

单细胞凝胶电泳检测外照射诱导 DNA 单链断裂和双链断裂

张军宁¹ 洪承皎² 朱寿彭²

¹苏州大学附属第一医院 苏州 215006)

²苏州大学医学院 苏州 215007)

摘要 分别应用中性单细胞凝胶电泳、碱性单细胞凝胶电泳技术检测了不同剂量 γ 射线外照射对小鼠外周血淋巴细胞DNA的损伤。结果表明, γ 射线外照射对小鼠外周血淋巴细胞DNA具有明显的损伤作用,彗星细胞百分率显著增加,DNA电泳迁移,且迁移的距离与照射剂量之间呈良好的线性关系。

关键词 中性单细胞凝胶电泳,DNA双链断裂,碱性单细胞凝胶电泳,DNA单链断裂,淋巴细胞, γ 射线照射

中图分类号 R 811.5

DNA的损伤与修复是放射生物学的重要研究课题,尤其是电离辐射所致DNA单链断裂和双链断裂是决定受照射细胞命运的关键因素之一。早期建立的检测DNA单链断裂和双链断裂方法灵敏度较低,操作条件不易控制,所获得的结果反映了群体细胞DNA损伤效应,不能对单个细胞进行分析^[1]。近年来由Olive^[2]等建立的测定DNA双链断裂的中性微凝胶电泳技术和Singh等^[3]建立的测定DNA单链断裂的碱性微凝胶电泳技术,已在有关研究领域内得到广泛的应用。为此,本工作在建立和改进单细胞微凝胶电泳(SCGE)技术的基础上,研究了 γ 射线对小鼠外周血淋巴细胞DNA的损伤效应。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和药品

正常熔点琼脂糖(NMA)、低熔点琼脂糖(LMA)、DMSO、Triton X-100及溴化乙锭均为AMRESCO公司产品(由华美生物工程公司分装)。

1.2 重要仪器

OLYMPUS BX60型荧光显微镜为日本株式会社产品;DY-II型电泳仪(南京大学产品),水平电泳槽(南京大学产品)。

1.3 实验动物

雄性昆明系小鼠购于苏州医学院动物部,6-7周龄,体重 $20\pm 2\text{g}$ 。

1.4 外周血淋巴细胞分离

取小鼠外周静脉血 $0.5-1\text{mL}$ 肝素抗凝,沿离心管加在等体积淋巴细胞分离液液面上, $3500\text{r}/\text{min}$ 离心 2min ,吸取中间层淋巴细胞于 10mL 离心管中,加磷酸缓冲液(PBS)至 5mL ,

苏州大学第一临床学院课题资助

第一作者:张军宁,男,1966年12月出生,2001年毕业于苏州大学核医学院,放射医学博士,苏州大学第一临床学院副主任医师

收稿日期:初稿 2001-12-19, 修回 2002-02-22

1500r/min 离心 8min,如此重复洗涤 2 次,再将细胞悬于 PBS,置 4℃待用。

1.5 照射条件

用⁶⁰Co 外照射治疗机照射淋巴细胞悬液。SSD70cm,吸收剂量率为 90.3cGy/min。中性单细胞凝胶电泳试验照射剂量为 0、1、5、10、15、20、30、40、60Gy,碱性单细胞凝胶电泳试验照射剂量为 0、0.5、1.0、3.0、5.0、10.0Gy。

1.6 中性单细胞凝胶电泳试验

参照 Banath 等^[4]的方法,简述如下:(1)正常熔点琼脂(0.5%)85μL 均匀铺在磨砂载玻片上,吸取 75μL 含约 10⁴ 个细胞的低熔点琼脂(0.7%)均匀铺在正常熔点凝胶层上,再于其上铺一层低熔点琼脂凝胶;(2)将玻片浸入新配的中性裂解液(2mol/L NaCl,30mmol/L EDTA,1%肌氨酸钠,10 mmol/L Tris,用前加 1% Triton X-100 和 10% DMSO, pH8.2-8.5)中 4℃裂解 2h;(3)取出玻片,用 0.5%TBE(2mmol/L EDTA,90mmol/L Tris,90mmol/L 硼酸,pH8.2-8.5)浸没漂洗 3 次,每次 1h 以上;(4)将玻片置于 0.5%TBE 电泳缓冲液中展开 20min 后,在 25V,300mA 电泳条件下电泳 20min;(5)用 100μL 溴化乙锭(2μg/mL)染色,盖上盖玻片在荧光显微镜下测量 DNA 迁移长度(length of migration, μm),每份样品随机观察 6-10 个细胞,每组观测 40 个细胞。

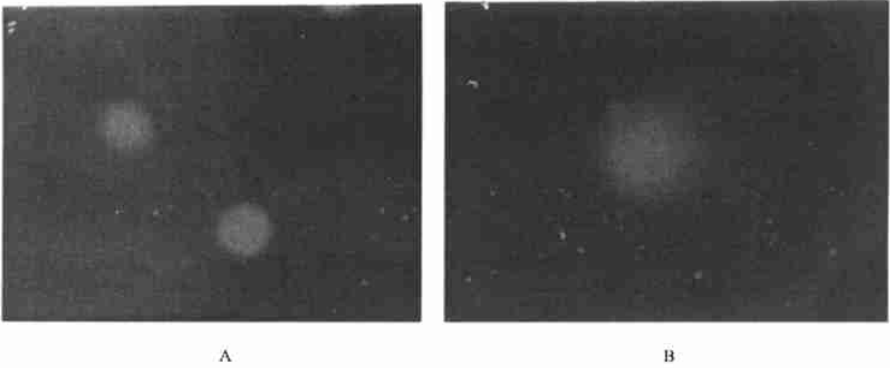
1.7 碱性单细胞凝胶电泳试验

参照 Singh 等^[3]的方法,简述如下:(1)正常熔点琼脂(0.5%)85μL 均匀铺在磨砂载玻片上,吸取 75μL 含约 10⁴ 个细胞的低熔点琼脂(0.7%)均匀铺在正常熔点凝胶层上,再于其上铺一层低熔点琼脂凝胶;(2)将玻片浸入新配的碱性细胞裂解液(2.5mol/L NaCl,100mmol/L EDTA,1%肌氨酸钠,10mmol/L Tris,用前加 1% Triton X-100 和 10% DMSO, pH 为 10)中裂解 1.5h;(3)取出玻片置于碱性电泳液中展开 20min 后,在 25V,300mA 电泳条件下电泳 20min;(4)用 Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)中和 3 次后加 100μL 溴乙锭(2μg/mL)染色,盖上盖玻片在荧光显微镜下测量 DNA 迁移长度(length of migration, μm),每份样品随机观察 6-10 个细胞,每组观测 40 个细胞。

2 结果

2.1 中性单细胞凝胶电泳图象

小鼠外周血淋巴细胞经 γ 射线照射可引起细胞 DNA 双链断裂。当核 DNA 解旋后,在电泳电场作用下,DNA 断裂离开细胞核向阳极迁移,形成拖尾(即彗星图象,见图 1)。



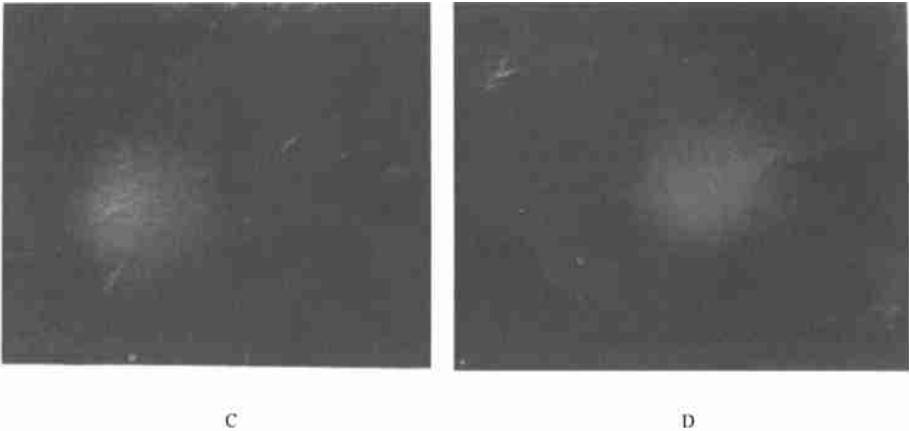


Fig.1 Typical photomicrographs of neutral electrophoresis of mouse blood lymphocytes (comet images) induced by γ rays

A. Untreated mouse blood lymphocytes, B. Mouse blood lymphocytes exposed to 10Gy of γ rays, C. Mouse blood lymphocytes exposed to 20Gy of γ rays, D. Mouse blood lymphocytes exposed to 30Gy of γ rays

2.2 碱性单细胞凝胶电泳图象

本文研究表明,小鼠外周血淋巴细胞经 γ 射线照射可引起细胞 DNA 单链断裂。当核 DNA 解旋后,在电泳电场作用下,DNA 断裂离开细胞核向阳极迁移,形成拖尾(即彗星图象,见图 2)。

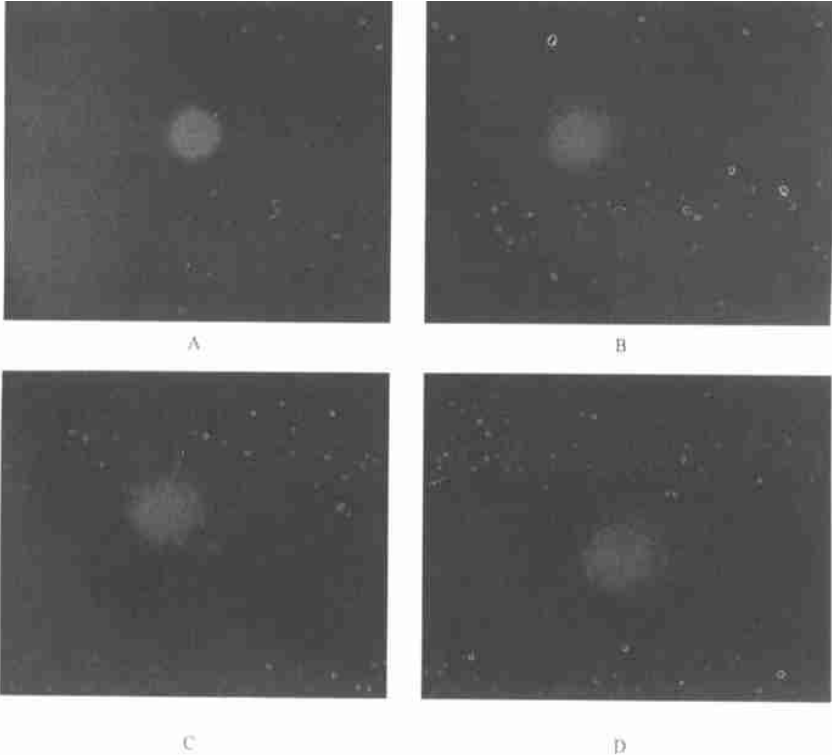


Fig.2 Typical photomicrographs of alkaline comet assay of mouse blood lymphocytes (comet images) induced by γ rays

A. Untreated Mouse blood lymphocytes, B. Mouse blood lymphocytes exposed to 5Gy of γ rays, C. Mouse blood lymphocytes exposed to 10Gy of γ rays, D. Mouse blood lymphocytes exposed to 15Gy of γ rays

2.3 外照射诱导离体淋巴细胞的 DNA 双链断裂

表 1 总结了小鼠外周血淋巴细胞经 γ 射线照射后因 DNA 双链断裂而发生迁移的细胞比率随剂量增加而增高, 平均每个细胞 DNA 迁移长度也随剂量增加而增长, 呈显著剂量效应关系 (相关系数 $r=0.82$, $p<0.01$)。

Tab.1 Effects of γ rays on DNAdsb migration in mouse blood lymphocytes ($\bar{x}\pm s$)

Dose/Gy	Percentage of cells with migrated DNA/%	Length of DNA migration/ $\mu\text{mol/L}$
0	3.9	23.42 $\pm$ 1.32
1.0	9.0 ⁽¹⁾	30.50 $\pm$ 2.14
5.0	28.0 ⁽²⁾	37.43 $\pm$ 0.75 ⁽¹⁾
10.0	32.0 ⁽²⁾	47.87 $\pm$ 1.50 ⁽¹⁾
15.0	44.0 ⁽²⁾	54.33 $\pm$ 0.33 ⁽²⁾
20.0	56.0 ⁽²⁾	60.72 $\pm$ 1.93 ⁽²⁾
30.0	64.0 ⁽²⁾	71.66 $\pm$ 0.68 ⁽²⁾
40.0	96.0 ⁽²⁾	74.00 $\pm$ 1.86 ⁽²⁾
60.0	96.0 ⁽²⁾	66.41 $\pm$ 3.68 ⁽²⁾

Diameter of nucleus is included in the length of DNA migration⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$ vs control

2.4 外照射诱导离体淋巴细胞的 DNA 单链断裂

表 2 总结了小鼠外周血淋巴细胞经 γ 射线照射后因 DNA 单链断裂发生 DNA 迁移的细胞比率随剂量增加而增高, 平均每个细胞 DNA 迁移长度也随剂量增加而增长, 呈显著剂量效应关系 (相关系数 $r=0.96$, $p<0.05$)。

Tab.2 Effects of γ rays on DNAssb migration in mouse blood lymphocytes ($\bar{x}\pm s$)

Dose/Gy	Percentage of cells with migrated DNA/%	Length of DNA migration/ $\mu\text{mol/L}$
0	1.80	21.59 $\pm$ 0.49
0.5	7.20 ⁽²⁾	25.58 $\pm$ 1.13
1.0	8.10 ⁽²⁾	27.09 $\pm$ 0.57 ⁽¹⁾
3.0	10.90 ⁽²⁾	27.18 $\pm$ 0.66 ⁽¹⁾
5.0	23.68 ⁽²⁾	36.25 $\pm$ 1.15 ⁽²⁾
10.0	27.77 ⁽²⁾	53.28 $\pm$ 0.13 ⁽²⁾

Diameter of nucleus is included in the length of DNA migration, ⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$ vs control

3 讨论

单细胞凝胶电泳技术是在核酸沉淀法(Nucleoid Sedimentation)和晕圈分析(Halo Assay)及弱碱性条件下的单细胞凝胶电泳等检测技术基础上逐步发展起来的一种检测哺乳类有核细胞 DNA 断裂的新技术。该方法简便、快速和灵敏, 与以往的 DNA 断裂检测技术相比, 具有明显的优势^[5, 6]。(1) 它能够直接对单个细胞进行原发性 DNA 损伤及修复的研究, 从而避免了只能对细胞群体的 DNA 改变进行检测的不足;(2) 它还可以检测 DNA 切除修复缺陷、DNA 交联以及氧化性损伤等多种类型的 DNA 损伤;(3) 可以连续观察 DNA 损伤和修复情况;(4) 所需样品细胞数目少(<10000 个), 无需放射性核素标记, 操作较为简单, 数小时即可出结果, 费用甚少;(5) 适用范围广, 凡能制成单细胞悬液的哺乳类动物细胞(包括静止状态的细胞), 均可进行 DNA 损伤的实验研究, 尤其对 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞均很敏感, 不象姐妹染色体互换试验(Sister Chromatid Exchange, SCE)仅限于 T 细胞, 微核试验仅限于 B 细胞。

受试细胞的 DNA 损伤与修复以及细胞周期是影响 SCGE 分析的重要因素。有些射线,如 γ 射线在接触的早期直接引起 DNA 断裂,并且大多数在 15min 内修复;而有些射线,如 UV 则多在照射后 1h 断裂达最高峰;在修复方面,各种细胞中也有差异。不同细胞周期对 SCGE 的敏感性也有影响,如 S 相细胞 DNA 比其他相 DNA 表现的损伤轻。此外,DNA 解旋时间、电泳时间也是影响因素。

γ 射线外照射致淋巴细胞 DNAssb、DNAdsb 和细胞功能障碍在体内和体外实验及人群资料中均得到证实^[7,8]。本工作观察了不同剂量 γ 射线照射后小鼠外周血淋巴细胞 DNAssb、DNAdsb 以说明该方法的可行性。结果发现, γ 射线照射后小鼠外周血淋巴细胞彗星百分率显著增加,DNA 电泳迁移,且迁移的距离与照射剂量之间呈良好的线性关系。Kent 等^[9]用 SCGE 检测了 CHO-K1 细胞的 DNA 损伤,发现 DNA 的迁移长度与照射剂量之间呈良好的线性关系。离体照射实验表明应用^[10-12]SCGE 对淋巴细胞的检测在 0.05—5.0Gy 范围内 DNA 的迁移长度随照射剂量加大而增加,符合线性平方方程。与本结果基本一致。

以上说明,SCGE 不但能用来观察辐射所致离体细胞 DNAssb 损伤效应,还能用来研究离体细胞 DNAdsb 辐射损伤和修复作用,并有望成为新一代生物剂量计。

参 考 文 献

- 1 Radford R. Int J Radiat Biol, 1985, **48**(1):45—52
- 2 Olive P L, Wlodek D, Banath J P. Cancer Res, 1991, **51**:4671—4677
- 3 Singh N P, McCoy M T, Tice R R *et al.* Exptl Cell Res, 1988, **175**:184—189
- 4 Banath J P, Fushiki M, Olive P L. Int J Radiat Biol, 1998, **73**(6):649—654
- 5 Kennelly J C, Lane M P, Barker J A *et al.* Cancinogenesis, 1993, **14**:637—643
- 6 Lankinen M H, Vilpo L M, Vilpo J A. Mutat Res, 1996, **352**:31—38
- 7 Vijayalaxmi, Tice R R, Strauss GHS. Mutat Res, 1992, **271**:243—247
- 8 Betti C, Davini R T, Giannessi L *et al.* Mutat Res, 1994, **307**:232—238
- 9 Kent C R H, Eady J J, Ross G M *et al.* Int J Radiat Biol, 1995, **67**(6):655—661
- 10 Plappert U, Raddatz K, Roth S *et al.* Stem Cells Dayt, 1995, **13**:215—220
- 11 Kruszewski M, Wojewodzka M, Lwanenko T *et al.* Mutat Res, 1998, **416**:37—43
- 12 Wojewodzka M, Kruszewski M, Lwanenko T *et al.* Mutat Res, 1998, **416**:21—25

DNA SINGLE AND DOUBLE STRAND BREAKS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN MICE INDUCED BY γ RAYS IRRADIATION

ZHANG Junning¹ HONG Chengjiao² ZHU Shoupeng²
(¹Suzhou University First Affiliated Hospital, Suzhou 215006)
(²Nuclear Medical College, Suzhou University, Suzhou 215007)

ABSTRACT DNA single— and double—strand breaks of peripheral blood lymphocytes in mice induced by γ rays irradiation were detected by neutral and alkaline comet assay. The results indicated that γ rays caused the increase of DNA migration length in the lymphocytes in a dose—dependent manner. It should be noted that comet assay can be applied not only to monitor DNA single and double strand breaks in vivo or in vitro, but also to serve as a new biological dosimeter.

KEYWORDS Neutral comet assay, DNA double strand breaks, Alkaline comet assay, DNA single strand breaks, Lymphocytes, γ rays irradiation

CLC R811.5