

彗星分析法检测 γ 射线诱导的 人肝癌细胞 DNA 链断裂

王菊芳 何 静 周光明 李文建 卫增泉

(中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

高清祥

(兰州大学 兰州 730000)

摘要 以人肝癌 SMMC-7721 细胞为材料,用彗星分析法研究了 γ 射线诱导的 DNA 链断裂,结果表明,随着剂量的增加,彗尾逐渐变长,彗尾的细胞数也越来越多,彗尾与彗头的长度比和面积比与剂量成线性正相关,尤以长度比随剂量的增加变化为明显,可反映 γ 射线诱导的 DNA 链断裂程度。

关键词 彗星分析, γ 射线, 人肝癌细胞, DNA 链断裂

中图分类号 Q691

电离辐射能对细胞产生多种损伤,如 DNA 单、双链的断裂,蛋白质交联以及碱基、糖基的破坏。目前已有许多方法可检测辐射造成的 DNA 损伤,如染色体畸变分析、微核试验,在碱性条件下解旋测 DNA 单链的断裂,可灵敏地检测出小至 0.05Gy 的剂量造成的损伤。但这些方法需要大量的细胞,而且反映的是整个细胞群的平均结果^[1]。

Ostling 和 Johanson^[2] 在 1984 年创建了一种检测单细胞 DNA 链断裂的方法,他们将少量经 γ 射线照射过的细胞包埋于薄层琼脂糖中,裂解后加电场电泳,用亲和 DNA 的荧光染料染色,在荧光显微镜下观察到断裂的 DNA 片段从大到小由细胞核向外扩散迁移,就象彗星一样,故称为彗星分析(Comet Assay),以后又有不少学者对这种方法进行了改善,包括裂解条件、染料选择、成像分析等。由于该法反映的是单个细胞 DNA 链断裂的情况,因此可用来观测是否所有的细胞受到同等程度的损伤和表现出同等的修复效率,这是其它方法所不能比拟的,因而在生物学和医学中的应用正日益受到重视。

本工作以人肝癌细胞为材料,用彗星分析法探讨了 γ 射线对培养的肿瘤细胞 DNA 链断裂的影响,并就彗星分析中彗星的测量方法及其应用作了一些讨论。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和辐照

人肝癌 SMMC-7721 细胞,购自中国医学科学院肿瘤研究所。培养基为含 10% 小牛血清的 RPMI-1640(GIBCO 产品)培养液,每 2—3 天消化传代一次,培养条件为 5% CO_2 培养箱 37℃。

中国科学院“西部之光”资助项目(XB980604)

第一作者:王菊芳,女,1967 年 11 月出生,1990 年毕业于兰州大学,现从事放射生物学工作,助研

收稿日期:1999-10-14,修回日期:2000-01-20

选取细胞密度适宜的培养瓶,吸掉培养基,加入少量无菌 PBS 缓冲液,应用 ^{60}Co γ 射线照射,剂量为 10、20、40Gy,另设一组未照射细胞为对照组。

1.2 单细胞电泳和荧光观测

细胞经照射后立即用胰酶进行消化、离心、洗涤收集,并用 PBS 缓冲液调整细胞浓度为 2×10^5 个细胞/mL,1 份细胞悬液加 3 份 1% 低熔点琼脂糖在 37℃ 混合,涂在干净的载玻片上,晾干后用 0.03mol/L NaOH 加 1mol/L NaCl 的裂解液裂解 1h,常温水洗 1h 另 1 份细胞在照射后换培养基继续培养 24h,然后用同样的方法制片研究 DNA 的修复。在含 40mmol/L Tris、5mmol/L EDTA、2mmol/L HAc、pH8.3 的电泳缓冲液中电泳 1h,电压 100V。

电泳结束后,用 0.01% 丫啶橙将薄层琼脂染色 15min,水洗后盖上盖玻片,在荧光显微镜下用 B 激发、525 阻断滤光片观察,并用 27° 高速感光胶卷拍照,每个剂量随机拍照 20—30 个细胞,冲卷后在放大机上测量,圆形部分为彗头,面积按圆形计算,彗尾长度为彗头圆周到彗尾末端的长度,彗尾面积根据实际情况按矩形或锥形计算,结果以彗尾长/彗头直径(T/H)和彗尾面积/彗头面积(S_t/S_h)的平均值计算,并计算标准误差。

2 结果和讨论

彗星分析中的彗头是细胞核,主要是未断裂的分子量较大的 DNA 片断,彗尾是由细胞核电泳出的 DNA 片段形成,分子量越小的 DNA,迁移的距离就越远。图 1 给出了细胞受 10、20、40Gy γ 射线辐照和未受辐照样品的彗星分析照片。从图 1 可以看出,未经照射的对照样品,彗头相对大而几乎没有彗尾,随着剂量增大,彗尾变得相对较长,而更主要的是出现彗尾的细胞数越来越多。尽管不经处理的细胞不应出现彗尾,但实际上有的细胞仍然出现了彗尾,这主要是因为肿瘤细胞本身具有不少无着丝粒碎片和断裂的单体,这是肿瘤细胞继发的赘生现象^[3]。

早已发现,电泳后彗头释放的 DNA 量是辐照剂量的函数。彗尾长/彗头直径(T/H)和彗尾面积/彗头面积(S_t/S_h)的大小可以反映细胞受照后 DNA 的损伤程度,彗尾越长,面积越大,受损越严重。我们的实验结果表明,彗尾与彗头的长度比(T/H)和面积比(S_t/S_h)与剂量均成良好的线性关系(图 2),且为正相关,它们的相关系数 r 分别为 0.974 和 0.961, p 分别为 0.026 和 0.039,可以看出,长度比与剂量的正相关性好于面积比,置信限也小于面积比,因此长度比较面积比能更好地反映 DNA 受损的程度。除这两种方法以外,近年来有人用尾矩(tail moment)表示 DNA 的损伤程度,它由彗尾 DNA 含量和尾长的乘积决定,能更准确更灵敏地反映出细胞核释放的 DNA 的量和大小,这种方法需要摄像机、计算机等,比起前面所说的方法在仪器上要复杂一些^[4]。在没有条件测量尾矩时, T/H 法仍不失为一种简便有效的方法。

图 3 给出了细胞受辐照后没有经过修复和修复 24h 后的彗尾与彗头长度比结果。从图 3 可以看出,照射剂量为 10Gy 时,细胞修复 24h 后彗尾与彗头的长度比明显增加,在制好的片子上,可以看到具有彗尾的细胞逐渐增多,彗尾变长,表明射线对细胞造成的损伤在细胞的分裂增殖中增加,而照射剂量为 20 和 40Gy 时,细胞经修复后彗尾与彗头的长度比反而明显降低,这可能是大剂量的辐射给细胞造成了严重损伤,使细胞死亡解体的缘故,在片子上只能看到许多发荧光的碎片,而很少看到其彗尾的细胞。因此,彗星分析法在较小剂量范围内可用来评估细胞受辐射后 DNA 的修复,在较大剂量范围内则不适宜。彗尾与彗头的面积比结果在修复 24h 后表现出同样的趋势。

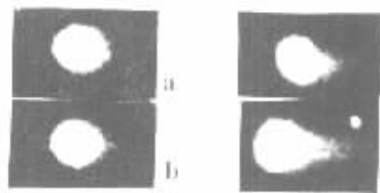


图 1 用荧光显微镜拍摄的 SMMC - 7721 细胞受 0(a), 10(b), 20(c), 40(d) Gy γ 射线照射的彗星分析照片

Fig.1 Fluorescence photomicrographs of comets of SMMC - 7721 cells exposed to 0(a), 10(b), 20(c) and 40(d) Gy γ - ray

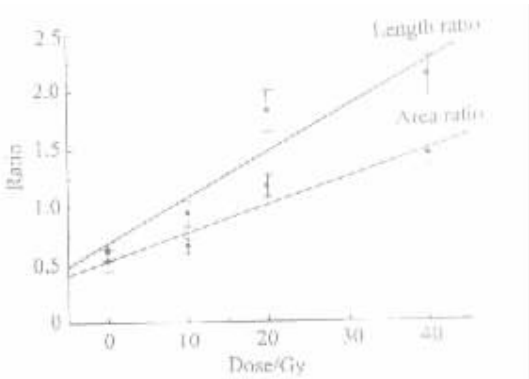


图 2 SMMC - 7721 细胞受 γ 射线辐照后彗星分析中长度比和面积比与剂量的效应关系

Fig.2 The dose responses of ratios of length and area in SMMC - 7721 cells by Comet Assay after irradiation of γ - ray

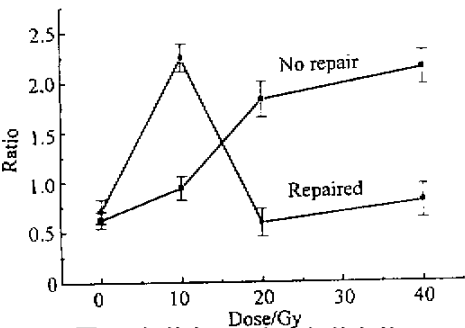


图 3 经修复 24h 和未经修复的 SMMC - 7721 细胞在彗星分析中长度比与剂量的效应关系

Fig.3 The dose responses of ratio of length in SMMC - 7721 cells by Comet Assay after repairing 0 and 24h

彗星分析能观测到单个细胞受电离辐射后 DNA 的损伤程度,具有所需样品少、简便、快速的特点,而且对处于细胞周期各时相的细胞同样敏感,能检测出细胞群中单个细胞 DNA 损伤与修复的差异,因此,这种方法对研究 DNA 的损伤与修复、肿瘤治疗方案优化和疗效是一种好的手段。

大多数人类和鼠类细胞都适用于彗星分析,如淋巴细胞、成纤维细胞、肝细胞、肾细胞及癌细胞,因此这种方法不仅可以用来评估辐射对细胞造成的 DNA 链损伤,还可用来分析有毒的化学试剂、活性自由基等对细胞 DNA 链的损伤^[5]。由于彗星分析检测的是单细胞 DNA 链的断裂,因此可以用来观察细胞凋亡。凋亡是细胞在生物体发育中在一定诱导条件下受指令发生的程序化事件,并最终自我消亡的生命活动^[6]。凋亡的细胞含有大量的核碎片,电泳后大多数 DNA 碎片都从细胞核泳动出来,只剩一个很小的核,因此很容易与其它细胞区分开来^[1]。癌症患者在放疗和化疗的过程中,肿瘤细胞原有的分裂和凋亡关系被改变,凋亡细胞显著增多,肿瘤生长速度明显减慢,因此,监测凋亡细胞能很好地反映放疗和化疗的疗效。

参 考 文 献

1 Olive P L, Banath J P, Durand R E. Radiat Res, 1990, 122(1) 36—90

- 2 Ostling O, Johanson K J. *Int J Radiat Biol*, 1987, **52**(6) 583—691
- 3 董荣春,周荣华,吕发度,等. *第二军医大学学报*, 1980, (1) 5—9
DONG Rongchun, ZHOU Ronghua, LU Fadu, *et al.* *J Secon Milit Med Univ*, 1980, (1) 5—9
- 4 Olive P L, Frazer G, Banath J P. *Radiat Res*, 1993, **136**(1) 130—136
- 5 Fairbairn D W, Olive P L. *Mutat Res*, 1995, **339**(1) 37—59
- 6 鲁润龙. *细胞生存、死亡与癌变*. 合肥:中国科学技术大学出版社, 1996. 128
LU Ruanlong. *The life, death and oncology of cells*. Hefei: Chinese Scientific and Technical University Press, 1996. 128

DNA strand breakage of human hepatoma cells induced by γ - ray measured using the Comet Assay

WANG Jufang HE Jing ZHOU Guangming LI Wenjian WEI Zengquan

(*Institute of Modern Physics, the Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000*)

GAO Qingxiang

(*Lanzhou University, Lanzhou 730000*)

Abstract

In this paper, DNA strand breakage induced by γ - ray was studied using the Comet Assay. The human hepatoma cells were chosen as the test cell line. The results showed that the length of the tail appeared longer as the dose increased, and the number of cells with tail, increased with increasing dose. The length ratio and area ratio had positive correlation with the dose. Among them, the length ratio showed more obvious change with the increasing dose than area ratio, thus it could be used to describe the level of DNA strand breakage simply and efficiently.

Key words Comet Assay, γ - ray, Human hepatoma cell, DNA strand breakage

CLC Q691

本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和‘中国期刊网’的声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和‘中国期刊网’。作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意将文章编入数据库,请来稿时声明,本刊将做适当处理。

《核技术》

《辐射研究与辐射工艺学报》 联合编辑部

《Nuclear Science and Techniques》