碱性单细胞凝胶电泳预测肿瘤细胞内在放射敏感性研究

张军宁[1]　洪承皎[2]　朱寿彭[2]

[1]（苏州大学附属第一医院　苏州 215006）

[2]（苏州大学核医学院　苏州 215007）

摘要　应用克隆形成法和碱性单细胞凝胶电泳技术检测辐射诱导的人红白血病细胞株 K_{562}、人结肠腺癌细胞株 LS-T-117 和鼠胶质瘤细胞株 C_6 的初始 DNA 单链断裂数及单链断裂后的修复与细胞内在放射敏感性之间的关系。结果表明，3 种细胞系的放射敏感性依次为 K_{562}>LS-T-117>C_6；3 种细胞系的 DNA 迁移距离都随着照射剂量的增加而增大，呈良好的剂量-效应关系。在相同剂量下，辐射诱导的 DNA 单链的初始断裂数目也依次为 K_{562}>LS-T-117>C_6；3 种细胞系经 10Gy X 射线照射并在 PBS 中培养不同时间后 DNA 迁移距离都有较大幅度的下降，但下降幅度依次为 C_6>LS-T-117>K_{562}，在相同剂量下辐射诱导的 DNA 单链断裂后的修复能力也依次为 C_6>LS-T-117> K_{562}。结果显示，辐射诱导的 DNA 单链断裂及修复与细胞内在放射敏感性有很好的相关性，可用于人体肿瘤细胞内在放射敏感性的预测。

关键词　肿瘤细胞放射敏感性，碱性单细胞凝胶电泳，DNA 单链断裂，DNA 单链断裂修复

中图分类号　R 811.5

以前的研究表明，辐射诱导 DNA 双链断裂及修复是预测人体肿瘤细胞内在放射敏感性的重要指标。中性单细胞凝胶电泳技术，通过检测辐射诱导 DNA 双链断裂及修复，作为预测人体肿瘤细胞内在放射敏感性的方法具有很大的应用潜力。但检测 DNA 双链断裂的中性凝胶电泳所需照射剂量比测定单链断裂的照射剂量高。于是有人改用碱性电泳检测单链断裂，结果在一定程度上也能反映肿瘤细胞的放射敏感性，国内尚未见此类报道。本工作采用碱性单细胞凝胶电泳技术，对辐射诱导的人体肿瘤细胞 DNA 单链断裂及修复进行了检测，并与细胞存活曲线进行了比较。

1　材料和方法

1.1　细胞系

K_{562}（人红白血病细胞）、LS-T-117(人结肠腺癌细胞)、C_6(鼠胶质瘤细胞)均由本院血研所提供。

1.2　细胞培养

RPMI-1640 全培养液为 RPMI-1640 培养液中增补 10%灭活胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、1 万单位 $100mL^{-1}$ 青霉素，10mg $100mL^{-1}$ 链霉素，并用 $NaHCO_3$ 调至 pH=7.2 使用。将细胞置于 37℃，体积分数为 5%的 CO_2 培养箱内培养至指数生长期进行实验，细胞消化用 0.25%胰酶 EDTA 溶液，隔 3d 传代 1 次。

1.3　照射条件

照射用西门子 KD-2 型直线加速器，6 MV X 射线，照射野为 10cm×10cm，源靶距为 100cm，吸收剂量率为 100cGy/min，瓶面上覆盖 1.5cm 组织等效物。用于单细胞凝胶电泳试验的样品，于照射时应将培养瓶置于冰面上。用于检测 DNA 链修复动力学的细胞，于照射后应在 PBS 中培养一定时间。用于碱性单细胞凝胶电泳试验的照射剂量为 0、1、2、5 和 10Gy，用于细胞存活曲线实验的照射剂量为 0、0.5、1、3、5 和 10Gy。

1.4　碱性单细胞凝胶电泳试验

参照 Singh 等[1]的方法，简述如下：(1) 正常熔点琼脂（0.5%）85μL 均匀铺在磨砂载玻片上，吸取 75μL 含约 10^4 个细胞的低熔点琼脂（0.7%）均匀铺在正常熔点凝胶层上，再于其上铺一层低熔点琼脂凝胶；(2) 将玻片浸入新配的碱性细胞裂解液（2.5mol/L NaCl，100mmol/L EDTA，1%肌氨酸钠，10mmol/L Tris，用前加 1% Triton X-100 和 10% DMSO， pH 为 10）中裂解 1.5h；(3) 取出玻片置于碱性电泳液中展开 20min 后，在 25V、300mA 电泳条

苏州大学第一临床学院基金资助

第一作者：张军宁，男，1966 年 12 月出生，2001 年毕业于苏州大学，放射医学专业，副主任医师，博士

收稿日期：初稿 2002-01-19，修回 2002-05-22

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

件下电泳 20min；(4) 用 Tris-HCl 缓冲液（pH7.5）中和 3 次后加 100μL 溴乙锭（2μg/mL）染色，盖上盖玻片在荧光显微镜下测量 DNA 迁移长度（length of migration，μm），每份样品随机观察 6—10 个细胞，每组观测 40 个细胞。

1.5　克隆形成实验

取指数生长期细胞，消化、计数、稀释，按吸收剂量大小将不同数目细胞接种于 100mL 培养瓶内照射。培养 12—14d 后，倾去培养液，用无水乙醇固定，结晶紫染色 1h。0Gy 组即不照射组用于计算集落形成率。在低倍显微镜下计数≥50 个细胞的克隆。每个剂量点设 3 个平行样品，实验重复 3 次，取均数。以每次实验的 0Gy 组结果计算集落形成率，集落形成率=集落数/接种细胞数×100%，各实验组的细胞存活分数（SF）按存活分数=集落数/接种细胞数/集落形成率×100%计算。

2　结果

2.1　细胞存活实验

K_{562}、LS-T-117、C_6 3种细胞系经 X 射线照射后的存活分数，与剂量拟合（用多靶单击模型）的细胞存活曲线分别为

$$S=3.3205e^{-3.7398D},\ S=0.1355e^{-0.1242D}$$

和

$$S=0.6408e^{-0.3403D}$$

式中，S 为某一剂量下细胞存活分数，D 为照射剂量。依据细胞存活曲线求出细胞受到 2Gy 照射时的存活分数（SF_2），K_{562}、LS-T-117、C_6 3 种细胞系的 SF_2 分别为 0.19%、10.57%和 32.44%。结果表明，3 种细胞系的放射敏感性依次为 K_{562}>LS-T-117>C_6。

2.2　辐射对人体肿瘤细胞系 DNA 的损伤

表 1 列出了 K_{562}、LS-T-117、C_6 这 3 种细胞系在受到不同剂量 X 射线照射后 DNA 单链的初始断裂情况,结果用 DNA 迁移距离(μm)表示。3 种细胞系的 DNA 迁移距离都随着照射剂量的增加而增大，呈良好的剂量效应关系。此外，对应于在各剂量点，3 种细胞系的 DNA 迁移距离依次为 K_{562}> LS-T-117>C_6。表明在相同剂量下，辐射诱导的 DNA 单链的初始断裂数目也依次为 K_{562}> LS-T-117>C_6。

Tab.1　Radiation induced DNA single strand breaks in K_{562}, LS-T-117 and C_6 cell lines

Dose / Gy	The length of DNA migration ($\bar{x}\pm s$, μm)		
	K_{562}	LS-T-117	C_6
0	4.00±2.22	3.75±1.66	328±0.44
1.0	18.46±3.15	13.98±4.16(1) (3)	9.54±4.31(2)
2.0	21.36±5.54	15.84±1.69(1) (3)	11.79±3.22(2)
5.0	26.14±3.21	17.24±3.96(1) (3)	14.53±2.84(2)
10.0	31.11±7.38	27.54±6.89(1) (3)	24.87±3.98(2)

LS-T-117 compared with K_{562}, (1)p<0.01, C_6 compared with K_{562}, (2) p<0.01, LS-T-117 compared with C_6, (3) p<0.01

2.3　辐射诱导人体肿瘤细胞 DNA 单链断裂的修复

表 2 列出了 K_{562}、LS-T-117、C_6 这 3 种细胞系经 10Gy X射线照射并在 PBS 中培养不同时间后 DNA 迁移距离的变化情况。

在受照射后 60min 内，这 3 种细胞系的 DNA 迁移距离都有较大幅度的下降，但下降幅度依次为 C_6>LS-T-117> K_{562}。结果表明，在相同剂量下，辐射诱导的 DNA 单链的修复能力也依次为 C_6>LS-T-117> K_{562}。

在照射后 60—120min 范围内,3 种细胞系的 DNA 迁移距离变化不大，显示 DNA 单链断裂的修复已处于坪期。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Tab.2 Non-repaired DNA single strand breaks in K_{562}, LS-T-117 and C_6 cell lines at different time after 10Gy X-ray irrdiation

Time / min	The length of DNA migration ($\bar{x} \pm s$, μm)		
	K_{562}	LS-T-117	C_6
0	31.11±7.38	27.54±6.89	24.87±3.98
30	29.33±9.98	24.42±5.01	17.31±4.43
60	28.03±2.23	21.28±6.23	9.24±2.92
120	27.79±2.92	18.35±5.78	10.11±1.41

3 讨论

Rydberg 等[1]最先提出单细胞 DNA 损伤定量。Ostling 等[2]引入了短时电泳，使 DNA 断片向阳极伸展形成慧尾，增加了探测 DNA 损伤的灵敏性。但目前应用较多的单细胞凝胶电泳技术是 Singh 等[3]1988 年提出的。本方法采用碱性单细胞凝胶电泳技术，即碱性松解后（电泳前）要将玻片置于低盐、无去污剂、高 pH 值的碱性电泳液中，并用高 pH 条件下的电泳，DNA 链解螺旋，使 DNA 的断链和碱易变性 DNA 片段从严密的超螺旋结构中释放出来；由于这些 DNA 的断链分子量较小且碱变性为单链，彗星尾几乎全由来自 DNA 单链断裂的 DNA 片段组成，适于 DNA 单链断裂的检测[4]。从方法学角度出发，改良后的方法其敏感性又明显提高，每 1×10^9u 中即可检测出 0.1 个 DNA 断裂[4]。文献[5]报道，它甚至可以测定单个细胞水平在临床放射治疗分割剂量 2Gy 以下照射时 DNA 损伤及修复。从临床角度出发，实体肿瘤对治疗的反应性除了受瘤细胞内在的放射敏感性的影响外，还与瘤体中不同的异质性细胞群体以及其所处的细胞周期、增殖动力学、所处的氧提供条件等有关。因此对人实体瘤，尤其对特定的临床肿瘤患者，应用碱性单细胞凝胶电泳技术来检测其瘤细胞对特定的放射治疗与化疗的反应将更具有实际意义[6,7]。

本研究的目的是要了解人体肿瘤细胞内在放射敏感性与 DNA 单链断裂的关系。通过对不同放射敏感性细胞系的比较研究发现，辐射诱导的各细胞系 DNA 迁移长度有显著性差异，放射敏感性愈高，辐射诱导的初始 DNA 单链断裂程度就愈重,这与 Nunez 等[8-10]的研究结果相一致。他们发现，辐射诱导人肿瘤细胞 DNA 损伤的初水平和克隆形成率的放射敏感性有非常明显的一致性。但也有一些研究结果表明，对于不同的放射敏感性细胞系，辐射诱导的初始 DNA 单链断裂数无显著差异[11]。目前，对造成这种实验结果差异的原因还不清楚，还有待于积累资料作进一步的研究。

Maity 等研究发现，有些细胞是由于 SSB 修复能力的缺陷而对射线敏感。本研究亦发现，辐射诱导的各细胞系 DNA 单链断裂的修复能力有显著性的差异，放射敏感性愈高，辐射诱导的各细胞系 DNA 单链断裂的修复能力就愈弱，这与文献[12]等的研究结果相一致。他们发现，肿瘤细胞株 CNE-1 细胞受照射后因自身修复能力较弱而对射线较敏感；而 GLC 细胞辐射后的自身修复较快，故对射线较为抗拒。

以上结果提示，辐射诱导 DNA 单链断裂及修复是预测人体肿瘤细胞内在放射敏感性的一种有用参数。碱性单细胞凝胶电泳技术通过检测辐射诱导 DNA 单链断裂及修复，作为预测人体肿瘤细胞内在放射敏感性的方法具有重要价值。

参考文献

1 Rydberg B, Johanson K J. Radiat Res, 1975, 64(2): 281-292
2 Ostling O, Johanson K J. Biochem Biohys Res Commun, 1984, 123(1): 291-298
3 Singh N P, McCoy M T, Tice R R *et al.* Exptl Cell Res, 1988, 175(1): 184-189
4 Collins A R, Dobson V L, Dusinska M *et al.* Mut Res, 1997, 375(2): 183-186
5 Muller W U, Bauch T, Streffer C *et al.* Int J Radiat Biol, 1994, 65(3): 315-322
6 Huang P, Olive P L, Durand R E. Br J Cancer, 1998, 77(3): 412-418
7 Fairbairn D W, Olive P L, O'Neill K L. Mutat Res, 1995, 339(1): 37-43
8 Nunez M I, McMillan T J, Valenzuela M T *et al.*

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Radiother Oncol, 1996, 39(2): 155-161
9 Hu Q, Kavanagh M C, Newcombe D *et al.* Radiat Res, 1995, 144(3): 266-271
10 Olive P L, Banath J P, MacPhail H S. Cancer Res, 1994, 54(14): 3939-3944
11 Dikomey E, Dahm-daphi J, Brammer I *et al.* Int J Radiat Biol, 1998, 73(3): 269-274
12 吕长兴，杨伟志，殷蔚伯等. 中华放射肿瘤学杂志，2000, 9(2): 114-116
LU C X, YANG W Z, YIN W B *et al.* Chin J Radiat Oncology, 2000, 9(2): 114-116

PREDICATION OF CELL RADIOSENSITIVITY USING THE ALKALINE SINGLE CELL ELECTROPHORESIS

ZHANG Junning[1] HONG Chengjiao[2] ZHU Shoupeng[2]
[1] *(Suzhou University First Affiliated Hospital, Suzhou 215006)*
[2] *(Nuclear Medicine College, Suzhou University, Suzhou 215007)*

ABSTRACT The relationship between intrinsic radiosensitivity of three kinds of tumor cells, K_{562}, LS-T-117 and C_6, and the radiation-induced initial DNA single-strand breaks(SSBs) and SSB repair in these cells were investigateded by the alkaline comet assay. It was found that there was a close correlation between the initial SSBs and the delivered dose to cells: the larger the dose, the severer the SSB. For the same single dose, the different initial SSBs and intrinsic radiosensitivity of the cells measured by means of the clonogenic assay ranked as in a descending order: K_{562}> LS-T-117>C_6, while the capacity of SSB repair did as C_6>LS-T-117>K_{562}. The results suggested that both radiation-induced initial SSBs and SSB repair correlated with the intrinsic radiosensitivity of cells to a certain extent, which could be used as potential predictors for the intrinsic radiosensitivity of tumor cells.

KEYWORDS Radiosensitivity for tumor cells, Alkaline comet assay, DNA single-strand breaks, DNA single-strand breaks repair
CLC R811.5

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net