

● 简报 ●

单细胞凝胶电泳对辐射所致肿瘤细胞 DNA 损伤的研究

刘芬菊 汪 涛 洪承皎 许玉杰 苏燎原 刘永彪

(苏州大学核医学院 苏州 215007)

摘要 为探测肿瘤细胞的辐射敏感性,应用单细胞凝胶电泳技术和 ^3H -TdR 掺入方法,对 γ 射线照射的 K562、SMMC-772 和 HOS8603 细胞株单细胞 DNA 链断裂的辐射效应进行了研究,实验表明上述 3 种肿瘤细胞在受到 1—20Gy ^{60}Co γ 射线照射后细胞迁移率增高,迁移距离延长,并且 DNA 合成受到抑制, ^3H -TdR 掺入下降。

关键词 细胞凝胶电泳, DNA 损伤, 肝癌细胞(SMMC772), 骨肉瘤细胞(HOS8603), 人红白血病细胞(K562)

中图分类号 R811.5

电离辐射对核酸代谢的影响一直是放射生物工作者研究的热门课题,DNA 损伤与修复的研究逐步深入,受到人们的关注。DNA 是电离辐射作用后引起细胞损伤的主要靶物质,其损伤有多种类型,诸如碱基破坏、单链断裂、双链断裂、氢键断裂等。生物学家采用细胞存活, ^3H -TdR 掺入,ESR,基因分析等方法进行研究探讨。我们采用碱性单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis assay,SCGE)法和 ^3H -TdR 掺入法,对比研究辐射对几种肿瘤细胞 DNA 损伤的效应,并且在实验中联合应用中药提取物榄香烯,观察对几株肿瘤细胞的杀伤效应。

1 材料和方法

1.1 细胞

人红白血病细胞(K562)、肝癌细胞(SMMC-772)、骨肉瘤细胞(HOS8603)。

1.2 细胞培养和中药榄香烯的配制

取上述传代的肿瘤细胞培养于 RPMI 1640 培养液中,培养液含 12%小牛血清,榄香烯^[1](大连金港制药公司,批号 9506071,100g/20L),用 1640 液配制,按 1:100 稀释,取 200 μL (含 5 μg)加入 2mL 培养物中。

1.3 照射条件

细胞在室温下接受 ^{60}Co γ 射线照射,照射焦距 3m,剂量分别为 0、1、5、10、15、20Gy,剂量率为 1Gy/min。

1.4 ^3H -TdR 掺入

肿瘤细胞在 RPMI 1640 培养液中培养 24h 后,加入 ^3H -TdR 20 μL ($7.4 \times 10^4\text{Bq}$),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养至 40h,收获培养物,用低本底液体闪烁计数器(Wallac 1415 瑞典)进行测量。

1.5 单细胞凝胶电泳

国家自然科学基金(39900039)资助

第一作者:刘芬菊,女,1954 年 12 月出生,1978 年毕业于苏州医学院,放射医学专业,副教授

收稿日期:初稿 2001-05-15, 修回 2001-06-20

1.5.1 凝胶样品的制备 在清洁的磨砂载玻片上,第 1 层铺 100μL 0.5%低熔点凝胶,加盖玻片冷凝,第 2 层用低熔点凝胶,先拿开盖玻片,取 45℃的 0.5%熔点琼脂糖 25μL,加入 25μL 细胞,混合,铺在第 1 层凝胶板上;第 3 层加 0.5%低熔点凝胶 75μL。

1.5.2 细胞裂解 将铺有凝胶的薄片在碱性裂解液中处理 2h。使包埋在凝胶中的细胞核膜裂解。裂解液的组成:2.5 mmol/L NaCl,100mol/L Na₂-EDTA,10mmol/L Tris-cl,1%肌氨酸钠,临用前加 1% Triton X-100,10%二甲亚砜,pH=10.0。

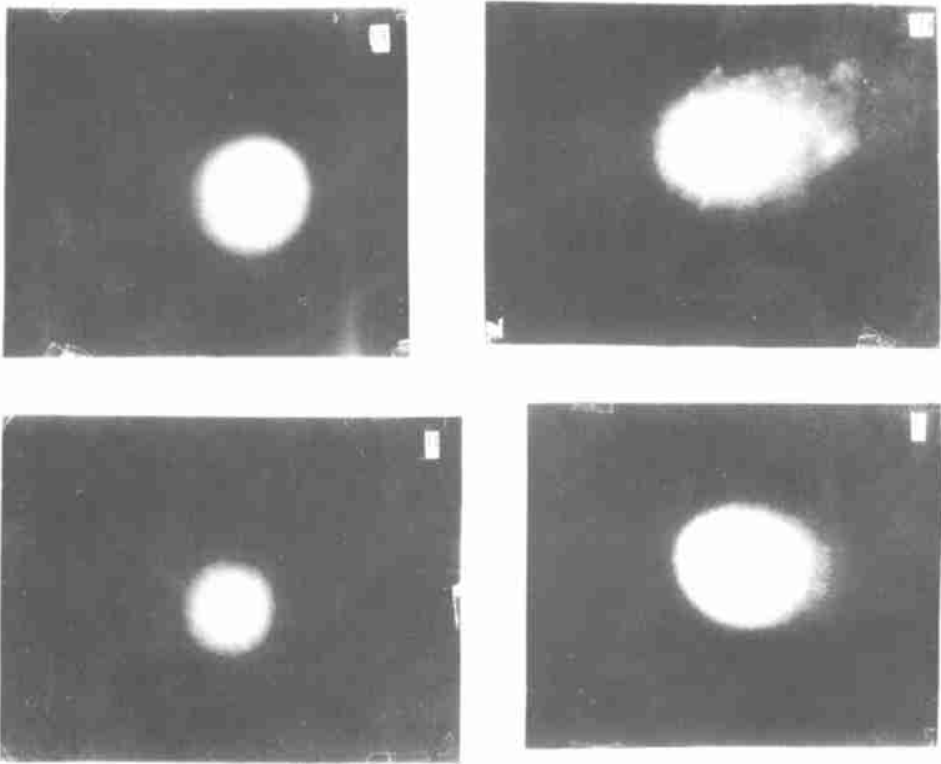
1.5.3 细胞电泳 将制备好的凝胶玻片用 PY-II 型电泳仪,置于水平电泳槽中,加入新配制的电泳液浮盖凝胶片,电泳 30 min,电压 25 V,电流 30mA,随后玻片在 Tris-cl 缓冲液中(pH = 7.5)中和。

1.5.4 染色和观察 电泳完毕后,玻片洗涤 3 次,在无水乙醇中处理 1h,加入 100μL 溴乙锭 (2mg/L)染色 15min,加盖片,在荧光显微镜下计数慧星细胞的发生率。用 OLYMPUS BX60 型 荧光显微镜(日本)观察及计算阳性率及核迁移距离,并拍片。

2 结果

2.1 单细胞凝胶电泳图象分析

细胞遭受 γ 线照射,致使细胞结构发生改变,DNA 产生链断裂,结果表明,照射剂量愈大,DNA 结构破坏愈严重,在电场的作用下,断裂的 DNA 脱离原来的部位,离开细胞核,向阳极迁移,形成拖尾(即慧星图象),DNA 破坏愈严重迁移距离愈远,慧星的尾巴愈长(见图 1)。



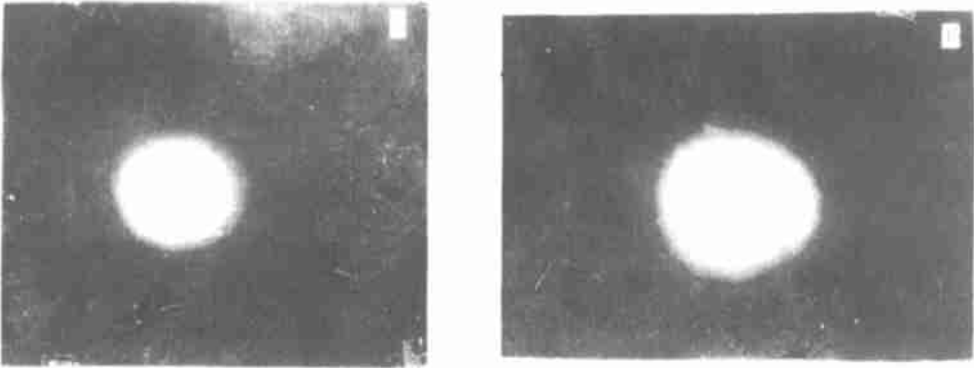


Fig.1 Comet images of tumor cell exposed to γ rays
(A) SMMC-772, Control (B) K562, Control (C) HOS8603, Control (D) SMMC-772, exposed to 10Gy
(E) K562, exposed to 10Gy (F) HOS8603, exposed to 20Gy

2.2 细胞迁移的剂量效应关系

在荧光显微镜下,用目镜测验微尺测量经照射的细胞迁移距离的变化,每种情况观察细胞不少于 50 个,取其平均值。结果发现,受照射的各组细胞迁移率均延长,随照射剂量增加,3 株瘤细胞 SMMC-772、K562、HOS8603 的迁移距离均增加,剂量效应直线回归方程分别为 $Y_{\text{SMMC-772}}=8.44+2.9D$, $Y_{\text{K562}}=8.26+3.306D$, $Y_{\text{HOS8603}}=11.43+0.85D$, 相关系数 r 分别为 0.99、0.99、0.98, 证明照射剂量与细胞迁移距离呈正直线相关(见图 2)。

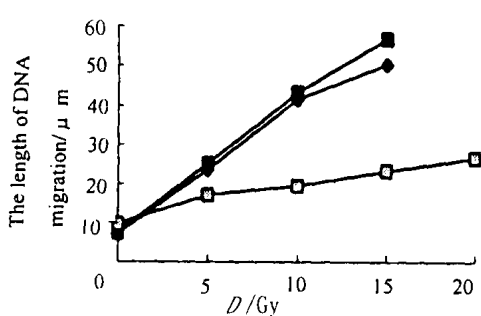


Fig.2 Changes in DNA migration of tumor cells after irradiation
◆ SMMC772, ■ K562, □ HOS8603

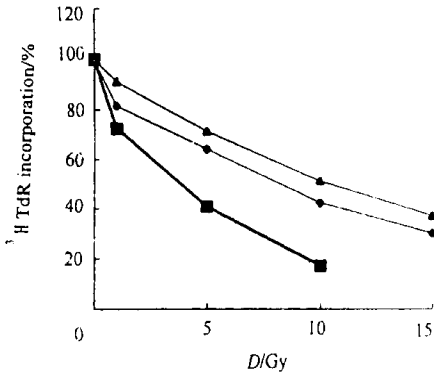


Fig.3 Effects of radiation on ^3H -TdR incorporation in SMMC772, K562, HOS8603 tumor cells
○ SMMC772, ■ K562, △ HOS8603

2.3 几种肿瘤细胞的剂量效应曲线比较

图 3 表明,3 种细胞受不同剂量照射后, ^3H -TdR 掺入率随剂量的增加而下降,同一照射点相比,K562 较其它两种为低,经统计学处理差别非常显著($p<0.01$)。

表 1 列出了 3 种肿瘤细胞受到同样剂量照射后,加入榄香稀测得 ^3H -TdR 掺入的百分数变化,经过配对组 t 检验,加药组放射性计数(CPM)明显低于单独照射组,SMMC772、K562、HOS8603 的 p 值均为($p<0.01$)。

γ 线照射后上述 3 种肿瘤细胞 DNA 遭受严重损伤,结构破坏导致迁移距离增加,代谢功能破坏导致 DNA 合成抑制, ^3H -TdR 掺入降低,以 K562 最为明显,在照射后的培养物中同时给

予中药榄香烯,对肿瘤细胞发挥照射、药物双重杀伤作用,产生明显的协同效果。

Tab.1 The effects of elemene on γ rays irradiation-induced DNA damage in tumor cells ($\bar{x} \pm s$)

<i>D</i> /Gy	Percentage of ^3H -TdR incorporation					
	SMMC722		K562		HOS8603	
	<i>R</i> ⁽¹⁾	<i>R</i> +Drug ⁽²⁾	<i>R</i> ⁽¹⁾	<i>R</i> +Drug ⁽²⁾	<i>R</i> ⁽¹⁾	<i>R</i> +Drug ⁽²⁾
0	100	90.44±9.31	100	84.63±8.49	100	89.41±10.79
1	84.28±6.63	91.13±5.42	72.91±9.58 *	85.94±5.53	83.81±14.56	73.39±10.68
5	61.76±5.68 *	76.34±1.71 *	40.86±2.06 *	75.48±2.84 *	68.99±15.78 *	73.22±11.21 *
10	40.42±2.64 *	83.85±8.62	17.57±1.68 *	70.33±15.82 *	49.46±8.45 *	68.96±13.68 *
15	25.92±1.28 *	85.05±10.90			38.91±11.81 *	82.92±3.22 *

⁽¹⁾Compared with 0 dose, ⁽²⁾Compared with radiation alone * *p* < 0.01

3 讨论

单细胞电泳试验发现肿瘤细胞受不同剂量照射后,DNA 受到损伤,发生链断裂,在电场的作用下产生细胞迁移及慧星发生率增加,这些现象可在荧光显微镜下观察,并计算迁移距离的长短,分析损伤的程度。众所周知,单细胞凝胶电泳是适用范围广,操作简便的一种方法,对于各类细胞 DNA 遭受各种因素(包括电离辐射)损伤时,均可以应用单细胞电泳技术进行测定,而且细胞用量少,同时能够对单一细胞的 DNA 损伤进行检测^[2,3],从而改变了对细胞群体 DNA 检测的依赖性。

实验中发现,随着照射剂量增加,细胞迁移距离不断延长,其慧星长度与照射剂量密切相关,相关系数 *r*=0.99,肝癌细胞,骨肉瘤细胞照射 1—20Gy 细胞迁移的长度随剂量增加而渐渐延长,符合线性回归方程,可以进行剂量估算^[4,5]。以往文献中有研究者用 SCGE 方法检测 0.5Gy 照射发现 DNA 有显著性变化^[6]。因此我们采用了该方法,值得注意的是,我们还发现未受到照射的肿瘤细胞也有核迁移现象,这就是自然损伤的发生率约占 3% 左右。

实验中采用 K562、SMMC-772、HOS8603 三株肿瘤细胞,发现照射后慧星尾部的长度随照射剂量增大而延长,表明肿瘤细胞受到大剂量照射后,DNA 受到损伤,损伤程度随照射剂量的加大而逐渐严重,但是各种细胞株对辐射的敏感性有明显差异,K562 及 SMMC-772 细胞受照 10Gy 时,迁移长度分别为 43.0 μm 及 41.4 μm ,而骨肉瘤细胞受到 20Gy 照射后,其核的迁移长度仅为 27.6 μm ,证明了骨肉瘤细胞具有一定的辐射抗性。

^3H -TdR 掺入试验证明,3 种肿瘤细胞受电离辐射作用后,细胞遭受严重破坏, ^3H -掺入明显受抑制(图 3),以 K562 下降最明显。有关榄香烯对淋巴细胞及其亚群的辐射效应^[1]的研究本科室已进行了探讨,但没有报道对几种肿瘤细胞同时进行比较。本工作对受照射的肿瘤细胞加入榄香烯处理,使肿瘤细胞得到照射和中药双重杀伤作用。结果发现①照射组与正常组(0)比较,进行配对 *t* 检验,受到 1、5、10、15Gy 不同剂量照射后,随着剂量的加大, ^3H -TdR 掺入率明显下降;②加药组 ^3H -TdR 掺入率与单独照射组比较明显降低(表 1,数据以单独照射为 100%),3 种瘤细胞与对照组相比进行组间配对 *t* 检验,有明显差异(*p* < 0.01)。为进一步比较加药对 3 种细胞的影响,又进行方差齐性检验,结果 HOS8603 差异非常显著(*p* < 0.01)。而 K562 及 SMMC772 细胞 *p* < 0.05,结果证明骨肉瘤细胞虽具有较强的辐射抗性,但加入榄香烯后下降的百分率较低;而 K562、SMMC-772 对辐射相对较敏感,电离辐射

作用后,DNA 分子受到破坏,核迁移距离延长,³H—TdR 掺入率明显下降。以 K562 细胞最敏感,3 种肿瘤细胞的辐射抗性依此为 HOS8603>SMMC—772>K562 与临床观察结果相一致。单细胞电泳技术可用于大剂量及小剂量照射所致的 DNA 损伤,根据不同肿瘤细胞的辐射敏感性,联合中药治疗可增强放疗效果,提高杀伤肿瘤细胞的能力。特别对辐射抗性强的骨肉瘤细胞具有明显的辅助杀伤作用,为临床放射治疗提供有意的实验依据。

致谢 本实验得到了辐照室王春雷老师的支持和帮助,在此表示感谢

参 考 文 献

1 刘永彪,苏燎原,孔向荣等. 辐射研究与辐射工艺学报,1998,16:54—56
LIU Y B, SU L Y, KONG X R *et al*., J Radiat Res Radiat Proces, 1998, 16:54—56
2 Lankinen M H, Vilpo L M, Vilpo J A. Mutat Res, 1996, 352: 31—38
3 Alapetite C, Wachter T, Sage E *et al*. Int J Radiat Biol, 1996, 69:359—361
4 Wojewodzka M, Kruzewski M, Iwanenko T *et al*. Mutat Res, 1998, 416: 21—35
5 Hu Q, Hill RP. Radiat Res . 1996, 146:636—645
6 洪承皎,童建,王 静. 中华放射医学与防护, 2001,21:28—29
HONG C J, TONG J, WANG J. Chin J Radiol Med Prot, 2001, 2128—29

STUDIES OF DNA DAMAGE IN TUMOR CELLS INDUCED BY RADIATION
EXPOSURE BY MEANS OF SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS

LIU Fenju WANG Tao HONG Chengjiao XU Yujie SU Liaoyuan LIU Yongbiao
(Nuclear Medical College, Suzhou University, Suzhou 215007)

ABSTRACT In order to detect the radiation sensitivity of tumor cells, the methods of single cell gel electrophoresis (SCGE) and ³H—TdR incorporation were applied to determine effects of radiation on single strand breaks of DNA in K562、SMMC—772 and HOS8603 cell lines . The experimental results proved that the cell migration distance was prolonged, DNA syntheses was restricted and the ³H—TdR incorporation rate was decreased in the above—mentioned 3 tumor cells lines after irradiation by ⁶⁰Co γ rays (1—20 Gy).

KEYWORDS Single cell gel electrophoresis (SCGE), DNA damage, ³H—TdR incorporation, SMMC—772, HOS8603, K562 cell lines

CLC R811.5