

文章编号: 1007-4627(2011)01-0114-04

模拟微重力效应对辐射致细胞 DNA 损伤修复效应的影响*

王弼乾^{1,2}, 李文建^{1, #}, 王转子¹, 党秉荣¹, 魏巍¹, 荆西刚¹, 张斌团^{1,2}

(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: 在地面模拟微重力的情况下, 应用碱性单细胞凝胶电泳(SCGE)技术对 80 MeV/u Ne 离子辐射诱发人血淋巴细胞 DNA 损伤修复效应进行了研究。在不同时刻对相同剂量辐照后的淋巴细胞经单细胞电泳处理后显示, 在模拟微重力下孵育的彗星尾更长, 彗星头面积更小。这表明, 相对地面环境而言, 模拟微重力环境对淋巴细胞的 DNA 损伤修复有一定的抑制作用。

关键词: 模拟微重力; 单细胞凝胶电泳; 人血淋巴细胞; 加速的 Ne 离子; DNA 损伤修复

中图分类号: Q256; Q274; Q345+.7; V520.6; V524.3

文献标识码: A

1 引言

随着载人航天技术的不断发展, 人们越来越关注空间环境对人类的影响。持续微重力和空间辐射是空间环境的两个最重要的特征。为了研究空间环境的生物学效应, 利用返回式卫星、飞船和空间搭载生物材料已取得一些研究成果。然而从 1961 年前苏联宇航员加加林第一次进入太空到现在, 有太空飞行经历的宇航员不超过 400 人, 而且关于他们的健康状况的数据报道是少之又少, 难以就此获得具有统计学意义的相关数据。此外, 空间搭载实验生物学研究的机会很少, 费用较高, 环境条件较难控制; 而且在卫星回收后, 需经过一段时间才能回到实验室进行分析, 微重力的效应可能消失。目前, 利用航天器的搭载条件和地面重离子加速器辐照条件相结合进行的高能重离子生物学效应研究正成为国际关注的热点^[1]。本文利用 HIRFL 提供的重离子束对人外周血淋巴细胞进行辐照, 考察了它们在不同重力条件下的修复程度, 结果表明微重力条件不利于 DNA 损伤的修复。

2 材料与方法

2.1 健康人外周血淋巴细胞分离和纯化

取健康人静脉血, 使用肝素抗凝。在超净条件下将 2 ml 血沿着管壁缓缓加入到内装有 2 ml 淋巴细胞分层液的无菌离心管中, 在水平离心机上 3500 rotations/min 离心 8 min, 向收集的淋巴细胞加 PBS 缓冲液混匀, 离心、清洗 2 次, 制成 10^5 cells/ml 淋巴细胞悬液。

2.2 细胞培养与辐照

将上述细胞放到混有 15% 灭活小牛血清的培养液中培养, 平均分装到培养皿中。立即将培养皿放到在 HIRFL 辐照终端上利用 80 MeV/u $^{20}\text{Ne}^{10+}$ 进行重离子辐照。剂量分别为 0.5, 1, 2 和 5 Gy。

2.3 辐照后细胞培养

本实验采用美国宇航局(NASA)改进的回转器来模拟微重力, 其原理是样品在电机的带动下不停地绕水平轴匀速旋转。在适当转速下, 达到模拟微重力条件下生物效应的结果。本实验所用的回转器的半径是 3 cm, 采用转速 23 rotations/min, 平均重力为 10^{-2}g ^[2]。将辐照后淋巴细胞分两组, 一组

* 收稿日期: 2010-06-29; 修改日期: 2010-09-02

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10875153)

作者简介: 王弼乾(1986—), 男(汉族), 吉林通化人, 硕士, 从事生物物理学研究; E-mail: wangbq_2008@hotmail.com

通讯联系人: 李文建, E-mail: wjli@impcas.ac.cn

放入地面环境的恒温细胞培养箱中 37 °C 孵育, 另一组置于模拟重力环境的恒温细胞培养箱中在 37 °C 下孵育, 两组同步孵育 0.5, 2 和 6 h。

2.4 DNA 损伤检测

(1) 凝胶样本制备

实验前预备打磨过的载玻片若干, 用 70% 酒精浸泡过夜、晾干和预冷备用。用 PBS 液配制的 0.5% 正常熔点琼脂糖溶解后, 滴加在事先准备好的载玻片上, 用细玻璃棒使胶均匀展开, 4 °C 下固化 10 min, 成为第一层胶。取新鲜制备的细胞悬液, 在 37 °C 水浴环境下按 1:3 的比例与用 PBS 液配制 0.5% 低熔点琼脂糖充分混匀后, 滴加到第一层胶上, 立即加盖盖玻片, 4 °C 下固化 30 min, 成为第二层胶。

(2) 细胞裂解

取下盖玻片, 将凝胶载玻片完全浸入新配制的低温裂解液 (2.5 mol/l NaCl, 10 mmol/l Tris, 1% 月桂酰肌氨酸钠, 100 mmol/l EDTA₂Na₂, 用前加 1% Triton X-100 和 10% DMSO) 中, 4 °C 下裂解 1.5—2 h。

(3) 电泳

中和 将凝胶载玻片从裂解液中取出, 用去离子水轻轻冲洗 3—5 遍, 洗去多余的盐分。

解旋 将洗好的凝胶载玻片移入水平电泳槽解旋 20—30 min, 解旋液 (1 mmol/l EDTA₂Na₂, 300 mmol/l NaOH, pH13) 预置于 4 °C 下 1 h。

电泳 20 V, 200 mA 条件下水平电泳 25 min, 低温避光。

染色 取出电泳后的凝胶载玻片, 用 0.4 mol/l Tris (pH 7.5) 漂洗 3 次, 每次 5 min, 然后滴加 40 mg/ml 溴化乙锭 20 μl。放置 4 °C 避光保存, 保持湿润。24 h 内观察, 以防荧光淬灭。

2.5 观察

在荧光显微镜下观察, 选择激发波长 400 nm, 光栅波长 590 nm, 放大倍数 400 倍, 每个样品随机选取 50—70 个细胞同步拍摄。三次重复。

2.6 结果分析

应用软件 Image J 对细胞图像进行测量分析。

3 结果

3.1 DNA 损伤的修复效应

淋巴细胞经 1 Gy 的 Ne 离子辐照后, 细胞

DNA 发生断裂, 分别在模拟微重力和地面环境下孵育 0.5, 2 和 6 h, 淋巴细胞 DNA 经解旋继而引起高级结构松散, 在电场作用下, 带负电松散的 DNA 会离开细胞核向正极迁移, 形成拖尾 (即彗星图像) (见图 1)。

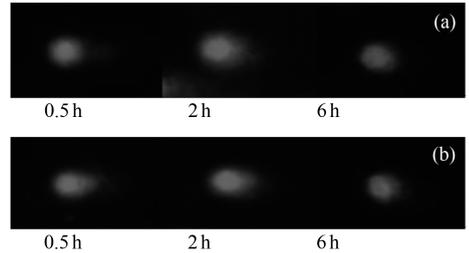


图 1 DNA 损伤修复效应的单细胞电泳图像
(a) 地面环境, (b) 模拟微重力效应。

图 2 给出了重离子辐射诱导淋巴细胞 DNA 损伤程度与修复的时间关系。结果表明, 随修复时间的延长, 在模拟微重力和地面环境条件下培养的细

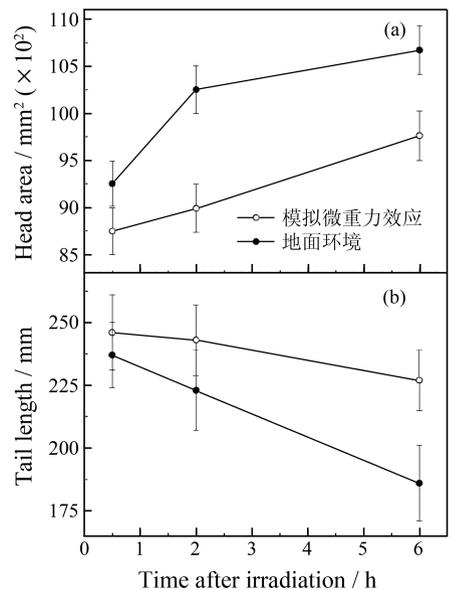


图 2 DNA 损伤修复效应统计数据图

胞都显示出彗星头部面积逐渐增大 (见图 2(a)), 彗尾长度逐渐变短 (见图 2(b)), 即随着辐照后修复时间的延长, 淋巴细胞 DNA 损伤程度逐渐减少。比较两种培养条件下 DNA 的修复情况, 观测到, 在相同的修复时间点, 模拟微重力条件下彗星头部面积相对较小, 彗尾长度相对较长, 即模拟微重力环境下培养的细胞相对地面环境培养的细胞表现出较低的 DNA 损伤修复效应。

3.2 DNA 损伤的剂量效应

重离子辐射诱导的淋巴细胞 DNA 损伤程度与辐射剂量之间的关系见图 3。在 0.5—5 Gy 的剂量范围内,随着剂量的增加,模拟微重力和地面条件下培养的细胞都显示出彗星头部面积逐渐减小,拖尾长度逐渐变长,即两种培养条件下,淋巴细胞 DNA 损伤程度都随辐射剂量的增大而增大;同时还观测到,在同一剂量点,与地面条件相比,模拟微重力环境下培养的细胞显示出更严重的 DNA 损伤,这种差异在辐射剂量为 2 Gy 处较为显著。

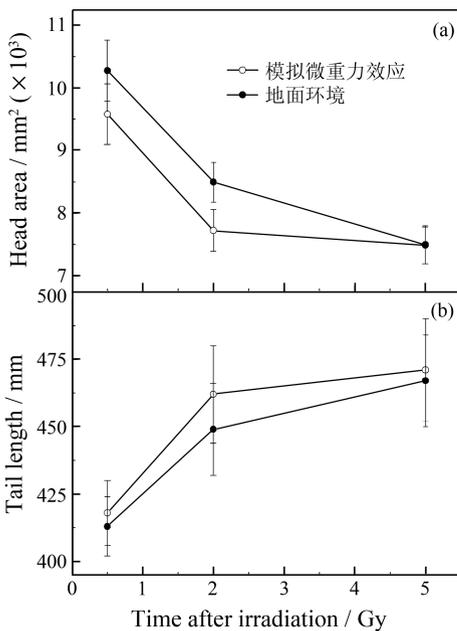


图 3 DNA 剂量效应统计数据图

4 结论

基于空间飞行所面临的重离子辐射和低重力环境,研究了 Ne 离子辐射诱导淋巴细胞 DNA 损伤修复效应以及模拟微重力条件对这种修复效应的影响。发现正常条件和模拟微重力条件下,辐射后随孵育时间的延长 DNA 损伤程度均逐渐减小,但在模拟微重力条件下,淋巴细胞 DNA 损伤修复能力有所降低;剂量效应结果显示,正常培养条件下,淋

巴细胞 DNA 损伤程度随剂量的增大而增大,这与其他研究结果一致^[3-5];模拟微重力条件下,淋巴细胞 DNA 损伤程度也随剂量的增大而增大,但在同一剂量点,模拟微重力条件下培养的细胞显示出更严重的 DNA 损伤。该研究表明,模拟微重力条件对重离子辐照诱导的 DNA 损伤修复效应有一定的抑制作用。Mognato 等^[6]以 γ 射线为辐射源也得到相同的结果。Hornbeck 等^[7-8]也报道:与地面条件相比,失重条件下空间重离子辐射诱导更严重的 DNA 损伤,且修复效率更低。推测其可能的原因是^[9]:低重力可能会影响细胞染色体的结构,而 DNA 损伤检测点的激活会受到染色体结构的影响,从而影响到 DNA 损伤的修复。

在空间环境中,高能高电荷重粒子(HZN)虽然很少,可是由于其 LET 很高,局部生物学效应很大,是空间辐射的主要来源。因此,地面模拟微重力结合重离子辐射条件进行 HZN 粒子产生的生物学效应的研究将为空间环境辐射生物学研究提供重要的理论和实践基础。

参考文献 (References):

- [1] Li Wenjian, Dang Bingrong, Wang Zhuanzi, *et al.* Nuclear Physics Review, 2010, **27**(2): 206(in Chinese).
(李文建, 党秉荣, 王转子等. 原子核物理评论, 2010, **27**(2):206.)
- [2] Canova S, Fiorasi F, Maddalena M, *et al.* Radiat. Res, 2005, **163**: 191.
- [3] Rydberg B. Radiat Res, 1996, **200**: 145.
- [4] Lobrich M, Cooper P K, Rydberg B. Radiat Biol, 1996, **493**: 80.
- [5] Newman H C, Prise K M, Folkard M, *et al.* Int J Radiat Biol, 1997, **347**: 71.
- [6] Mognato M, Girardi C, Fabris S, *et al.* Mutat Res, 2009, **663**: 32
- [7] Horneck G. Mutat Res, 1999, **430**: 221.
- [8] Horneck G. Nucl Radiat Meas, 1992, **185**: 20.
- [9] Harper J V, Anderson J A, O'Neill P. DNA Repair, 2010, **907**: 9.

Effects of Modeled Microgravity on DNA Repair of Lymphocytes Induced by Ne Ions^{*}

WANG Bi-qian^{1, 2}, LI Wen-jian^{1, #}, WANG Zhuan-zi¹, DANG Bing-rong¹, WEI Wei¹,
JING Xi-gang¹, ZHANG Bin-tuan^{1, 2}

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*
2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: Effect of the modeled microgravity (MMG) on heavy ion-induced lymphocytes DNA repair by using single cell gel electrophoresis (SCGE) has been studied. The results showed that residual DNA damage induced by Ne ions irradiation increased more in cultures incubated in MMG than in 1 g, which indicated that MMG incubation after Ne ions irradiation reduce the DNA damage repair capacity.

Key words: MMG; SCGE; human blood lymphocyte; accelerate Ne ion; DNA repair

* **Received date:** 29 Jun. 2010; **Revised date:** 2 Sep. 2010

* **Foundation item:** National Natural Science Foundation of China(10875153)

Corresponding author: Li Wen-jian, E-mail: wjli@impcas.ac.cn