

文章编号:1004 - 616X(2001)03 - 0154 - 03

·论著·

SCGE,SCE 和染色体畸变分析法用于 DNA 损伤与修复检测的对比研究

收稿日期:2000 - 11 - 16;修订日期:2001 - 03 - 12

基金项目:山东省教委科研基金(Z98K54)

作者简介:马爱国(1956 -) ,男,江苏省宿迁市人,教授,从事营养与食品卫生学研究。

表 1. 各组动物食管粘膜组织学变化情况

Table 1. The histological lesions of esophageal mucosas

Group	Rat (n)	Proliferation	Papilloma	Hyperplasia of basal layer	Atypical hyperplasia
M	19	19	17	18	11
M+LP	26	26 [*]	16 [*]	16 [*]	3 [*]
C	18	0	0	0	0

^{*}M+LP group vs M group, P<0.05

2.4 大鼠体内抗氧化功能的改变

M+LP 组血清 SOD 活力和 ROS 单位高于 M 组,低于 C 组;全血 GSH-Px 活力高于其他 2 组;而血清脂质过氧化产物 MDA 含量低于 M 组,接近 C 组。M 组 SOD 和 ROS 单位低于 C 组,GSH-Px 和 MDA 高于 C 组。见表 2。

表 2. 血抗氧化物酶和脂质过氧化产物($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Levels of preoxidant and antioxidase in blood

Group	Rat	ROS unit (U/ml)	SOD (NU/ml)	GSH-Px (U/ml)	MDA (nmol/ml)
M+LP	26	27.74 ±1.69 ^a	7.64 ±0.89 ^a	153.44 ±28.79 ^a	11.10 ±1.98 ^b
M	19	23.48 ±1.47 ^c	5.13 ±2.65 ^c	130.19 ±22.01 ^c	17.50 ±3.21 ^c
C	18	43.53 ±2.13	27.62 ±2.85	125.06 ±2.28	11.12 ±2.28

a: M+LP group vs M and C groups, P<0.01;

b: M+LP group vs M group, P<0.01;

c: M group vs C group, P<0.01;

3 讨论

从膳食中摄入 N-亚硝基化合物及其前体物很可能是导致我国食管癌和胃癌高发的主要原因之一³,而在癌肿的发生与发展过程中,若施加某些有效干预因子,可阻断其发生、发展⁴。番茄红素是一种类胡萝卜素,主要存在于番茄中,尤其是经加工而成的番茄酱中含量很高。流行病学调查表明,番茄红

素有预防消化道肿瘤的作用⁵。实验证明,番茄红素是天然类胡萝卜素中最有效的单线态自由基捕获剂,通过淬灭单线氧和清除自由基而发挥抗癌作用⁶。本次实验结果表明,番茄红素对 MANA 所致大鼠癌前病变的发生有抑制作用。MANA 可以降低大鼠体内 SOD 酶的活力和活性氧单位,增加血中脂质过氧化产物 MDA 的含量;通过添加番茄红素干预,能提高 SOD 和 GSH-Px 的活力。SOD 和 GSH-Px 可清除体内过多的自由基,在本实验中表现为清除自由基的能力的活性氧单位提高,脂质过氧化产物 MDA 降低。这提示番茄红素对 NAMA 致癌过程的抑制,可能与番茄红素具有较强的抗氧化作用,能有效抑制脂质过氧化有关。本研究结果为番茄红素对食管癌的干预实验提供了模型基础,对指导食管癌高发区居民饮食有积极的意义。

参考文献:

- 1 王朝俊,罗德元,白邵槐. 不同剂量甲基亚硝胺诱发大鼠食管癌的观察 J. 中华肿瘤杂志,1980,2(4):263~267.
- 2 陈君石,闻乏梅,译. World Cancer Research Fund. 食物、营养与癌症预防 M. 上海:上海医科大学出版社,1999. 91~407.
- 3 Lu SH, Yang WX, Guo LP, et al. Determination of N-nitrosamines in gastric juice and urine and a comparison of endogenous formation of nitrosoprotein and its inhibition in subjects from high and low risk area for esophageal cancer J. LARC Sci Publ, 1987, 84: 853~861.
- 4 汤钊猷. 现代肿瘤学 M. 上海:上海医科大学出版社,1993. 158~163.
- 5 Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature J. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(4): 317~331.
- 6 Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants J. Am J Clin Nut, 1995, 62(6 Suppl): 1315S~1321S.

马爱国,臧金林,宋风荣,张日金

(青岛大学医学院医学营养研究所,山东 青岛 266021)

摘要:目的与方法:单细胞凝胶电泳技术(SCGE)、姐妹染色单体交换法(SCE)和染色体畸变分析法均能被用来检测DNA的损伤或修复。通过对比研究了这3种方法在DNA损伤和修复检测中的灵敏度和准确性。结果:SCGE检测H₂O₂所致的DNA损伤比SCE更为灵敏,在H₂O₂ 100 μmol/L和200 μmol/L剂量组,SCGE检测到的DNA损伤率分别达到45.6%和59.5%,而姐妹染色单体交换法检测到相应2个剂量组的DNA损伤率仅为3.4%和5.3%。用染色体畸变分析法,H₂O₂处理的4个实验组的染色体畸变率与对照组无明显差异。结论:SCGE,SCE和染色体畸变分析法是在3个不同水平检测DNA的损伤和修复,SCGE具有操作简便、快速、灵敏的优势。

关键词:SCGE;SCE;染色体畸变;DNA损伤;DNA修复

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

COMPARISON RESEARCH OF SCGE, SCE AND CHROMOSOME ABERRATION FOR DETERMINING DNA DAMAGE

Ma Ai-guo, Zang Jin-lin, Song Feng-rong, Zhang Ri-jin

(Institute of Human Nutrition, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China)

Abstract: Purpose and Methods: Single cell gel electrophoresis (SCGE), sister chromatid exchanges (SCE), chromosome aberrations are three methods to determine DNA damage and repair. The purpose of this study was to compare the sensitivity and accuracy of the three methods. **Results:** SCGE was the most sensitive one for detecting DNA damage induced by H₂O₂. The rates of DNA damage at 100 μmol/L and 200 μmol/L of H₂O₂ were 45.6% and 59.5% measured by SCGE, and 3.4% and 5.3% by SCE, respectively. DNA damage induced by H₂O₂ was not detectable with chromosome aberration method. **Conclusion:** SCGE, SCE and chromosome aberration were considered to be used in three different levels, whereas SCGE was a quick, simple and more sensitive technique for detecting DNA damage and repair.

Key words: SCGE; SCE; chromosome aberration; DNA damage; DNA repair

单细胞凝胶电泳技术(SCGE)、姐妹染色单体交换试验(SCE)和染色体畸变分析3种方法均被用来检测DNA的损伤。SCE和染色体畸变分析法在70~80年代被国内外广泛应用。SCGE技术又称“彗星”试验,是90年代初发展起来的一种DNA损伤与修复检测方法。本文对这3种DNA损伤与修复检测方法进行了对比研究。

1 材料与方 法

1.1 SCGE¹ 实验所需RPMF1640和低熔点、正常熔点琼脂糖均为Sigma公司产品,荧光剂DAPI为Boehringer Mannheim公司产品。

1.2 人体外周血淋巴细胞的收集 取指尖血30 μl(约1滴)与1 ml含有10%的小牛血清的RPMF1640培养液混合,在冰上放置30 min后加入100 μl淋巴细胞分离液,4℃,200 ×g离心3 min,在培养液与分离液交界处吸取粉红色层液获取淋巴细胞。DNA损伤剂选用

H₂O₂,剂量分别为0 μmol/L,100 μmol/L,200 μmol/L。

1.3 图象分析 实验分析时,每种处理至少观察100个细胞。用眼睛观察判断DNA断裂损伤分级需要通过计算机彗星图像分析加以确定²。

1.4 SCE和染色体畸变率分析

1.4.1 淋巴细胞的培养和处理 取人体外周血加入含有20%小牛血清的RPMF1640培养液中进行培养,每培养瓶血量为0.4 ml,PHA的终浓度为0.02~0.04(μg/ml),培养至72 h,按常规制成染色体标本³。正常人外周血体外培养的淋巴细胞分成正常和实验处理组,处理组给予DNA损伤剂H₂O₂。染色体畸变分析中H₂O₂的剂量分别为0 μmol/L,50 μmol/L,100 μmol/L,200 μmol/L和600 μmol/L;SCE的H₂O₂剂量分别为0 μmol/L,100 μmol/L,200 μmol/L,均培养3 d(72 h)后收获细胞。

1.4.2 染色体畸变分析 在低倍镜下选择背景清

晰、染色体分散良好,长短适度的完整有丝分裂中期细胞,观察约100个中期细胞作染色体计数,按人类细胞遗传学命名的国际体制非显带标本的定义为标准鉴别染色体畸变类型。染色体断裂包括染色体和染色单体断裂、断片、缺失、双着丝粒等。统计分析指标选用细胞畸变率。

1.4.3 SCE常规微量全血进行外周血淋巴细胞培养,24h后加BUdR(5-溴脱氧尿核苷)10 μg/ml,避光培养48h,收获前3h加入秋水仙素(终浓度0.2 μg/ml),常规收获细胞和制片。标本避光在37℃温箱放置2d,以紫外灯2×SSC法进行姐妹染色体分化染色,Gemsa染色10min。选择约100个分散良好,染色体完整及分化染色清晰的第2周期(M2期)的细胞,油镜下计数SCE率。凡染色体末端或着丝粒区的交换计1次,染色体臂内中间节段的交换计2次,求其平均值。实验均在双盲条件下进行⁴。

2 结果

2.1 染色体畸变率分析 结果显示体外培养的淋巴细胞畸变率在正常组和用H₂O₂处理的各实验组之间无明显差异(P>0.05),染色体畸变率在5组间也未见明显统计学上的差异(P>0.05),见表1。

2.2 SCE分析 正常淋巴细胞组SCE率只有

1.90%,给予H₂O₂处理后,染色体SCE率明显增加。经统计学分析,H₂O₂100 μmol/L和200 μmol/L组与0 μmol/L组间存在明显差异,P值均小于0.01,见表2。

表1. H₂O₂所致染色体畸变率(%)

Table 1. Rates of chromosome aberrations induced by H₂O₂(%)

H ₂ O ₂ dose (μmol/L)	cell number	abnormal cells	rate of abnormal cells	total number of chromosomes	number of aberrations	rate of aberrations
0	213	5	2.35	9 798	5	0.051
50	96	2	2.08	4 416	2	0.045
100	164	4	2.40	7 544	5	0.066
200	98	1	1.02	4 508	1	0.022
600	104	2	1.92	4 784	2	0.042

表2. SCE检测H₂O₂所致的DNA损伤

Table 2. The rates of SCE induced by H₂O₂

groups	cells number	total number of chromosomes	number of exchanges	SCE(%)
0 μmol/L	184	8 464	161	1.90
100 μmol/L	105	4 830	165	3.42 **
200 μmol/L	100	4 600	264	5.74 **

** P<0.01

2.3 SCGE检测H₂O₂致DNA的损伤 DNA损伤的程度随着H₂O₂剂量的增加而升高,淋巴细胞表现出对H₂O₂的损伤高度敏感,并显示出明显的剂量反应关系;经统计学分析3个处理组DNA总损伤程度明显高于对照组,P值均小于0.01,见表3。

表3. SCGE检测H₂O₂对DNA损伤的影响(̄x ±s)

Table 3. DNA damage induced by H₂O₂ and measured by SCGE (̄x ±s)

H ₂ O ₂ dose	DNA damage(arbitrary units)					
	0	1	2	3	4	total
0 μmol/L	96.4 ±47.2	1.7 ±1.4	1.9 ±1.6			3.6 ±2.4
50 μmol/L	70.3 ±34.3	5.8 ±2.9	3.4 ±2.1	5.7 ±2.6	14.7 ±6.8	88.5 ±35.6 **
100 μmol/L	48.9 ±23.6	4.2 ±2.0	2.9 ±1.5	4.3 ±1.8	39.8 ±23.5	182.2 ±29.8 **
200 μmol/L	30.0 ±11.2	12.4 ±7.6	0.9 ±1.1	6.5 ±3.1	217.2 ±37.3	237.9 ±48.1 **

** P<0.01

2.4 采用SCGE检测DNA的损伤修复 实验选择100 μmol/L H₂O₂剂量组所致的DNA损伤为基数,观察1h,2h,3h后DNA自发的修复水平。实验结果显示受损伤DNA自发的修复能力极强。损伤1h后,DNA经过修复使损伤下降到89.6(P<0.01),在3h内DNA损伤的修复率已达到67.2%,见表4。

表4. 淋巴细胞DNA损伤后的修复
Table 4. DNA repair of human lymphocytes

DNA Repair	period of repair(h)			
	0	1	2	3
DNA damage	182.2 ±29.8	89.6 ±31.2 **	65.3 ±23.5 **	59.8 ±18.5 **
repair(%)	0.0	50.8	64.2	67.2

** P<0.01

3 讨论

本实验在染色体畸变分析中所用的DNA损伤剂为H₂O₂,在淋巴细胞开始培养时加入。通过SCGE已证实H₂O₂对淋巴细胞DNA具有较强的损伤力,然而,经过3d(72h)的培养,淋巴细胞不断的增生和繁殖,受损伤的DNA已得到了修复。因此,即使把H₂O₂的剂量增加到600 μmol/L,在培养3d后也未观察到染色体畸变的明显增加。由于染色体畸变分析的结果是体细胞DNA不断的遭到(自身毒物或外来化合物)损伤和体细胞自身不断修复的综合结果,而染色体畸变如染色(单)体断裂、裂隙等的存在应是受损伤的DNA难以修复的结果。所以,染色

文章编号:1004 - 616X(2001)03 - 0157 - 03

·论著·

紫外线照射后可移植性白血病模型微核研究

万美蓉¹,陈绍志²

(1. 徐州医学院附院中心实验室,江苏 徐州 221002; 2. 徐州市儿童医院内科,江苏 徐州 221005)

摘要:目的:研究可移植性 T 细胞白血病模型(L7212 细胞)在不同剂量紫外线照射后的微核变化。方法:应用胞质阻断培养法检测 L7212 细胞微核。结果:发现该模型对紫外线敏感,当紫外线剂量达 $45 \times 10^{-7} \text{ J}/(\text{s} \cdot \text{mm}^2)$ 以上时,其微核细胞率、微核率均高于对照组 ($P < 0.05$),并且剂量-效应曲线呈 $Y = a + \text{blg}X$ ($P < 0.01$)。结论:应用胞质阻断法检测微核比常规培养法灵敏。

收稿日期:2000 - 03 - 02;修订日期:2001 - 2 - 26

基金项目:江苏省教委资助课题(98 KJD310002)

作者简介:万美蓉(1952 -),女,浙江建德人,副研究员,从事血液遗传学研究。

体畸变分析技术对 DNA 初级损伤检测可能不是一种敏感和可靠的方法。

SCE 尽管被认为可能与 DNA 断裂和复制有关,但主要反映体细胞 DNA 的受损伤程度,而不能准确的检测 DNA 损伤后的修复结果。此外,体外实验由于时间较长,体外培养细胞的 DNA 不仅受到外来化合物的作用,而且可能受到培养条件(如培养时间延长促使 SCE 率下降)、培养温度(意外升高而使 SCE 率增加)的干扰。此外,血清成分、培养基差异、染色方法等均可影响 SCE 率,甚至 DNA 复制期间的 DNA 损伤也可能增加 SCE 率⁵。由此可以认为,一个实验结果的 SCE 应是多种因素综合影响的结果。

SCGE 可直接观察 DNA 损伤。本实验过程中,人体淋巴细胞离体在 30 min 内给予外来化合物(H_2O_2)处理,并始终在 4℃ 条件下操作,直到荧光显微镜观察,其目的是在低温条件下抑制 DNA 修复内切酶、DNA 聚合酶等的活性,使断裂的 DNA 片段能够得以保留至最终分析。这样实验结果就能较准确地检测到某种外来化合物是否造成体细胞的 DNA 断裂损伤以及损伤 DNA 的修复情况。然而,SCGE 也受到许多因素的影响,如琼脂凝胶薄板的制备、实验温度、碱化处理的条件、电泳电压以及电泳时间等均可对 DNA 损伤程度产生影响⁶。因此,在严格控制影响因素后才能使 SCGE 在 DNA 断裂损伤检测中发挥快速、灵敏的优势。

SCGE 能够检测损伤 DNA 的修复。本实验是在

同一张有受损 DNA 细胞的片子上进行,首先观察 DNA 的损伤率,然后把该片放置 CO_2 培养箱内 37℃ 培养,分别于 1 h, 2 h, 3 h 后取出再进行分析。结果显示 DNA 在损伤后的 1 h 内表现出极强的修复能力,自发修复率达到 50.8%。此后,修复速度减慢,到第 2 h, 3 h 后修复率已分别达到 64.2% 和 67.2%。由此看出,淋巴细胞 DNA 的修复是逐渐修复和完善的动态过程。因此,SCGE 在 DNA 修复动力学的研究中可能显示出重要作用。总之,从本实验结果中可以看到,SCGE 是一种操作简便、快速(整个实验过程约 4 - 6 h)、灵敏的 DNA 损伤与修复的检测技术,有着广泛的应用前景。

参考文献:

- 1 马爱国,韩秀霞,刘四朝,等. 两种 DNA 断裂损伤检测方法敏感性的比较 J. 遗传,1997,19(1): 32~34.
- 2 Susan DJ, Ma AG, Ross MA, et al. Antioxidant supplementation decrease oxidative DNA damage in human lymphocytes J. Cancer Res, 1996, 56(3): 1 291~1 295.
- 3 马爱国,郑雨沛,张月明. 食管癌高发区人群染色体自发畸变率与民族、年龄的关系. 肿瘤防治研究,1989,16(1): 47~49.
- 4 赵艳青,陈安军,蒋晓璇,等. 维生素 A 对癌高发家族高危人群 SCE 率的影响 J. 中华医学遗传学杂志,1996,13(1): 53~54.
- 5 王戈华. 姐妹染色单体交换与 DNA 复制及修复 J. 国外医学遗传学分册,1982, 5: 126~129.
- 6 马爱国,臧金林,刘四朝. 单细胞凝胶电泳技术影响因素分析 J. 中华预防医学杂志,1999,33(3): 165.