

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.01.004

E838 对辐射所致小鼠淋巴细胞 DNA 双链断裂的防护作用

王月英, 刘 强, 吴红英, 李德冠, 张 恒, 王小春, 路 璐, 孟爱民, 王汝勤, 张良安

Protective Effects of E838 on Mouse Lymphocyte Double-strand DNA Broken Induced by Radiation

WANG Yue-ying, LIU Qiang, WU Hong-ying, LI De-guan, ZHANG Heng, WANG Xiao-chun, LU Lu, MENG Ai-min, WANG Ru-qin, ZHANG Liang-an

*Institute of Radiation Medicine, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Science, Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Tianjin 300192, China**Corresponding Author: MENG Ai-min, E-mail: ai_min_meng@126.com*

Abstract: Objective To investigate the effects of E838 on mouse survival after lethal dose irradiation and double-strand DNA broken in mouse lymphocyte induced by radiation. **Methods** E838 was given intraperitoneal injection before radiation. The survival time and mortality of mouse were observed. Double-strand DNA broken after 1 Gy γ radiation was detected by single cell gel electrophoresis assay technology and the results was compared with positive drug. The comet image was analyzed by using CASP software and SPSS 12.0 was used for statistical analysis. **Results** The 30d survival time of E838 groups were significantly increased compared with that of control group. Compared with the control group, survival rate in group of E838 with high dose, middle dose and low dose increases by 55 percent, 85 percent, 75 percent respectively, and it has a significant difference in the survival time ($P < 0.001$). The protective index is 1.99, 2.56, 2.46 respectively. Compared with Ethinylestradiol, mouse in group of E838 with middle dose and high dose has longer survival time ($P < 0.001$). The double-strand DNA broken in lymphocytes was obviously decreased when mice were preventively given E838 before irradiation. The group of E838 with high dose, middle dose and low dose, the percentage of TDNA (11.68, 6.24, 9.05), TL (18.53, 10.09, 16.02), TM (2.13, 0.64, 1.21) and OTM (2.52, 0.99, 1.59) have a decrease in residual damage (P value < 0.001). It has a significant difference among E838, Ethinylestradiol and Nylestriol. **Conclusion** E838 has remarkable protective effects on DNA damage after γ -irradiation.

Key words: E838; Radiation damage; DNA double-strand break

摘 要: 目的 探讨 E838 对辐射导致小鼠淋巴细胞 DNA 双链断裂的防护作用。 **方法** 小鼠照射前给予 E838, 观察其存活率和动物平均存活时间; 用中性单细胞凝胶电泳技术, 检测 1 Gy γ 射线照射后小鼠淋巴细胞 DNA 双链断裂, 并与给予同类药物小鼠进行比较, 用 CASP 软件分析彗星图像, SPSS12.0 进行数据的统计学分析。 **结果** E838 预防用药能够明显提高损伤动物的 30 天存活率, E838 低、中、高剂量组存活率分别比对照组提高 55%、85%、75%, 平均生存天数与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 保护指数分别为 1.99、2.56、2.46。 E838 与炔雌醇比较, 中、高剂量组的动物平均生存天数明显延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。 E838 能明显减轻淋巴细胞 DNA 双链断裂损伤, E838 低、中、高组, TDNA 百分比 (11.68、6.24、9.05)、TL (18.53、10.09、16.02)、TM

(2.13、0.64、1.21) 和 OTM (2.52、0.99、1.59) 残余损伤逐渐减少, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。 E838 与炔雌醇、尼尔雌醇比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** E838 对辐射损伤具有明显的保护作用。

关键词: E838; 辐射损伤; DNA 双链断裂
中图分类号: R73-36 **文献标识码:** A
文章编号: 1000-8578(2010)07-0748-03

收稿日期: 2009-09-11; **修回日期:** 2009-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30770645); 天津市自然科学基金资助项目 (08JCYBJC07300); 天津市自然科学基金重点基金资助项目 (043802411)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院 中国协和医科大学放射医学研究所 天津市分子核医学重点实验室

通信作者: 孟爱民, E-mail: ai_min_meng@126.com

作者简介: 王月英 (1957-), 女, 本科, 副研究员, 主要从事放射生物学、实验动物学的研究

0 引言

放射损伤是核事故和核爆炸时所发生的主要伤类,伤情严重,救治困难,因此研究对此类损伤的有效防治措施具有十分重要的意义。随着辐射分子生物学研究的不断深入,越来越多的电离辐射研究转向 DNA 的损伤和修复。单细胞凝胶电泳(single cell gelelectrophoresis, SCGE), 又称彗星试验(comet assay), 能从单细胞水平检测 DNA 双链断裂(double strand break, DSB)指标。E838 是一种新型的雌激素衍生物,初步实验表明,它有抑瘤^[1]和抗放作用,为进一步证实该药对辐射的防护作用,本实验选用 E838、炔雌醇、尼尔雌醇抗放射损伤药物进行对比,通过动物实验研究它们对放射损伤的防治效果,为该药的推广应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂

炔雌醇(EE2) 由四川省放射卫生防护所供给,尼尔雌醇(523) 由军事医学科学院供给。正常熔点琼脂糖凝胶购自 Biowest 公司,低熔点琼脂糖凝胶为美国 Promega 公司产品, Tris-HCl、二甲基亚砷(DMSO)和 Triton X-100 均为美国 Sigma 公司产品,中国医学科学院血液学研究所科技公司分装。水平电泳仪为美国 BIO—RAD 公司产品, RPMI1640 培养液购自美国 Invitrogen Corporation。

1.2 实验动物

我所培育的 IRM-2 近交系小鼠 160 只, [合格证号: SCXK(津) 2005-0001], 6~7 周龄, 雌雄各半, 体重(20~22)g。

1.3 照射条件

¹³⁷Cs γ 射线一次性全身照射(辐射源购自加拿大原子能有限公司), 吸收剂量分别为 8.0Gy 和 1.0Gy, 剂量率为 0.87 Gy/min。

1.4 30 天存活率观察

将小鼠随机分为对照组、阳性对照炔雌醇(EE2)组和 E838 药物 5、7.5、10 mg/kg (低、中、高)5 组, 每组各 20 只, 照射前 3、2、1d 连续 3 次腹腔注射 E838, 每只 0.2 ml, EE2 1.25 mg/kg。对照组给予同体积的茶油。最后一次给药后 24h 进行照射, 照射剂量 8.0Gy。观察 30d 存活率和死亡动物的平均存活时间及保护指数。

1.5 单细胞凝胶电泳(SCGE)实验

将小鼠随机分为对照组、阳性对照炔雌醇(EE2)组、尼尔雌醇(523)组和 E838 药物低、中、高 6 组, 每组各 10 只, 照射前 3、2、1d 连续 3 次腹腔注射 E838,

每只 0.2 ml, 阳性对照组给予 EE2 25 μ g/0.2 ml。在照射前 7d、3d 分 2 次给予 523 5 mg/kg。最后一次给药后 24h 进行照射, 照射剂量 1.0 Gy。2 h 之内用单细胞凝胶电泳(SCGE)实验, 检测小鼠淋巴细胞照射后的 DNA 双链断裂, 观察彗星尾部 DNA 百分比(tail DNA%, TDNA%)、彗星尾长(tail length, TL)、彗星尾矩(tail moment, TM)和 Olive 尾矩(olive tail moment, OTM)指标。

1.6 淋巴细胞分离

取各组鼠外周血 0.2ml, 肝素抗凝, 加入等体积淋巴细胞, 3 500 r/min 离心 4 min。取中间层淋巴细胞并加入 PBS 至 2 ml, 1 500 r/min 离心 6 min。重复洗涤细胞两次。再将细胞悬于 PBS, 调整细胞浓度为 2×10^4 /ml 置于 4℃ 冰箱备用。

1.7 中性单细胞凝胶电泳实验

参考 Banath 等^[2]单细胞凝胶电泳(SCGE)方法, 并稍加改良。(1)铺胶:取 100 正常熔点琼脂糖凝胶均匀铺于自制微电泳槽内, 置 4℃ 冰箱固化, 采用淋巴细胞悬液配置 75% 低熔点琼脂糖凝胶, 混匀后均匀铺于第 1 层凝胶上面, 置于 4℃ 冰箱固化;(2)裂解和电泳:胶板置于新鲜配制的中性裂解液, 4℃ 冰箱中裂解 1.5 h;用双蒸水漂洗去掉多余的盐分, 于 4℃ 电泳液中静置 20 min, 然后在 20 V、200 mA 条件下电泳 20 min;(3)染色和观察:溴化乙锭(EB)染色, 双蒸水漂洗, 荧光显微镜下观察彗星, 用 Nikon 相机随机摄取彗星图像, 每个剂量点拍摄 100 个彗星图像。

1.8 彗星图像分析

彗星图像采用波兰弗罗茨瓦夫大学(University of Wroclaw)提供的 CASP^[3]系统自动分析, 分析结果用 SPSS 12.0 统计软件直接读取。选取 TDNA%、TL、TM 和 OTM 作为分析指标。

1.9 统计学方法

30 天存活率实验数据为 $\bar{x} \pm s$, 两组比较用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。彗星图像分析用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析和组间两两对比。

2 结果

2.1 E838 对大剂量辐射致死损伤的预防作用结果

E838 低、中、高三个剂量组存活率分别比对照组提高 55%、85%、75%, EE2 组为 30%, 动物存活数分别为 11、17、15 只, EE2 组存活 6 只, 平均生存天数分别为 (21.60 ± 9.40) 、 (27.75 ± 5.47) 、 (26.75 ± 6.16) 天与对照组 (10.85 ± 3.61) 天比较, 差异有统计学意

义($P < 0.001$), 保护指数分别为 1.99、2.56、2.46。EE2 平均生存天数为(15.80 ± 10.53)天, E838 与 EE2 比较, 中、高两个剂量组的动物平均生存天数明显延长, 差异有统计学意义($P < 0.001$), 见图 1。

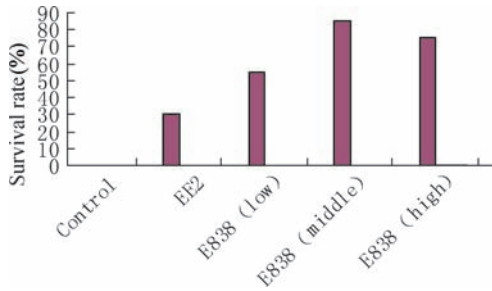


图 1 8.0Gy γ 射线照射后小鼠 30d 存活率的比较

Figure 1 30d survival rate of mouse after 8.0Gy γ radiation

2.2 E838 对受照小鼠淋巴细胞 DNA 损伤修复的影响

E838 三个剂量组与对照组相比, 受照小鼠淋巴细胞 DNA 双链断裂的彗星各项指标 TDNA%、TL、TM 和 OTM 残余损伤逐渐减少, 给药组 DNA 损伤修复增加, 各项指标经统计学分析, 与对照组之间的差别均有统计学意义($P < 0.001$)。与 EE2、523 之间的差别均有统计学意义($P < 0.05$), 提示 E838 具有保护和减轻辐射对淋巴细胞的损伤, 其中中剂量对 DNA 损伤的修复作用最好, 对 DNA 的损伤能发挥最佳保护作用, 见表 1。

2.3 辐照后的彗星图像结果

照射后的淋巴细胞均出现明显拖尾现象, 彗星图像经 CASP 软件分析后, 得到尾清晰可辨的新图像, 更加直观地显示出彗星的尾部, 反映细胞核 DNA 在彗星中的分布情况。肉眼观察对照组 DNA 片段的迁移长度明显增加, 彗星尾长明显大于各给药组的彗星尾长, 而 E838 各组彗星尾长明显降低。右侧为辐照后各组彗星图像; 左侧为对应各组彗星经 CASP 软件分析后的图像, 见图 2。

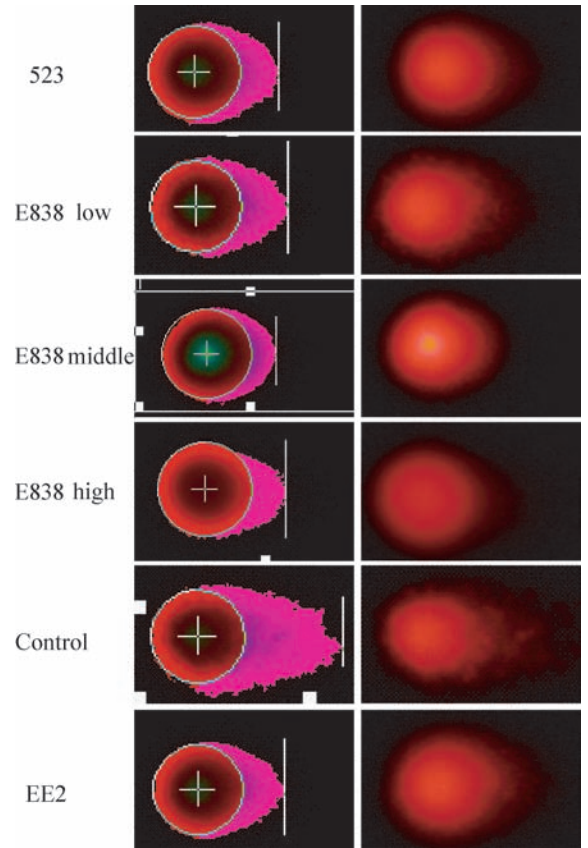


图 2 1Gy 照射后各组彗星图像

Figure 2 Comet image of each group after 1 Gy radiation

3 讨论

尽量减轻射线对造血细胞的损伤和加快造血损伤后的恢复是放射性造血损伤防治药物研究的两个重要方面^[4], 实验结果显示, E838 预防用药能显著提高受照射小鼠 30 天存活率及平均存活时间和保护指数, 表明 E838 对放射损伤具有预防效果。

SCGE 是 20 世纪 80 年代建立的用于检测 DNA 断裂的新技术^[5], 此方法能从单细胞水平上检测 DNA 双链断裂, 并根据 DNA 双链断裂的量化指标, 分析 DNA 残余损伤的量, 来揭示 DNA 的修复

表 1 E838 对¹³⁷Cs γ 1Gy 射线照射小鼠淋巴细胞 DNA 双链断裂的各项指标($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Indicators of dsDNA broken in mouse lymphocyte induced by ¹³⁷Cs γ 1Gy after given E838($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Groups	Cell number	TDNA%	TL(pix)	TM	OTM
Control	100	36.05 ± 5.86	78.69 ± 9.65	27.31 ± 5.61	21.13 ± 3.88
E838(low)	100	11.68 ± 2.39 ¹⁾⁴⁾	18.53 ± 3.64 ¹⁾	2.13 ± 0.55 ¹⁾³⁾⁴⁾	2.52 ± 0.46 ¹⁾
E838(middle)	100	6.24 ± 0.97 ²⁾³⁾⁵⁾	10.09 ± 2.15 ²⁾³⁾⁵⁾	0.64 ± 0.11 ²⁾³⁾⁵⁾	0.99 ± 0.14 ²⁾³⁾⁵⁾
E838(high)	100	9.05 ± 1.47 ²⁾³⁾⁵⁾	16.02 ± 2.57 ²⁾³⁾⁵⁾	1.21 ± 0.32 ²⁾³⁾⁵⁾	1.59 ± 0.33 ²⁾³⁾⁵⁾
EE2	100	12.01 ± 1.38 ¹⁾	18.94 ± 2.89 ¹⁾	2.81 ± 0.44 ²⁾	2.91 ± 0.50 ²⁾
523	100	11.23 ± 1.54 ¹⁾	19.29 ± 3.58 ¹⁾	2.39 ± 0.52 ¹⁾	2.66 ± 0.38 ²⁾

Note: compared with control, 1): $P < 0.01$; 2): $P < 0.001$; compare with 523: 3): $P < 0.05$; compare with EE₂: 4): $P < 0.05$, 5): $P < 0.01$

增加,呈剂量依赖性。与文献报道^[5-6]维甲酸能上调人类宫颈癌细胞和人神经母细胞瘤 p21 的表达水平,使细胞周期发生 G₁ 期阻滞的实验结果相一致,提示 ATRA 抑制甲状腺鳞癌 SW579 细胞增殖的作用与上调 p21 的表达水平有关。有研究表明^[7],在 p21 的启动子上存在维甲酸的反应元件,因此本研究提示:ATRA 可能通过高表达的 RAR β 与 p21 启动子上的维甲酸反应元件结合,促进 p21 基因的表达,使细胞阻滞在 G₁ 期,从而抑制 SW579 细胞增殖和诱导细胞向良性分化。关于 ATRA 抑制 SW579 细胞增殖和诱导分化的作用机制仍在进一步研究之中。

参考文献:

- [1] Elisei R, Vivaldi A, Agate L, et al. All-trans-retinoic acid treatment inhibits the growth of retinoic acid receptor beta messenger ribonucleic acid expressing thyroid cancer cell lines but does not reinduce the expression of thyroid-specific genes [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(4):2403-2411.
- [2] Schmutzler C, Hoang-Vu C, Ruger B, et al. Human thyroid

carcinoma cell lines show different retinoic acid receptor repertoires and retinoid responses[J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 150(4):547-556.

- [3] Lei M, de Thé H. Retinoids and retinoic acid receptor in cancer [J]. *EJC Supplements*, 2003, 1(2):13-18.
- [4] Schmutzler C, Hoang-Vu C, Ruger B, et al. Human thyroid carcinoma cell lines show different retinoic acid receptor repertoires and retinoid responses[J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 150(4):547-556.
- [5] Borutinskaite VV, Navakauskiene R, Magnusson KE, et al. Retinoic acid and histone deacetylase inhibitor BML-210 inhibit proliferation of human cervical cancer HeLa cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1091:346-355.
- [6] De los Santos M, Zambrano A, Aranda A, et al. Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(4):1425-1432.
- [7] Tanaka T, Suh KS, Lo AM, et al. p21WAF1/CIP1 is a common transcriptional target of retinoid receptors: pleiotropic regulatory mechanism through retinoic acid receptor (RAR)/retinoid X receptor (RXR) heterodimer and RXR/RXR homodimer[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(41):29987-29997.

[编辑校对:杨 卉]

(上接第 750 页)

过程。该方法简便、经济、快速、敏感度高,近几年来在国内生物学、毒理学、肿瘤学等领域得到广泛应用,但未见该方法应用于药物对辐射损伤 DNA 修复的研究报道。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分析剂量效应关系,其不足之处是在较大剂量时曲线平台的出现^[6],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)更灵敏和准确^[7]。本实验结果显示,实验各组小鼠全身经 1.0 Gy 辐照后,细胞的 DNA 残余损伤水平不同, E838 三个剂量组细胞的 DNA 残余损伤各项指标的数值均明显低于对照组和阳性对照组,与对照组之间的差别均有统计学意义 ($P < 0.01$),与 523、EE2 之间的差别均有统计学意义 ($P < 0.05$),提示 E838 对小鼠全身 1.0 Gy 辐照后的 DNA 损伤有良好的修复作用, E838 预防用药具有保护和减轻辐射对淋巴细胞损伤的作用。

参考文献:

- [1] 王月英,李德冠,吴红英,等. E838 联合 γ 射线对淋巴瘤荷瘤小鼠的协同抑瘤作用[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(10):9-12.
- [2] Banath JP, Fushiki M, Olive PL. Rejoining of DNA single and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation[J]. *Int J Radiat Biol*, 1998, 73(6):649-660.
- [3] Końca K, Lankoff A, Banasik A, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay[J]. *Mutat Res*, 2003, 534(1-2):15-20.
- [4] 叶飞,苏士杰,曹瑞敏,黄蔚多糖对受 X 射线照射小鼠的防护作用[J]. *辐射防护*, 1998, 18(1):52-55.
- [5] Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles applications, and limitations[J]. *Mol Biotechnol*, 2004, 26(3):249-261.
- [6] Kent CR, Eady JJ, Ross GM, et al. The comet moment at a measure of DNA damage in the comet assay[J]. *Int J Radiat Biol*, 1995, 67(6):655-660.
- [7] Hellman B, Vaghef H, Bestrom B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay[J]. *Mutat Res*, 1995, 336(2):123-131.

[编辑:安 凤;校对:黄园玲]