

用 BrdU 法研究 γ 射线外照射诱发 外周血淋巴细胞 HPRT 基因突变

赵 涛 崔凤梅 赵经涌 劳勤华 王六一

(苏州大学核医学院 苏州 215007)

摘要 用 5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)法检测,不同剂量 γ 射线外照射诱发正常人外周血淋巴细胞 HPRT 基因突变频率(MFs),并研究其剂量效应关系。抽取正常成年人静脉血,分成 5 组,分别用 0.0—4.0Gy 的不同剂量 γ 射线照射,全血培养后用 BrdU 法检测淋巴细胞 HPRT 基因 MFs。结果表明,正常人外周血淋巴细胞的 MFs 随外照射剂量的增加而上升,且剂量效应关系符合线性平方模型。研究证明了 BrdU 法是一种快速、简便、较敏感的检测外照射诱发 HPRT 基因突变的方法,HPRT 基因辐射突变可作为生物剂量计。

关键词 BrdU 法, HPRT 基因, 突变频率, 剂量效应关系

中图分类号 R349.2

外周血淋巴细胞次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine—guanine phosphoribosyl transferase, HPRT)基因辐射突变具有灵敏度高,剂量效应关系好,在体内稳定等优点,已被用于作为衡量电离辐射损伤的分子标志。HPRT 基因编码的 HPRT 参与细胞嘌呤核苷酸的“补救”合成(salvage synthesis),当在细胞培养基中加入毒性嘌呤类似物 6-巯基鸟嘌呤(6-thioguanine, 6-TG)后,正常细胞死亡,而 HPRT 基因突变细胞则存活^[1]。藉此可以筛选出 HPRT 基因突变体。有关辐射诱发外周血淋巴细胞 HPRT 基因突变已有报道^[2]这些研究中应用的方法多是放射自显影法、多核细胞法和克隆法,用 5-溴脱氧尿嘧啶(5-bromodeoxyuridine, BrdU)法研究辐射诱发 HPRT 基因突变的文献很少,国内更是未见报道。BrdU 法主要原理是利用 BrdU 能掺入增殖的细胞 DNA,再用荧光加 Giemsa(fluorescence plus Giemsa, FPG)染色,从而检测在选择性培养基中生长的 HPRT 基因突变的细胞。本实验用 BrdU 法研究辐射诱发 HPRT 基因突变的剂量效应关系,探讨 BrdU 法在实践中应用的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

6-TG 系美国 Sigma 化学公司产品;RPMI1640 培养基为美国 GIBCO 公司产品;小牛血清(已灭活)、Hoechst 33258 和 BrdU 从华美生物公司购入;植物血凝素(PHA)由广州医药工业研究所购入。

1.2 方法

1.2.1 取血和辐照 取一健康成年男子(无吸烟史和近期放射线照射史)静脉血 50mL(预加适量肝素),分成 5 组,每组 10mL 血。其中 1 组为对照组,其余 4 组为实验组,实验组用 ⁶⁰Co 源 γ 射线照射,照射剂量分别为 0.5、1.0、2.0、4.0Gy。照射条件:源距离为 60cm,剂量率为

国防科工委(Y5573062)资助

第一作者:赵涛,男,1975 年 11 月出生,2001 年毕业于苏州大学核医学院,卫生毒理学专业,硕士研究生

收稿日期:初稿 2001-08-15, 修回 2001-11-12

0.713Gy/min。照射环境温度保持在 37℃左右。

1.2.2 淋巴细胞培养 各组血用 RPMI1640 培养液以 1:10 的比例稀释后放置于 4℃的冰箱中 24h,其目的是去除拟表型(phenocopy)对实验结果的影响。将血样取出后,以 1500 转/min 离心 10min,弃去上清后再重复 1 次。在离心后的沉淀中加入生长培养基(内含 80%RP-MI1640,20%灭活小牛血清,100IU/mL 庆大霉素,PHA 适量)至原体积(10mL)。每组血样平行做 5 个样本,每个样本培养两瓶,其中 1 瓶加入 6-TG 1×10^{-4} mol/L。所有培养瓶中含生长培养基 4.5mL,加血 0.5mL。在 37℃培养 24h 后加入 5×10^{-3} mol/L BrdU,再避光直立培养 16h^[2]。

1.2.3 收获细胞和制片 将培养物加入离心管,1500 转/min 离心 10min,吸去上清后,加入 0.075mol/L KCl 8mL,混匀。置于 37℃水浴中放置 30min 后,1500 转/min 离心 10min,吸去上清,加入 8mL 固定液(甲醇:冰乙酸=3:1),混匀后放置 20min,1500 转/min 再离心 10min,吸去上清。重复固定 1 次后,加适量固定液搅匀,滴于预冷的玻片上,空气干燥后用 Hoechst 33258 染色 30min,15W 紫外灯 30cm 处照射 3-5h,接着用 4%的 Giemsa 染液染色 15min^[2]。

1.2.4 阅片及淋巴细胞转化率和基因突变频率(mutation frequencies, MFs)的计算 盲法阅片不加 6-TG 的样本计数 3000 个转化及未转化淋巴细胞,加 6-TG 的样本计数突变细胞,各种细胞的鉴别标准见参考文献[2]。

淋巴细胞转化率 = (转化淋巴细胞数/3000 个转化及未转化淋巴 细胞)×100%

淋巴细胞突变率(MFs) = 突变淋巴细胞数/(0.5mL 正常人外周血淋巴 细胞数 × 淋巴 细胞转化率)

1.2.5 统计学处理 先用 Bartlett 法检验方差齐性。再用 Student-Newman-Keuls 法进行各组之间的两两比较,具体步骤见参考文献[3]。

2 结果

2.1 外周血淋巴细胞转化率与 γ 射线照射剂量之间的关系

表 1 为外周血淋巴细胞转化率与 γ 射线照射剂量之间的关系。由表 1 可知,淋巴细胞转化率随剂量增加而下降。当剂量为 0.5Gy 时,转化率就已明显下降,与对照组相比有统计学差异($p<0.05$);照射剂量>1.0Gy 时,转化率下降极为明显($p<0.01$),光镜下可见转化淋巴细胞数明显下降。淋巴细胞转化率与照射剂量之间的关系可用线性模型关系式表示: $Y=63.1990-8.5445D$ 。其中, D 为 γ 射线照射剂量(Gy), Y 为淋巴细胞转化率(%),此直线的相关系数 $r=0.8557$ (见图 1)。

Tab.1 The relationship between lymphocytic transformation rates and radiation doses of γ rays

Group	Radiation dose/Gy	Number of calculated lymphocytes	Number of transformed lymphocytes	Transformation rate /%
Control	0.0	18000	13014	72.3239±2.2435
No. 1	0.5	18000	10998	61.1904±6.6182 ⁽¹⁾
No. 2	1.0	18000	7884	43.8240±8.8563 ⁽²⁾
No. 3	2.0	18000	7259	40.3278±8.7916 ⁽²⁾
No. 4	4.0	18000	6216	34.5425±8.2765 ⁽²⁾

⁽¹⁾ $p<0.05$ (Comparing with control) , ⁽²⁾ $p<0.01$ (Comparing with control and group No. 1), $\bar{x}\pm s$

2.2 照射剂量与外周血淋巴细胞 HPRT 基因突变频率之间的关系

表 2 为淋巴细胞 HPRT 基因突变频率之间的关系。由表 2 可知,随着 γ 射线照射剂量的逐步增加,淋巴细胞 HPRT 基因 MFs 也相应升高。当照射剂量为 2.0Gy、4.0Gy 时,HPRT 基

因 MFs 与对照组、实验 1 组相比有非常显著差异($p<0.01$)。照射剂量与 MFs 之间的关系符合线性平方模型,拟合的剂量效应关系函数为: $Y=0.7306+0.7774D+0.0706D^2$ 。其相关系数 $r=0.9952$ (见图 2)。

Tab-2 The relationship between HPRT gene MFs and radiation doses of γ ray				
Group	Radiation dose /Gy	Lymphocytic transformation—rate / %, $\bar{x}\pm s$	Number of mutational lymphocytes ⁽¹⁾	MFs, $\times 10^{-5}$ $\bar{x}\pm s$
Control	0.0	72.3239 $\pm$ 2.2435	191	0.8842 $\pm$ 0.2332
No.1	0.5	61.1904 $\pm$ 6.6182	183	1.0020 $\pm$ 0.4507
No.2	1.0	43.8240 $\pm$ 8.8563	191	1.4054 $\pm$ 0.5034
No.3	2.0	40.3278 $\pm$ 8.7916	416	2.7568 $\pm$ 0.2789 ⁽²⁾
No.4	4.0	34.5425 $\pm$ 8.2765	511	4.9345 $\pm$ 0.8761 ⁽²⁾

⁽¹⁾The number of total mutational lymphocytes of 5 blood samples.
⁽²⁾ $p<0.01$ (Comparing with control and group No.1)

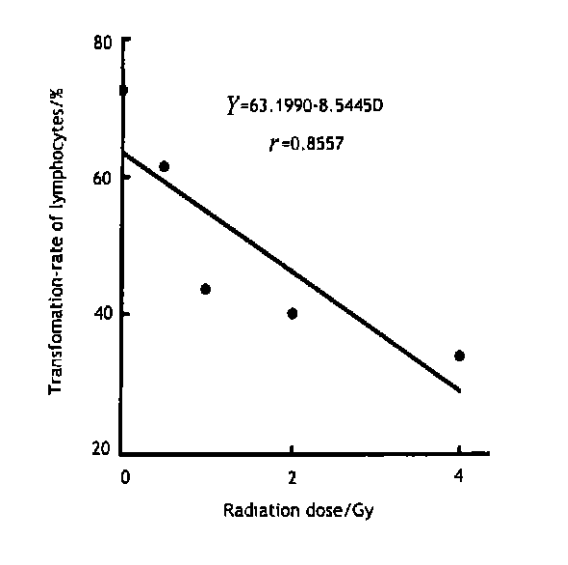


Fig.1 The relationship between lymphocytic transformation—rates and radiation doses

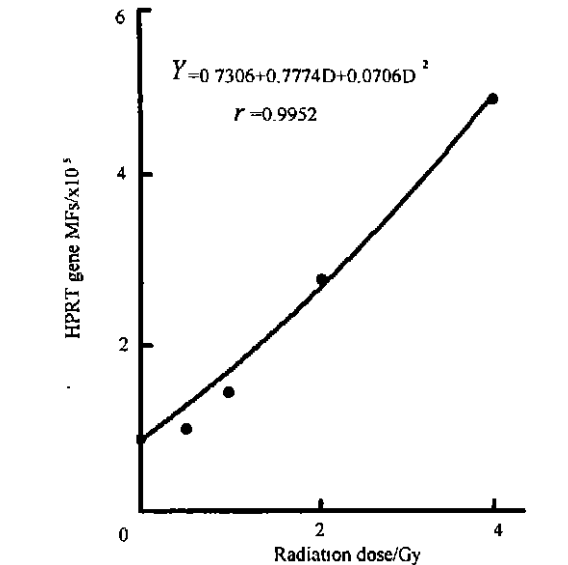


Fig.2 The relationship between HPRTgene Mfs and raadiation doses

3 讨论

淋巴细胞转化率是指淋巴细胞在受到 PHA 刺激后,转化为可增殖的淋巴母细胞的比率。淋巴细胞转化率和照射剂量的关系,文献中报道不一。如 Ostrosky—Wegman 等^[4]曾报道在墨西哥核事故和切尔诺贝利核电站事故中⁶⁰Co 源 γ 射线照射者的淋巴细胞的转化率明显地低于对照组,但淋巴细胞转化率的降低与其 HPRT 基因 MFs 的升高并无严格的对应关系。李铁骥等^[5]用放射自显影法的研究结果表明,剂量为 0.0—5.0Gy(剂量率为 0.289Gy/min)的 X 射线照射下,人体外周血淋巴细胞的转化率几乎没有任何变化,因而不影响 HPRT 基因 MFs。本实验中,随着照射剂量的增加,淋巴细胞转化率下降,两者呈明显的负相关(相关系数 $r=0.8557$)。因此,我们认为,在计算辐射诱发淋巴细胞 HPRT 基因突变率时,应考虑不同剂量照射条件下的淋巴细胞转化率,否则可能会使结果偏低。

关于外照射剂量与 HPRT 基因突变频率之间剂量效应关系的文献很多^[6,7],国内目前多用多核细胞法和克隆法检测。这些检测 HPRT 基因突变实验结果表明,随着外照射剂量的增大,HPRT 基因突变频率也不断上升,与本实验的结果相似。在本实验中,照射剂量与基因突

变频率之间的关系呈线性平方模型,且相关系数达到了0.9952。由此可见,用BrdU法研究外照射诱发HPRT基因突变同样具有一定的准确度和灵敏度。

BrdU法最早用于对姐妹染色单体交换的研究,涉及HPRT基因突变研究的报道不多,国内至今未见报道。BrdU检测法的优点是:与克隆法相比,它所需的经费较少,实验器材简单,并且耗时很短。一般的实验室都可以开展此项工作,特别是在短期内对大批量群体的HPRT基因突变情况的调查,更显出它的优势;此外,BrdU法用BrdU代替了放射自显影法中的 ^3H ,实验人员不受到放射线照射。用BrdU法检测HPRT基因突变还可以通过流式细胞仪进行,可实现HPRT基因突变检测的自动化。由于BrdU法具有上述优点,它更适合在实践中应用。

参 考 文 献

- 1 Albertini R J, Nicklas J A, Skopek T R *et al*. *Mutat Res*, 1998, **400**(1-2):381-389
- 2 Ostrosky-wegman P, Regina Montero, Cristina Cristinas do nava *et al*. *Mutat Res*, 1987, **191**(3-4):211-214
- 3 金丕焕. 医用统计方法. 上海:上海医科大学出版社, 1997, 56-64
JIN P H. *Statistic Methods for Medical Science*, Shanghai: Publishing House of Shanghai Medical University, 1997, 56-64
- 4 Ostrosky-Wegman P, Montero R, Palao A *et al*. *Mutat Res*, 1990, **232**(1):49-56
- 5 李铁骥, 陈强, 金玉珂等. 白求恩医科大学学报, 1996, **22**(4):360-361
LI T Y, CHEN Q, JIN Y K *et al*. *J Norman Bethune Univ Med Sci*, 1996, **22**(4):360-361
- 6 刘胜学, 曹佳, 安辉等. 中华放射医学与防护杂志, 2000, **20**(4):225-227
LIU S X, CAO J, AN H *et al*. *Chin J Radiol Med Prot*, 2000, **20**(4):225-227
- 7 邬洪良, 朱魏, 高锦声等. 中华放射医学与防护杂志, 1999, **19**(2):128-129
WU H L, ZHU W, GAO J S *et al*. *Chin J Radiol Med Prot*, 1999, **19**(2):128-129

USING BRDU LABELING TO DETECT THE HPRT GENE MUTATION FREQUENCIES INDUCED BY γ RAYS

ZHAO Tao CUI Fengmei ZHAO Jingyong LAO Qinhu WANG Liuyi

(*Institute of nuclear medicine, Suzhou University, Suzhou 215007*)

ABSTRACT Using BrdU labeling to detect the HPRT gene mutation frequencies(MFs)of a normal adult induced by γ rays of different doses and to analysis the relationship between the HPRT gene MFs and the radiation doses. Blood was drawn via the vein of a normal adult and was equally divided into five groups. The blood was exposed to γ rays with a dose range from 0.0Gy to 4.0Gy respectively. After having cultivated the whole blood, we got the HPRT gene MFs of the lymphocytes. With the increase of the doses, the MFs of the HPRT gene rose accordingly. The result also showed that there is a linear-square relationship between the doses of the γ ray and the MFs of the HPRT gene. According to the result, we may conclude that BrdU labeling method is a quick, simple and relatively sensitive method for detecting the HPRT gene mutations of somatic cells induced by external radiation exposure and HPRT gene mutation may be used as a radiobiological dosimeter.

KEYWORDS BrdU labeling method, HPRT gene, Mutation frequencies, Dose-effect relationship

CLC R349.2