

文章编号: 1007-4627(2007)02-0103-05

γ 射线诱导 DNA 损伤中 DNA 浓度和剂量率的影响*

孔福全¹, 王 潇¹, 倪崑楠¹, 隋 丽¹, 杨明建^{1, 2}, 赵 葵^{1, 2, 3, #}

(1 中国原子能科学研究院, 北京 102413;

2 河北工业大学理学院, 天津 300130;

3 北京师范大学射线束技术与材料改性教育部重点实验室, 北京 100875)

摘 要: 在进行辐射致 DNA 损伤中, DNA 浓度和剂量率是两个重要的因素。利用 γ 射线在不同的剂量率下对不同浓度的质粒 DNA pUC19 水溶液进行了辐照, 利用凝胶电泳对辐照后的样品进行分析。结果表明, 在同一剂量下被辐照的 DNA 样品, 随浓度的降低 DNA 损伤越来越严重; 通过分析软件和理论公式得到的每个 DNA 上的双链断裂数随着 DNA 浓度的变化呈现为非线性趋势。

关键词: γ 射线; DNA 损伤; DNA 浓度; 剂量率; pUC19

中图分类号: Q691; TN16 **文献标识码:** A

1 引言

DNA 作为生物体中的一类基本生物大分子, 是离子辐射导致生物效应的关键靶分子。电离辐射可引起多种类型的损伤, 例如, 碱基变化、糖基损伤、单链和双链断裂(DSB)、DNA 和蛋白质的交联等^[1]。其中 DSB 是辐射所致生物效应中最重要的原初损伤, 非重接性的 DSB 则被认为是细胞杀伤效应最重要的损伤。辐射损伤过程中, 射线品质、剂量和生物体的辐射敏感性等对生物体的损伤都有很重要的影响。同时辐照过程中的 DNA 浓度和剂量率也是辐射致 DNA 损伤中重要的影响条件。

在辐照过程中关于 DNA 浓度方面的影响往往被忽略, 目前还没有系统的研究。2000 年, 余碧钰等^[2]通过比较激光辐照后 DNA 吸收峰的改变发现, 激光辐照 DNA, 即激光对 DNA 作用效果, 不但与激光剂量有关, 还与 DNA 溶液的浓度有关。同年, 邵春林等^[3]利用 γ 射线辐照了超螺旋 pBR322 DNA 分子, 计算与实验结果相比发现, $G(\alpha\text{DSB})$ 的倒数与 DNA 浓度的倒数成线性关系。在辐照剂量率效应方面, 报道的工作多集中在生命体、组织器官和细胞方面。Michael 等^[4]报道称, 对于人体和微生物细胞来说, 离子辐射的遗传效应的

危险性随着剂量率的减少而降低, 这种现象被称作直接剂量率效应(DRE), 但是一些细胞也存在相反的效应。2002 年, Mirzaie-Joniani 等^[5]用 γ 射线在不同剂量率下对 HeLa Hep2 细胞辐照后发现, 低剂量率和低剂量的辐照比高剂量率和高剂量的辐照更能有效地导致细胞凋亡, 这可能是在低剂量率时, 细胞的修复系统还没有启动的缘故。冯惠茹等^[6]在不同剂量率下研究了放射性核素 ³²P 照射 HeLa 细胞产生的凋亡, 结果表明剂量率高其凋亡率也高。随后冯惠茹等^[7]利用低剂量率持续 β 射线和高剂量率 γ 射线对人宫颈癌 HeLa 细胞系进行了辐照。结果表明低剂量率 ³²P β 射线持续照射抑制细胞增殖为渐进性, 允许多数的细胞在倍增 1 个或几个细胞周期后死亡, 即对细胞周期阻滞程度低、时间长, 而 ⁶⁰Co γ 射线则相反, 高剂量率 ⁶⁰Co γ 射线照射对细胞的抑制作用直接、迅速。因此, 剂量率作为辐射过程中的一个重要参数起着很大的作用。目前的研究多为复杂体, 总体效应中既有辐照的剂量率效应, 又存在修复等机制。

本文利用中国原子能科学研究院原子高科股份有限公司的 ⁶⁰Co γ 射线对离体质粒 DNA 在不同的

* 收稿日期: 2007-02-08

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10175095, 10435020); 中国原子能科学研究院院长基金资助项目和中国原子能科学研究院核物理研究所所长基金资助项目(12SZZ-200602)

作者简介: 孔福全(1979-), 男(汉族), 河北献县人, 博士研究生, 从事辐射生物学研究; E-mail: fqkong@ciae.ac.cn

通讯联系人: 赵 葵, E-mail: kuiz@ciae.ac.cn

浓度和剂量率下进行了辐照, 离体 DNA 不具有修复等复杂的因素, 因此期望能够得到简单的 DNA 浓度和剂量率对 DNA 损伤的影响。

2 实验设备

中国原子能科学研究院原子高科股份有限公司的 ^{60}Co γ 射线, 其活度为 12×10^4 Ci, 能量 1.25 MeV。北京市六一仪器厂沃德生物医学仪器公司生产的 DYY-6B 型稳压稳流电泳仪, 美国 Alpha 公司生产的数字凝胶成像系统。

3 实验材料与方法

辐照用质粒 DNA pUC19 购自大连宝生物工程有限公司, 原始浓度 $500 \text{ ng}/\mu\text{l}$, 长度为 2 686 bp, 90% 以上为共价闭环状, 保存在 TE Buffer 溶液环境下。为了研究 DNA 浓度在 γ 射线辐照诱发的 DNA 损伤中的影响, 首先将原始 DNA 溶液稀释, 在 630 Gy 的剂量和 12.6 Gy/min 的剂量率下, 分别对 500, 250, 100 和 $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 的 DNA 溶液进行辐照。并且在 630 和 873 Gy 的剂量下, 以 6.3, 12.6 和 $31.5 \text{ Gy}/\text{min}$ 的剂量率对浓度为 $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 的 DNA 进行了辐照。辐照过程中, 样品都置于冰上。辐照前后的 DNA 样品分别混以 1/6 体积的上样缓冲液后加入 1% 琼脂糖凝胶。4 V/cm 电泳 90 min 后, 以 Alpha Innotech 数字成像系统在 302 nm 处扫描凝胶, 得到了 DNA 超螺旋(SC), 线性(L) 和开环(OC) 3 种形态的电泳图, 由此可得 DNA 各形态的份额(百分比)。利用如下公式计算出平均每个 DNA 上的单链断裂数(SSBs/DNA 或称 $\text{SSBs}/\text{Plasmid}$)和平均每个 DNA 上的双链断裂数(DSBs/DNA 或称 $\text{DSBs}/\text{Plasmid}$)^[8]。

$$\text{SSBs}/\text{plasmid} = \ln \left[\frac{1 - f(\text{L})}{f(\text{SC})} \right], \quad (1)$$

$$\text{DSBs}/\text{plasmid} = \frac{f(\text{L})}{[1 - f(\text{L})]}, \quad (2)$$

$f(\text{L})$ 和 $f(\text{SC})$ 分别为线性和超螺旋 DNA 的份额。

4 结果与讨论

4.1 DNA 浓度对 DNA 损伤的影响

4.1.1 电泳图

图 1 给出了不同浓度的 DNA 经过 γ 射线辐照后的凝胶电泳图像。其中泳道 1 和 6 是对照 DNA 样品, 主要以开环和超螺旋两种形态存在, 并且超螺旋 DNA 达到 90% 左右, 泳道 2, 3, 4 和 5 分别是浓度为 500, 250, 100 和 $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 的 DNA 样品辐照后的图像。凝胶电泳结果表明, 在 630 Gy 剂量下, 与对照 DNA 样品相比, 浓度为 $500 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 的样品中出现了大量开环 DNA, 超螺旋 DNA 变得很少, 并且出现了线性 DNA; 随着 DNA 浓度的降低, 超螺旋 DNA 继续减少直到完全消失, 开环 DNA 随着原始浓度继续减少为先增后减的趋势, 线性 DNA 含量持续增加, 在 DNA 浓度为 $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 时, 线性 DNA 中出现了弥散的条带, 即在同一剂量下随着 DNA 浓度的降低, DNA 双链断裂越来越多, DNA 小片段增加, 损伤越来越严重。

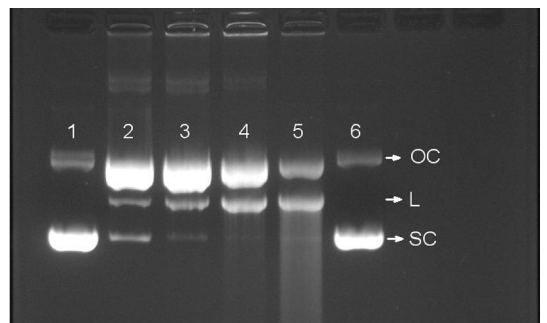


图 1 不同浓度的 DNA 经 630 Gy 的 γ 射线辐照后的电泳图

4.1.2 DNA 单链断裂和双链断裂

利用凝胶电泳分析软件 Alpha Ease FC 测量出了辐照后 DNA 的 3 种形态的比例, 再用公式(1)和(2)计算出 DNA 被辐照后 DNA 的 SSBs/DNA 和 DSBs/DNA 。对于 SSBs/DNA , 从图 1 可以看出, 由于超螺旋形态的份额为零, 公式(1)对 4 和 5 泳道的 DNA 样品失去了意义, 只能计算得到 2 和 3 泳道的 SSBs 。2 泳道的 $\text{SSBs}/\text{DNA} = 2.80$, 3 泳道的 $\text{SSBs}/\text{DNA} = 4.17$ 。 DSBs/DNA 随 DNA 浓度的变化曲线如图 2 所示。

从 2 和 3 道的 SSBs/DNA 可以看出, 随着 DNA 浓度的降低, 每个 DNA 上的 SSBs 增加。图 2 中给出的每个 DNA 上的 DSBs 也呈现了相同的趋势, 但是这一变化并不是简单的线性变化。从图可以看出, 当 DNA 的浓度从 $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 增加到 $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 时, DSBs 减少了 5 倍左右, DNA 的浓度从

100 ng/ μl 增加到 250 ng/ μl 时, DSBs 减少了 4 倍左右, DNA 的浓度从 250 ng/ μl 增加到 500 ng/ μl 时, DSBs 的变化很小。即原始 DNA 的浓度越大时, 每个 DNA 上的 DSBs 随 DNA 浓度的变化越小。 γ 辐照过程为平均的面照射, 在剂量一定和辐照条件相同的情况下, 自由基环境也是一定的。随着 DNA 浓度的降低, 与每个 DNA 进行反应的自由基数目增加, 单链断裂和双链断裂的几率也随之增加。DNA 浓度继续降低, 单链断裂演变成双链断裂, 因此超螺旋 DNA 减少, 开环 DNA 先增后减, 而线性 DNA 一直增加, 并出现了小碎片。

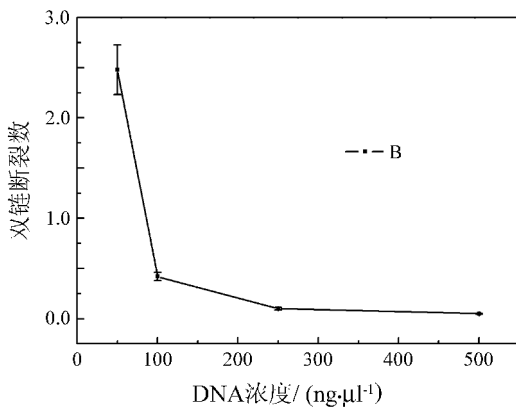


图 2 同一剂量下平均每个 DNA 上的双链断裂数随 DNA 浓度的变化

4.2 剂量率变化对 DNA 损伤的影响

4.2.1 电泳图

图 3 中, 1 和 8 道为对照 DNA 样品, 与图 1 具有相同的分布, 2, 3 和 4 道是辐照剂量为 630 Gy 的样品, 5, 6 和 7 是辐照剂量为 873 Gy 的样品, 2 和 7 道是辐照剂量率为 6.255 Gy/min 的样品, 3 和 6 道是辐照剂量率为 12.55 Gy/min 的样品, 4 和 5 道是辐照剂量率为 31.35 Gy/min 的样品。

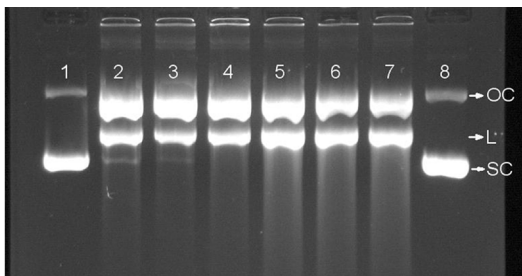


图 3 DNA 在不同剂量率下经 γ 射线辐照后的电泳图

从图 3 中可以看出, 当辐照剂量为 630 Gy 时, 在不同的剂量率下辐照后的 DNA 形态变化略微有

所不同, 高剂量率辐照的 DNA 比低剂量率辐照的 DNA 损伤要严重一些, 但差别微小。而在 873 Gy 的辐照剂量下, 经过不同剂量率辐照后的 DNA 的形态变化没有明显的差别。考虑到公式(1)的不适用性, 本文仅对 DNA 双链断裂数进行了计算。

4.2.2 DNA 双链断裂

利用分析软件 Alpha Ease FC 和公式(2)计算了辐照后的每个 DNA 上的双链断裂数, 如图 4 所示。从图中可以看出, 在 630 Gy 的剂量下, 随着剂量率的增加每个 DNA 上的双链断裂数呈现出了先减后增的趋势, 而在 873 Gy 的剂量下, 随着剂量率的增加每个 DNA 上的双链断裂数呈现出了持续减少, 并且变化甚微。考虑到误差的因素, 可以说 γ 射线诱发的 DNA 损伤中几乎不存在剂量率效应, 这与我们观察到的重离子致质粒 DNA 损伤中的剂量率效应不同。这种现象可能由于 γ 射线与水的作用机制和重离子不同造成的, γ 射线在水中的径迹非常平均, 因此剂量率效应对于 γ 射线没有太大的影响, 而由于重离子具有致密复杂的电离径迹, 剂量率对于 DNA 的损伤具有一定的影响。

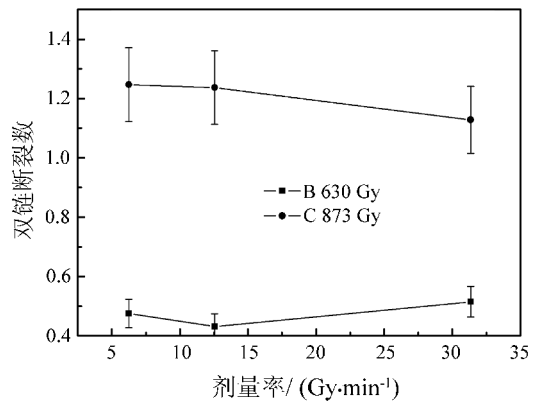


图 4 在同一剂量下平均每个 DNA 上的双链断裂数随剂量率的变化

5 结论

本文利用 γ 射线在不同的浓度和剂量率下对质粒 DNApUC19 进行了辐照, 利用凝胶电泳对辐照后的样品进行了分析。结果发现, 在同一剂量下随着被辐照的 DNA 浓度的降低, DNA 被损伤的程度越来越严重, 而剂量率的变化对 DNA 的损伤没有明显的影响。利用公式计算的结果表明, 在同一剂量下, 随着被辐照 DNA 浓度的降低, 平均每个

DNA 上的单链断裂数和双链断裂数都呈现了逐渐增加的趋势, 并且随着 DNA 浓度的逐渐降低增加趋势更陡峭。 γ 辐照过程为平均的面照射, 在剂量一定和辐照条件相同的情况下, 自由基环境也是一定的, 随着 DNA 浓度的降低, 平均与每个 DNA 作用的自由基数目增加, 因此 DNA 链的断裂机会也越来越大, 损伤越来越严重。

随着剂量率的增加, 平均每个 DNA 上的双链断裂数出现了没有规律的变化, 并且变化甚微, 因此剂量率的变化对于自由基的产生没有明显影响。

与重离子辐射致 DNA 损伤相比, 重离子与 γ 射线辐照引起的 DNA 浓度效应的趋势是一样的, 但是在剂量率效应上却出现了不同的结果。在进行 DNA 浓度实验时, 无论是 γ 射线还是重离子, 辐照过程中的辐照条件是一样的, 所以当 DNA 浓度降低时, 平均每个 DNA 的单链断裂和双链断裂产生几率增加, 因此损伤越来越严重。但是在变化剂量率时, 辐照条件随着也发生了变化, γ 射线为面照射, 短时间的大剂量率和长时间的小剂量率的统计效果是一样的, 而重离子为非常集中的径迹结构, 它的统计效果是不相同的, 因此 γ 射线和重离子的效应是不一样的, 其原理和效应曲线还有待于进一步的实验研究。

参考文献 (References):

[1] Yang Chuixu, Mei Mantong. Space Radiobiology. Guang-

zhou; Zhongshan University Press, 1995, 23—24 (in Chinese).

(杨垂绪, 梅曼彤. 太空放射生物学. 广州: 中山大学出版社, 1995, 23—24.)

[2] Yu Biyu, Lu Xiaolong, Cao Yongzhong, *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 2000, **9**(4): 295(in Chinese).

(余碧钰, 陆小龙, 曹永忠等. 激光生物学报, 2000, **9**(4): 295.)

[3] Shao Chunlin, Saito Masahiro, Yu Zengliang. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 2000, **32**(4): 379(in Chinese).

(邵春林, 齐藤真弘, 余增亮. 生物化学与生物物理学报, 2000, **32**(4): 379.)

[4] Michael M, Vilenchik, Alfred G, *et al.* PNAS, 2000, **97**(10): 5 381.

[5] Mirzaie-Joniani H, Eriksson D, Johansson A, *et al.* Radiation Research, 2002, **158**: 634.

[6] Feng Huiru, Tian Jiahe, Zhang Jinming. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2001, **19**(4): 311 (in Chinese).

(冯惠茹, 田嘉禾, 张锦明. 辐射研究与辐射工艺学报, 2001, **19**(4): 311.)

[7] Feng Huiru, Tian Jiahe, Ding Weimin, *et al.* Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2004, **22**(3): 181 (in Chinese).

(冯惠茹, 田嘉禾, 丁为民等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, **22**(3): 181.)

[8] Spothem-Maurizot M, Charlier M, Sabattier R. Int J Radiat Biol, 1990, **57**: 301.

Effect of Concentration of DNA and Dose Rate in DNA Damage Induced by γ Ray*

KONG Fu-quan¹, WANG Xiao¹, NI Mei-nan¹, SUI Li¹, YANG Ming-jian^{1, 2}, ZHAO Kui^{1, 2, 3, #}

(1 China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China;

2 School of Science, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China;

3 Key Laboratory of Beam Technology and Modification of Ministry of Education, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: As two factors, the changes of concentration of DNA and dose rate are of significance in the

* Received date: 8 Feb. 2007

* Foundation item: National Natural Science Foundation of China(10175095, 10435020); President Foundation of China Institute of Atomic Energy and Department of Nuclear Physics of China Institute of Atomic Energy(12SZZ-200602)

Corresponding author: Zhao Kui, E-mail: kuiz@ciae.ac.cn

study of DNA damage induced by irradiation. The influence of DNA damage induced by γ ray at different concentration of DNA under different dose rate was investigated. The result of gel electrophoresis indicate that DNA molecules were damaged severely as the concentration of DNA decreasing. The number of double strand breakages per DNA were obtained by the software of Alpha Innotech and theoretical analysis. It shows that the numbers of double strand breakages per DNA presented nonlinear feature as the concentration of DNA decreasing, and the dose rate had little influence on DNA damage.

Key words: γ ray; DNA damage; concentration of DNA; dose rate; pUC19