

钴-60 伽玛射线诱导淋巴细胞 γ H2AX 表达的研究

潘艳 高刚 刘澜涛 阮健磊 刘建香 苏旭

(辐射防护与核应急中国疾病预防控制中心重点实验室)

中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所 北京 100088)

摘要 采用流式细胞术检测 ^{60}Co γ -射线照射后 γ H2AX 表达的量效和时程关系, 同时探讨紫外线联合 ^{60}Co γ -射线照射后 γ H2AX 的表达情况。结果表明, 不同剂量 ^{60}Co γ -射线照射后 γ H2AX 表达量与照射剂量之间呈现明显的剂量效应关系。4 Gy ^{60}Co γ -射线照射后, γ H2AX 的表达在 1 h 达到峰值, 随后逐渐减少。与假照组相比, 单纯紫外线照射组 γ H2AX 表达增加, 一直稳定维持约 6 h 左右, 随后开始减少。紫外线联合 ^{60}Co γ -射线照射组与单纯 ^{60}Co γ -射线照射比较, γ H2AX 的表达无显著性差异。结果提示采用流式细胞术检测 γ H2AX 的表达估算受照剂量具有可行性, 该法有望成为估算辐射剂量的新方法。

关键词 ^{60}Co γ -射线, γ H2AX, 紫外线, DNA 损伤, 生物剂量计

中图分类号 R811.5, Q691.5

现代社会人们的生活方式已越来越多的涉及到辐射相关领域, 辐射相关应用在造福人类同时, 防护不当的情况下也会对人类造成伤害, 极端情况甚至偶有核与辐射事件的发生。事件发生后, 对可疑人群排查及暴露人群快速、准确的辐射生物剂量评估是有效应对的关键之一^[1]。常用的染色体畸变分析因实验周期长、技术要求高等缺点, 需寻求快速、高通量的分析方法来进行有益补充^[2]。近年发现, DNA 双链断裂(DSBs)均伴有 H2AX 的磷酸化和聚集, 形成荧光下可分辨的焦点, 且与 DSBs 数量呈对应关系^[3-4]。我们前期以及众多国内外研究均表明 γ H2AX 与电离辐射吸收剂量有显著的量效和时程关系, 有望成为新型的辐射生物剂量计^[3,5-8]。前期对 γ H2AX 的研究多采用免疫荧光法, 该法虽然能在荧光显微镜下直观、准确的观察到 H2AX 所形成的焦点, 但所需时间长, 每个样本均需计数焦点数, 不适合在突发情况下快速高通量筛查的要求。因此, 本实验室用 ^{60}Co γ 射线照射人外周血淋巴细胞后, 采用流式细胞术的方法, 建立 γ H2AX 表达与 ^{60}Co γ 射线的量效关系和时程关系曲线, 同时探讨紫外线对 γ H2AX 表达的影响, 以期通过该方法进行快速准确的筛查工作。

1 材料与方法

1.1 血样收集

健康志愿献血者, 年龄在 25-35 周岁, 身体健康, 无烟酒嗜好, 无慢性疾病、无血液系统疾病史, 3 个月内未曾接受放射或化学治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。采血前签署知情同意书。试验方案经中国疾控中心辐射安全所伦理委员会批准。

1.2 照射条件

利用中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所 IAEA/WHO 二级标准实验室 ^{60}Co γ -射线照射。剂量率 $0.27 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$, 源物距 0.85 m, 照射剂量 0-6 Gy, 假照组除不接受照射外, 其他条件与照射组相同。紫外线照射采用紫外线消毒灯管, 短波功率 $224.5 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$, 中长波功率 $627 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$, 源物距 0.6 m, 照射时间为 2 min。紫外线联合 ^{60}Co γ 射线为先紫外线照射 2 min 后立即采用 4 Gy ^{60}Co γ 射线照射。

基金资助: 卫生行业科研专项(201002009)、中国疾病预防控制中心青年科研基金课题(2012A203)资助

第一作者: 潘艳, 女, 1980 年 8 月出生, 2007 年获得吉林大学放射医学博士学位, 现为中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所副研究员, 主要从事电离辐射效应相关的研究

通讯作者: 苏旭, 博士, 研究员, E-mail: suxu@nirp.cn

收稿日期: 初稿 2013-10-14, 修回 2013-11-14

1.3 血样培养

照射后样本立即置于冰盒中暂存。回实验室后即将样本置于 37 ℃、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养, 根据所需时间取出进行实验。

1.4 主要试剂和仪器

FITC 标记的鼠抗人 Anti-phospho-histone H2AX(Ser139)单克隆抗体和二抗同型对照 Mouse IgG₁ negative control monoclonal antibody 购自美国 Millipore 公司, FACS™ Lysing Solution 购自美国 BD 公司, 荧光显微镜为德国 Zeiss 公司产品, 流式细胞仪为美国 BD 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

1.5 实验分组

剂量分别为 0、0.5、1、2、4 和 6 Gy; 4 Gy ⁶⁰Co γ-射线照射后收获时间分别为 0、1、2、4、6、12 和 24 h; 紫外线联合 ⁶⁰Co γ-射线照射分为: 假照组、4 Gy ⁶⁰Co γ-射线照射组、UV 照射组、UV+4 Gy ⁶⁰Co γ-射线照射组。

1.6 样本固定与荧光标记

每个样本采用 0.2 mL 肘静脉血, 加 2 mL FACS™ Lysing Solution 裂解 10 min, 4 ℃条件下 500 g 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。用冰甲醇固定 30 min。离心去上清, 取固定细胞, PBS 洗涤 1 次, 用 1% BSA + 0.5% Tween-20 + 0.1% Trion-100 封闭破膜 20 min, 离心, 去上清, 加入 FITC 标记的鼠抗人 γH2AX 抗体, 在 37 ℃条件下避光孵育 30 min。PBS 洗涤后, 去上清, 重复一次, 细胞沉淀用 400 μL PBS 重悬, 转移至流式检测专用管中, 流式细胞仪检测。每组实验所需样品均来自同一志愿者, 实验设定 3 个重复样, 以同型对照管作为对照。

1.7 流式细胞术检测蛋白表达

采用 FACS Aria II 流式细胞仪检测, Diva 软件收集细胞, 分析处理数据, 记录阳性细胞百分率。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件包进行独立样本 *t* 检验分析, *p* < 0.05 代表具有显著性差异, *p* < 0.01 代表具有非常显著性差异。

2 结果

2.1 流式细胞术检测 γH2AX 的表达

调节前向角散射光(FSC)和侧向角散射光(SSC)数值, 观察细胞分群情况。当 FSC 为 150, SSC 为 345 时, 细胞分群良好。根据细胞大小选取淋巴细胞群 P1 门。通过对圈定的淋巴细胞群进行分析, 以 488 nm 激发光获取 FITC 信号, 以同型对照为参考, FITC 阴性峰位置位于 10² 处, 调节 FITC 电压, 设定为 480。以同型对照阳性细胞率在 1% 以内, 假照组细胞阳性细胞率在 5% 以内, 设定 P2 门。每个样品收集 1×10⁴ 细胞, 获取 FITC 表达的阳性细胞率。

2.2 4 Gy ⁶⁰Co γ-射线照射后 γH2AX 表达的时间效应关系

4 Gy ⁶⁰Co γ-射线照射后, 分别于培养箱培养 0、1、2、4、6、12 和 24 h 后处理血样, 流式细胞术检测淋巴细胞中 γH2AX 表达水平在 1 h 达到最高峰, 表达量为 82.4%, 随着时间的推移表达量开始下降, 到照射后 24 h γH2AX 表达量为 11.2%, 与 0 h 组比较没有显著性差异, 见图 1。

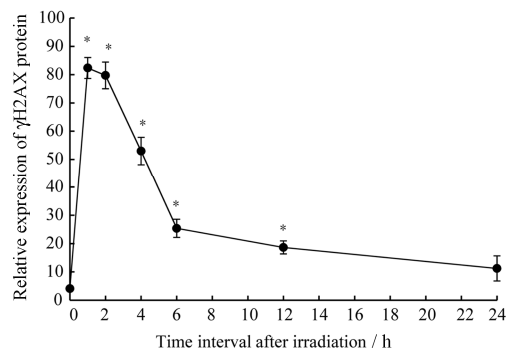


图1 4 Gy ⁶⁰Co γ-射线照射后淋巴细胞中 γH2AX 表达的时间效应曲线

Fig.1 Time-effect curve of γH2AX protein expression in peripheral blood lymphocyte after irradiation with 4 Gy ⁶⁰Co γ-rays, **p* < 0.01 vs. 0 h

2.3 不同剂量 ⁶⁰Co γ-射线照射 1 h 后 γH2AX 表达的剂量效应关系

不同剂量 ⁶⁰Co γ-射线照射后, 人外周血淋巴细胞中 γH2AX 表达水平随着吸收剂量的增加而增加, 两者间存在着良好的二项式关系, 具体见图 2。

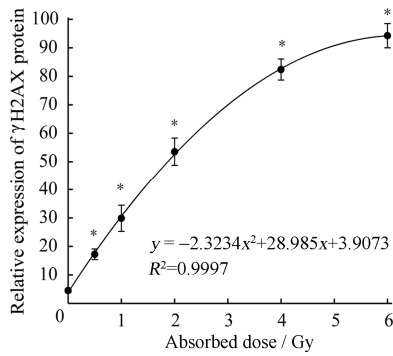


图2 0-6 Gy ^{60}Co γ -射线照射后 1 h 淋巴细胞中 γ H2AX 表达的剂量效应关系

Fig.2 Dose-effect curve of γ H2AX protein expression in peripheral blood lymphocyte after irradiation with 0-6 Gy ^{60}Co γ -rays, * $p < 0.01$ vs. 0 Gy

2.4 紫外线联合 ^{60}Co γ -射线照射后, γ H2AX 的表达情况

UV 组 γ H2AX 表达增加, 直至 6 h 后达到峰值表达量为 17.1%, 随后开始下降, 到 12 h 后表达量为 9.4%。UV+4 Gy ^{60}Co γ -射线照射组与单纯 4 Gy ^{60}Co γ -射线照射比较, γ H2AX 的表达在各个时间点均没有显著性差异。见图 3。

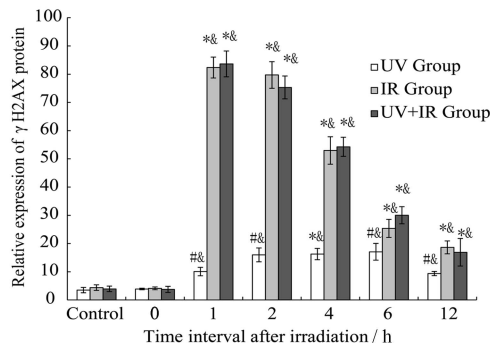


图3 紫外线联合 ^{60}Co γ -射线照射后淋巴细胞中 γ H2AX 的表达情况

Fig.3 γ H2AX protein expression in peripheral blood lymphocyte induced by UV irradiation and ^{60}Co γ -rays # $p < 0.05$, * $p < 0.01$ vs. 0 h respective group, & $p < 0.01$ vs. respective control group

3 讨论

国内外众多研究者对 γ H2AX 的表达与电离辐射的关系进行了深入探讨。Rothkamm 等^[9]人采用免疫荧光法进行四个实验室间电离辐射后 γ H2AX 表达情况的比对, 结果表明 γ H2AX 的表达情况在各实验室间具有可重复性, 能够准确、恒定的反映所接受电离辐射的情况。胡海亮等^[10]细致深入地探讨了采用流式细胞术检测淋巴细胞 γ H2AX 表达的稳定性。Lisowska^[11]等探讨了温度对接受电离辐射后

γ H2AX 表达的影响, 结果表明 γ H2AX 所形成的焦点不受所处环境温度的影响。上述各项研究均表明, γ H2AX 对电离辐射的响应具有稳定性和可重复性, 且受环境因素影响较小。

本研究通过探讨采用流式细胞术检测 γ H2AX 的表达, 对 γ H2AX 的阳性表达率进行定量, 并探讨其与电离辐射剂量以及照射后时间的关系。在本研究中, 人外周血淋巴细胞 γ H2AX 的表达与吸收剂量之间有良好的二项式关系, $R^2=0.9997$, 该结果提示我们可以通过流式细胞术检测 γ H2AX 表达的阳性率来估算受照剂量。但同时 γ H2AX 的表达也存在时效性, 其表达量在接受照射 1 h 后即开始衰减, 这也成为能否通过检测 γ H2AX 表达估算受照剂量的一个局限。考虑突发事件的实际情况, 我们下一步还需建立接受不同剂量 ^{60}Co γ -射线后不同时间点 γ H2AX 表达的剂量效应曲线, 进而系统地完善 γ H2AX 表达与受照剂量和受照后时间的相互关系, 为其能否作为辐射事故中的生物剂量计提供依据。

γ H2AX 对电离辐射非常敏感, 但对非电离辐射是否也如此敏感? 本研究采用消毒紫外灯照射人外周血, 采用流式细胞术检测 γ H2AX 的表达情况。结果表明接受紫外线照射后, γ H2AX 的表达高峰仅为假照组的 4 倍, 而 4 Gy ^{60}Co γ -射线组和 UV+4 Gy ^{60}Co γ -射线组 γ H2AX 的表达为均假照组的 20 倍, 且各时间点两组之间没有显著性差异。说明, γ H2AX 的表达对电离辐射是相对敏感和特异的。

根据 γ H2AX 对电离辐射反应的迅速、敏感、稳定和相关性, γ H2AX 已经被众多研究者预测为检测 DNA 双链断裂的金指标。采用流式细胞术快速检测其表达情况, 依赖其快速、简便、准确的优点, 有望成为估算受照人员接受剂量的新方法。

参考文献

- Gougelet R M, Rea M E, Nicolalde R J, et al. The view from the trenches: emergency medical response plans and the need for EPR screening [J]. Health Physics, 2010, 98(2): 118-127.
- International Atomic Energy Agency. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Technical Reports Series No.405. Vienna, IAEA, 2001.
- Rothkamm K, Horn S. Gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure [J]. Annali dell'Istituto

- Superiore di Sanità, 2009, **45**(3): 265-271.
- 4 Redon C E, Dickey J S, Bonner W M, *et al.* γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin [J]. *Advances in Space Research*, 2009, **43**(8): 1171-1178.
 - 5 田梅, 潘艳, 刘建香, 等. γ 射线诱导人淋巴细胞损伤及磷酸化组蛋白 H2AX 和 ATM 表达 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2011, **31**(2): 126-129.
 - TIAN Mei, PAN Yan, LIU Jianxiang, *et al.* Human Lymphocyte damage and phosphorylation of H2AX and ATM induced by γ -rays [J]. *Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection*. 2011, **31**(2): 126-129.
 - 6 潘艳, 田梅, 刘建香, 等. ^{60}Co γ 射线诱导 EJ 细胞 DNA 损伤及 γ H2AX 表达的研究 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2009, **29**(6): 586-589.
 - PAN Yan, TIAN Mei, LIU Jianxiang, *et al.* DNA damage and γ H2AX expression in EJ cells induced by ^{60}Co gamma-rays [J]. *Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection*, 2009, **29**(6): 586-589.
 - 7 Horn S, Barnard S, Rothkamm K. Gamma-H2AX-based dose estimation for whole and partial body radiation exposure [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(9): e25113.
 - 8 Roch-Lefevre S, Mandina T, Voisin P, *et al.* Quantification of gamma-H2AX foci in human lymphocytes: a method for biological dosimetry after ionizing radiation exposure [J]. *Radiation Research*, 2010, **174**(2): 185-194.
 - 9 Rothkamm K, Horn S, Scherthan H, *et al.* Laboratory intercomparison on the γ -H2AX Foci Assay [J]. *Radiation Research*, 2013, **180**(2):149-155.
 - 10 胡海亮, 王治东, 张学清, 等. 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 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2012, **30**(4):120-124.
 - HU Hailiang, WANG Zhidong, ZHANG Xueqing, *et al.* Relationship between γ -H2AX in lymphocytes and radiation dose of γ -rays by flow cytometry assay [J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2012, **30**(4):120-124.
 - 11 Lisowska H, Wegierek-Ciuk A, Banasik-Nowak A, *et al.* The dose-response relationship for dicentric chromosomes and γ -H2AX foci in human peripheral blood lymphocytes: influence of temperature during exposure and intra- and inter-individual variability of donors [J]. *International Journal of Radiation Biology*, 2013, **89**(3): 191-199.

Study on γ H2AX expression of human lymphocytes induced by ^{60}Co gamma-rays

PAN Yan GAO Gang LIU Lantao RUAN Jianlei LIU Jianxiang SU Xu

(Key Laboratory of Radiological Protection and Nuclear Emergency, China CDC, National Institute for Radiological Protection, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100088, China)

ABSTRACT Flow cytometry analysis method was used to detect the changes of γ H2AX protein expression in human peripheral blood lymphocytes. In the dose-effect study, peripheral blood was irradiated by ^{60}Co γ -rays with the dose of 0-6 Gy and cultivated for 1 h. Peripheral blood were cultivated for 0-24 h after 4 Gy ^{60}Co γ -rays irradiation for the time-effect study. Then, the peripheral blood was divided into four treatment groups, i.e. UV irradiation, ^{60}Co γ -rays irradiation, UV plus ^{60}Co γ -rays irradiation and control group to detect the changes of protein expression in different time. The results showed that the γ H2AX protein expression was in a dose-dependent form. The expression of γ H2AX peaked at 1 h after 4 Gy irradiation and began to decrease quickly. The expression of γ H2AX in UV irradiation group increased compared with that of the sham-irradiation control group, and the expression of γ H2AX peaked at 6 h. While compared with that of the ^{60}Co γ -rays group, the γ H2AX expression of UV combined ^{60}Co γ -rays group was unchanged. The results reveal that the detection of γ H2AX protein expression changes in peripheral blood lymphocyte by flow cytometry analysis is reasonable and may turns be a new way for biological dosimeter.

KEYWORDS ^{60}Co γ -rays, γ H2AX, UV, DNA damage, Biodosimeter

CLC R811.5, Q691.5