

文章编号: 1007-4627(2008)01-0067-05

彗星电泳检测 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照人类肝 L02 细胞的 DNA 损伤效应*

何 晶^{1,2}, 李 强¹, 李 萍¹

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 以传能线密度为 $30 \text{ keV}/\mu\text{m}$ 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照人类肝 L02 细胞, 利用彗星电泳技术检测了以 DNA 链断裂为生物终点的 DNA 辐射损伤效应。CASP 软件分析彗星图像, 主要检测尾部 DNA (TDNA%)、彗星全长 (CL)、尾长 (TL)、尾矩 (TM) 和 Olive 尾矩 (OTM) 等指标, SPSS 11.5 软件进行统计学分析, 绘制并拟合 TM-剂量曲线。结果显示, 辐照以剂量依赖的方式引起 L02 细胞彗星图像各指标的增大, 且 TM 值与剂量线性正相关。说明 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对 DNA 有较强的致损伤效应, 且与剂量正相关。研究为正确评价重离子对人体正常组织的辐射风险及危害提供了一定的基础数据和依据。

关键词: 彗星电泳; 重离子; 剂量效应关系; DNA 损伤

中图分类号: R730; Q691

文献标识码: A

1 引言

DNA 的损伤与修复是辐射生物学的重要研究课题, 尤其是电离辐射所致 DNA 断裂是决定受照细胞命运的关键因素之一。近年来, 重离子束因其独特的深度剂量分布和高的相对生物学效应 (RBE) 等优势, 被誉为迄今为止最理想的放射治疗用射线, 因而重离子治癌也被认为是一种最有效的放射治疗技术^[1,2]。美国劳伦斯伯克利实验室 (LBL)、日本国立放射线医学综合研究所 (NIRS) 和德国重离子研究中心 (GSI) 在基础研究和临床治疗试验研究的基础上, 已证实 Ne 以上的重离子由于给人体正常组织带来难以容许的伤害而不适用于肿瘤治疗, 认为 C 离子是适合治疗用的重离子。因此, 当前 C 离子是作为重离子治癌的唯一离子种类。然而 C 离子在具有对靶区癌细胞的致死损伤效应的同时, 对周围的正常组织也必然会有一定剂量的辐照。了解这部分辐照对人体正常组织的影响对评价重离子治癌的安全性显得格外重要。另外, 随着人们对宇宙空间探测水平的提高, 载人航天观测

也会越来越多, 而宇宙空间中存在大量射线, 其中 85% 是质子辐射, 14% 是 α 粒子辐射, 1% 是重离子辐射, 这些辐射对宇航员也会产生影响。空间宇宙辐射是仅次于微重力的环境危险因素, 正确评价各种辐射对宇航员的危害程度对于载人航天事业的发展具有重要的意义。

彗星电泳 (Comet assay), 又称单细胞凝胶电泳 (Single Cell Gel Electrophoresis, 简称 SCGE), 是利用断裂的 DNA 碎片在裂解液的作用下, 从 DNA 的超螺旋结构中释放出来, 在电泳时移向阳极, 通过分析产生的彗星样影像对 DNA 进行检测的一种方法, 是检验各种哺乳动物细胞 DNA 断裂的新技术^[3]。与传统方法相比, 它具有简便、快速、敏感、所需样品量少、无需细胞处于生长状态以及可使用放射性同位素跟踪等优点。自 1978 年 Rydcbert 等人成功地将彗星电泳用于检验 DNA 链断裂以来, 经过不断的改进, 它已成为一种快速、灵敏和简便的检测 DNA 损伤的方法, 广泛地应用于 DNA 放射损伤研究、DNA 交联检测、药物的遗传毒性评价和

* 收稿日期: 2007 - 06 - 05; 修改日期: 2007 - 07 - 03

* 基金项目: 中国科学院“百人计划”资助项目 (O506120BR0); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2006AA02Z499)

作者简介: 何 晶 (1983—), 女 (汉族), 江西萍乡人, 硕士研究生, 从事辐射生物学研究; E-mail: nicehj@126.com

细胞凋亡鉴定。由于核内的 DNA 是电离辐射在细胞内的主要靶点,通过诱发 DNA 损伤来诱发细胞的改变和癌变,因此彗星电泳检测 DNA 的损伤是评价电离辐射对细胞损伤作用的良好手段。

本文利用彗星电泳分析法研究中能 (83.6 MeV/u) $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照人类肝 L02 细胞所致的 DNA 损伤效应,为正确评价重离子辐射对人体正常组织细胞的辐射损伤程度提供基础数据和理论依据。

2 材料和方法

2.1 细胞培养

本实验所用的细胞系为中国科学院近代物理研究所离子生物学实验室保存的人类肝 L02 细胞。L02 细胞在含有 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素、100 u/ml 链霉素的 DMEM (GIBCO) 培养基中,于 37 °C、饱和湿度和 5% CO_2 条件下培养,每 3—4 d 传代一次。

2.2 辐照

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束由中国科学院近代物理研究所的兰州重离子研究装置 (HIRFL) 提供,辐照是在 HIRFL 的浅层肿瘤重离子治疗终端完成的。细胞在辐照前 20 h 左右接种于培养皿中。HIRFL 提供了 100 MeV/u 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束,经终端真空隔离窗、束流探测器等降能后 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束到达细胞样品处的能量为 83.6 MeV/u,对应的传能线密度 (LET) 值约为 30 keV/ μm ,细胞照射时的剂量率为 3—4 Gy/min。照射分为 0, 0.5, 1, 2, 4 和 6 Gy 6 个剂量点。

2.3 彗星电泳

参照 Wojewodzka 等^[3]的方法,步骤简述如下: (1) 照射后的 L02 细胞立即用 PBS 洗两遍,经 0.25 胰蛋白酶消化后于 1 000 r/min 离心收集,精确计数,用 PBS 将细胞稀释至 10^5 cells/ml 左右; (2) 将正常熔点琼脂 (0.5%) 90 μl 均匀铺在磨砂玻璃片上,每个照射剂量吸取 10 μl 细胞悬液与 80 μl 低熔点琼脂 (0.6%) 混合,均匀铺在正常熔点凝胶层上,于 4 °C 冷却; (3) 将玻片浸入新鲜配制的碱性细胞裂解液 (2.5 mol/l NaCl, 100 mmol/l Na_2EDTA , 10 mmol/l Tris, 1% 桂酰肌氨酸钠, pH9.5, 临用前加入 1% DMSO 和 1% Triton X-100) 中裂解 2 h; (4) 取出玻片,置于碱性电泳缓冲液 (1 mmol/l

Na_2EDTA , 300 mmol/l NaOH, pH > 13) 中解旋 40 min 后,在 25 V 和 300 mA 条件下电泳 30 min; (5) 用 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 中和 3 次后,每片加 100 溴乙锭 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 染色,盖上盖玻片在荧光显微镜下观察并拍照,每个剂量共 3 张玻片,每片随机拍摄 33—34 个细胞,单个剂量共拍摄 100 个细胞; (6) 拍摄的照片用 CASP 软件分析,结果输入 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。

3 结果

3.1 彗星电泳图像

L02 细胞经 0—6 Gy 的 83.6 MeV/u $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后发生 DNA 链断裂。DNA 解旋后,在电场作用下, DNA 断片在电泳液中离开核区域向阳极迁移,形成特征性的彗星状拖尾。图 1 显示了不同剂量辐照后 L02 细胞的彗星电泳图像。可以看到,彗星图像中 DNA 分布均匀,拖尾明显,杂质干扰少,准确反映了 DNA 的损伤程度。另外还可以清楚地看到,随着照射剂量的增大,彗星全长和彗星尾长均呈明显的增大趋势。

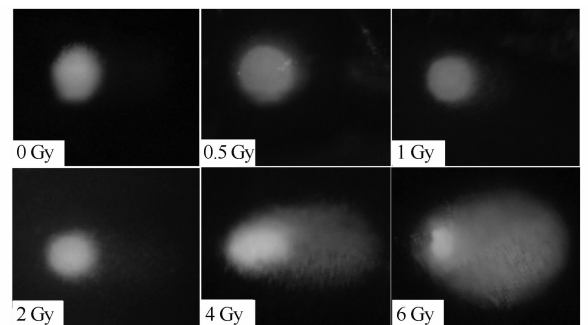


图 1 不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束 ($\text{LET} = 30 \text{ keV}/\mu\text{m}$) 辐照人类肝 L02 细胞荧光显微镜下的彗星图像

3.2 DNA 链断裂的指标

辐照后 DNA 链断裂的各项指标见表 1。从表 1 可以看出,随着照射剂量的增大,彗星的头部 DNA (HDNA%) 逐渐减少,尾部 DNA (TDNA%)、彗星全长 (CL)、尾长 (TL)、尾矩 (TM) 和 Olive 尾矩 (OTM) 都逐渐增加,呈显著的剂量效应关系。

3.3 尾矩与剂量间的关系

有实验证明,辐照剂量增大时, DNA 损伤程度明显增加而尾长基本不变^[4]。为更全面反映 DNA

损伤程度, Olive 等^[5]于 1990 年首次描述了 TM 的概念, 定义为尾部 DNA 占总 DNA 的百分比与头、尾部中心间距的乘积。实验证实该指标比上述其它指标都优越。本实验的 TM 值与剂量的关系曲线如

图 2 所示。可以清楚地看到, TM 值与剂量 (D) 成明显的线性正相关 (TM 值为 $18.59D + 1.43$, 相关系数 $R = 0.9644$)。

表 1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束 ($LET = 30 \text{ keV}/\mu\text{m}$) 辐照人类肝 L02 细胞 DNA 链断裂的各项指标 (平均值 \pm 标准偏差) *

剂量	细胞数	HDNA%	TDNA%	CL(pix)	TL(pix)	TM	OTM
0	100	96 \pm 1.9	4 \pm 1.9	150 \pm 28	29 \pm 11	1.3 \pm 0.78	0.83 \pm 0.66
0.5	100	78 \pm 12.5	22 \pm 12.5	246 \pm 32	134 \pm 28	17.6 \pm 6.9	14.3 \pm 6.5
1	100	70 \pm 11.7	30 \pm 11.7	304 \pm 28	178 \pm 23	28.9 \pm 8.6	17.2 \pm 6.7
2	100	61 \pm 8.4	39 \pm 8.4	323 \pm 24	201 \pm 20	38.6 \pm 14.7	22.3 \pm 7.5
4	100	50 \pm 10.7	50 \pm 10.7	362 \pm 41	234 \pm 32	61.2 \pm 21.1	39.1 \pm 10.9
6	100	37 \pm 11.2	63 \pm 11.2	397 \pm 62	285 \pm 57	101.9 \pm 35.5	86.1 \pm 27.1

* 各组间两两比较 $p < 0.01$ 。

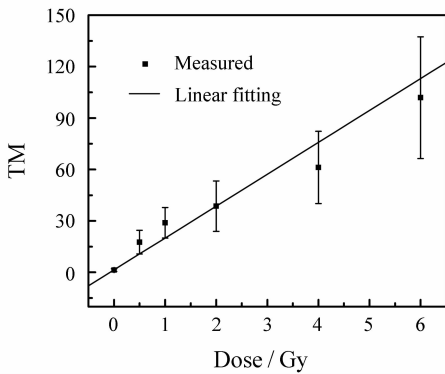


图 2 TM 的剂量效应关系 (各组间两两比较 $p < 0.01$)

4 讨论

彗星电泳技术是近年来迅速发展起来的一种检测 DNA 损伤简便、快速的方法。彗星分析能检测到单个细胞受电离辐射后 DNA 的损伤程度, 对于细胞周期各时相的细胞同样敏感, 因此, 这种方法对于研究 DNA 损伤与修复、肿瘤治疗方案优化和疗效是一种很好的手段。DNA 以片段的形式迁移, 与常规电泳一样, DNA 的迁移距离与片段的大小相关。彗尾形成的模式取决于两类主要因素: DNA 碎片的大小和数量。DNA 碎片越小, 迁移的距离就越长。在一定范围内, 彗星的长度和经荧光染色后的彗星荧光强度 (代表 DNA 的量) 与 DNA 损伤程度有关, 这就是定量检测单个细胞中 DNA 损伤的依据。

从图 1 可以看出, 未经照射或低剂量照射的样

品, 彗头相对较大, 而彗尾几乎没有或极少产生彗尾, 随着剂量增大, 彗尾变得越来越长。未经照射的对照组本不应出现彗尾, 但实际上出现了少量极短的彗尾。这可能是与细胞操作的过程有关, 或者细胞自发产生一些 DNA 断裂, 但由于这些彗尾极少且极短, 与预期结果基本一致。本实验分析结果显示, 彗星图像的各指标均对剂量成明显的依赖关系。随着剂量增大, 头部 DNA 的含量逐渐下降, 而尾部 DNA 含量、尾长、彗星全长、TM 值和 OTM 值都逐渐增大。其 TM 值更是与剂量线性正相关。事实上, 在彗星电泳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]中也发现了显著的剂量-效应关系。说明这种剂量-效应关系是普遍存在的。

在彗星电泳实验的各评价指标中, TM 值是一个比较常用且重要的参数。分析 TM 可同时得知最小的发生了迁移的 DNA (反映在彗星尾的长度) 和被释放或断裂的 DNA 片段 (通过尾部 DNA 的荧光强度反映出来)。从图 2 线性拟合的结果来看, TM 值与剂量成良好的线性正相关, 说明 DNA 损伤对剂量有较强的依赖性, 即损伤程度直接取决于照射剂量的大小。Wada 等^[10]用彗星电泳法研究了 7.2 MeV/u ^{40}Ar 离子, 15.7 和 10.4 MeV/u ^{20}Ne 离子辐照 CHO-K1 细胞引起的 DNA 突变情况, 发现 TM 值与剂量拟合的结果也均成线性关系。CHO-K1 细胞与 L02 细胞一样, 都是正常组织细胞, 可见重离子

束辐照对于人体正常细胞 DNA 的损伤效应有相似之处,都与剂量大小有较密切的关系。因此无论是在重离子治癌过程中还是在空间宇宙射线防护研究中,尽量避免重离子对人体健康组织直接大剂量的辐照是十分重要的。

从 Haines 等^[9]和 Moneef 等^[11]用 X 射线照射不同种正常细胞的彗星电泳结果来看, X 射线辐照后彗星的评价指标值偏低, DNA 损伤随剂量增大的幅度比重离子弱,变化趋势也与重离子不尽相同。重离子对 DNA 强的致损效应是与这种高 LET 射线的特征联系在一起的。与 X 和 γ 射线这种低 LET 辐射不同,高 LET 射线引起细胞 DNA 损伤有直接作用和间接作用^[8]。虽然尚未检测直接作用所致 DNA 损伤与间接作用的比值,但一般认为重离子所致的 DNA 损伤是由对糖和磷酸位点损伤的直接作用引起的,因此,重离子辐射造成的 DNA 断裂与离子注量为线性正相关关系,即随着离子注量值增大,断裂 DNA 的量也逐渐上升。DNA 断裂越多,片段化程度越高,电泳时的拖尾也越长。对于重离子而言,特别是在超过布拉格峰的区域,如何使 DNA 造成辐射损伤目前还知道得很少。推测这种损伤可能因失去了大部分能量之后的重离子或由低能的次级离子所引起。有实验证明,重离子辐照所产生的次级离子在其径迹末端造成的最初损伤要比 X 射线和 γ 射线造成的损伤更复杂、更致命。因此,尽管重离子治癌在迄今为止的临床治疗试验研究中取得了非常显著的临床治疗效果^[12-15],但对于布拉格峰后面的正常组织,也应该充分认识重离子所带来的辐射危害及风险。

本文实验所用 C 离子束的 LET(30 keV/ μm)恰处于重离子治癌中离子束贯穿健康组织通道到达肿瘤靶区前所具有的 LET 范围之内。在利用 C 离子治疗肿瘤的过程中, C 离子束贯穿正常组织时的吸收剂量通常在 0.5 Gy 左右。从本实验结果来看, 0.5 Gy 剂量照射时细胞的 TL 数值为 134 ± 28 , 与对照组的 29 ± 11 相比,数值已经有显著的增加,说明 DNA 链断裂已达到了一个较高的水平。因此,应当在充分考虑重离子对正常组织辐射风险的前提条件

下合理地制订治疗计划,确保重离子治癌在有效的同时也是一种安全的放射治疗模式。

尽管彗星实验可以认为是检测 DNA 损伤良好的生物学标志,但由于各实验室的操作方法差异较大,包括溶解液、电泳液的配方、溶解时间、电泳参数和 DNA 结合荧光染料的选择都远远没有标准化,而且受 S 期细胞影响,复制过程中由于 DNA 结构松散而可能被检测为断裂,小于 50 kb 的单链断裂可能在裂解和电泳过程中丢失,以及分析软件各不相同等原因,此研究方法仍需进一步改进。

参考文献 (References):

- [1] Li Q. *Acta Laser Biology Sinica*, 2003, **2**(5): 386 (in Chinese). (李强. *激光生物学报*, 2003, **2**(5): 386.)
- [2] Kraft G. *Prog Part Nucl Phys*, 2000, **45**: S473.
- [3] Wojewodzka M, Buraczewska I, Kruszewski M. *Mutat Res*, 2002, **518**: 9.
- [4] Kent C R H, Eady J J, Ross G M, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 1995, **67**: 655.
- [5] Olive P L, Banath J P. *Mutat Res*, 1993, **294**(1): 275.
- [6] Hu Q, Hill R P. *Radiat Res*, 1996, **146**: 636.
- [7] Wada S, Kurahayashi H, Kobayashi Y, *et al.* *J Vet Med Sci*, 2003, **65**: 471.
- [8] Qiu L M, Li W J, Feng Y, *et al.* *Chin J Radiol Med Prot*, 2003, **23**(3): 169 (in Chinese). (邱丽梅, 李文建, 冯岩等. *中华放射医学与防护杂志*, 2003, **23**(3): 169.)
- [9] Haines G A, Hendry J H, Daniel C P, *et al.* *Biol Reprod*, 2002, **67**: 854.
- [10] Wada S, Kobayashi Y, Funayama T, *et al.* *J Radiat Res*, 2002, **43**: S153.
- [11] Moneef M A L, Sherwood B T, Bowman K J, *et al.* *British Journal of Cancer*, 2003, **89**: 2 271.
- [12] Castro J R. *Radiat Environ Biophys*, 1995, **34**: 45.
- [13] Miyamoto T, Yamamoto N, Nishimura H, *et al.* *Radiother Oncol*, 2003, **66**: 127.
- [14] Kato M, Miyamoto T, Yamamoto N, *et al.* *Radiother Oncol*, 2004, **71**: 147.
- [15] Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Thilmann C, *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, **58**: 631.

$^{12}\text{C}^{6+}$ Ion Beam Induced DNA Damage in Human Hepatocyte L02 Cells Detected by Comet Assay*

HE Jing^{1,2,1)}, LI Qiang¹, LI Ping¹

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: Human hepatocyte L02 cells were irradiated by the carbon ion beam with *LET* of 30 keV/ μm and DNA strand breaks were detected immediately after the irradiation using comet assay. Based on the comet images, all the indexes of comet assay including head DNA%, tail DNA%, comet length, tail length, tail moment and olive tail moment were analyzed with CASP and SPSS 11.5 code. Statistically significant dose-effect relationships could be observed in all the indexes of comet assay and TM increased with increasing the radiation dose. These experimental results suggest that carbon ion beam with intermediate *LET* value would cause remarkable DNA strand breaks immediately and the damage increases in a dose-dependent manner. This work provides basic data and evidence for the risk assessment of heavy ion radiation to healthy tissue.

Key words: comet assay; heavy ion; dose-effect relationship; DNA damage

* **Received date:** 5 Jun. 2007; **Revised date:** 3 Jul. 2007

Foundation item: Century Program of Chinese Academy of Sciences (0506120BR0); National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2006AA02Z499)

1) E-mail: nicehj@126.com