

文章编号: 1007-4627(2010)04-0469-05

## 不同 LET 辐射致 DNA 集簇性损伤的研究\*

徐辉辉<sup>1</sup>, 隋丽<sup>1,2</sup>, 刘晓丹<sup>1</sup>, 汪黎<sup>1</sup>, 王潇<sup>2</sup>, 王豫<sup>1</sup>, 徐勤枝<sup>1</sup>, 周平坤<sup>1, #</sup>

(1 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850;

2 中国原子能科学研究院, 北京 102413)

**摘要:** 利用辐照质粒 DNA 构象变化的分子模型, 以 DNA 糖苷酶 Fpg 和 AP 核酸内切酶 Endo III 识别并切割辐射所致 DNA 碱基损伤, 将其转换为 DNA 断裂损伤, 通过电泳分析 DNA 分子构象变化, 研究比较  $\gamma$  射线、质子和  $^7\text{Li}$  离子诱发 DNA 集簇性损伤。50 Gy 以上高剂量  $\gamma$  辐射对质粒 DNA 的损伤主要表现为单链断裂(SSB)和很少比例的双链断裂(DSB), 并能产生一定水平的集簇性损伤。相比之下, 高能质子束和高 LET 的  $^7\text{Li}$  离子直接所致 DNA 的断裂损伤以及所产生的集簇性碱基损伤比  $\gamma$  射线的要严重, 质子 10 Gy 照射就可诱发明显的集簇损伤。

**关键词:** DNA 集簇性损伤; 重离子; 质子;  $\gamma$  射线

**中图分类号:** R99      **文献标识码:** A

### 1 引言

重离子和质子与低传能线密度(LET)辐射(如 X 射线、 $\gamma$  射线和电子束等)相比, 有着不同的能量沉积密度、剂量分布等物理性质, 使其在通过生物物质时的电离径迹极为复杂, 产生更高的相对生物效应(RBE)<sup>[1]</sup>。DNA 是电离辐射作用于生物体的靶分子, 沿电离辐射径迹能量沉积致 DNA 产生一系列损伤, 包括单一位点损伤和区域多位点损伤即集簇性损伤(Clustered damage), 是辐射生物学效应和健康危害的关键原初分子事件<sup>[2]</sup>。单一位点损伤主要包括双链断裂(DSB)、单链断裂(SSB)、碱基损伤(AP 位点)和 DNA 交联等。集簇性损伤是指在约 20 个碱基对范围内的 DNA 分子中出现多个 DNA 损伤位点(包括 DSB、SSB 和 AP 位点等), 它是几种 DNA 损伤的集合<sup>[2, 3]</sup>。集簇性损伤又可区分为 DSB-集簇性损伤和 No-DSB 集簇性损伤<sup>[4, 5]</sup>。由于 DNA 集簇性损伤密集分布在狭小的空间结构里、且损伤类型多样, 致使其修复更为困难, 从而阻碍基因组 DNA 复制和转录等功能, 更

易造成细胞死亡、突变和癌变的严重后果<sup>[2, 5]</sup>。因此, 开展 DNA 集簇性损伤研究, 对于深入了解不同能量或 LET 粒子的生物学效应特点有着重要意义。借助一些识别 DNA 损伤的工具酶、并结合 DNA 的构象变化特点, 可达到检测和分析 DNA 集簇损伤的目的。大肠杆菌 DNA 糖苷酶 Fpg 也称为 8-氧化鸟嘌呤 DNA 糖苷酶, 既有 N-糖苷酶活性也有 AP-裂解活性, 可以降解双链 DNA 分子中受损的嘌呤碱基, 产生一个脱嘌呤位点, 并进一步切除 AP-位点, 产生单碱基的缺口<sup>[6]</sup>。大肠杆菌核酸内切酶 III(Endo III)既有 N-糖苷酶活性也有裂解 AP-位点活性, 也能去除 DNA 双链上受损的嘧啶碱基, 产生缺口<sup>[7-9]</sup>。本研究利用上述两种酶, 识别和切割被电离辐射作用的质粒 DNA 分子中碱基损伤成分, 再通过琼脂糖凝胶电泳将不同构象结构的 DNA 区分开来<sup>[10]</sup>, 研究比较  $\gamma$  射线、质子和  $^7\text{Li}$  离子产生的 DNA 集簇性损伤, 为下一步开展不同 LET 辐射致 DNA 集簇性损伤的机制研究、健康危害和防护评价奠定基础<sup>[11, 12]</sup>。

\* 收稿日期: 2010-02-05; 修改日期: 2010-03-13

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973 项目)(2007CB914603); 国家自然科学基金杰出青年基金资助项目(30825011); 国家自然科学基金青年基金资助项目(10805078)

作者简介: 徐辉辉(1985-), 男(汉族), 河南偃师人, 硕士研究生, 从事放射生物学研究; E-mail: xhh285846@126.com

# 通讯联系人: 周平坤, E-mail: zhoupk@nic.bmi.ac.cn

## 2 材料和方法

### 2.1 实验材料

PBR327 质粒(编号: 49, 由放射毒理与辐射危害评价研究室保存), 4.7 kb 大小, 转染感受态 DH5 $\alpha$ , 涂铺氨苄青霉素琼脂培养板, 挑克隆菌落用含氨苄青霉素的 LB 培养基摇菌, 用高纯度中量质粒提取试剂盒(天根公司)提取和纯化质粒 DNA, 用 PH8.0 的无菌水洗脱质粒 DNA, 测得浓度为 110 ng/ $\mu$ l, 高浓度的质粒 DNA 用无菌水稀释至 110 ng/ $\mu$ l。经琼脂糖凝胶电泳检测质粒 DNA 开环比例小于等于 5%、并无基因组 DNA 污染即用于下一步实验。Fpg 酶和 EndoIII 酶购自 NEB 公司。

### 2.2 质粒 DNA 照射

$\gamma$  射线照射为军事医学科学院放射与辐射医学研究所<sup>60</sup>Co 辐照装置, 样品距 Co 源中心线 1.5 m, 高 1.2 m, 剂量率为 14.3 Gy/min。实验分为对照组(0 Gy)和照射组, 照射组又按照剂量设为不同组别。质粒 DNA 分装至 0.2 ml 的 EP 管中, 照射剂量率 14.3 Gy/min, 套照。

质子和<sup>7</sup>Li 束照射是在中国原子能科学研究所的 HI-13 串列加速器上进行的。被加速的质子和<sup>7</sup>Li 离子能量分别为 15 和 43 MeV。进行辐照实验时, 粒子束经 Au 靶散射后进入 Q3D 磁谱仪, 通过散焦后经过 50  $\mu$ m 的 Kapton 膜由真空引入大气, 实现在大气环境下对 DNA 样品进行均匀照射。经过 Kapton 膜和空气层的能量损失后, 到达样品表面时质子和<sup>7</sup>Li 离子的能量分别为 14.7 和 37.3 MeV, 所对应的在水中的 LET 值分别约为 3.4 和 70 keV/ $\mu$ m。质子照射时, 由于质子穿透能力较强, 射程在 3 mm 左右, 将 DNA 溶液分装于 0.2 ml 的 EP 管中进行不同剂量的照射。重离子射程约为 300  $\mu$ m 左右, 射程相对较短, 照射时需使用特制的 DNA 样品固定装置, 将 DNA 样品溶液夹于两层 4  $\mu$ m 厚的 Mylar 膜之间实施不同剂量的照射。质子和<sup>7</sup>Li 离子照射时, 相应的剂量率分别为 8 和 16 Gy/min。

### 2.3 质粒 DNA 损伤分析

#### (1) DNA 断裂损伤的分析

DNA 受照射后, 直接进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 100 V, 时间 60 min。电泳后凝胶成像

仪照相, 观察超螺旋(完整质粒)、开环(SSB)、线性(DSB)的质粒 DNA 比例, 并用 Quantitu One 软件进行灰度扫描和定量分析, 实验重复 3 次以上。

#### (2) DNA 集簇性损伤分析<sup>[6]</sup>

质粒 DNA 照射后, 用 Fpg 酶和 Endo III 酶切反应, 反应的总体积为 20  $\mu$ l, 其中含质粒 DNA 10  $\mu$ l(质粒总量为 1.1  $\mu$ g)、Fpg 酶 4 U、Endo III 酶 5 U、BSA 2  $\mu$ l、酶切缓冲液 Buffer I 和 Buffer Endo III 各 1  $\mu$ l。轻轻混匀, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 识别和切割集簇损伤碱基, 转换成为 DNA 断裂损伤。后加入 2  $\mu$ l 0.1 mol/l 的 EDTA 终止反应, 立即电泳分析或存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱备用。

### 2.4 统计学方法

实验数据用均值 $\pm$ 单次测量标准差表示。用 SPSS 统计软件进行统计学处理, 组间比较采用方差分析及 t 检验进行统计分析。

## 3 结果与讨论

### 3.1 <sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线致 DNA 损伤

完整的质粒 DNA 分子应为超螺旋结构(SC), 发生 SSB 损伤后成为开环结构(OC), DSB 损伤后就成为线性 DNA 分子。图 1 给出了琼脂糖凝胶电泳观察  $\gamma$  射线体外照射直接造成的质粒 DNA 断裂损伤的电泳图谱(图 1(a)) 和定量检测结果(图 1(b))。质粒超螺旋结构在 50 Gy 照射后就有所减少, 并随着照射剂量的增加逐渐减少, 与之相对应

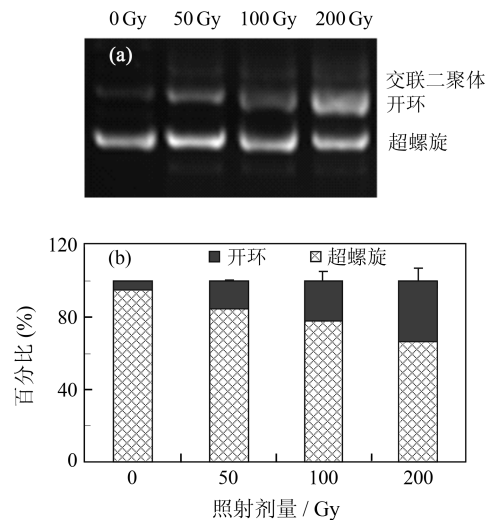


图 1 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线照射 (a) 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图和 (b) 致质粒 DNA SSB 损伤(开环 DNA) 的定量分析结果

的因 SSB 造成的开环构象 DNA 的量逐渐增加。此外，因照射造成的质粒 DNA 分子间的交联而形成的二聚体也有所增加。这种二聚体 DNA 分子是在另外一组原子力显微镜实验中被观察到，而且两个 DNA 分子间交联与 DNA 大小、浓度等成正比(结果另文发表)。此外，预实验中发现 20 Gy 以下剂量  $\gamma$  射线体外照射所致质粒 DNA 损伤不很明显。

为检测  $\gamma$  射线照射致 DNA 集簇性损伤，不同剂量照射的质粒 DNA 在 20  $\mu$ l 反应体系中经 Fpg 和 Endo III 双酶切，切除受照 DNA 分子上的损伤碱基和形成的 AP-位点，通过电泳将集簇损伤反映出来，以非酶切样品作为对照(图 2)。由于这两个酶是优先剪切受损碱基，并非绝对特异性剪切，因此在图 2(b)统计分析中减除了未照射对照样品中被 Fpg 和 Endo III 酶剪切的正常 DNA 的那部分。由图 2(a)的电泳图可以直观地看出，照射后经酶切

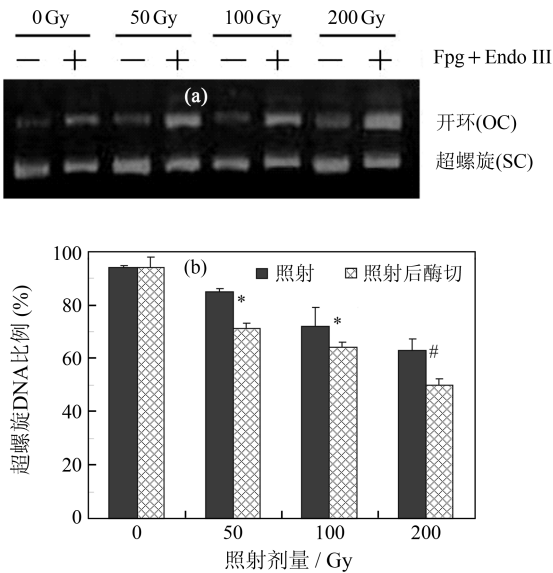


图 2 (a)  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线照射质粒 DNA 集簇损伤的检测 (Fpg 和 Endo V 酶切后琼脂糖凝胶电泳图和 (b) 受照质粒 DNA 在 Fpg 和 End III 酶切前后的超螺旋构象 DNA 的量的变化 (与酶切前的结果比较: \*  $P < 0.05$ ; #  $P < 0.01$ )

质粒的超螺旋构象 DNA 的量进一步减少，由此产生的单链缺口的开环形式 DNA 量显著增加。结果表明，大剂量  $\gamma$  射线照射后双链 DNA 中存在一定量的碱基损伤和 SSB，这些损伤位点中并不是简单的单一损伤位点，往往表现为非 DSB 的集簇性损伤和少量的 DSB 集簇性损伤，但在所观察的 50—

200 Gy 剂量范围中，DNA 集簇性碱基损伤的量并没有明显的剂量依赖性，基本维持在约 10% 的水平。

### 3.2 质子照射致 DNA 损伤

将质粒 DNA 分装于 0.2 ml 的 EP 管进行质子束照射，每支辐照样品种体积小于 40  $\mu$ l，以使质子能够完全穿透 DNA 样品。图 3 的实验结果显示，在所检测的剂量范围内，质子致质粒 DNA 损伤类型仍然以 SSB 损伤(开环构象)为主，随着照射剂量的增加，显著增加。可以看出，由于所采用的质子束为高能粒子束，虽然所使用的照射剂量低于或等于  $\gamma$  射线，但质子诱发的 DNA 损伤要比  $\gamma$  辐照的严

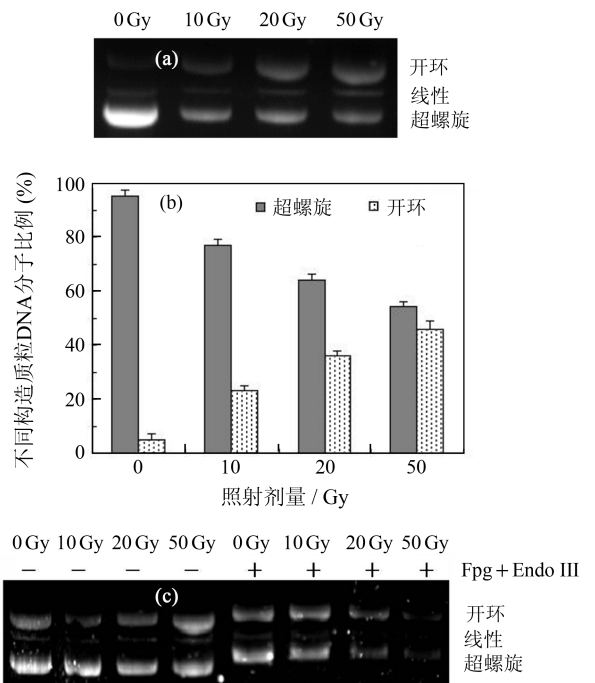


图 3 质子照射 (a) 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图、(b) 致质粒 DNA SSB 损伤(开环)的定量分析结果和 (c) 致质粒 DNA 集簇损伤的检测 (Fpg 和 Endo III 酶切后琼脂糖凝胶电泳图)

重得多。如 50 Gy 照射所产生的 SSB(开环构象)所占的比例为 46%，如图 3(b)所示，这比 200 Gy  $\gamma$  射线照射所产生的 DNA 损伤量还要高。通过 Fpg 和 Endo III 酶切后电泳观察质子照射对 DNA 的集簇性损伤，可见相对较小的剂量照射，质子就可造成很严重的碱基损伤(图 3(c))，特别是 50 Gy 酶切后电泳，发现 DNA 大量减少，并且出现 DNA 弥散区域，说明照射后 DNA 上存在严重的碱基损伤和

SSB, 经酶切后产生大量 DNA 片段。这些碱基损伤, 加上 SSB 和 DSB 损伤构成了 DNA 集簇性损伤, 同样比  $\gamma$  射线的严重得多。另外, 由于酶切体系中含有 Buffer、BSA、酶等原因, 致使酶切后的质粒在电泳时比没有酶切的质粒 DNA 的电泳速率要整体稍慢一些(图 3(c))。

### 3.3 $^7\text{Li}$ 离子照射致 DNA 损伤

$^7\text{Li}$  离子照射时, 将溶液状态 DNA 样品加至两层 mylar 膜之间实施照射, 照射后回收质粒 DNA 进行损伤检测。由图 4(a)和图 4(b)可见, 照射后, 超螺旋构象质粒 DNA 随着剂量的增加逐渐减少, 而开环构象显著增加, 线性 DNA 也少量增加。与  $\gamma$  射线造成的 DNA 损伤(图 1)比较, 同等剂

致损伤(图 3(a)和 3(b))相比,  $^7\text{Li}$  离子的效应相对要小。这可能是由于质子质量较轻, 在照射过程中, 很容易与其他介质发生反应, 产生一定量的中子、次级粒子和  $\gamma$  射线, 从而增加了损伤效应。另外, 由于  $^7\text{Li}$  离子的穿透能力有限, 其照射的质粒 DNA 在两层 mylar 膜之间, 加样的两层 mylar 膜之间厚度约为 30—35  $\mu\text{m}$ , 而  $^7\text{Li}$  离子穿透深度为 70—80  $\mu\text{m}$ , 其照射能量会有损失, 但大部分不能够沉积在样品中, 而质子照射是在 0.2 ml 的 EP 管中, 其能量能够完全沉积于样品中, 所以质子的损伤效应比  $^7\text{Li}$  离子的要严重。

同样, 通过 Fpg 和 Endo III 酶切后电泳观察  $^7\text{Li}$  离子照射对 DNA 的集簇性损伤(图 4(c)), 可见 50 Gy 照射质粒 DNA 经 Fpg 和 End III 酶切后, 超螺旋 DNA 的残留量就已很少, 100 Gy 以上照射样品超螺旋 DNA 几乎消失, 开环构象和交联二聚体分子的比例随之显著上升, 表明重离子辐射能诱发 DNA 严重的集簇性损伤。

## 4 结论

本研究利用质粒 DNA 分子构象变化的实验模型研究比较  $\gamma$  射线、质子和  $^7\text{Li}$  离子诱发 DNA 断裂损伤和集簇性碱基损伤。结果显示, 50 Gy 以上高剂量  $\gamma$  辐射对质粒 DNA 的损伤主要表现为 SSB 和很少比例的 DSB, 并能产生一定水平( $\sim 10\%$ )的集簇性碱基损伤, 但 50—200 Gy 剂量范围中集簇损伤的量并没有明显的剂量依赖性。相比之下, 高能质子和高 LET 的  $^7\text{Li}$  离子直接所致 DNA 的断裂损伤明显要比  $\gamma$  射线产生的多。例如, 50 Gy 照射所产生的 DNA SSB 损伤量比 200 Gy  $\gamma$  射线照射所产生的量还要高。质子和  $^7\text{Li}$  离子所产生的集簇性碱基损伤比  $\gamma$  射线更加严重, 10 Gy 的质子照射就可诱发明显的集簇损伤。这些实验结果不但丰富了对不同 LET 辐射致 DNA 集簇损伤的认识, 也为危害评价和损伤防护措施研究提供了依据和技术手段。

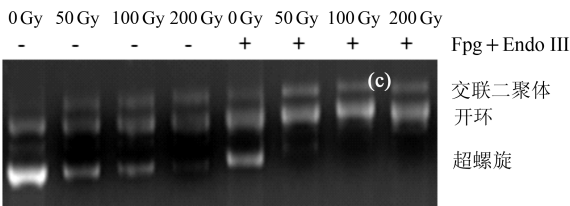
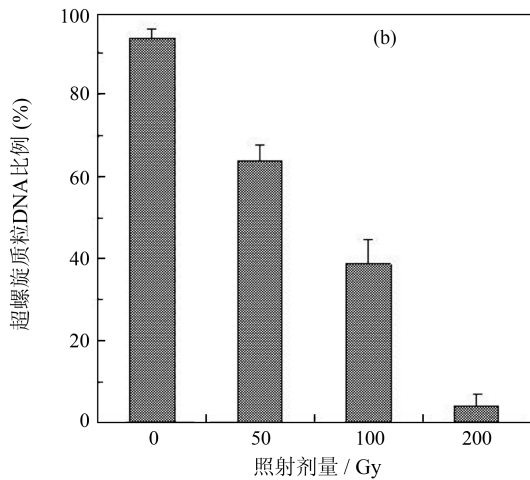
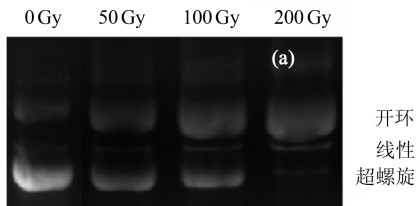


图 4  $^7\text{Li}$  离子照射(a)质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图、(b) 质粒 DNA 的超螺旋构象比例变化的定量分析结果和 (c)离子照射质粒 DNA 集簇损伤的检测(Fpg 和 Endo III 酶切后琼脂糖凝胶电泳图)

量下  $^7\text{Li}$  离子致质粒 DNA 损伤更严重, 但与质子所

### 参考文献 (References):

[1] Jing Xigang, Li Wenjian, Yang She, *et al.* Nuclear Physics Review, 2009, 26(3): 259(in Chinese).  
(荆西刚, 李文建, 杨建设, 等. 原子核物理评论, 2009, 26(3): 259.)

- [2] Hada M, Georgakilas A G. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2008, **49** (3): 203 (review).
- [3] Alexandros G G, Paula V B, David M W, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(18): 5609.
- [4] Melanie Gulston, Catherine de Lara, Terry Jenner, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**(4): 1602.
- [5] Bellon S, Shikazono N, Cunniffe S, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(13): 4430.
- [6] Sutherland B M, Bennett P V, Sidorkina O, *et al.* *Biochemistry*, 2000, **39** (27): 8026.
- [7] Fromme J C, Verdine G L. *EMBO J*, 2003, **22**(13): 3461.
- [8] Naoya Shikazono, Colin Pearson, Peter O'Neill, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(13): 3722.
- [9] David-Cordonnier M H, Laval J, O'Neill P. *Biochemistry*, 2001, **40**: 5738.
- [10] Maddalena M, Cristina G, Sonia F, *et al.* *Mutation Research*, 2009, **663**(1—2): (32).
- [11] Terato H, Ide H. *Biological Science in Space*, 2004, **18**(4): 206.
- [12] Hada M, Sutherland B M. *Radiation Research*, 2006, **165** (2): 223.

## Comparative Studies on Clustered DNA Damage Induced by Different LET Ionizing Radiation<sup>\*</sup>

XU Hui-hui<sup>1</sup>, SUI Li<sup>1, 2</sup>, LIU Xiao-dan<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, WANG Xiao<sup>2</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, XU Qin-zhi<sup>1</sup>, ZHOU Ping-kun<sup>1, #</sup>

(1 *Institute of Radiation Medicine of Military Academy of Medical Science, Beijing 100850 China*;

2 *China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413 China*)

**Abstract:** Based on the molecular model of conformation changes of plasmid DNA, the DNA damages induced by  $\gamma$ -rays, proton and  $^7\text{Li}$  ion were studied and compared. In order to detect the clustered DNA damage, the irradiated plasmid DNA was digested with *E Coli* formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) and AP endonuclease III (Endo III) which convert the damaged bases and AP sites into single-strand breaks (SSB), and then subjected to agarose gel electrophoresis. The results indicated that SSB, a certain level of clustered bases lesions and a tiny of double-strand breaks (DSB) were induced by the observed 50—200 Gy of  $\gamma$ -rays. The DNA breakage and clustered bases lesions induced by high LET proton and  $^7\text{Li}$  ion were much higher as compared with that induced by  $\gamma$ -rays. Our data also showed that an obvious clustered DNA damage was induced by proton even at 10 Gy dose, and the effectiveness of DNA damage induction by proton was higher than that of  $^7\text{Li}$  ion.

**Key words:** clustered DNA damage; heavy ion; proton;  $\gamma$  ray

\* **Received date:** 5 Feb. 2010; **Revised date:** 13 Mar. 2010

\* **Foundation item:** Major State Basic Research Development Program of China(973 Program)(2007CB914603); Outstanding Youth Science Foundation of NFSC of China(30825011); Youth Funds of National Natural Science Foundation of China(10805078)

# **Corresponding author:** Zhou Ping-kun, E-mail: zhoupk@nic.bmi.ac.cn