水。对照组大鼠在动物房正常饲养,动物房的本底氡浓度为 0.08Bq/L。大鼠末次照射后 0.5h 采样检测。

1.2 样品制备

1.2.1 肺灌洗 大鼠照射达要求剂量后,从氡室取出,于 0.5h 内用 36%水合氯醛麻醉,经腹主动脉放血处死,暴露气管和肺,用含 0.02%EDTA 的 D-HanKs 液 5mL 注入肺中,使肺完全充盈,边抽边轻轻按摩肺脏,抽出的细胞悬液经 2 层纱布过滤到试管内,如此反复 5 次,收集支气管肺灌洗液(Bronchi alveolar lavage fluid, BALF)约 20mL,离心,收获 BALF 细胞。

1.2.2 单细胞悬液制备 制备肺、脾及胸腺组织的单细胞悬液,取小块组织约 80g 放在用 Hanks 液浸透的 2 层纱布上,用 1 次性注射器针栓将组织磨碎,

江苏省重点实验室开放基金(KJS01009)资助

第一作者:李冰燕,女,1966 年 9 月出生,1988 年毕业于山西医科大学,公共卫生学院,预防医学专业,硕士研究生

收稿日期:初稿 2002-06-27,修回 2002-09-01

边碾磨边加 Hanks 液，最后用 4 号针头过滤细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^6 ，将上述收获的 BALF 细胞也调整为此浓度；取肝素抗凝的外周血 100 μ L 为 SCGE 检测的 PBMC（包括淋巴细胞和单核细胞），4 备用。

1.3 SCGE 检测

参照 Singh 等^[2]的方法，稍作改进，具体操作如下：

1.3.1 制板 先将铺在磨沙载玻片上的 0.5% 正常融点凝胶 85 μ L 刮掉，再在玻片上铺第 1 层即 0.5% 正常融点凝胶 85 μ L，然后将 75 μ L 0.7% 低融点凝胶与等体积细胞悬液混匀，铺第 2 层，最后用 0.7% 低融点凝胶 85 μ L 铺第 3 层。

1.3.2 裂解 将玻片浸于新鲜配置的碱性裂解液（含 10% DMSO, 1% Triton X-100 等）中，4 裂解 2h。

1.3.3 电泳 将玻片取出放入电泳槽平板上，先置于新配置的电泳液（含 1mmol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0.3mol/L NaOH）中解旋 20min，然后在 300mV、25V 条件下电泳 20min。

1.3.4 中性化 将玻片取出，用 Tris-HCL 缓冲液（pH=7.5）中性化 3 次，每次间隔 5min。

1.3.5 染色 每张片子滴加 2 μ g/mL 的 EB 染液 100 μ L 染色，封片后立即阅片。

1.3.6 观察结果和拍照 在 Olympus 荧光显微镜下观察，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 μ m）。为保证测量的质量，减少主观误差，整个实验测量的是核 DNA 长度而不是核 DNA 拖尾的距离，测量由专人负责。

1.4 统计分析

用 10.0 SPSS 软件对各剂量组之间的差异进行单因素方差分析（ANOVA），有显著意义的再进行两两比较（Tukey HSD）检验。对 PBMC 与肺细胞之间 DNA 的损伤关系进行 Pearson 相关分析，并进行回归分析和直线拟合。

2 结果

2.1 氡及其子体对大鼠脏器细胞 DNA 的损伤效应

大鼠吸入氡及其子体后，PBMC、BALF、肺、脾脏和胸腺细胞 DNA 链断裂的迁移情况见表 1 和图 1。PBMC、BALF、DNA 的迁移距离在 3 个照射剂量下以及肺的细胞 DNA 迁移距离在两个照射剂量下均显著高于对照组（ $p < 0.01$ ），且随着剂量的增加，迁移长度也增加，但脾脏和胸腺细胞 DNA 的迁移距离只在高剂量组 174WLM 下才与对照组有差异（ $p < 0.01$ ）。

2.2 大鼠 PBMC 与肺细胞 DNA 损伤之间的相关性

把 PBMC 的 DNA 迁移距离与肺细胞的迁移距离进行相关分析 相关系数 r 为 0.887（ $p < 0.01$ ），直线拟合后，相关指数 R^2 为 0.787，求得回归方程为 $Y = 0.978X - 0.12$ （见图 2）。用 PBMC 的 DNA 链断裂对肺细胞的 DNA 损伤进行预测，结果见表 2。

Tab.1 DNA migration of the cells from tissues of rats inhaling radon and its progeny ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Dose	PBMC	BALF	Lung	Spleen	Thymus
Control	20.84 \pm 1.79	20.39 \pm 1.29	20.64 \pm 4.26	19.68 \pm 0.61	19.71 \pm 0.63
66WLM	26.31 \pm 0.88 ⁽¹⁾	25.54 \pm 1.74 ⁽¹⁾	24.34 \pm 0.61	21.97 \pm 1.36	22.67 \pm 1.44
111WLM	32.13 \pm 0.77 ⁽¹⁾	29.31 \pm 2.45 ⁽¹⁾	30.24 \pm 4.82 ⁽¹⁾	24.62 \pm 1.67	26.09 \pm 3.35
174WLM	35.55 \pm 2.42 ⁽¹⁾	40.68 \pm 3.42 ⁽¹⁾	35.85 \pm 1.56 ⁽¹⁾	36.12 \pm 6.15 ⁽¹⁾	34.91 \pm 5.85 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$, vs control

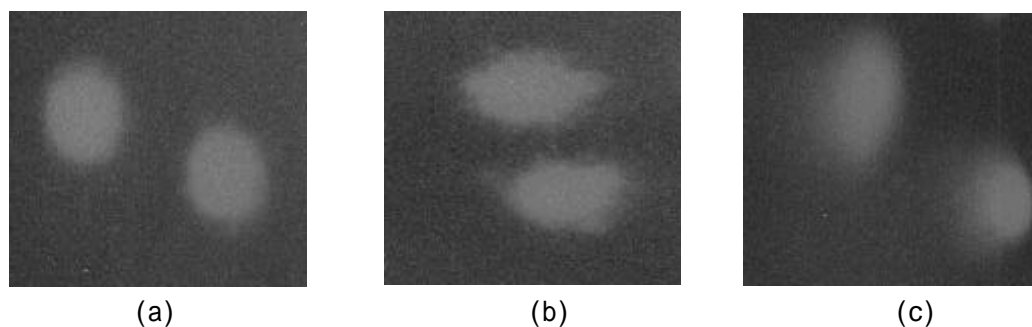


Fig.1 Image of DNA migration of BALF cells of rats exposed to radon and its progeny (a) Control group, (b) 111WLM group, (c) 174WLM group.

Tab.2 Regression analysis of relationship between DNA migration on PBMC and lung cell in rats inhaled radon and its progeny ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}, n=20$)

	PBMC	Observed lung cells	Predicted lung cells
control	20.84 ± 1.79	20.64 ± 4.26	20.27 ± 1.75
66WLM	26.31 ± 0.88	24.34 ± 0.61	25.62 ± 0.86
111WLM	32.14 ± 0.77	30.24 ± 4.82	31.32 ± 0.76
174WLM	35.55 ± 2.42	35.85 ± 1.56	34.66 ± 2.37

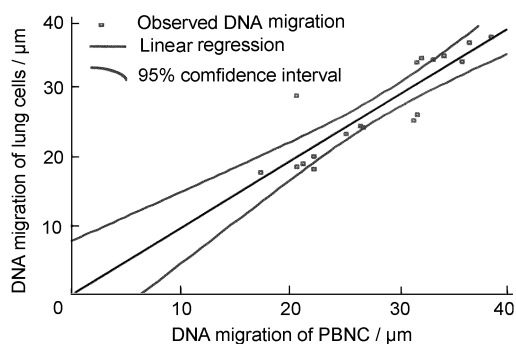


Fig.2 Linear regression with its 95% confidence interval for the relationship between the DNA migration(μm) of PBMC and lung cells of rats inhaling radon and its progeny.

3 讨论

进入呼吸道的氡及其子体很容易经肺吸收,约三分之一可经肺转移进入血流,所以肺、血液和几个其他脏器和组织都可能暴露于氡及其子体的 α 粒子照射^[3]。其中,肺受损伤的程度最为严重。最后是其它脏器。Nagarkatti 等^[4]研究 C57BL/6 小鼠吸入氡及氡子体后对肺相关淋巴结、外周淋巴结、胸腺及脾脏的影响。结果发现,氡照射能引起肺相关

淋

巴结中 T 细胞对丝裂原的刺激反应减弱,而 B 淋巴细胞对丝裂原的刺激反应没有变化;却引起脾脏和外周淋巴结中 T 和 B 细胞对丝裂原的刺激反应增加。Nagarkatti 等^[4]分析氡对肺相关淋巴结的影响可能是 α 粒子对迁移至肺的淋巴细胞的直接作用,而对脾脏和外周淋巴结可能只是间接作用。

单细胞凝胶电泳 (SCGE) 即彗星试验是近十几年发展起来的一种简单、灵敏的检测 DNA 断裂的技术,已广泛运用于毒理学领域^[5,6]。正常的细胞基因组 DNA 是一个完整的整体,由于其相对分子质量特别大,在一般电场的作用下,不会发生移动,在荧光显色以后,会见到一个几乎正圆形的斑点(见图 1a)。如果细胞 DNA 受损,当 DNA 解螺旋且碱变性为单链,由于 DNA 断链分子量较小,在电场中就可以离开核 DNA 向阳极移动,形成彗星图象(见图 1c)。DNA 受损伤愈严重,产生的断链和片段就愈多,断链也愈小,在相同电泳条件下 DNA 迁移的距离就愈长。因此,通过测定 DNA 迁移长度可定量测定 DNA 损伤程度,确定电离辐射剂量与 DNA 损伤效应之间的关系。本实验室已成熟地建立用 SCGE 技术监测外

周血淋巴细胞 DNA 损伤的方法，曾发现随着大鼠暴露氡及其子体剂量的增加，外周血淋巴细胞的 DNA 迁移长度逐渐增加^[7]。SCGE 技术研究氡对 BALF、肺细胞和其它脏器细胞 DNA 的损伤在国内外尚未见报道，本研究发现各照射组 PBMC、BALF 和肺细胞的 DNA 迁移长度显著增加，而且这种效应随照射剂量增大而增加，显示一定的剂量-效应关系。脾脏和胸腺只有在最高照射剂量下才有明显增加。由于 PBMC 和肺细胞的 DNA 损伤之间存在相关性，可以用 PBMC 的 DNA 损伤程度预测肺细胞 DNA 的损伤。这为今后对动物个体的动态研究以及氡照射的人群调查，提供了外周血采样的依据，同时在筛选氡及其子体致损伤的生物标志物时，可考虑用 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，用于氡及其子体致损伤效应的危险度评价。

参考文献

- 1 IPCS. Environmental Health Criteria 211. Health effects of interactions between tobacco use and exposure to other agents. Geneva: WHO, 1999: 57
- 2 Singh N P, McCoy M T, Tice R Pet al. Exp Cell Res, 1988, 175 (1): 184-191
- 3 Hellman B, Friis L, Vaghef H et al. Mutation Research, 1999, 442 (2): 121-132
- 4 Nagarkatti M, Nagarkatti P S, Brooks A. J Toxicol Environ Health, 1996, 47 (6): 535-552
- 5 Moller P, Knudsen L E, Loft S et al. Cancer Epidemiol Biomarkers-Prev, 2000, 9 (10): 1005-1015
- 6 Banath J P, Fushiki M, Olive P L. INT J Radiat Biol, 1998, 73 (6): 649-660
- 7 童建, 洪承皎, 王静等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2001, 19 (3): 236-238

TONG Jian, HONG Chengjiao, WANG Jing et al. J Radiat Res Radiat Process, 2001, 19 (3): 236-238

GENTIC EFFECT OF INHALED RADON AND ITS PROGENY IN RATS

LI Bingyan¹ TONG Jian¹ HONG Chengjiao¹ ZHANG Zengli¹ JIN Nianzu² ZHOU Jianwei²

¹(Nuclear Medical School of Soochow University, Suzhou 215007)

²(School Health Public, Nanjin Medical University, Nanjin 210029)

ABSTRACT A study was done on DNA damage in tissue cells of ranon-inhaled rats. Sprague-Dawley rats were exposed to radon and its progeny to doses of 66, 111 and 174 WLM(working level month), respectively. Single cell suspensions of the rat lung, spleen and thymus were prepared. Single cell gel eletrophoresis(SCGE) was performed to detect the length of DNA migration in the rat peripheral blood mononuclear cells(PBMC), bronchi alveolar lavage fluids (BALF)cells, lung cells, spleen cells and thymus cells. DNA migration in the rat PBMC, BALF cells and lung cells increased with cumulative doses. The dose-effect relationships of the DNA damages and a correlation between DNA migration in PBMC and lung cells could be established. Radon and its progeny could cause DNA strand break in rat PBMC, BALF cells and lung cells.

KEYWORDS Single cell gel electrophoresis (SCGE), Peripheral blood mononuclear cell (PBMC), Lung cell, DNA damage

CLC R811