

《单细胞凝胶电泳用于受照人员剂量估算技术规范》 解读

刘强 王彦 杜利清 曹嘉 徐畅 姜恩海 姜立平 王晓光 樊飞跃

【摘要】 《单细胞凝胶电泳用于受照人员剂量估算技术规范》的起草人收集整理并全面阅读了与本标准有关的国内外技术资料 and 现行有效的我国放射性疾病诊断标准, 并在明确了制定依据和原则的基础上制定了本标准。此标准适用于低线性能量传递射线比较均匀的全身急性外照射受照人员的早期 DNA 损伤定量分析。为更好地贯彻执行这一标准, 该文对该标准的编制内容进行说明和解读。

【关键词】 彗星试验; 剂量效应关系, 辐射; 规范

Explanation for the Specification of Dose Estimation for the Radiation Victims in the Early Stage Using Single Cell Gel Electrophoresis LIU Qiang, WANG Yan, DU Li-qing, CAO Jia, XU Chang, JIANG En-hai, JIANG Li-ping, WANG Xiao-guang, FAN Fei-yue. Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300192, China

Corresponding author: FAN Fei-yue, Email: faithyfan@yahoo.com

【Abstract】 Based on the extensive research of literature, systematic study of the relevant laws and regulations related to the specification, the *Specification of Dose Estimation for the Radiation Victims in the Early Stage Using Single Cell Gel Electrophoresis* was enacted according to the principles about it. It can be used for the quantitative assay of DNA damage induced by whole body uniform irradiation in case of low linear energy transfer. To correctly implement this specification, contents in it were interpreted in this article.

【Key words】 Comet assay; Dose-response relationship, radiation; Benchmarking

1 目的和背景

战时核武器的使用以及平时核与辐射事故的发生, 可能会在短时间内产生大量核辐射伤员。了解伤员受辐射的生物剂量是对这些伤员进行有效救治的前提条件^[1], 应尽早合理而可靠地估算出伤员所受的辐射剂量。国内外学者为解决辐射事故应急及辐射防护中所遇到的各种医学问题作了大量研究工作, 建立了成熟的估算受照剂量的生物剂量学方法, 如染色体畸变法、微核测定法等^[2]。多年的实践证明, 淋巴细胞染色体畸变分析是一种可靠的生物剂量计^[2], 但此方法受一定条件的制约, 而单细

胞凝胶电泳方法因其具有简便、低耗、灵敏度高、快速和适应高通量分析等优点^[3], 引起了学者们的普遍重视。前期动物实验研究结果表明, 用单细胞凝胶电泳技术分析离体和整体照射诱导淋巴细胞 DNA 双链断裂的各项指标, 它们之间的差异无统计学意义, 可以用离体血照射来反应整体照射所致的 DNA 损伤^[4-5]。进一步拟合剂量效应曲线, 有望用于受照人员 DNA 损伤的定量分析。

2 基础和根据

单细胞凝胶电泳试验(single cell gel electrophoresis, SCGE)方法刚刚建立时就被证实了其检测指标具有剂量-效应关系。后来, 随着研究的不断深入, 在中国仓鼠卵巢细胞^[6]、肿瘤细胞^[7-8]和生殖细胞^[9]中均发现显著的剂量-效应关系。Singh^[10]用 0~0.25 Gy X 射线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($R^2=0.77$ 和 0.51 , P 均 $<$

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2012.04.012

基金项目: 卫生部行业基金(201002009); 卫生部标准研究课题(2006-09-04); 北京协和医学院教学科研项目(1141,1145,1146)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室

通信作者: 樊飞跃(Email: faithyfan@yahoo.com)

0.05), 但其研究所用的辐射剂量范围较小。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, 但这些因素引起的 DNA 损伤绝大多数是以 DNA 碱基损伤和丢失以及 DNA 单链断裂的形式出现^[11], 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。有研究表明, DNA 双链断裂的错配修复是构成不同品质电离辐射诱发的以稳定性畸变为特征的关键因素^[12]。电离辐射所致的 DNA 损伤导致的各种类型的突变(如大片缺失和重排等较大的改变)可能是由于 DNA 双链断裂引起的^[13]。一般认为, DNA 双链断裂是可用体细胞和生殖细胞突变来证明的细胞核临界损伤最恰当的指标。

目前绝大多数 SCGE 研究均是通过在显微镜下目测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会出现曲线平台^[14]。在一定的辐射剂量范围内, 随着照射剂量的增大, DNA 双链断裂点增多, DNA 片段变小, 尾长增长。如果辐射剂量超过此剂量范围, 即使剂量增大, DNA 片段也不再减小, 只是表现为片段增多, 电泳后, 尾长不再增加, 因而长度指标(如尾长)的剂量-效应曲线出现平台。而且目测彗星尾长或彗星全长, 主观因素较多, 人为误差较大。而矩类指标(尾矩、Olive 尾矩)较长度指标更灵敏和准确, 即使剂量较大时也不会出现平台^[15], 而且符合辐射生物剂量学指标应具备的条件。我们用 CASP 软件(一种彗星分析软件)^[16]自动分析实验所得的彗星图像, 使实验结果更加客观准确, 避免了人为误差。而且着重观察了尾矩和 Olive 尾矩两个比较灵敏的指标, 并与其他指标进行对比分析, 进一步提高了 SCGE 技术作为辐射生物剂量计的准确率和灵敏度。

在染色体畸变分析、微核试验与 SCGE 的对比研究中, 对于放射性工作人员 DNA 损伤的评价, SCGE 的结果与前两者的结果基本一致, 而 SCGE 的灵敏度更高, 速度更快^[17-19]。Garaj-Vrhovac 等^[20]用 SCGE 方法观察了一次辐射事故(吸收剂量为 0.221 Sv)后, 受照患者不同时间点的淋巴细胞 DNA 修复情况, 发现辐照后 1 年内患者淋巴细胞彗星尾长和尾矩随时间的延长而下降, 但仍大于正常对照者。由此可知, SCGE 技术能够检测辐照后远期残存的微量 DNA 损伤, 说明此技术具有较高的灵敏度, 用来

评价受照人员的 DNA 损伤将大有潜力。

刘强等^[21]采用中性 SCGE 技术, 检测 0~5 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照射后的淋巴细胞 DNA 双链断裂情况, 结果发现, 随照射剂量的增大, 受损细胞数量增加, 损伤程度加重, 呈现明显剂量-效应关系。综合考虑所得曲线的形态、方程的简易程度和拟合优度判定系数 R^2 , 筛选符合要求的曲线方程。尾长得到的最佳方程符合 $Y=a+bD$ 模式: $Y_{TL}=24.9228+20.1896D$ ($R^2=0.896, P<0.01$), 而尾矩和 Olive 尾矩得到的方程符合 $Y=a+bD+cD^2$ 模式, $Y_{TM}=3.8305+2.8903D+2.5736D^2$ ($R^2=0.880, P<0.01$), $Y_{OTM}=30292+1.8163D+1.0007D^2$ ($R^2=0.895, P<0.01$)(方程中, Y 为各指标的实测值; D 为剂量, 单位为 Gy; TL 为尾长; TM 为尾矩; OTM 为 Olive 尾矩)。在所有指标中, 彗星 Olive 尾矩综合了彗星荧光强度和头尾部长度, 在所有分析指标中是最科学可靠的^[21], 说明这个指标在实验选择的剂量范围内, 最能灵敏、准确地反映辐射后的 DNA 损伤程度。

辐射事故具有不可预见性, 事故发生时, 医疗救治人员不一定能够及时取得患者的血样进行生物剂量估算^[22-23]。人体是一个复杂的有机体, 细胞 DNA 损伤后, 修复机制很快启动。受照后不同时间采取的血样, 细胞的 DNA 残余损伤水平也不同, 所以, 在辐射事故后的生物剂量估算中, 很难测得机体细胞受照后的原发损伤, 从而影响估算结果。因此, 在辐照后的不同时间检测细胞 DNA 残余损伤水平, 用于辐射生物剂量估算的参考显得非常必要^[24]。为了解决这一问题, 进一步提高剂量-效应曲线在核事故临床应急中的实用性, 我们在观察了动物淋巴细胞 DNA 体内修复规律的基础上, 观察了人血照射后的晚期修复过程, 拟合修复曲线: $Y_{TL}=78.501-1.932T+0.016T^2$ ($R^2=0.909, P<0.05$), $Y_{TM}=29.115-1.146T+0.011T^2$ ($R^2=0.855, P<0.05$), $Y_{OTM}=17.393-0.577T+0.005T^2$ ($R^2=0.879, P<0.05$)(方程中, Y 为各指标的实测值; T 为照后时间, 单位为 h; TL 为尾长; TM 为尾矩; OTM 为 Olive 尾矩)。

3 内容解读

3.1 本标准的适用范围

本标准适用于低线性能量传递射线比较均匀的全身急性外照射受照人员的早期 DNA 损伤定量分

析, 不适用于高线性能量传递和慢性职业受照人群、非均匀照射和内照射受照人群、早先事故受照者的剂量估算和事故性受照者远期生物剂量估算和远期随访。

3.2 剂量-效应曲线与时间-效应曲线的建立

在建立剂量-效应曲线时, 先进行淋巴细胞分离, 并把细胞预先包埋在凝胶中, 采用双层铺胶法, 第一层为正常熔点凝胶, 第二层为低熔点凝胶与细胞悬液的混合物, 低熔点凝胶要预先煮沸并置于 37 °C 水浴内备用。照射时把包埋有淋巴细胞的凝胶置于冰上照射, 照后立即把凝胶置于裂解液中进行裂解, 以尽量防止细胞 DNA 的修复。

在建立时间-效应曲线时, 检测的是不同时间点 DNA 的残留损伤, 所以要全血照射并控制照射时温度为 (37 ± 0.5) °C, 以尽量不影响细胞的 DNA 修复。照后把细胞置于 (37 ± 0.5) °C 环境中进行体外培养, 培养到相应时间点后取出进行裂解。

在建立剂量-效应曲线和时间-效应曲线的实验中, 经中国医学科学院放射医学研究所和中国医学科学院血液病研究所的 3 个实验室采用相同的实验方法重复验证得知, 各个剂量点照射后的尾长、尾矩和 Olive 尾矩均未见统计学差异。

4 小结

本文对《单细胞凝胶电泳用于受照人员剂量估算技术规范》研制的目的和背景、基础和依据、适用范围和剂量-效应曲线拟合等方面进行了解读, 对放射生物学相关人员正确认识和理解这一标准, 并在辐射损伤应急响应中正确贯彻执行将发挥指导作用。

参 考 文 献

- [1] Turai I, Veress K, Günalp B, et al. Medical response to radiation incidents and radionuclear threats. *BMJ*, 2004, 328 (7439): 568–572.
- [2] International Atomic Energy Agency. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment (a manual). Technical Report Series No.405. Vienna: IAEA, 2001: 105–122.
- [3] Banath JP, Fushiki M, Olive PL. Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, 1998, 73(6): 649–660.
- [4] 刘强, 姜恩海, 李进, 等. 单细胞凝胶电泳技术对离体和整体照射致细胞 DNA 断裂的一致性研究. *中国辐射卫生*, 2006, 15 (2): 153–155.
- [5] 刘强, 姜恩海, 李进, 等. 单细胞凝胶电泳检测 DNA 辐射损伤的剂量-效应关系研究. *中华放射医学与防护杂志*, 2006, 26(6): 573–576.
- [6] Hu Q, Hill RP. Radiosensitivity, apoptosis and repair of DNA double-strand breaks in radiation-sensitive Chinese hamster ovary cell mutants treated at different dose rates. *Radiat Res*, 1996, 146(6): 636–645.
- [7] Wada S, Kurahayashi H, Kobayashi Y, et al. The relationship between cellular radiosensitivity and radiation-induced DNA damage measured by the comet assay. *J Vet Med Sci*, 2003, 65(4): 471–477.
- [8] Qiu LM, Li WJ, Pang XY, et al. Observation of DNA damage of human hepatoma cells irradiated by heavy ions using comet assay. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(7): 1450–1454.
- [9] Haines GA, Hendry JH, Daniel CP, et al. Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biol Reprod*, 2002, 67 (3): 854–861.
- [10] Singh NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res*, 2000, 455(1–2): 111–127.
- [11] Marcon F, Andreoli C, Rossi S, et al. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. *Mutat Res*, 2003, 541(1–2): 1–8.
- [12] Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2000, 21 (3): 397–404.
- [13] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 电离辐射源与效应 (卷 II 效应). 中国核学会辐射防护学会, 译. 太原: 山西科学技术出版社, 2002: 648–695.
- [14] Kent CR, Eady JJ, Ross GM, et al. The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. *Int J Radiat Biol*, 1995, 67 (6): 655–660.
- [15] Hellman B, Vaghef H, Boström B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*, 1995, 336(2): 123–131.
- [16] Koňca K, Lankoff A, Banasik A, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res*, 2003, 534(1–2): 15–20.
- [17] 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. *Int J Hyg Environ Health*, 2005, 208(3): 179–191.
- [18] Maluf SW. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clin Chim Acta*, 2004, 347(1–2): 15–24.
- [19] He J, Chen W, Jin L, et al. Comet assay and cytokinesis-blocked micronucleus test for monitoring the genotoxic effects of X-ray radiation in humans. *Chin Med J (Engl)*, 2000, 113(10): 911–914.
- [20] 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. *Radiat Prot Dosimetry*, 2002, 98(4): 407–416.
- [21] Olive PL. Impact of the comet assay in radiobiology. *Mutat Res*,