

Res, 1999, 152: 225-231.

- [17] Schmidt-Ullrich RK, Valerie K, Fogleman PB, et al. Radiation-induced autophosphorylation of epidermal growth factor receptor in human malignant mammary and squamous epithelial cells [J]. Radiat Res, 1996, 145: 81-85.
- [18] Canman E and Kastan M B. Three paths to stress relief [J]. Nature, 1996, 384: 213-214.
- [19] Porten CS, Wilson JW, Booth C, et al. Regulation and significance of apoptosis in the stem cell of the gastrointestinal epithelium [J]. Stem Cell, 1997, 15: 87-93.
- [20] Zhan Q, Alamo L, Yu K, et al. The apoptosis-associated γ -ray response of Bcl-X₁ depends on normal p53 function [J]. Oncogene, 1996, 13: 2287-2293.

- [21] Mothersill C, Omaney J, Harney J, et al. Further investigation of the response of human uroepithelium to low dose of Cobalt-60 gamma rays [J]. Radiat Res, 1997, 147: 156-165.
- [22] Harney J, Nurphy D, Jones M, et al. p53 expression in urothelium from normal and tumor bearing patients [J]. Br J Cancer, 1995, 71: 25-29.
- [23] Ohnishi T, Wang X, Takahashi A, et al. Low-dose-rate radiation attenuates the response of the tumor suppressor TP53 [J]. Radiat Res, 1999, 151: 367-372.
- [24] Colucci S, Mothersill C, Harney J, et al. Induction of multiple PCR-SSCPE mobility shifts in p53 exons in cultures of normal human urothelium exposed to low-dose radiation [J]. Int J Radiat Biol, 1997, 72(1): 21-23.

Stimulative effects of low dose radiation and their mechanism

LU Dui-cai

(School of Nuclear Medicine Su Zhou University, Su Zhou JiangSu 215007, China)

Abstract Studies related to stimulative effects of low dose radiation began in the late 1970s. In recent years, these studies have focused on the mechanism of the stimulation through low-dose-radiation induced proteins and gene regulation. This review consists two parts: epidemiological studies and radiobiological studies of stimulative effects of low dose radiation and their mechanism.

Key words low dose radiation; stimulative effects; high background radiation area; occupational irradiation; immunity enhancing effect; low-dose-radiation induced proteins; gene regulation

文章编号: 1001-098X(2000)06-0281-04

单细胞凝胶电泳在放射医学中的应用

洪承皎, 张军宁

(苏州大学核医学院, 苏州 215007)

摘要: 单细胞凝胶电泳是一种在单细胞水平检测哺乳类有核细胞 DNA断裂的新技术。本文着重介绍了该技术在 DNA辐射损伤、辐射致突变致癌分子机制、自由基清除与辐射效应阻断药物、辐射剂量估算、肿瘤放射敏感性的预测、辐射诱发细胞凋亡的研究中的应用进展。

关键词: 单细胞凝胶电泳; DNA损伤; 电离辐射

中图分类号: R818.03

文献标识码: A

收稿日期: 1999-06-21

作者简介: ①洪承皎(1966-),女,江苏苏州人,苏州大学核医学主管技师。

②张军宁(1966-),男,陕西耀县人,苏州大学附属第一医院博士研究生,主要从事肿瘤放射治疗的基础及临床研究。

审校者: ①苏州大学核医学院 童建

②苏州大学核医学院 王崇道

单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE)技术,又称彗星试验(comet assay)或微凝胶电泳(microgel electrophoresis, MGE),它是在核酸沉淀法(nucleoid sedimentation)和晕圈分析(halo 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

起来的一种在单细胞水平检测哺乳类有核细胞 DNA 断裂的新技术。它主要包括 Olive PL 等在 1984 年建立的测定 DNA 双链断裂 (dsb) 的中性微凝胶电泳技术和 Singh NP 等在 1988 年建立的测定 DNA 单链断裂 (ssb) 的碱性微凝胶电泳技术。

SCGE 的确切检测机制目前尚不清楚。一般认为,细胞核中的 DNA 为负超螺旋结构,如果有去污剂进入细胞, DNA 双股链结构打开,单股链上断裂碎片即可释放出来,在电泳时 DNA 碎片移向阳极,荧光染色之后可在荧光显微镜下观察到尾部朝向阳极有彗星样影像,彗尾的长度、面积、DNA 含量(荧光强度)等与 DNA 断裂的频率有关。

该方法简便、快速和灵敏,与以往的 DNA 断裂检测技术相比,具有明显的优势:所需样品细胞数目少 (< 10 000 个),无需放射性核素,操作较为简单,数小时即可出结果,费用甚少;适用范围广,凡能制成单细胞悬液的哺乳类细胞(包括静止状态的细胞),均可进行 DNA 损伤的实验研究,尤其对 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞均很敏感,不像姐妹染色单体交换 (SCE) 试验仅限于 T 细胞,微核试验仅限于 B 细胞^[1];它能够对单个细胞进行 DNA 损伤研究,从而避免了只能对细胞群体的 DNA 改变进行检测的不足^[2];比 SCE 和非程序性 DNA 合成 (UDS) 试验具有更高的敏感性,它可检出 0.1 个 DNA 断裂 / 10⁹ 分子,甚至可检测到自然光照射体外淋巴细胞 1h 所引起的 DNA 损伤, SCGE 与 ³²P 后标记 DNA 加合物检测法的灵敏度一致,并被认为是检测低水平辐射 (0.05 Gy) 所致损害的快速敏感方法^[1]。近来,该技术已广泛用于放射生物学、遗传毒理学、生物监测、癌症化疗和放疗敏感性的预测、衰老学及细胞凋亡等领域的研究。本文着重介绍该技术在放射医学领域中的应用进展。

1 SCGE 在 DNA 辐射损伤研究中的应用

DNA 链断裂特别是双链断裂的检测方法是研究 DNA 辐射损伤的一个关键技术。SCGE 不仅能检测 DNA 链断裂损伤,分析 DNA 断链的重接 (rejoining of breaks) 或修复,而且如能结合核酸酶 (或荧光-姬姆萨染色,长、中、短波紫外线) 的运用还可以测定 DNA 嘧啶 (或嘌呤等) 位置的氧化损伤^[3]。另外, SCGE 能够对单个细胞的 DNA 损伤进

行检测,从而解决了细胞在辐射反应中的异型性 (heterogeneity) 问题。近年来由于科学家对电离辐射引起的细胞致死的分子机制日益重视,越来越多的研究将转向 DNA 的损伤,尤其是 DNA dsb 及与终点效应的关系,随着分子辐射生物学研究的不断深入,有关 DNA 的辐射损伤与修复、低剂量照射刺激性效应和适应性反应的分子学机制的研究已成为当前研究热点之一。用 SCGE 分析不同细胞周期亚群的修复发现, G₁ 期细胞能较快地修复 DNA ssb, S 期细胞 DNA ssb 的修复则比较缓慢。Wojewodzka 等^[4]应用 SCGE 研究发现, CD-38 抗体能阻止 X 射线诱导的人淋巴细胞的适应性反应。Wojcik 等^[5]应用 SCGE 研究适应性反应的分子学机制发现, X 射线诱导的人淋巴细胞的适应性反应可能由染色体损伤的修复引导。其次,由于 DNA 双链断裂与辐射敏感性密切相关, SCGE 已在或将在当前的通过修饰 DNA 修复过程而改变辐射敏感性的研究中得到广泛应用。

2 SCGE 在辐射致突致癌分子机制中的应用

DNA 损伤导致的诱变、致癌效应是遗传毒性的长期效应。SCGE 是一种评价遗传毒性损害的非常敏感的方法,可在组织培养细胞及悬浮培养的原代细胞中进行 DNA 损伤诱导,在体内外均可用此法进行遗传毒性检测,以探讨照射剂量与辐射诱发的遗传效应的关系。辐射诱发的遗传效应主要包括体细胞的遗传效应和生殖细胞的遗传效应,诱发突变的程度及类型取决于 DNA 链断裂的修复情况。许多学者应用 SCGE 技术检测了犬全身照射后骨髓细胞的 DNA 损伤, Hughes 等^[6]应用 SCGE 观察了辐射对雄性犬睾丸不同发育阶段的生殖细胞 DNA 损伤的情况, Wojcik 等^[5]还应用 SCGE 研究了辐射诱发 DNA 损伤与染色体畸变的关系。近来, SCGE 在辐射致癌“始动-促进-发展”多阶段发生实验及其生物学机制的研究中也得到广泛应用,并有可能成为检出辐射高敏感人群的方法之一。

3 SCGE 在自由基清除与辐射效应阻断药物研究中的应用

DNA 是射线作用的靶, DNA 链断裂则是电离辐射直接损伤和间接作用中产生的自由基损伤的综

合。SCGE技术可以测定自由基清除剂(或辐射效应阻断药物)使用后DNA链断裂情况,并为对药效的评价提供了可行的方法^[7]。与传统的电子自旋顺磁共振谱(ESR)和脉冲辐解技术相比,简单、经济,易在国内推广使用。

4 SCGE在辐射剂量估算中的应用

准确估算受照者的吸收剂量,对于放射损伤的诊断和事故处理等至关重要。估算剂量除应用物理检测系统外,生物剂量测定也是一个重要方面。染色体畸变分析、胞质分裂阻滞法微核分析为传统可靠的生物剂量计,但不足之处是畸变分析需要丰富的经验和熟练的技巧,也较费时间,剂量超过5Gy时,只有少数的淋巴细胞进入有丝分裂期,剂量大于8Gy时,剂量效应曲线往往趋于饱和;胞质分裂阻滞法微核分析时,微核不像双着丝粒体对电离辐射那么敏感、特异,且自发率较高,约1%~2%,估算剂量的下限值的不确定度较高。但是DNA损伤和可见的染色体畸变之间存在着密切的联系:凡是增加染色体畸变率的因素均具有损伤DNA和干扰DNA合成能力的倾向;错误的或不完整的DNA损伤的修复是染色体畸变的主要原因。Kent等^[8]用SCGE检测了CHO-K1细胞的DNA损伤,发现慧星的长度与照射剂量之间有良好的线性关系。离体照射实验表明,应用SCGE检测淋巴细胞在0.05~5.0Gy范围内慧星的长度随照射剂量加大而增加,符合线性平方方程^[9~11]。鉴于SCGE可探测低水平辐射(0.05Gy)所致损害,因此SCGE有望成为新一代生物剂量计。

5 肿瘤辐射敏感性的预测

早在1968年,Alexander就提出了细胞辐射敏感性取决于其DNA断裂修复能力的概念。近年来,快速发展的分子生物学则越来越证明,DNA损伤(包括dsb,ssb,碱基损伤和蛋白交联),尤其是dsb的损伤和修复与辐射敏感性密切相关。多数辐射敏感细胞株具有dsb修复缺陷,许多人肿瘤细胞株的辐射敏感性更与dsb修复有关。SCGE通过对细胞照射后在37℃的环境下孵育一段时间和不孵育的结果进行比较来检测细胞系的修复功能,便可以对肿瘤细胞株的辐射敏感性作出预测。Muller等^[12]用

慧星试验发现,肿瘤细胞株PECA4197与MeWo辐射敏感性的差异主要来源于前者的修复快于后者。Olive等也应用慧星试验比较了不同辐射敏感性肿瘤细胞株的损伤和修复情况,还观察到六株人肿瘤细胞株的辐射敏感性与dsb的损伤和修复无关^[13]。所以,辐射敏感性的问题相当复杂,有待于进一步探讨。另外,慧星试验可用于肿瘤敏感或抵抗细胞亚群的检测,为放疗方案的制定、放疗疗效的评估提供依据。Olive等^[14,15]已成功地建立了通过照射或RB-6145处理测定乏氧细胞的方法。

6 辐射诱发的细胞凋亡的研究

细胞凋亡的过程是先出现DNA较大分子量的链断裂,继而导致限制性内切酶的活化,引起DNA在核小体间断裂和核小体的碎裂。慧星试验则以核小体碎裂形成的DNA断片的大小为终点来评估细胞凋亡,因为凋亡细胞的DNA断片是DNA链断裂的特征性产物。电泳时,DNA的广泛降解使大部分DNA断片从慧星头部移出,从而很容易从损伤细胞中将其鉴别出^[16]。Humar等^[17]采用慧星试验观察了运动失调性毛细血管扩张症患者的原始淋巴细胞的p53非依赖性凋亡与其辐射敏感性和免疫缺陷的关系。Hu等^[18]则采用此法研究了不同剂量率照射后中国仓鼠卵巢细胞的辐射敏感性、凋亡及dsb的修复,他们均发现这种试验比标准流动计数方法能更快地探测出凋亡细胞的高断片。

7 小结

单细胞凝胶电泳在辐射研究领域中具有极高的实用价值和十分广阔的应用前景,但该方法仍有待完善之处:①该检测方法的确切理论基础、生物学机制尚不很清楚;②该方法用台盼兰染色测定细胞的存活率,此法虽然简单,但不能指出细胞的代谢状况,需寻找新的方法替代;③SCGE测试程序有待于标准化;④如能发展适于光学显微镜分析的SCGE,将使该方法的普及成为现实。

参考文献:

- [1] Kennelly JC, Lane MP, Barker JA, et al. Genotoxic activity of 1-chloromethyl-pyrene in stomach epithelium *in vivo* insensitivity of the stomach scintillation UDS assay [J]. *Carcinogenesis*, 1993, 14

- 637-640.
- [2] 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: 31-38.
- [3] Alapetite C, Wachter T, Sage E, et al. Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UV C, UVB, UVA and gamma-rays [J]. *Int J Radiat Biol*, 1996, 69: 359-369.
- [4] Wojewodzka M, Kruszewski M, Szumiel I. Anti-CD38 prevents the development of the adaptive response induced by X-rays in human lymphocytes [J]. *Mutagenesis*, 1996, 11: 593-596.
- [5] Wojcik A, Sauer C, Zolzer F, et al. Analysis of DNA damage recovery processes in the adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes [J]. *Mutagenesis*, 1996, 11: 291-297.
- [6] Hughes CM, Lewis SE, McKelvey Martin VJ, et al. The effects of antioxidant supplementation during percoll preparation on human sperm DNA integrity [J]. *Hum Reprod*, 1988, 13: 1240-1247.
- [7] Zheng H, Olive PL. Reduction of tumor hypoxia and inhibition of DNA repair by nicotinamide after irradiation of SCCV II murine tumors and normal tissues [J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 2801-2808.
- [8] Kent CR, Eady JJ, Ross GM, et al. The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay [J]. *Int J Radiat Biol*, 1995, 67: 655-660.
- [9] Plappert U, Raddatz K, Roth S, et al. DNA-damage detection in man after radiation exposure- the comet assay- its possible application for human biomonitoring [J]. *Stem Cells Dayt*, 1995, 13: 215-222.
- [10] Kruszewski M, Wojewodzka M, Iwanenko T, et al. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. II. Base damage [J]. *Mutat Res*, 1998, 416: 37-57.
- [11] Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, et al. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. Strand breakage [J]. *Mutat Res*, 1998, 416: 21-35.
- [12] Muller WU, Bauch T, Streffer C, et al. Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumour cell lines [J]. *Int J Radiat Biol*, 1994, 65: 315-319.
- [13] Olive PL, Banath JP, MacPhail HS, et al. Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumour cell lines [J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 3939-3946.
- [14] Olive PL, Horsman MR, Grau C, et al. Detection of hypoxic cells in a C3H mouse mammary carcinoma using the comet assay [J]. *Br J Cancer*, 1997, 76: 694-699.
- [15] Olive PL. Detection of hypoxia by measurement of DNA damage in individual cells from spheroids and murine tumours exposed to bioreductive drugs. I. Tirapazamine [J]. *Br J Cancer*, 1995, 71: 529-536.
- [16] Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review [J]. *Mutat Res*, 1995, 339: 37-59.
- [17] Humar B, Muller H, Scott RJ. Elevated frequency of p53-independent apoptosis irradiation increases levels of DNA breaks in ataxia telangiectasia lymphoblasts [J]. *Int J Radiat Biol*, 1997, 72: 257-269.
- [18] Hu Q, Hill RP. Radiosensitivity, apoptosis and repair of DNA double-strand breaks in radiation-sensitive Chinese hamster ovary cell mutants treated at different doses rates [J]. *Radiat Res*, 1996, 146: 636-645.

Applications of single cell gel electrophoresis assay in radiation research

HONG Cheng-jiao, ZHANG Jun-ming

(School of medicine, Suzhou university, Suzhou 215007, China)

Abstract The single cell gel electrophoresis (SCGE), also called comet assay, is a sensitive and rapid method for DNA damage detection in individual mammalian cell. Its use has increased significantly in the past few years. Applications in the field of radiation medicine are reviewed and possible future directions of the technique are briefly explored.

Key words single cell gel electrophoresis; DNA strand break; ionizing radiation