

文章编号:0253-9950(2009)01-0036-06

单细胞凝胶电泳技术用于生物体系辐射损伤评价

姜 林¹, 牟婉君¹, 刘国平¹, 许云书¹, 罗顺忠¹, 高清祥²

1. 中国工程物理研究院 核物理与化学研究所, 四川 绵阳 621900;

2. 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730000

摘要:采用单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis, SCGE), 又称彗星电泳, 表征不同剂量 α , γ 射线照射诱导健康人体外周血淋巴细胞 DNA 和小鼠活体与离体外周血淋巴细胞 DNA 瞬时损伤的剂量效应关系, 建立了 α , γ 射线辐照剂量刻度曲线, 并对活体小鼠的辐射损伤进行了吸收剂量估算, 对辐射危害进行了评价。结果表明, 单细胞凝胶电泳技术能够精确表征射线所致生物体损伤的生物学效应, 而且能够对辐照后生物体的吸收剂量、尤其是辐射事故后的生物体进行剂量离线评测, 建立生物体辐射损伤事后评测机制。

关键词:单细胞凝胶电泳; DNA 损伤; α 射线; γ 射线; 生物剂量

中图分类号:R816.3 **文献标志码:**A

Application of Single Cell Gel Electrophoresis in Post-Evaluation of Organism Radiation Damage

JIANG Lin¹, MU Wan-jun¹, LIU Guo-ping¹, XU Yun-shu¹,
LUO Shun-zhong¹, GAO Qing-xiang²

1. Institute of Nuclear Physics and Chemistry, Mianyang 621900, China;

2. School of Live Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: The transient irradiation-caused DNA damage in the human peripheral blood lymphocytes, mouse peripheral blood lymphocytes and alive mouse irradiated by α -ray and γ -ray was investigated, and the single cell gel electrophoresis(SCGE, Comet Assay) was used to detect the extent of DNA damage. On this basis, the dose-effect curve and the evaluating method for radiant after-effect were established, the absorbed dose of alive mouse A irradiated by γ -rays was computed. The results indicate that not only the dose-effect can be described by using SCGE, but also the dose-computed after organism irradiated by radiant rays is achieved with it, and SCGE may be used as a new biological dosimeter.

Key words: SCGE; DNA damage; α -ray; γ -ray; biological dose

DNA 损伤是放射生物学的重要研究课题, 尤其是电离辐射所致 DNA 单链和双链断裂是决定

受照细胞结局的关键因素之一。早期建立的检测 DNA 的损伤方法, 如染色体畸变、细胞微核等方

收稿日期:2007-09-10; 修订日期:2008-07-02

基金项目:中国工程物理研究院科学技术基金资助项目(20050547)

作者简介:姜 林(1978—), 男, 山东威海人, 从事放射化学与辐射生物效应研究

法灵敏度较低、操作条件不易控制,且获得的结果仅反映群体细胞 DNA 的损伤效应,不能对单个细胞进行分析^[1]。近年来测定 DNA 损伤的单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis, SCGE)已在有关领域得到广泛应用^[2-4]。单细胞凝胶电泳技术是一种对辐射损伤进行定量测定的新技术,该法灵敏度高,可检测 0.045 Gy 以下的辐射损伤^[5],并可检测各种类型的辐射损伤^[6]。目前为止,尚没有用 SCGE 作为辐射生物剂量计研究的专门报道,但一些研究已经显示了该方法在辐射生物损伤评价方面的应用潜力^[7-9]。

除了核战争、核恐怖事件外,在平时的工作中,由于工作的需要和防护条件的限制,工作人员会长期受到低剂量电离辐射的慢性作用。特别是在没有物理剂量检测的条件下,如何精确反映人员的剂量生物效应、准确地估算受照人员的吸收剂量是一个必须解决的问题,但是仅由单一的物理剂量估算是无法反映生物效应的。单细胞凝胶电泳技术能够对生物大分子 DNA 直接进行测量,通过表征射线诱导的 DNA 损伤可以进行吸收剂量的估算和辐射损伤的评价,这里的生物剂量估算的生物学方法,通常称之为“生物剂量计”,即通过对受照者的生物样品,比如血液或骨髓等进行测定,依据剂量效应关系来估算受照量。

一次或分次受到 1.0 Gy 以下的射线或中子流的外照射;经常受到低剂量率的慢性照射(长期接触射线的职业性照射),并超过剂量限值的照射称为低剂量过量照射,这种照射对人和生物造成的影响称为低剂量过量照射效应^[10]。本工作拟在这个剂量范围内,研究不同剂量 α 、 γ 射线照射诱导健康人体外周血淋巴细胞 DNA 和小鼠活体与离体外周血淋巴细胞 DNA 瞬时损伤的剂量效应关系。

1 实验部分

1.1 试剂

正常熔点琼脂糖(NMA),上海东海制药厂,电泳用琼脂糖;低熔点琼脂糖(LMA),D0015-2G,西班牙原装,上海世泽生物有限公司分装;二甲基亚砜(DMSO)、Triton X-100、溴化乙锭(EB),兰州佰澳生物公司分装;其他试剂均为分析纯。正常人体离体血淋巴细胞(human lymphocytes, HL),实验人员体检后捐献;小鼠离体血淋巴细胞(mouse lymphocytes, ML)及小鼠活

体(照射后取血分离淋巴细胞,AML),兰州大学第一附属医院提供;²⁴¹Am 源,中国工程物理研究院核物理与化学研究所特种材料中心。

1.2 主要仪器

Olympus BX60 型荧光显微镜,日本 OLYMPUS 公司;DYY-III 型-6B 型电泳仪,DYY-III 型电泳槽,北京六一仪器厂;DSC-H3 SONY CYBERSHOT 数码相机,日本 SONY 公司;荧光分析软件,北京唯恩公司;Fcy-50H 回旋式⁶⁰Co 治疗机,兰州大学第一附属医院提供。

1.3 单细胞凝胶电泳实验

1.3.1 辐照 用⁶⁰Co 治疗机、²⁴¹Am 源按照 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0 Gy 和空白照射样品。

1.3.2 外周血淋巴细胞的分离与制片 将辐照后样品分别缓慢加入有 1 mL 淋巴细胞分离液的离心管中,离心 20 min,吸取中间层的淋巴细胞于离心管中,纯化后,加 0.5 mL 磷酸缓冲液(PBS)将细胞悬浮。正常熔点琼脂糖(1%)铺在磨砂载玻片上,固化后形成第一层胶。取细胞悬浮液在 37 °C 下按体积比 1:3 与低熔点琼脂糖(1%)充分混合,铺到第一层胶上,4 °C 固化 4 min 后,即第 2 层胶。

1.3.3 裂解 将载玻片放入大培养皿中,加入裂解液(NaCl 2.5 mol/L, EDTA-2Na 100 mmol/L, 肌氨酸钠 C₁₅H₂₈NNaO₃ 1%, 10 mmol/L, pH=10, 用前加 $\varphi=1\%$ Triton 和 $\varphi=10\%$ DMSO)裂解 1 h。

1.3.4 电泳 把载玻片放入电泳槽中,加电泳缓冲液(EDTA-2Na 1 mmol/L, NaOH 300 mmol/L)漫过玻片 1 cm,静置 5 min,开始电泳,调节电压约为 60 V,电流 300 mA,温度 4 °C,避光电泳 30 min。

1.3.5 染色观察 将电泳后的载玻片放入中和液(Tris-HCl 0.4 mol/L, pH=7.5)10 min,取出晾干。20 μ L EB 染色 20 min。染色后的载玻片置于荧光显微镜下观察,用数码相机同步照相,像素 1 280×960($n=9$),每片随机观察 30~40 个 DNA 图像,用荧光分析软件进行分析。

1.3.6 数据分析处理 使用 Origin 7.0 进行数据处理和效应曲线拟合。数据用(均值±单次量标准差)表示,使用单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用最小显著性差异 t 检验(LSD t)分析统计学差异。

2 实验结果

2.1 彗星图像

不同辐照剂量下的 DNA 彗星图像示于图 1。由图 1 可知,彗星图像分布均匀,随着辐照剂量的增加,彗星图像的尾长增加,尾部荧光强度增强。由于纯化淋巴细胞实验过程中的非生理环境也会对细胞产生一定的损伤,所以在空白实验中,彗星图像有一定的拖尾现象。

2.2 淋巴细胞 DNA 损伤的剂量效应关系

彗星荧光参数中最重要的参数是尾长、彗尾 DNA 含量、Olive 矩。尾长与 DNA 损伤直接相关,在低剂量范围内尾长与 DNA 损伤程度呈线

性关系,但当照射剂量超出某一范围,尾长并不随 DNA 损伤程度的增加而增长。此时,彗尾 DNA 含量和 Olive 矩与 DNA 损伤程度相关性更为密切。Olive 矩是个复合指标,能够满足多种情况下的 SCGE 分析。在分析软件广泛普及后,Olive 矩是被普遍采信的一个表征 DNA 损伤的参数。本工作在数据分析时采用了彗尾 DNA 含量和 Olive 矩这 2 个指标,彗星图像经荧光分析软件统计分析结果列入表 1, 2,并依据 DNA 双链断裂模型,拟合剂量效应关系式列入表 3,关系式中 x 值代表吸收剂量, y 值代表生物效应量,拟合效应曲线示于图 2。

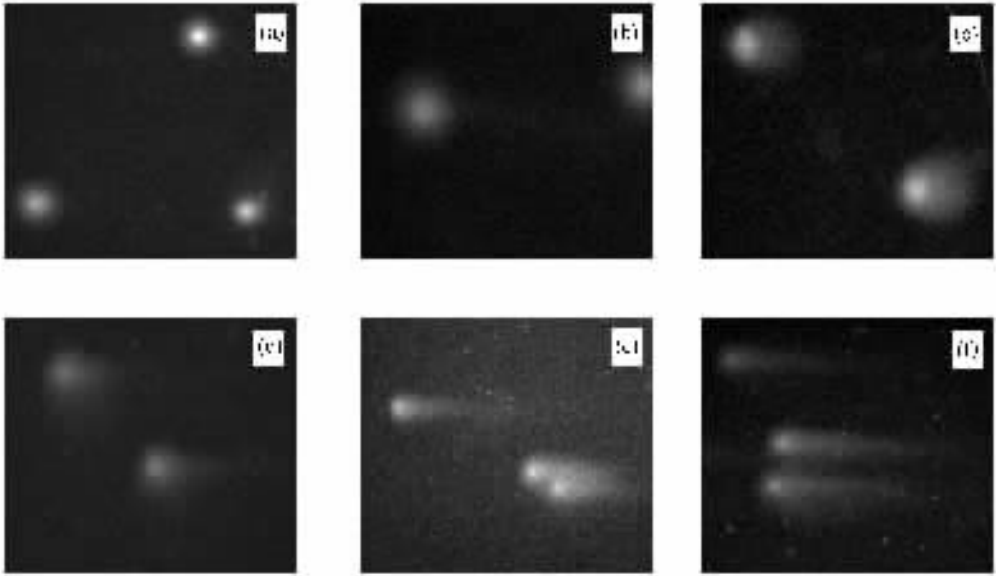


图 1 不同辐照剂量下的 DNA 彗星图像

Fig. 1 Photomicrographs of typical comet DNA exposed to various radiations D , Gy: (a)——0.0, (b)——0.1, (c)——0.3, (d)——0.5, (e)——1.0, (f)——2.0

表 1 α , γ 射线照射后淋巴细胞 DNA 链断裂的彗尾 DNA 含量参数变化情况

Table 1 DNA content response of human and mouse lymphocytes towards $^{241}\text{Am } \alpha$ and $^{60}\text{Co } \gamma$ radiation %

D/Gy	γ -人体血液 (HL irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$)	γ -老鼠血液 (ML irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$)	γ -老鼠活体 (AML irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$)	α -人体血液 (HL irradiated by $^{241}\text{Am } \alpha$)	α -老鼠血液 (ML irradiated by $^{241}\text{Am } \alpha$)
0.0	3.137 ± 2.036	5.005 ± 2.691	2.790 ± 1.840	2.980 ± 2.020	3.057 ± 2.380
0.1	3.045 ± 1.940	6.244 ± 3.159	13.578 ± 3.540	15.834 ± 6.090	16.967 ± 6.910
0.3	18.154 ± 7.384	33.119 ± 7.943	29.323 ± 14.031	12.673 ± 5.370	24.667 ± 6.380
0.5	28.806 ± 5.902	38.292 ± 10.304	58.454 ± 8.870	29.075 ± 11.278	—
0.8	73.802 ± 11.731	70.992 ± 9.670	—	49.239 ± 10.033	69.704 ± 6.720
1.0	63.564 ± 5.388	66.654 ± 4.590	82.137 ± 5.390	72.123 ± 6.560	65.242 ± 7.260
2.0	89.370 ± 7.212	59.116 ± 5.920	83.224 ± 7.240	79.144 ± 9.000	65.000 ± 6.460

表 2 α , γ 射线照射后淋巴细胞 DNA 链断裂的 Olive 矩参数变化情况Table 2 Olive moment response of human and mouse lymphocytes towards $^{241}\text{Am } \alpha$ and $^{60}\text{Co } \gamma$ radiation

D/Gy	γ -人体血液	γ -老鼠血液	γ -老鼠活体	α -人体血液	α -老鼠血液
	(HL irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$)	(ML irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$)	(AML irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$)	(HL irradiated by $^{241}\text{Am } \alpha$)	(ML irradiated by $^{241}\text{Am } \alpha$)
0.0	0.357±0.220	0.722±0.383	0.333±0.210	0.462±0.313	0.547±0.430
0.1	0.398±0.250	1.090±0.597	3.740±1.039	4.642±2.682	4.684±2.460
0.3	3.389±1.553	9.512±2.532	7.682±3.911	4.361±2.798	10.912±6.520
0.5	9.022±2.150	10.571±3.040	42.338±11.752	19.732±13.085	—
0.8	35.521±6.680	34.113±7.610	—	44.396±5.890	56.365±16.039
1.0	31.334±5.811	50.484±7.290	95.449±16.410	84.352±26.674	68.518±21.724
2.0	33.094±6.430	46.324±6.750	141.423±21.802	119.179±35.423	61.436±15.125

表 3 实验数据拟合剂量效应关系式

Table 3 Dose-effect curves

实验项目 (Items)	彗尾 DNA 含量 (Tail content)	Olive 矩 (Moment)
γ -人体离体血液 (HL irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$)	$y = -39.58x^2 + 110.93x - 5.20$ $r^2 = 0.9034$	$y = -16.45x^2 + 52.35x - 4.91$ $r^2 = 0.8676$
γ -小鼠离体血液 (ML irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$)	$y = -39.98x^2 + 109.16x + 0.84$ $r^2 = 0.9582$	$y = -18.85x^2 + 64.36x - 5.25$ $r^2 = 0.8948$
γ -小鼠活体 (AML irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$)	$y = -41.15x^2 + 123.04x + 1.64$ $r^2 = 0.9892$	$y = -19.22x^2 + 114.40x - 8.74$ $r^2 = 0.9744$
α -人体离体血液 (HL irradiated by $^{241}\text{Am } \alpha$)	$y = -20.07x^2 + 80.34x + 0.53$ $r^2 = 0.9359$	$y = -7.40x^2 + 79.54x - 7.49$ $r^2 = 0.9395$
α -小鼠离体血液 (ML irradiated by $^{241}\text{Am } \alpha$)	$y = -35.73x^2 + 102.20x + 3.42$ $r^2 = 0.9699$	$y = -35.31x^2 + 104.80x - 5.84$ $r^2 = 0.9598$

2.3 生物剂量估算

2.3.1 小鼠活体 A 的生物剂量估算 在剂量效应刻度曲线建立以后,使用 0.5 Gy γ 射线外照射小鼠活体 A,按照实验步骤,小鼠活体 A 的 DNA 链断裂的参数分析结果列入表 4。按照彗尾 DNA 含量的剂量效应关系式 $y = -41.15x^2 + 123.04x + 1.64$, $r^2 = 0.9892$ 计算,小鼠活体 A 的吸收剂量为 $x = 0.53$ Gy。按照 Olive 矩的剂量效应关系式 $y = -19.22x^2 + 114.40x - 8.74$, $r^2 = 0.9744$ 计算,小鼠活体 A 的吸收剂量为 $x = 0.44$ Gy。小鼠活体 A 的吸收剂量估算值与设定值基本一致。这种一致性大体上证明了剂量效应式的正确性。小鼠活体 A 与拟合曲线的实验小鼠状态一致,曲线拟合时与剂量估算时

实验操作条件严格保持一致是吸收剂量估算准确性的保证。

2.3.2 生物剂量估算的不确定性 一般而言,用生物剂量学方法估算的剂量不确定性较大。生物剂量学方法估算的剂量不确定性的来源大致分为 3 方面:一是来自检测者,即检测人员的素质,检测技术方法的稳定性,检测设备和条件的可靠性及数据分析处理的合理性等;二是照射方面,即是局部照射还是全身照射、照射的均匀性、照射的剂量和剂量率、射线的品质和能量、屏蔽条件及与其它因素复合作用等;三是来自受照物,即个体内和个体间辐射敏感性的变异性,这是客观存在的。探讨不确定性的来源和降低不确定性措施,可以提高检测的可靠性和可比性。

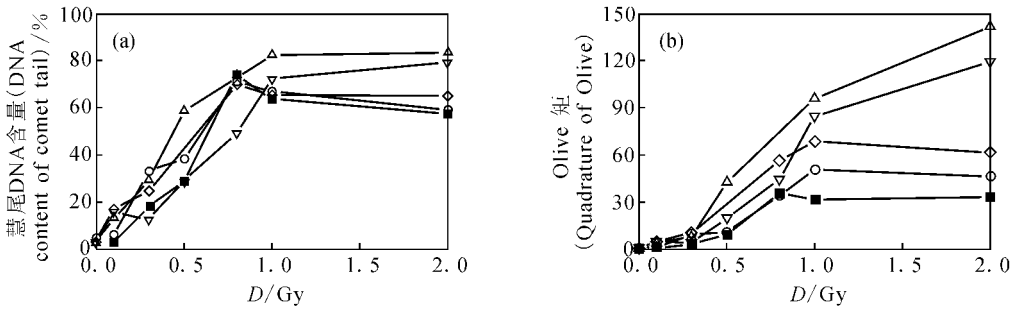


图 2 彗尾 DNA 含量(a),Olive 矩(b)与剂量的效应关系

Fig. 2 DNA content response (a) and Olive moment response (b) towards radiation

■—— γ 辐照人体离体血液(HL irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$), ○—— γ 辐照小鼠离体血液(ML irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$),
 \triangle —— γ 辐照活体小鼠血液(AML irradiated by $^{60}\text{Co } \gamma$), ∇ —— α 辐照人体离体血液(HL irradiated by $^{241}\text{Am } \alpha$),
 \diamond —— α 辐照小鼠离体血液(ML irradiated by $^{241}\text{Am } \alpha$)

表 4 γ 射线照射后小鼠活体 A 的淋巴细胞 DNA 链断裂的参数变化情况

Table 4 Dose response of alive mouse A lymphocytes towards $^{60}\text{Co } \gamma$ radiation

No.	彗尾长度 (Tail length) / μm	Olive 矩 (Moment)	彗尾 DNA 含量 (DNA content of tail) /%	彗头 DNA 含量 (DNA content of head) /%	彗星面积 (Comet area) / μm^2
1	120	47.33	58.07	41.93	6 343
2	90	31.45	45.25	54.75	5 173
3	113	43.37	58.61	41.39	5 269
4	82	32.06	53.88	46.12	3 766
5	92	37.20	60.48	39.52	3 534
	(99 \pm 14)	(38.28 \pm 5.66)	(55.26 \pm 4.56)	(44.74 \pm 4.56)	(4818 \pm 934)

注(Note): 括号内数值为平均值(The data in parentheses are the average)

3 讨论

3.1 α , γ 射线生物效应的比较

由表 3 和图 2 可知,正常人体离体血液和小鼠离体血液受到 α , γ 射线辐照,在研究的剂量范围内, α 射线的生物效应大于 γ 射线的生物效应,1 Gy 吸收剂量的相对生物效能为 2.7。

3.2 损伤效应和低剂量效应

由图 2 所知,随着吸收剂量的增加,彗尾 DNA 含量增加和 Olive 矩也增大,表现出很好的剂量效应响应关系。同时,由图 2(a)和表 3 可知,关系式中的二项系数为负值,表明在研究剂量范围内,低剂量下单位剂量的生物效应要大于高剂量下单位剂量的生物效应。

3.3 活体实验与离体实验的比较

从 γ 射线辐照小鼠活体与离体血液 2 种不同的照射方式得出的剂量效应关系来看,小鼠活体照射的生物效应大于离体血液照射的生物效应。

活体照射时,动物体作为一个系统稳态,对外来刺激做出应答,加剧了外周血液细胞的损伤程度,使活体的生物效应增大。

3.4 小鼠与人的辐射敏感性的比较

影响电离辐射生物效应与机体有关的因素主要是生物机体的放射敏感性。因为人和小鼠细胞 DNA 的“临界靶的大小”(每单位容积的 DNA 含量)相同,以同样的射线照射 2 个不同种系的样品,以 2 Gy 照射时彗尾 DNA 含量作为考察辐射敏感性的指标,小白鼠与人的辐射敏感性的比较列入表 5。由表 5 可知,人的辐射敏感性大于小白鼠的辐射敏感性。这种不同种系的辐射敏感性的差别,可能是由于辐射后的损伤修复能力差异性造成的。

3.5 辐射危害程度评价

依据彗尾 DNA 含量对 DNA 损伤的分级评估方法,损伤被分为 5 级:0 级(无损伤,彗尾 DNA 含量小于 5%)、1 级(轻度损伤,彗尾 DNA 含量

5%~20%)、2 级(中度损伤,彗尾 DNA 含量为 20%~40%)、3 级(高度损伤,彗尾 DNA 含量为 40%~95%)、4 级(重度损伤,彗尾 DNA 含量大于 95%)。依据这个分级评估方法, γ 射线照射人体离体血液实验中,空白实验操作、0.1 Gy 辐射造成的 DNA 损伤为 0 级;0.3, 0.5 Gy 效应为 1 级;0.8, 1.0, 2.0 Gy 效应为 2 级。彗尾 DNA 含量的分级评估方法虽然缺乏精确性,但具有实用价值。

表 5 小白鼠与人的辐射敏感性的比较

Table 5 Comparison of the radiation sensitivity of human with mouse

射线种类 (Various radiations)	种系 (Genus)	2 Gy 照射时彗尾
		DNA 含量(DNA content of tail irradiated by 2 Gy)/%
α	HL	79.14
	ML	65.00
γ	HL	79.37
	ML	59.12

4 结 论

单细胞凝胶电泳技术能够准确定量地检测细胞 DNA 损伤的程度,在 0~2 Gy α , γ 射线照射的剂量范围内,彗尾 DNA 含量和 Olive 矩都与吸收剂量呈现良好的线性平方关系,这表明,使用单细胞凝胶电泳技术来推导生物体的吸收剂量、对辐照后生物体进行辐射损伤评价是可行的。

在细胞中,电离辐射诱发的 DNA 损伤是一个复杂的过程,充分研究其作用机理,将对辐射防护、辐射危害评估和急性放射事故的医学处置提供有力的理论基础。

参考文献:

- [1] Radfor R. The Level of Induced DNA Double-Strand Breakage Correlates With Cell Killing After X-irradiation [J]. *Int J Radiat Biot*, 1985, 48: 45.
- [2] Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 123(1): 291-298.
- [3] He J L, Chen W L, Jin L F, et al. Comparative Evaluation of the *in Vitro* Micronucleus Test and the Comet Assay for the Detection of Genotoxic Effects of X-Ray Radiation [J]. *Mutation Res*, 2000, 469(2): 223-231.
- [4] Vijayalaxmi, Tice R R, Strauss G H S. Assessment of Radiation-Induced DNA Damage in Human Blood Lymphocytes From 100 Normal Subjects [J]. *Mutation Res*, 1992, 271(2): 243-252.
- [5] 张慧丽,余 卫,闫长会.单细胞凝胶电泳技术在军事毒理学上的应用[J]. *卫生毒理学杂志*, 1999, 13(3): 182-184.
- [6] Fairbairn D W, Olive P L, O'neill K L. The Comet Assay: A Comprehensive Review [J]. *Mutation Res*, 1995, 339(1): 37-39.
- [7] 曹 毅,陈 瑞,王仲文,等.彗星分析技术检测辐射和化学物质诱导的 DNA 损伤[J]. *癌变·畸变·突变*, 2003, 15(3): 144-146.
- [8] Kopjar N, Garaj-Vrhovac V. Assessment of DNA Damage in Nuclear Medicine Personnel Comparative Study With the Alkaline Comet Assay and the Chromosome Aberration Test [J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2005, 208(3): 179-191.
- [9] 蒋亚齐,陈 英,刘芬菊,等.碱性单细胞凝胶电泳技术用于辐射损伤快速剂量估算的时效和量效关系研究[J]. *辐射防护*, 2006, 26(6): 353-357.
- [10] Cebulska W A, Nowak D, Niedzwiedz W, et al. Correlations Between DNA and Cytogenetic Damage Induced After Chemical Treatment and Radiation [J]. *Mutation Res*, 1998, 421(1): 83-91.