

- dionuclides. Federal Guidance Report No.13. EPA 402-R-99-001 [R]. Washington: EPA, 1999.
- 3 UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, Sources and Effects of Ionizing Radiation[R]. New York: United Nations, 2000.
 - 4 EPA. Health risks from low-level environmental exposure to radionuclides. Federal Guidance Report No.13[R]. Washington: EPA, 1998.
 - 5 NCRP. Evaluation of the reliability of biokinetic and dosimetric models and parameters used to assess individual doses for risk assessment purposes. NCRP Commentary No. 15[R]. Oxford: Pergamon Press, 1998.
 - 6 ICRP. International Commission on Radiological Protection, "1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection", ICRP Publication 60[R]. Oxford: Pergamon Press, 1991.
 - 7 ICRP. Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. Part 5. Compilation of ingestion and inhalation dose coefficients. ICRP Publication 72[R]. Oxford: Pergamon Press, 1996.
 - 8 EPA. Estimating radiogenic cancer risks, addendum: uncertainty analysis. 402-R-99-003[R], Washington: EPA, 1999.
 - 9 NCRP. Uncertainties in fatal cancer risk estimates used in radiation protection. NCRP Report No. 126[R]. Oxford: Pergamon Press, 1997.
 - 10 Little MP, Deltour I, Richardson S. Projection of cancer risks from the Japanese atomic bomb survivors to the England and Wales population taking into account uncertainty in risk parameters [J]. Radiat Environ Biophys, 2001, 40(3): 236.

(收稿日期: 2004-09-25)

文章编号: 1001-098X(2005)03-0126-04

SCGE 作为辐射生物剂量计的可行性研究

刘强 姜恩海 李进 唐卫生 王知权

摘要 单细胞凝胶电泳技术建立于 20 世纪 80 年代, 用于检测单个细胞的 DNA 损伤。放射生物学研究表明, 该技术可用于检测精子细胞、肿瘤细胞和淋巴细胞等哺乳动物细胞受照后的 DNA 损伤。近年来, 随着科学技术的不断进步, 各种有关软件的深层开发, 使得这一技术增添了许多新的内涵。尤其在照后早期, 较其他传统生物剂量学技术具有明显优势, 用于放射生物剂量学研究将有良好前景。

关键词 单细胞凝胶电泳; 电离辐射; DNA 损伤; 生物剂量计

中图分类号 Q503, R144.1

文献标识码 A

Study on the possibility of SCGE as radiation biological dosimeter

LIU Qiang, JIANG En-hai, LI Jin, TANG Wei-sheng, WANG Zhi-quan

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science and Pecking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

Abstract Single cell gel electrophoresis(SCGE), which has founded in 1980s, can detect the DNA injury in single cell. Studies on radiation biology has indicated that we can detect the DNA injury by SCGE in mammal cells such as sperm cell, tumor cell and lymphocyte after radiation. Recently, along with the rapid progress of technology, new software has been exploited, which adds much new meanings to this method. SCGE reveals a great future in study of radiation biological dosimetry and has more advantage than the other traditional methods, particularly at the early stage after radiation.

Key words single cell gel electrophoresis; ionization radiation; DNA injury; biological dosimeter

据 WHO 卫生官员 Turai I 等^[1]统计, 1944~2002 年间, 全球共有 134 人死于 420 起辐射事故, 因此事故后的剂量估算对于伤情判断及救治显得尤为重要。目前, 外照射在辐射事故中占有主要份额, 其剂量估算方法主要有 3 种: 物理、生物和

临床的方法^[2]。3 种估算方法各有优缺点, 但生物学方法更为人们关注。生物学方法是利用生物标本在电离辐射后留下的辐射特异性损伤, 根据实验中得到的剂量-效应曲线推断辐射剂量的方法。以往辐射事故中常用的生物剂量学方法包括染色体畸变法、微核测定法等, 但人们渴望找到一种更为快速、简便、灵敏的检测方法。

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院 中国协和医科大学放射医学研究所

单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE)是由 Ostling O 等于 1984 年首次提出,并利用该技术在中性条件下检测 γ 射线引起的 DNA 双链断裂。此后该技术已由多个实验室进行了改良,不仅可以检测 DNA 单、双链断裂,还可以用来检测碱性不稳定位点、DNA 交联、不完全切除修复位点等。1997 年, Santos SJ 等^[3]首次将 SCGE 技术与 DNA 荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)结合起来,为 SCGE 技术的应用开辟了新途径。2001 年, Nadin SB 等^[4]进一步改进了 SCGE 的染色方法,建立了银染法,提高了 DNA 分析的灵敏度,越是靠近电离辐射作用初始阶段的事件越能直接真实地反映吸收剂量。许多研究结果显示,用 SCGE 技术分析离体人外周血淋巴细胞照后的 DNA 损伤,拟合剂量效应曲线,有望在受照后早期快速准确地给出受照剂量,为伤员的医疗救护和放射医学防护工作提供理论依据。

1 技术原理

电离辐射等各种外界因子诱发细胞 DNA 断裂时, DNA 的超螺旋结构被破坏,在裂解液的作用下,细胞膜和核膜等膜结构受到破坏,细胞内的蛋白质和 RNA 等其他成分扩散到裂解液中,而核 DNA 由于分子质量太大只能留在原位,在中性条件下, DNA 片段可扩散入凝胶,而在碱性条件下, DNA 发生解螺旋,受损的 DNA 断链和片段被释放出来,由于这些 DNA 的相对分子质量很小,所以在电泳过程中离开核 DNA 向阳极迁移,荧光染色后受损部分形成彗星状图像,故 SCGE 又称“彗星试验(comet assay)”。彗尾的长短因 DNA 片段的大小而不同。

目前, SCGE 分析的主要指标包括形状指标(彗星细胞率)、距离指标(尾长、彗星全长)、强度指标(头 DNA 含量、尾 DNA 含量)和矩类指标(尾矩、Olive 尾矩)等。

2 SCGE 在放射医学中的应用

2.1 淋巴细胞

目前,国内外尚无以 SCGE 为基础的辐射生物剂量计,但已有人把 SCGE 技术用于检测辐射事故后的淋巴细胞 DNA 损伤。

人外周血淋巴细胞受 γ 射线照射后, DNA 链断

裂随受照剂量的增加而增加,细胞 DNA 迁移长度呈显著的剂量效应关系。对离体人淋巴细胞分不同剂量 γ 照射,用 SCGE 技术观察彗星细胞率和彗星尾长的剂量效应关系,得出 DNA 迁移长度(L)与照射剂量(D)呈明显正相关^[5],符合回归方程 $L=0.678+11.874D-1.065D^2$, ($r=0.99, P<0.01$)^[6]。比较离体人和鼠淋巴细胞经 γ 射线照后两者的剂量效应曲线发现,人淋巴细胞照后的剂量效应曲线为直线,而鼠更趋于 S 形^[7]。Singh NP^[8]用 0~0.25Gy(0~25rad)X 照射离体人淋巴细胞,分别检测 DNA 单链、双链断裂,结果发现 DNA 迁移长度与辐射剂量均呈直线模式, r^2 分别为 0.77 和 0.51, $P<0.05$,但其研究所用的辐射剂量范围较小。Plappert U 等^[9]的研究表明, SCGE 能有效测定 0.05~1Gy 照射所致的单细胞 DNA 单、双链断裂及碱基脆弱部位的断裂或损伤,作为生物剂量计具有良好应用前景。

SCGE 法观察淋巴细胞 DNA 损伤的影响因素较多,包括吸烟习惯、感染、空气污染及饮食习惯等,但是这些因素引起的 DNA 损伤绝大多数是以 DNA 碱基损伤、碱基丢失和 DNA 单链断裂的形式出现的^[10],而双链断裂相对较少见,说明 DNA 双链断裂较单链断裂更具有辐射损伤特异性。一般认为, DNA 双链断裂是证明引起体细胞和生殖细胞突变的细胞核临界损伤最恰当的指标。目前绝大多数研究是通过彗星长度或尾长来分析剂量效应关系,其不足之处是在较大剂量时曲线平台的出现,而 SCGE 得到的矩类指标(尾矩, Olive 尾矩)较尾长和彗星细胞率更灵敏和准确,即使剂量较大时也不会出现平台^[11],而且符合放射生物剂量学指标应具备的条件。Garaj-Vrhovac V 等^[12]在一次 ⁶⁰Co 辐射事故后(受照剂量当量 221mSv)检测受照者淋巴细胞 DNA 损伤,发现照后 1d~1a 不同阶段的彗星尾长和尾矩均明显高于对照者。Frenzilli G 等^[13]在切尔诺贝利事故 10 年后,采取当时受照的白俄罗斯儿童淋巴细胞,发现其 DNA 迁移长度仍明显大于对照组。上述结果表明, SCGE 适合于事故性照射后人体内的生物监测。

2.2 生殖细胞

Grant AH 等^[14]用 SCGE 方法观察小鼠睾丸照射后 45d 的精子细胞 DNA 损伤,得到剂量效应曲线, $y=6.8238x+2.4075$,并且发现受照后 120d,精子彗星尾矩仍明显大于对照组。Singh NP^[8]采用 0~1Gy X 线照射人精子细胞,用中性 SCGE 检测

DNA双链断裂,发现精子DNA迁移长度与照射剂量呈正相关, $r^2=0.94$ 。

2.3 与自动分析软件的结合应用

SCGE技术问世以来得到了广泛应用,其实验方法和实验条件更加完善,但是,多数研究仍依靠目镜测微尺人工测量彗星距离指标,主观性较强,人为误差较大,而且矩类指标更需要人工通过公式计算得出,使研究人员的工作量加大。因此,研究人员渴望开发出一种专用的彗星图像分析软件。近年来,各国研究机构纷纷推出各自的图像分析软件,这些分析软件可以快速提供一系列评价参数,如彗星总长、尾长、尾DNA含量、尾矩和Olive尾矩等,更好地客观定量DNA损伤。目前,用于彗星分析的软件包括英国Kinetic Imaging公司的Komet5.5、Perceptive Instruments公司的Comet Assay III、LAI公司的LACAAS,美国NIH的ImagJ、TriTek公司的CometScore™,印度原子能研究所^[7]的SCGE-Pro,奥地利癌症研究所^[15]开发的自动分析软件等。其中,部分软件可以到其相应网站下载,但最好与相应的彗星分析系统硬件设备配套使用,价格昂贵,提高了研究成本。新近研发的彗星分析软件(Comet Assay Software Project, CASP)^[16]很好地解决了这一问题,该软件可以在普通微机上运行,界面友好,使用方便,分析速度快,可以一次同时给出最多达13个指标,结果可以以文本文件直接输出,统计软件可以直接读取其输出结果,便于统计学分析,节省大量人力物力。

3 SCGE与其他方法的比较

3.1 与其他生物学指标比较

传统的染色体畸变法为生物剂量的估算树立了一座里程碑,此方法稳定、可靠,被人们广泛认可,但费时、费力,得出结果需要4~5d。Hartmann A等^[17]分别用染色体畸变和SCGE观察药物所致细胞遗传毒性效应,发现这两种方法具有高度一致性,而SCGE的操作程序明显简便和迅速。其他生物学方法包括微核检测、淋巴细胞下降速率等,这些方法至少需要2~4d的时间,而SCGE技术可在一日内得出结果。微核法检测的本底高,且波动范围大,最好与染色体畸变配合使用,且用时较长。He JL等^[18,19]用微核实验和SCGE对比观察X射线所致的遗传毒性效应,发现SCGE技

术的敏感性明显高于微核法。

3.2 SCGE的优点

放射生物学研究表明,细胞中的遗传物质DNA是电离辐射作用最重要的靶,DNA损伤发生的概率随照射剂量和靶体积的增大而增加。对于辐射所致DNA损伤的研究,SCGE技术较其他传统生物学技术有多种优势:①从单细胞水平上检测DNA原发损伤;②适用范围广:可检测多种类型的组织细胞,而且对T和B淋巴细胞均敏感;③简便、经济、快速:所需样品数量少(<0.2ml血样),无需放射性核素,检测时间短,步骤简单,花费甚少;④敏感性高:可检测到0.05Gy的低水平辐射,比传统生物剂量学技术具有更高的敏感性。

综上所述,SCGE技术目前被越来越多的人广泛关注,随着自动分析软件的问世^[7,15,16],使彗星图像分析更加省时、省力,避免了人为测量的误差,而且可测定多项指标,提高了检测的速度。更难能可贵的是,与传统且已被公认的细胞遗传学分析结果非常一致。目前,人们正在探寻新的生物剂量学终点,如细胞膜表面标志的改变、DNA大分子损伤的直接测定等,以建立新的生物剂量计。如果以人外周血淋巴细胞作为研究对象,用长度或矩类指标拟合剂量效应曲线,估算受照人员的生物剂量,可以为急性辐射事故的早期快速分类诊断及救治提供科学依据,该技术用于放射生物剂量学研究将会大有潜力。

参 考 文 献

- 1 Turai I, Veress K, Günalp B, et al. Medical response to radiation incidents and radionuclear threats[J]. *Biol Med J*, 2004, 328 (7439): 568-572.
- 2 Dainiak N, Waselenko JK, Armitage JO, et al. The Hematologist and radiation casualties [J]. *Hematology (Am Soc Hematol Educ program)*, 2003, 473-496.
- 3 Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT. Fluorescence in situ Hybridization with comets [J]. *Exp Cell Res*, 1997, 232(2): 407-411.
- 4 Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay[J]. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49(9): 1183-1186.
- 5 高建军, 丰盛梅, 顾淑珠, 等. 利用单细胞凝胶技术估算淋巴细胞受照剂量[J]. *复旦学报(医学版)*, 2004, 31(1): 69-70.
- 6 张连珍, 池翠萍. 应用单细胞凝胶电泳技术对辐射诱发人血淋巴细胞DNA损伤的研究[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1998, 16(2): 106-109.
- 7 Chaubey RC, Bhilwade HN, Rajagopalan R, et al. Gamma ray induced DNA damage in human and mouse leucocytes measured by SCGE-Pro: a software developed for automated image analysis and data processing for comet assay[J]. *Mutat Res*, 2001, 490(2): 187-197.
- 8 Singh NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA pro-

- tein crosslinks and apoptosis[J]. *Mutat Res*, 2000, 455: 111-127.
- 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*, 1995, 13(suppl1): 215-222.
 - 10 Marcon F, Andreoli C, Rossi S, et al. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population[J]. *Mutat Res*, 2003, 541(1-2): 1-8.
 - 11 Hellman B, Vaghef H, Bostrom B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay[J]. *Mutat Res*, 1995, 336(2): 123-131.
 - 12 Garaj-Vrhovac V, Kopjar N, Razem D, et al. Application of the alkaline comet assay in biodosimetry: assessment of in vivo DNA damage in human peripheral leukocytes after a gamma radiation incident[J]. *Radiat Prot Dosi*, 2002, 98(4): 407-416.
 - 13 Frenzilli G, Bosco E, Antonelli A, et al. DNA damage evaluated by alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) in children of chernobyl, 10 years after the disaster[J]. *Mutat Res*, 2001, 491(1-2): 139-149.
 - 14 Grant AH, Jolyon HH, Paul DC, et al. Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation[J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(3): 854-861.
 - 15 Helma C, Uhl M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel- electrophoresis comet assay[J]. *Mutat Res*, 2000, 466: 9-15.
 - 16 Konca K, Lankoff A, Banasik A, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay[J]. *Mutat Res*, 2003, 534: 15-20.
 - 17 Hartmann A, Plappert U, Poetter F, et al. Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test [J]. *Mutat Res*, 2003, 536: 27-38.
 - 18 He JL, Chen WL, Jin LF, 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]. *Mutat Res*, 2000, 469(2): 223-231.
 - 19 He JL, Chen WL, Jin LF, et al. Comet assay and cytokinesis-blocked micronucleus test for monitoring the genotoxic effects of X-ray radiation in humans[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2000, 113(10): 911-914.

(收稿日期: 2005-01-05)

文章编号: 1001-098X(2005)03-0129-03

环氧合酶-2 抑制剂及其辐射增敏效应

周乐源 周菊英

摘要 环氧合酶-2(COX-2)抑制剂因其广泛的预防和抑制肿瘤作用, 近年来得到人们的关注。COX-2 抑制剂与射线合并作用于肿瘤细胞时产生了辐射增敏现象, 增敏的机制可能是 COX-2 抑制剂改变了细胞周期分布, 抑制细胞的亚致死性损伤修复, 提高对辐射诱导凋亡易感性等。

关键词 环氧合酶-2; 辐射增敏; 肿瘤

中图分类号 R730.55 文献标识码 A

COX-2 inhibitors and enhancement of tumor radiosensitivity

ZHOU Le-yuan ZHOU Ju-ying

(Department of Radiation Oncology, The First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, China)

Abstract Cyclooxygenase-2(COX-2) inhibitors has recently received extensive attention for its role in prevention and inhibition of malignancies. COX-2 inhibitors are enhancers of tumor cells response to irradiation. The possible mechanisms consist of effect on cell cycle distribution, inhibition of repair from sublethal radiation damage, increasing susceptibility of cells to radiation-induced apoptosis.

Key Words cyclooxygenase-2 ; radiosensitization; tumor

1 COX-2

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸转化为前列腺素的限速酶, 存在 COX-1 和 COX-2 两种同功酶, 其中 COX-2 是一种诱导酶。通常, COX-2 在大多数正常细胞中不表达, 只参与炎症

和肿瘤的病理过程, 而在许多肿瘤如肺癌、乳腺癌、结肠癌以及头颈部鳞癌等中则有稳定表达。大量的研究表明, COX-2 的表达与人类多数肿瘤呈密切相关, 它参与了肿瘤细胞的生长、转化和凋亡的过程, 同时也与细胞的运动、转移以及肿瘤新生血管的形成关系密切。

很多作者研究了 COX-2 在包括胃癌、结肠癌、

作者单位: 215006, 苏州大学附属第一医院放射治疗科