

应用单细胞微凝胶电泳技术检测成纤维细胞的放射敏感性

徐永忠^{1,2} 郑斯英¹ 朱巍¹ 赵经涌¹ 曹建平¹

¹(苏州大学核医学院放射医学系 苏州 215007)

²(复旦大学遗传所 上海 200433)

摘要 应用单细胞微凝胶电泳(SCGE)技术以及噻唑蓝(MTT)比色法检测辐射诱发的成纤维细胞系 AT5BIVA 和 GM637 的初始 DNA 双链断裂数及断裂后的修复与细胞放射敏感性之间的关系。结果表明,AT5BIVA 细胞系的放射敏感性显著高于 GM637。两种细胞系的初始 DNA 双链断裂数均随剂量的增加而增加,呈显著的剂量效应关系,在给定的剂量点,辐射诱发的 AT5BIVA 细胞系的初始 DNA 双链断裂数显著高于 GM637。AT5BIVA 细胞系对辐射诱发的 DNA 双链断裂的修复能力小于 GM637。结果提示,辐射诱发的初始 DNA 双链断裂数及断裂后的修复与细胞的放射敏感性均有一定的相关性,作为细胞放射敏感性预测指标具有很大的应用潜势。

关键词 单细胞微凝胶电泳, DNA 双链断裂, 修复, 放射敏感性

中图分类号 Q691

细胞放射敏感性预测在放射生物学和肿瘤学领域中一直是研究的热点之一。由于 DNA 双链是射线所致细胞损伤和死亡的敏感靶分子之一, DNA 双链断裂和细胞死亡之间的关系已明确。因而,目前有很多的研究都集中在 DNA 双链断裂及修复的检测上。研究表明,辐射诱发的 DNA 双链断裂、细胞对断裂后 DNA 修复能力与细胞放射敏感性有很好的相关性,有望成为细胞放射敏感性的预测指标^[1,2]。目前用于 DNA 双链断裂及修复检测的方法主要有脉冲电场凝胶电泳(PSFE)、梯度电压电泳(GVGE)及单细胞微凝胶电泳(Single cell microgel electrophoresis, SCGE)技术等。其中由 Singh 等^[3]于 1988 年发展的 SCGE 技术已成为检测 DNA 损伤的一种快速、灵敏和简便的技术。

1 材料和方法

1.1 细胞系和培养

成纤维细胞系 GM637, AT5BIVA 由德国国家环境与健康研究中心放射生物实验室提供。细胞接种于 RPMI 1640 培养基(含 10% 小牛血清和 100U/mL 庆大霉素),在 37℃、5%CO₂ 培养箱中传代培养。

1.2 MIT 比色实验^[4]

取对数生长期细胞用胰酶消化,计数活细胞并调整细胞密度为 2×10^5 /mL。在有氧条件下,用 ⁶⁰Co γ 射线照射,吸收剂量分别为 0、0.5、1、2、3、4Gy(剂量率 1.0Gy/min)。将照射与未照射细胞 100 μ L 分别接种 96 孔酶标板后培养(每个剂量点平行做 6 孔)。调零孔加 100 μ L

国防科工委基金(Y5573262)资助

第一作者:徐永忠,男,1968年10月生,2000年7月毕业于苏州大学核医学院(原苏州医学院放射医学系),获博士学位。现在复旦大学遗传所从事微生物分子遗传研究工作

收稿日期:初稿 2000-12-12, 修回 2001-02-19

RPMI 1640 培养基, 5d 后于终止培养前 4h 每孔加 $10^4\mu\text{L}$ MTT ($5\text{mg}/\text{mL}$)。培养完毕, 每孔另加 $100^4\mu\text{L}$ 10%SDS-0.1mol/L HCl, 37°C 过夜。用酶标仪在 590nm 波长下检测各孔 OD 值。细胞存活率以各剂量点 OD 值与未照射细胞孔 OD 值的百分比表示。

1.3 单细胞微凝胶电泳

按 Banath 等提供的方法^[5]略加修改。

1.3.1 单个细胞悬液的制备和照射 取对数生长期细胞, 胰酶消化后用 RPMI 1640 培养基调整细胞密度为 $10^6/\text{mL}$ 。 ^{60}Co γ 射线照射, 吸收剂量分别为 0、5、10、20、40Gy (剂量率 $5.0\text{Gy}/\text{min}$), 照射时将细胞置于冰上, 照射后立即测定。当观察细胞 DNA 双链断裂修复动力学时, 将照射 20Gy 的细胞放置 37°C 继续培养 30、60 和 90min 后再测定。

1.3.2 制片 分 3 层, 第 1 层为 0.5% 正常熔点琼脂糖 (NMA), 第 2 层为含细胞的 0.7% 低熔点琼脂糖 (LMA), 第 3 层为不含细胞的 0.7% LMA。

1.3.3 细胞裂解、漂洗、电泳、染色 将制好的玻片浸入新配制的细胞裂解液 ($2\text{mol}/\text{L}$ NaCl, $30\text{mmol}/\text{L}$ EDTA, 1% 肌氨酸钠, $10\text{mmol}/\text{L}$ Tris, 用前加 1% Triton X-100, 10% 二甲基亚砜, pH 8.2) 中 4°C 裂解 2h。然后将玻片浸入漂洗液 ($2\text{mmol}/\text{L}$ EDTA, $90\text{mmol}/\text{L}$ Tris, $90\text{mmol}/\text{L}$ 硼酸, pH 8.2) 中漂洗 3 次。漂洗后电泳 (电泳缓冲液同漂洗液)、溴化乙锭 (EB) 染色。

1.3.4 观察结果 EB 染色后的标本在 Olympus BX 60 荧光显微镜下观察电泳图像, 在 IY 激发光下, DNA 图像呈红色, 可清楚地看到核 DNA 和尾 DNA (即慧星, 见图 1)。每个样本随机选择 50 个细胞, 用目镜测微尺测定核 DNA 直径和 DNA 迁移的长度并拍照。

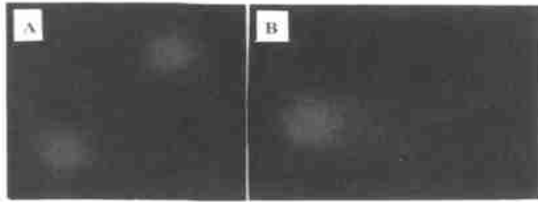


Fig. 1 SCGE images of AT⁵BIVA cell line treated with ⁶⁰Co γ rays
A. Unirradiator, B. Exposed to 20Gy

2 结果

2.1 MIT 法细胞存活分析

表 1 为 AT⁵BIVA 和 GM⁶³⁷ 两细胞系受不同剂量 ⁶⁰Co γ 射线照射后细胞存活率的变化, 拟合的细胞存活的曲线分别为 $S = 1.0206 e^{-0.2762D}$ ($R^2 = 0.9770$) 和 $S = 0.9755 e^{-0.7169D}$ ($R^2 = 0.9919$), 式中, S 为某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放射生物学参数: 平均致死剂量 (D_0) 和细胞受 2Gy 剂量照射时的存活分数 (SF2)。对 AT⁵BIVA 细胞系, 其 D_0 和 SF2 分别为 1.39Gy 和 23.26%, 而 GM⁶³⁷ 分别为 3.62Gy 和 58.74%。结果表明, AT⁵BIVA 细胞系的放射敏感性高于 GM⁶³⁷ 细胞系。

2.2 SCGE 检测的 DNA 双链断裂和修复

表 2 列出了 AT⁵BIVA 和 GM⁶³⁷ 两细胞系在受到不同剂量 ⁶⁰Co γ 射线照射后 DNA 双链的初始断裂情况 (照射后立即检测), 结果用 DNA 平均迁移长度 ($\mu\text{m}/\text{cell}$) 表示。从表 2 可看出, 两细胞系的 DNA 平均迁移长度都随着照射剂量的增加而增加, 呈显著的剂量效应关系。

此外,在各剂量点,AT⁵BIVA 细胞系的 DNA 平均迁移长度均长于 GM⁶³⁷ 细胞系。表明在相同剂量下,辐射诱发的平均每个细胞的 DNA 双链断裂数,AT⁵BIVA 细胞系多于 GM⁶³⁷。

Tab.1 Survival fraction of AT⁵BIVA and GM⁶³⁷ cell lines treated with ⁶⁰Co γ rays

Dose/Gy	Survival fraction/%	
	AT ⁵ BIVA	GM ⁶³⁷
0	100	100
0.5	64.39±5.67	89.44±4.05
1.0	46.00±5.26	73.79±4.31
2.0	23.63±3.40	62.20±4.77
3.0	13.49±3.13	48.75±3.89
4.0	4.91±1.97	31.06±3.98

Tab.2 Radiation-induced DNA double strand breaks in AT⁵BIVA and GM⁶³⁷ cell strains detected immediately after irradiation

Dose/Gy	The average length of DNA migration/ $\mu\text{m} \cdot \text{cell}^{-1}$	
	AT ⁵ BIVA	GM ⁶³⁷
0	5.2±3.8	4.4±3.7
5	11.3±5.6	8.3±5.5 ⁽¹⁾
10	26.3±6.2	20.1±6.3 ⁽²⁾
20	44.6±7.5	37.2±6.1 ⁽²⁾
40	73.4±8.5	61.2±10.3 ⁽²⁾

Compared with AT⁵BIVA cells, ⁽¹⁾ $p < 0.01$, ⁽²⁾ $p < 0.001$

表 3 总结了 AT⁵BIVA 和 GM⁶³⁷ 两细胞系在受到 20Gy 剂量照射后不同时间 DNA 平均迁移长度的变化情况。在受照射后 60min 内,这两种细胞系的 DNA 平均迁移长度都有较大幅度的下降,但 GM⁶³⁷ 细胞系下降的幅度(26.4 $\mu\text{m}/\text{cell}$ 43%) 大于 AT⁵BIVA 细胞系(18 $\mu\text{m}/\text{cell}$ 26%),表明 GM⁶³⁷ 细胞系的修复能力大于 AT⁵BIVA。在照射后 60-120min 时间段,这两种细胞系的 DNA 平均迁移长度都没什么变化,提示 DNA 双链断裂的修复达到了一个平台期。

Tab.3 DNA double strand breaks in AT⁵BIVA and GM⁶³⁷ cell strains at different time after exposure to 20Gy

Time after exposure/min	The average length of DNA migration/ $\mu\text{m} \cdot \text{cell}^{-1}$	
	AT ⁵ BIVA	GM ⁶³⁷
0	44.6±7.5	37.2±6.1
30	33.1±8.6	21.2±8.3
60	26.8±7.9	10.8±6.0
120	27.9±8.4	9.5±5.6

3 讨论

文献[6]结果表明,用 MTT 法测定的细胞存活分数与克隆形成法有较好的相关性,是一种较为快速、简便的测定细胞放射敏感性的方法。本实验所用的成纤维细胞系 AT⁵BIVA 和 GM637 分别来自毛细血管扩张-共济失调症(ataxia-telangiectasia, A-T)患者和正常个体。本研究表明,用 MTT 法测定的 AT⁵BIVA 细胞系的放射敏感性高于 GM637,与 AT 患者的高辐射敏感性相一致。

本研究的目的是了解细胞的放射敏感性与 DNA 双链断裂之间的关系。通过对有修复缺陷的 AT⁵BIVA 细胞系和正常的 GM637 细胞系的比较研究后发现,辐射诱发的 AT⁵BIVA 细胞系与 GM637 细胞系 DNA 迁移长度有显著差异,放射敏感性愈高,辐射诱发的初始 DNA 双链断裂数就愈多,这与文献[7,8]报道的结果相一致。但也有一些研究结果表明,对于不同的放射敏感性细胞,辐射诱发的初始 DNA 双链断裂数目无显著差异^[2,9]。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。

本研究还发现,AT⁵BIVA 和 GM637 两细胞系对辐射诱发的 DNA 双链断裂的修复有较大差异,放射敏感性高的 AT⁵BIVA 细胞对 DNA 双链断裂的修复能力弱。这与 Dikomey 等^[2]的研究结果相一致,他们对 9 株具有不同的修复能力和有修复缺陷的细胞系进行研究后发现,细胞的放射敏感性越高,对 DNA 双链断裂的修复能力越弱,细胞的死亡与未修复的 DNA 双链断裂呈显著相关($r^2=0.87$),而与 DNA 单链断裂没有相关性($r^2=0.27$)。这证明射线造成细胞死亡的主要原因是由于 DNA 双链断裂,而 DNA 单链断裂的影响很小。文献[10]的研究结果也表明,细胞的放射敏感性与 DNA 双链断裂的修复相关。以上结果提示,辐射诱发的 DNA 双链断裂及细胞对这一断裂的修复能力是预测细胞放射敏感性的一种有用参数。

参 考 文 献

- 1 Olive P L. Radiat Res, 1998, **150**(suppl):S42-S51
- 2 Dikomey E, Dahm-daphi J, Brammer I *et al*. Int J Radiat Biol, 1998, **73**(3):269-278
- 3 Singh N P. Int J Radiat Biol, 1994, **66**:23-28
- 4 Price P, McMillan T J. Cancer Res, 1990, **50**:1392-1396
- 5 Banath J P, Fushiki M, Olive P L. Int J Radiat Biol, 1998, **73**(6):649-660
- 6 刘 斌,司徒镇强,吴军正等.实用口腔医学杂志,1997, **13**(2):126-128
LIU B, SI-TU Z Q, WU J Z *et al*. J Pract Oral Med, 1997, **13**(2):126-128
- 7 Nunez M I, Villalobos M, Olea N *et al*. Br J Cancer, 1995, **71**:311-316
- 8 Zaffaroni N, Orland I, Villa R *et al*. Int J Radiat Biol, 1994, **66**:279-285
- 9 McKay M J, Kefford R F. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995, **31**:345-352
- 10 Whitaker S J, Ung Y C, McMillan T J. Int J Radiat Biol, 1995, **67**:7-18

USE OF SINGLE CELL MICROGEL ELECTROPHORESIS TO DETECT THE CELLULAR RADIOSENSITIVITY OF TWO FIBROBLAST STRAINS

XU Yongzhong^{1,2} ZHENG Siying¹ ZHU Wei ZHAO Jingyong¹ CAO Jianping

¹(*Department of Radiation Medicine, School of Nuclear Medicine, Soochow University, Suzhou 215007*)

²(*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433*)

ABSTRACT Single cell microgel electrophoresis(SCGE) and MTT assay were used to determine the relationships between radiation-induced initial DNA double-strand breaks(DSBs), the ability of cells to repair DSBs and cellular radiosensitivity in both AT⁵BIVA and GM⁶³⁷ cell lines. The results demonstrated that AT⁵BIVA cell line was significantly more radiosensitive than GM⁶³⁷. The initial DSBs in both AT⁵BIVA and GM⁶³⁷ lines increased with the rise of irradiation dose, and showed significant dependence on dose. At a given dose of ²⁰Gy, radiation-induced initial DSBs in AT⁵BIVA cell line was significantly higher than those in GM⁶³⁷. The ability of AT⁵BIVA cell line to repair DSBs was more powerful than that of GM⁶³⁷. The results suggested that the radiation-induced initial DSBs in cells and the ability of cells to repair DSBs both correlated with cellular radiosensitivity to a certain extent, and could be used as potential predictors of intrinsic radiosensitivity of cells.

KEYWORDS Single cell microgel electrophoresis, DNA double-strand breaks, Repair, Radiosensitivity

CLC Q691