

应用单细胞微凝胶电泳技术对辐射诱发人血淋巴细胞 DNA 损伤的研究

张连珍 池翠萍

(中国辐射防护研究院 太原 030006)

摘要 应用单细胞微凝胶电泳 (SCGE) 技术对 γ 射线照射诱发人血淋巴细胞 DNA 损伤的效应进行了研究。结果表明, γ 射线照射以剂量依赖方式引起人血淋巴细胞 DNA 迁移长度的增加, DNA 迁移长度随照射剂量 (0~3.0 Gy) 的增加而增加。

关键词 单细胞微凝胶电泳 (SCGE), 人血淋巴细胞, γ 射线, DNA 损伤

国内外学者为解决辐射事故应急、辐射防护和核技术开发利用中所遇到的医学问题作了大量的研究工作, 建立了估算受照射剂量的生物剂量学方法^[1,2], 如细胞遗传学方法——染色体畸变分析法、微核测定法等, 但人们渴望能找到一种更为有效、快速、简便、灵敏的检测方法, 对辐射危害进行评价, 从而达到防护的目的。众所周知, DNA 是放射线引起细胞损伤的主要靶物质, 而 DNA 链断裂是细胞损伤的主要类型之一, 于 1984 年由 Ostling 和 Johanson 改进并建立起一种简单易行检测 DNA 损伤方法——即单细胞凝胶电泳, 并首次在中性条件下检测离体哺乳动物细胞在电离辐射后 DNA 链断裂^[3]。本文应用单细胞凝胶电泳技术研究辐射诱发人血淋巴细胞 DNA 的损伤效应。

1 材料与 方法

1.1 人血淋巴细胞分离、纯化

取 2 名健康男性静脉血各 2ml, 肝素抗凝。将血沿管壁缓缓加入内装 2ml 淋巴细胞分层液 (天津放医所) 的离心管中, 水平离心机上离心, 3500rpm, 2min, 收集淋巴细胞加 HBSS 液混匀, 离心, 3500rpm, 2min, 清洗 2 次, 制成 $10^5/\text{ml}$ 细胞悬液。

1.2 细胞照射

淋巴细胞在 0℃ 条件下接受 γ 射线照射, ^{60}Co 治疗机源强度 $93 \times 10^{12} \text{ Bq}$, 剂量率 0.503 Gy/min , 照射距离 80cm, 剂量 0~3.0 Gy。

1.3 凝胶样本制备

(1) 在 45℃ 下将 $100 \mu\text{l}$ 0.5% 正常熔点琼脂糖 (NMA) 浇注到磨砂的载玻片上, 迅速盖上 1 号盖玻片, 置 4℃ 10min 使琼脂糖固化。(2) 在 37℃ 下取 $10 \mu\text{l}$ 细胞悬液与 $75 \mu\text{l}$ 0.5% 低熔点的琼脂糖 (LMA) 相混, 轻轻移开盖玻片迅速将细胞液滴到第一层琼脂糖上, 盖上玻片, 置 4℃ 10min。(3) 在 37℃ 下移开盖玻片, 将 $75 \mu\text{l}$ 0.5% 低熔点琼脂糖作为第 3 层滴加于玻片上, 置 4℃ 固化。

核工业总公司资助课题

收稿日期: 初稿 1997-06-26, 修回 1997-08-11

1.4 细胞裂解

移开盖玻片,将载玻片浸入新配制的4℃冷溶解液。溶解液组成:2.5mol/L NaCl,100mol/L Na₂EDTA,10mmol/L Tris-HCl pH10,1% 肌氨酸钠。用前加1% Triton X-100,10% 二甲基亚砜(DMSO),裂解2h。

1.5 单细胞电泳

将载玻片取出,晾干,并列置于水平凝胶电泳槽中阳极端,电泳槽中盛新配制电泳缓冲液(1mmol/L Na₂EDTA 和 300mmol/L NaOH),约覆过载玻片0.25cm,在高pH电泳液中放置40min,在室温下电泳40min(25V,300A)。

1.6 中和与染色

将胶板浸没于中和液(0.4mol/L Tris-HCl pH7.5)中,15min后取出,放入无水乙醇中处理1h,取出过夜(室温)。溴乙锭(13μg/ml)染色,盖上盖玻片20min。

1.7 分析、拍照

在荧光显微镜下(UV光激发)观察细胞电泳图像,用目镜测微尺测定细胞DNA迁移长度(μm)(总长度-细胞直径)。每个样点至少测量25个细胞,拍照。

2 结果

2.1 细胞凝胶电泳图像

经0.2~3.0 Gy γ射线照射,使人血淋巴细胞DNA产生链断裂,继而引起高级结构松散,在电场作用下,松散的DNA会离开细胞核向正极迁移,形成拖尾(即彗星图像),迁移程度与DNA损伤程度呈正相关(图1a-d)。对照组72%~80%细胞DNA未显示迁移,少数细胞DNA迁移长度也较短(平均为0.71~0.99 μm),受照组则有56~100%的细胞DNA发生迁移,且DNA迁移细胞率有随照射剂量的增加而增加的趋势。

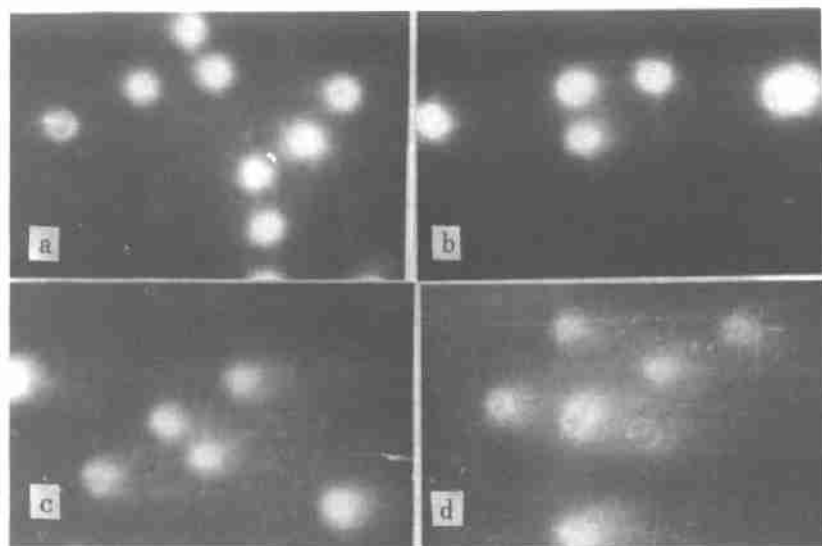


Fig.1 Comet images of human blood lymphocytes exposed to γ-rays

(a) Control human blood lymphocytes (b) Human blood lymphocytes exposed to 0.5 Gy (c) 1.0 Gy
(d) 3.0 Gy

2.2 DNA 迁移长度的剂量效应

细胞 DNA 迁移长度是在荧光显微镜下采用目镜测微尺 (已标定) 量度, 测量数据及统计处理结果列于表 1。表中所列 2 名供血者外周血淋巴细胞经 0.2~3.0Gy γ 射线照射后, 每个剂量点 DNA 迁移长度均大于对照组, 经统计学处理, 差异非常显著 ($p < 0.01$); 由表 1 显示, 人血淋巴细胞 DNA 迁移长度随照射剂量增加而增加, 其拟合为一元二次方程 $L_1 = 0.678 + 11.874 D - 1.065 D^2$, 相关系数 $r = 0.990 (p < 0.01)$; $L_2 = 0.888 + 12.120 D - 0.952 D^2$, 相关系数 $r = 0.993 (p < 0.01)$ 。

Tab.1 Effect of DNA damage induced by γ -rays irradiation in human blood lymphocytes

Donor	Dose/Gy	Percentage of cells with DNA migration/%	DNA migration length/ μm
A	0	28.0	0.99 $\pm$ 1.59
	0.2	56.0	2.44 $\pm$ 2.40 ⁽¹⁾
	0.5	64.0	5.25 $\pm$ 5.60 ⁽¹⁾
	1.0	96.0	14.06 $\pm$ 6.85 ⁽¹⁾
	2.0	96.0	18.46 $\pm$ 7.51 ⁽²⁾
	3.0	100.0	27.26 $\pm$ 9.56 ⁽²⁾
B	0	20.0	0.71 $\pm$ 1.42
	0.2	56.0	2.56 $\pm$ 2.56 ⁽²⁾
	0.5	72.0	6.96 $\pm$ 6.54 ⁽²⁾
	1.0	92.0	13.92 $\pm$ 6.50 ⁽²⁾
	2.0	96.0	19.50 $\pm$ 7.03 ⁽²⁾
	3.0	100.0	29.28 $\pm$ 9.08 ⁽²⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$ ⁽²⁾ $p < 0.001$

3 讨 论

人血淋巴细胞 DNA 如同其它种类哺乳类细胞一样, 其分子量很高且具有严密的超螺旋结构。实验时, 对淋巴细胞分离、纯化、包埋、碱处理等过程均保持小心谨慎地操作, 使细胞内 DNA 不受破坏, 其结构的严密性象在活细胞中那样完整, 在电泳电场中其 DNA 就不会游离出来, 因此也不会出现 DNA 迁移图像。当 DNA 受到损伤产生链断裂时, DNA 超螺旋结构受到破坏, 断裂造成的断片就可以在电场的作用下迁移出来, 在琼脂糖凝胶中显示 DNA 迁移, 在荧光显微镜下可看到橙红色的彗星状图像。DNA 断裂愈多, 断片愈小, 在相同电泳条件下 DNA 迁移的量就愈大, 迁移的长变就愈长。人血淋巴细胞受 γ 射线照射以后, 其细胞中 DNA 发生链断裂, 且随照射剂量的增加而增加, 导致细胞 DNA 迁移长度随剂量增加而增加, 呈显著的剂量效应关系 [4,5]。

在实验中未受照射的人血淋巴细胞如 Betti 等 [5] 报道的, 也表现有微弱的细胞 DNA 迁移现象 [6~8], 作者认为这主要是由于人血淋巴细胞从静脉血分离出来以后, 其体外条件毕竟是一种非生理条件, 离开活体的细胞不可避免地会受到某些非生理条件的影响, 细胞中的 DNA 会不同程度地受到一些损伤, 这就是对照组细胞 DNA 发生部分迁移的原因。文献报道, 用碱洗脱法和 DNA 碱解旋速率法测定 DNA 单链断裂, 发现未照射的人血淋巴细胞 DNA 单链断裂占总 DNA 的 30% 左右 [9~11], 也表明非生理条件能诱发细胞 DNA 损伤, 与本实验结果一致。

经 0.2~3.0Gy γ 射线照射的人血淋巴细胞 DNA 在凝胶中的电泳迁移长度 (L) 与照射剂量 (D) 呈明显的正相关, 其回归方程为 $L = C + aD - bD^2$, 式中 L 代表细胞 DNA 在凝胶中迁移长度 (μm); D 代表 γ 射线照射剂量 (Gy)。

根据这一公式,可从受照人员外周血淋巴细胞 DNA(在相同实验条件下)电泳迁移长度来估算该受照人员的受照剂量,从而将单细胞凝胶电泳技术作为辐射生物剂量计,为急慢性辐射事故的救治提供科学依据。由于单细胞凝胶电泳技术测定 DNA 损伤具有灵敏度高、快速、简便、细胞用量少等优点,明显优越于其它辐射生物剂量计,文献报道应用该技术可以检测到 0.1Gy 电离辐射诱发的细胞 DNA 损伤^[4],作者以 0.2Gy 照射人血淋巴细胞也观察到 DNA 的明显损伤 ($p < 0.01$),证实了单细胞凝胶电泳法是一种检测低剂量辐射引起细胞 DNA 损伤的快速、灵敏和实用的技术。此项技术能用于各种理化因素诱导的 DNA 损伤与修复的研究;作为生物标记进行生物监测及流行病学研究;遗传管理学研究;肿瘤治疗方案研究等。然而,单细胞凝胶电泳技术毕竟是 80 年代末期建立起来的新的研究方法,如何准确、快速地作为生物剂量计应用于实践在国内外尚属起步阶段。今后还需进行大量的研究工作。

参 考 文 献

- 1 Lloyd D C. Radiat Prot Dosimetry, 1981, 1:19
- 2 李进. 国外医学 (放射医学核医学分册), 1995, 19(6):276
- 3 Ostling O, Johanson K J. Biochem Biophys Res Comm, 1984, 123:291
- 4 Singh N P, McCoy M T, Tice R R *et al.* Exp Cell Res, 1988, 175:184
- 5 Ribas G, Frenzilli G, Barale R *et al.* Mutat Res, 1995, 344:41
- 6 Betti C, Davini R T, Giannessi L *et al.* Mutat Res, 1994, 307(1):323
- 7 Vijayalaxmi, Tice R R, Strauss G H S *et al.* Mutat Res, 1992, 271:243
- 8 Singh N P, Stephens R E, Schnieder E L. Int Radiat Biol, 1994, 66:23
- 9 孟紫强, 张连珍. 环境科学学报, 1988, 8:56
- 10 孟紫强. 中华放射医学与防护杂志, 1987, 7:351
- 11 孟紫强. 辐射研究与辐射工艺学报, 1987, 5:14

STUDIES ON DNA DAMAGE INDUCED BY IONIZING RADIATION IN HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES USING THE SCGE TECHNIQUE

Zhang Lianzhen Chi Cuiping

(China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006)

ABSTRACT Effects of DNA damage induced by γ -rays irradiation in human blood lymphocytes were studied using the single cell microgel electrophoresis (SCGE) technique. It was shown that γ -rays irradiation caused the increase of DNA migration length in the lymphocytes in the dose dependent manner. The DNA migration length of the lymphocytes increased with dosage (0~3.0Gy).

KEYWORDS Single cell microgel electrophoresis (SCGE), Human blood lymphocytes, γ -rays, DNA damage