

应用单细胞凝胶电泳技术检测辐射致外周血淋巴细胞 DNA 损伤

洪承皎, 王 静, 童 建

(苏州医学院放射医学系, 江苏 苏州 215007)

摘要: 应用单细胞凝胶电泳试验 (SCGE) 分别检测了受 γ 射线照射后小鼠及从事 X 射线探伤工人的外周血淋巴细胞 DNA 单链断裂 (ssb), 结果发现: 0.5 Gy 和 5.0 Gy 的 γ 射线照射组小鼠, 外周血淋巴细胞彗星百分率显著高于对照组; 从事 X 射线探伤工人的外周血淋巴细胞彗星百分率也显著升高。提示 SCGE 检测的 DNA_{ssb} 可作为射线对健康影响的早期生物学指标。

关键词: 单细胞凝胶电泳试验; 电离辐射; 淋巴细胞; DNA 单链断裂 (ssb)

中图分类号: R446.11⁺³; X591 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X (1999)06-0346-02

Detection of radiation-induced DNA damage in peripheral lymphocytes with single cell gelelectrophoresis

HONG Cheng-jiao, WANG Jing, TONG Jian

(Department of Radiation Medicine, Suzhou Medical College, Suzhou 215007, China)

Abstract Objective To study radiation-induced DNA damage in peripheral lymphocytes. **Methods** Breakage of single strand DNA in mice exposed to γ -ray and in workers engaged in flaw-detection and exposed to X-ray was detected with single cell gel electrophoresis (SCGE). **Results** Comet percentage in peripheral lymphocytes increased in mice exposed to 0.5 Gy and 5.0 Gy γ -ray, significantly higher than that in controls. Also, comet percentage increased in workers engaged in flaw detection and exposed to X-ray. **Conclusion** It suggests that single strand DNA breakage detected by SCGE can be used as an early biological indicator reflecting radiation effect on health.

Key words: Single cell gel electrophoresis; Ionizing radiation; Lymphocyte; Single strand DNA breakage

电离辐射往往是通过损伤 DNA 而诱发细胞突变和癌变。近年来由 Singh 等改进和建立的单细胞凝胶电泳试验 (single cell microgel electrophoresis, SCGE), 俗称“彗星”试验 (Comet assay), 是一种检测哺乳动物细胞 DNA 断裂的新技术^[1,2]。该技术已广泛应用于放射生物学、遗传毒理学、生物监测及细胞凋亡等领域的研究。本文应用 SCGE 检测了受 γ 射线照射后小鼠及从事 X 射线探伤工人的外周血淋巴细胞 DNA 单链断裂 (DNA_{ssb}) 的情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物及照射

雄性昆明系小鼠由苏州医学院实验动物中心提供, 6~7 周龄, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 用 Co-60 外照射治疗机全身照射小鼠。球靶距 70cm, 照射剂量 0.5 和 5.0 Gy, 剂量率为 90.3 cGy/min。

1.2 调查对象

选择从事 X 射线探伤的工人 18 名, 采集静脉血 0.5~1ml 肝素抗凝, 以非 X 射线接触者 20 名为对照组。

1.3 外周血淋巴细胞分离

取静脉血 0.5~1ml 肝素抗凝, 沿离心管加在等体积淋巴细胞分离液面上, 3 500r/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, 1 500r/min 离心 8min, 如此重复洗涤 2 次, 再将细胞悬于 PBS, 置 4℃待用。

1.4 单细胞凝胶电泳试验

参照 Singh 等^[2]的方法, 简述如下: (1) 正常熔点琼脂 (0.5%) 85 μ l 均匀铺在磨砂载玻片上, 吸取 75 μ l 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 (含 10% DMSO, 1% Triton X-100) 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

收稿日期: 1999-10-20

作者简介: 洪承皎 (1966—), 女, 江苏苏州人, 主管技师。

电泳条件下电泳 20min; (4) 用 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 中和 3 次后加 100 μ l 溴乙锭 (2 μ g/ml) 染色, 盖上盖玻片在荧光显微镜下观察计数彗星细胞的百分率, 每份样品计数 200 个细胞。

2 结果

2.1 X 射线探伤工人调查结果

从事 X 射线探伤的工人, 年龄 27~58 岁, 平均 (42.1 $\pm$ 8.4) 岁, 职业工龄 3~18 年, 平均 (13.4 $\pm$ 7.9) 年。人均累积剂量当量 (0.69 $\pm$ 0.35) Sv, 人均年剂量当量 0.05Sv $\cdot$ a $^{-1}$ 。

2.2 γ 射线照射后小鼠淋巴细胞 DNA 的改变

由表 1 可见, 0.5Gy 和 5.0Gy 的 γ 射线照射组小鼠, 淋巴细胞彗星百分率显著高于对照组。经统计学处理, 差异有高度显著性。

表 1 γ 射线照射后小鼠淋巴细胞彗星百分率的改变 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	彗星百分率
对照组	10	1.00 $\pm$ 0.10
0.5Gy	10	9.00 $\pm$ 2.34 **
5.0Gy	10	28.30 $\pm$ 4.82 **

** 与对照组相比, $P<0.01$ 。

2.3 X 射线探伤工人淋巴细胞 DNA 的改变

由表 2 可见, 从事 X 射线探伤工人的淋巴细胞彗星百分率显著高于对照组。经统计学处理, 差异有高度显著性。

表 2 X 射线探伤工人淋巴细胞彗星百分率的改变 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	彗星百分率
对照组	20	0
X 射线探伤组	18	3.9 $\pm$ 2.16 **

** 与对照组相比, $P<0.01$ 。

3 讨论

DNA 链断裂的检测是研究 DNA 辐射损伤的方法之一。早期建立的检测方法很多 (如速度沉降法、羟基磷灰石柱层析分析法、中性膜洗脱法等)。这些方法灵敏度低, 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^[3]。而 SCGE 是在核酸沉淀法 (Nucleoid Sedimentation) 和晕圈分析 (Holo 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, 它具有如下的优点^[4,5]: (1) 在单细胞水平上的检测技术, SCGE 能够对单个细胞的 DNA 损伤进行研究, 避免了只能对细胞群体的 DNA 改变进行检测的不足; (2) 适用范围广, 可检测各种类型组织细胞, 不仅适用于静止状态的细胞, 且对 T 和 B 淋巴细胞均敏感, 不像 SCE 试验仅对 T 淋巴细胞, 微核试验仅对 B 淋巴细胞敏感; (3) 简便经济快速, 所需样品细胞数目少 (<10 000 个), 无需放射性核素, 检测时间短, 步骤较为简单, 花费甚少; (4) 敏感性高, 它可检出 0.1 个 DNA 断裂/10⁹ 道尔顿, 比 SCE 和 UDS 试验具有更高的灵敏性。

辐射致淋巴细胞 DNA 损伤、功能障碍在体内和体外实验及人群资料中均得到证实^[6,7]。本研究发现, γ 射线照射后小鼠淋巴细胞彗星百分率显著增加, 从事 X 射线探伤工人的淋巴细胞彗星百分率也显著增加。这表明 SCGE 可以灵敏地检测 DNA 损伤 (包括射线对工人细胞的 DNA 损伤), 从而为现场调查提供方便的检测指标。近来有人结合应用核酸酶 (或 FPG, UVC, UVB, UVA) 测定了 DNA 分子中嘧啶 (或嘌呤等) 位置的氧化损伤^[8]。可见, SCGE 检测的 DNA 损伤可作为射线对健康影响的早期生物学指标。

参考文献:

- [1] Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984, 123 (1): 291.
- [2] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cell Res, 1988, 175: 184.
- [3] Akpa TC, Weber KJ, Schneider E, et al. Heavy ion-induced DNA double-strand breaks in yeast [J]. Int J Radiat Biol, 1992, 62: 279.
- [4] Kennelly JC, Lane MP, Barker JA, et al. Genotoxic activity of 1-chloromethylpyrene in stomach epithelium in vivo: insensitivity of the stomach scintillation UDS assay [J]. Carcinogenesis, 1993, 14 (4): 637.
- [5] Lankinen MH, Vilpo LM, Vilpo JA. UV- and gamma-irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes [J]. Mutat Res, 1996, 352: 31.
- [6] Vijayalaxmi, Tice RR, Strauss GHS. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique [J]. Mutat Res, 1992, 271: 243.
- [7] Betti C, Davini RT, Giannesi L, et al. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects [J]. Mutat Res, 1994, 307: 232.
- [8] Alapetite C, Wachter T, Sage E, et al. Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and gamma-rays [J]. Int J Radiat Biol, 1996, 69: 359.