

用流式细胞术检测 γ 射线诱发淋巴细胞 γ -H2AX 与照射剂量的关系

胡海亮^{1,2} 王治东² 张学清² 陈茂胜² 薛绍礼¹ 陈英²

¹ (安徽医科大学医学生物工程教研室 合肥 230032)

² (军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 100850)

摘要 本研究使用流式细胞术检测了外周血淋巴细胞 γ -H2AX 表达水平,探讨了该方法用于辐射生物剂量估算的可能性。采集健康人外周血,进行体外 ^{60}Co γ 射线照射,利用 γ -H2AX 特异性抗体对淋巴细胞进行间接免疫荧光标记,采用流式细胞仪分析淋巴细胞中 γ -H2AX 的几何平均荧光强度值,并计算出相对荧光强度;比较了仪器类型和参数设定对上述两项指标的影响,以上述两项指标分别建立照射后 30 min 的剂量-效应曲线并进行对比。结果显示:参数设定和仪器类型均明显影响 ^{60}Co γ 射线照射后 γ -H2AX 几何平均荧光强度,而相对荧光强度无显著影响。因此,用流式细胞仪分析 γ -H2AX 的相对荧光强度,较好地解决了实验的稳定性和重复性问题,有望成为一种估算辐射生物剂量的新方法。

关键词 流式细胞术, γ 射线, γ -H2AX, 剂量效应关系

中图分类号 R811.5

组蛋白 H2A 是染色质核小体组蛋白核心成员之一,主要成分为 H2A1 和 H2A2,另外还有 H2AZ、H2AX^[1]、macroH2A1、macroH2A2^[2]和 H2A-Bbd^[3]等 5 个亚型。其中 H2AX 在 DNA 断裂时,末端丝氨酸的 139 位残基上发生磷酸化^[4],在 DNA 双链断裂处形成 γ -H2AX 聚集点,参与 DNA 损伤修复^[5],并且募集多种参与 DNA 损伤修复的分子到 DNA 双链断裂处,促进 DNA 损伤修复。目前认为 γ -H2AX 聚集点是 DNA 损伤修复的分子标志物。对 γ -H2AX 聚集点的分析方法主要是采用荧光显微镜下分析聚集点数目,但该方法过于繁琐、不能实现高通量,在大规模人群辐照事件处理中应用有限^[6]。而流式细胞分析方法具有分析速度快、高通量等特点。已有报道发现^[7],利用流式细胞分析照射后外周血淋巴细胞中 γ -H2AX 含量变化,发现其与电离辐射具有很好的剂量依赖关系,但是该方法采用直接荧光强度作为分析指标,发现实验的重复性差,容易受到仪器参数设定等因素影响。

本研究主要利用流式细胞仪的高通量、客观可靠等特点,以人外周血淋巴细胞作为研究对象,采

用间接免疫荧光标记的方法,以相对荧光强度为分析指标,建立了外周血淋巴细胞 γ -H2AX 水平的一种新的分析方法,有望实现利用流式细胞分析方法,进行快速、高通量的辐射生物剂量估算。

1 实验材料和方法

1.1 血样收集及照射

健康男性志愿献血者 3 名,年龄在 26—28 周岁,无烟酒嗜好,无血液系统疾病史,3 个月内未曾接受放疗或化疗及未接触过有毒有害化学物质。采集肘静脉血,收集在肝素抗凝管中,进行 ^{60}Co γ 射线照射(放射源为军事医学科学院放射与辐射医学研究所 ^{60}Co 源),照射剂量为 0—8 Gy,剂量率为 1.72 Gy/min,对照组除不接受照射外,其他条件与照射组相同。

1.2 主要试剂

鼠抗人 γ -H2AX 抗体(JBW301,Upstate Biotechnology, NY, USA), FITC 标记羊抗鼠 IgG(ZE-

军队医药卫生科研基金(08G143)资助

第一作者:胡海亮,男,1986年4月出生,2009级安徽医科大学在读硕士生,研究方向:生物化学和分子生物学;共同第

一作者:王治东,男,1977年11月出生,放射医学博士,研究方向:放射损伤诊断和医学应急处理

通讯作者:薛绍礼,教授,Email:xuesl@sina.com;陈英,研究员,博士生导师,Email:yingchen29@yahoo.com.

收稿日期:初稿 2011-11-22,修回 2012-1-10

0312, SantCruz, USA), 红细胞裂解液(C3702, 碧云天), 0.2% Triton, 0.4% Triton 等均为本实验室自行配置。

1.3 样本固定、荧光标记

血液样本 0.5 mL, 加 5 mL 红细胞裂解液混匀裂解 10 min, 4℃ 条件下 1500 r/min 离心 5 min。去上清后用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 离心收集细胞沉淀。用 2% 多聚甲醛室温固定 30 min。取固定细胞, 离心去上清, 用 0.4% Trion-100 破膜 15 min, 加入鼠抗人 γ -H2AX 抗体(1:200 稀释), 在 37℃ 条件下作用 30 min (避光)。PBS 洗涤后, 去上清, 加入 FITC 标记羊抗鼠 IgG (1:200 稀释) 在 37℃ 条件下作用 30 min (避光), 离心去上清, PBS 洗涤 2 次, 细胞沉淀用 PBS 重悬, 转移至流式检测专用管中, 流式细胞仪检测。实验设定 3 个重复样品均来自同一个志愿者, 以单独加入 FITC 标记羊抗鼠 IgG 和未加任何抗体的空白管作为对照。

1.4 流式细胞仪检测

流式细胞仪检测, 调整 FSC 和 SSC, 选取淋巴细胞群, 以 FL1 通道获取 FITC 信号, 收集 1×10^4 淋巴细胞, 获取几何平均荧光强度。

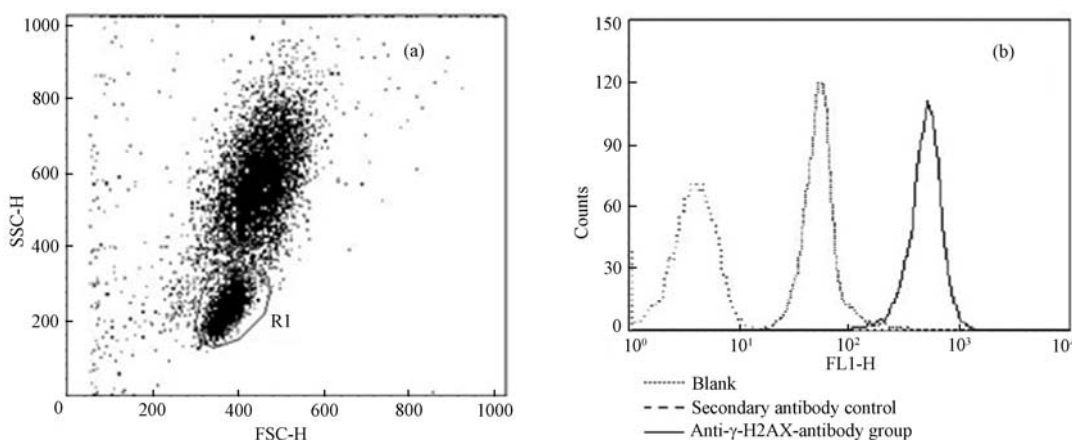


Fig.1 γ -H2AX in lymphocytes labeled with anti- γ -H2AX-antibody were analyzed by flow cytometry. (a) The gate was set to select the lymphocytes which were used for all subsequent analysis by flow cytometry on forward scatter vs. side scatter plot in the region R1. (b) Histogram of flow cytometry analysis for the lymphocyte gate (R1) for 6 Gy after 30 min incubation. From left to right represented blank, secondary antibody control and, respectively

2.2 仪器参数对淋巴细胞中 γ -H2AX几何平均荧光强度和相对荧光强度的影响

为了分析仪器参数设定对淋巴细胞中 γ -H2AX几何平均荧光强度和相对荧光强度的影响, 在血样裂解、标记后, 以未标记对照细胞作为参照, 调整仪器参数, 设定 A 和 B 两个参数(参数 A 表示 FL-1

1.5 统计学处理

实验数据以“均数 $\pm$ 标准误”表示。采用 SPSS 统计软件包(18.0)进行 t 检验分析, $p < 0.05$ 代表有显著差异, $p < 0.01$ 代表有非常显著的差异。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测外周血中的淋巴细胞荧光强度

主要分析外周血淋巴细胞中 γ -H2AX含量, 根据前向角散射光(FSC)和侧向角散射光(SSC), 通过细胞大小选取淋巴细胞群(见图 1(a)中 R1 部分), 而后对淋巴细胞进行分析, 以未加任何抗体的样品作为对照, 进行参数设定, 而后测定单独加入 FITC 标记的 IgG 细胞样品(二抗对照)与加入 γ -H2AX 特异性抗体和 FITC 标记的 IgG 细胞样品(γ -H2AX 组)的几何平均荧光强度。如图 1(b)所示, 二抗对照样品几何平均荧光强度为 55.40 ± 0.92 , γ -H2AX 标记细胞的几何平均荧光强度为 393.71 ± 11.16 , 表明 γ -H2AX 特异性抗体成功标记细胞内的 γ -H2AX 蛋白。相对荧光强度= γ -H2AX 标记细胞的几何平均荧光强度/二抗对照样品几何平均荧光强度(下同)。

的电压是 547, 参数 B 表示 FL-1 的电压是 613), 分别收集未标记对照细胞、二抗对照细胞和 γ -H2AX 标记细胞。如表 1 所示, 参数由 A 调到 B 之后, 对照组及 γ -H2AX 标记组样品相对几何平均荧光强度明显增加, 而两组的相对荧光强度对比无明显差别, 表明相对荧光强度不受仪器参数的改变影响。

Table 1 The effect of parameter setting changes on the geometric mean fluorescence intensity and the relative fluorescence intensity ($n=1$)

Indicator	Treat condition	Parameter A	Parameter B
The geometric mean fluorescence intensity	Blank	1.84	3.87
	Secondary antibody control	24.68	46.98
	Anti- γ -H2AX-antibody group	62.36	116.1
The relative fluorescence intensity		2.53	2.47

2.3 不同仪器对细胞 γ -H2AX 几何平均荧光强度和相对荧光强度的影响

在很多情况下,不同实验室采用不同的流式细胞分析仪进行分析。为了研究不同仪器对试验数据的影响,选取 0、2 和 6 Gy 照射的血样,进行相同裂解、抗体标记后,分别利用不同的流式细胞仪进行分析,结果如表 2 所示。在两种仪器上,未加抗

体对照、二抗对照和 γ -H2AX 抗体标记样品的几何平均荧光强度分别对比有显著性差异,但是 γ -H2AX 相对荧光强度两者对比无显著性差异 ($p>0.05$),上述结果表明,以 γ -H2AX 相对荧光强度为分析指标,与使用仪器类型无关,可以实现不同实验室之间的数据对比。

Table 2 The effect of different instruments type on the geometric mean fluorescence intensity and the relative fluorescence intensity ($n=3$)

Instruments type	Indicator	Treat condition	0 Gy	2 Gy	6 Gy
A	The geometric mean fluorescence intensity	Blank	0.45 $\pm$ 0.03 $\triangle\triangle$	0.42 $\pm$ 0.03 $\triangle\triangle$	0.42 $\pm$ 0.01 $\triangle\triangle$
		Secondary antibody control	6.24 $\pm$ 0.24 $\blacktriangle\blacktriangle$	6.21 $\pm$ 0.17 $\blacktriangle\blacktriangle$	6.71 $\pm$ 0.31 $\blacktriangle\blacktriangle$
		Anti- γ -H2AX-antibody group	16.13 $\pm$ 0.07 $^{##}$	25.40 $\pm$ 0.40 $^{##}$	37.90 $\pm$ 0.98 $^{##}$
	The relative fluorescence intensity		2.59 $\pm$ 0.07	4.09 $\pm$ 0.06	5.65 $\pm$ 0.15
B	The geometric mean fluorescence intensity	Blank	2.71 $\pm$ 0.45	2.52 $\pm$ 0.06	2.42 $\pm$ 0.28
		Secondary antibody control	58.99 $\pm$ 4.91	58.79 $\pm$ 5.34	58.48 $\pm$ 4.44
		Anti- γ -H2AX-antibody group	145.71 $\pm$ 9.14	217.18 $\pm$ 33.41	304.65 $\pm$ 17.22
	The relative fluorescence intensity		2.47 $\pm$ 0.08	3.69 $\pm$ 0.27	5.21 $\pm$ 0.26

Note: $\triangle\triangle$, $\blacktriangle\blacktriangle$, $^{##}$ Represent $p<0.01$, vs. Instrument type B.

2.4 剂量-效应曲线比较

根据文献[8]—[10]报道,照射后 30 min γ -H2AX 的含量最多,分析照射后淋巴细胞 γ -H2AX 的荧光强度呈剂量依赖增加,具有明显的剂量依赖关系,本研究采用相对荧光强度分析观察是否具有同样的变化。对血样进行 0、1、2、4、6 和 8 Gy 照射,照射后 30 min 分析淋巴细胞中 γ -H2AX 几何平均荧光

强度和相对荧光强度,并分别拟合剂量效应曲线及方程,见图 2。以淋巴细胞中 γ -H2AX 几何平均荧光强度为分析指标拟合方程为: $Y=38.91D+35.3$,相关系数为 0.953 (Y 代表几何平均荧光强度, D 代表剂量);以淋巴细胞中 γ -H2AX 相对荧光强度为分析指标拟合方程为: $Y=0.636D+3.126$,相关系数为 0.969 (Y 代表相对荧光强度, D 代表剂量)。两者相关系数接近。

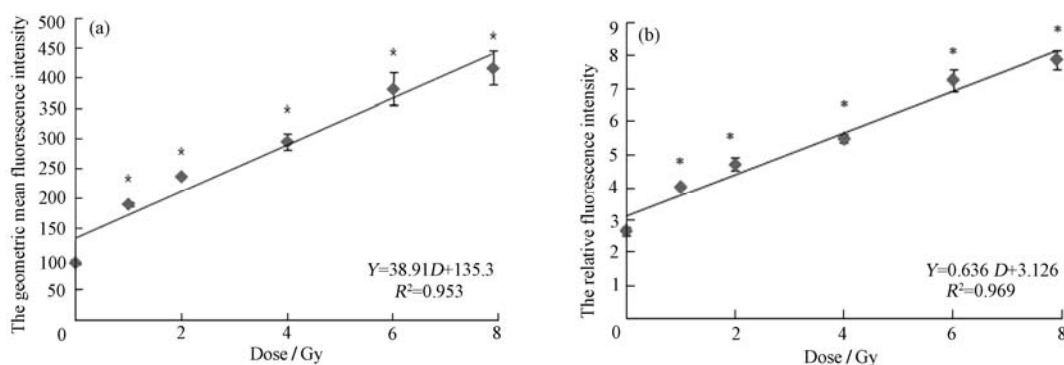


Fig.2 Dose-response curves of the geometric mean fluorescence intensity and the relative fluorescence intensity. * Represent $p<0.01$, vs. Nonirradiation ($n=3$)

(a) Dose-response curve of the geometric mean fluorescence intensity; (b) Dose-response curve of the relative fluorescence intensity

3 讨论

DNA 作为电离辐射的主要靶分子,细胞受到电离辐射后,发生 DNA 双链断裂,在断裂处形成 γ -H2AX 聚集点,根据聚集点的数目可以判断 DNA 损伤的程度。所以, γ -H2AX 在 DNA 损伤处形成的聚集点可看作是 DNA 损伤的分子标志。研究表明,电离辐射后,淋巴细胞中 γ -H2AX 聚集点的数目与照射剂量具有很好的剂量依赖关系,具有发展成为辐射生物剂量计的可能^[11]。然而这种方法主要是利用荧光显微镜镜下进行计数,存在操作复杂、费力耗时、低通量等缺点。

近年来,利用流式细胞术分析淋巴细胞内 γ -H2AX 水平,具有检测操作简便、快速、高通量等特点;同时有报道^[7,12-14]通过流式细胞术发现 γ -H2AX 荧光强度与照射剂量有关。其中, Andrievski 等^[7]使用直接免疫荧光标记,在数据分析处理时采用 γ -H2AX 的几何平均荧光强度作为分析指标,发现 γ -H2AX 与照射剂量有很好的依赖关系。但是这个指标也导致不同实验室之间数据差异较大,同一实验室在不同时间检测时,可能由于仪器参数设定差异,同样导致数据差异较大,存在试验重复性差等问题。

本研究采用间接免疫荧光标记方法进行分析,结果表明,以相对荧光强度为分析指标,试验结果与仪器参数设定的改变无显著性差异,与使用不同的流式细胞仪检测无显著性差异,以几何平均荧光强度和相对荧光强度为分析指标建立的剂量-效应曲线具有相似的相关系数和曲线斜率,表明两者具有相同的变化规律,很好地解决了实验重复性差的问题,为受照后早期进行生物剂量估算及大批量人群健康监测提供了一种快速稳定的新方法,可以在不同实验室间相互协助、共同筛查。本研究为进一

步深入研究淋巴细胞 γ -H2AX 用于辐射生物剂量估算提供了一种新的方法。

参考文献

- West M H, Bonner W M. Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry*, 1980, **19** (14): 3238-3245
- Pehrson J R, Fuji R N. Evolutionary conservation of histone macro H2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**(12): 2837-2842
- Chadwick B, Willard H F. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol*, 2001, **152**(2): 375-384
- Rogakou E P, Pilchet D R, Orr A H, *et al.* DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 1998, **273**(10): 5858-5868
- Pilch D R, Redon C, Sedelnikova O A, *et al.* Two-dimensional gel analysis of histones and other H2AX-related methods. *Methods Enzymol*, 2004, **375**(5): 76-88
- Reitsemma T J, Banath J P, MacPhail S H, *et al.* Hypertonic saline enhances expression of phosphorylated histone H2AX after irradiation. *Radiat Res*, 2004, **161**(4): 402-408
- Andrievski A, Wilkins R C. The response of γ -H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures. *Int J Radiat Biol*, 2009, **85**(4): 369-376
- Roch-Lefevre S, Mandina T, Voisin P, *et al.* Quantification of γ -H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure. *Radiat Res*, 2010, **174**(2): 185-194
- Lobrich M, Rief N, Kuhne M, *et al.* In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed

- tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(25): 8984-8989
- 10 Leatherbarrow E L, Harper J V, Cucinotta F A, *et al.* Induction and quantification of γ -H2AX foci following low and high LET-irradiation. *Int J Radiat Biol*, 2006, **82**(2): 111-118
- 11 Fernandez-Capetillo, Lee A O, Nussenzweig M, *et al.* H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*, 2004, **3**(8-9): 959-967
- 12 Olive P L. Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol*, 2004, **75**(14): 355-373
- 13 MacPhail S H, Banath J P, Yu T Y, *et al.* Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol*, 2003, **79**(5): 351-358
- 14 Banath J P, Macphail S H, Olive P L. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res*, 2004, **64**(19): 7144-7149

Relationship between γ -H2AX in lymphocytes and radiation dose of γ -rays by flow cytometry assay

HU Hailiang^{1,2} WANG Zhidong² ZHANG Xueqing²
CHEN Maosheng² XUE Shaoli¹ CHEN Ying²

¹ (Department of Biotechnology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

² (Department of Radiation Toxicology and Oncology, Beijing Institute of Radiation Medicine, 27 Taiping Road, Haidian District, Beijing 100850, China)

ABSTRACT To search for the opportunity for assessing doses as a biological dosimeter, an approach was established for detecting the expression levels of γ -H2AX in peripheral blood lymphocytes by flow cytometry. The peripheral blood from health donors irradiated in vitro by ^{60}Co γ -rays. The geometric mean fluorescence intensity values of γ -H2AX in lymphocytes labeled with anti- γ -H2AX-antibody by using indirect immunofluorescence were analyzed by flow cytometry, and the relative fluorescence intensity was calculated. The geometric mean fluorescence intensity values and the relative fluorescence intensity of γ -H2AX in intracellular effect were compared between the different instruments type and parameters setting. Two dose-response curves were established and compared 30 min post-irradiated when the geometric mean fluorescence intensity and the relative fluorescence intensity of γ -H2AX in lymphocytes were used as the indicators. The geometric mean fluorescence intensity was obviously affected by different instruments type and parameters setting after irradiation with various doses, but the relative fluorescence intensity of γ -H2AX in lymphocytes did not significantly correlate with the different instruments type and parameters setting after irradiation with various doses. The relative fluorescence intensity as the indicator analyzed by flow cytometry might improve the stability and repeatability, so this new approach would be a potential biological dosimeter.

KEYWORDS Flow cytometry, γ -rays, γ -H2AX, Dose-effect relationship

CLC R811.5