

UVB 照射后小鼠脾淋巴细胞 DNA 损伤程度的检测

赵海滨, 张楠, 刘洁, 张乐, 时永香*

(山东大学生命科学院, 济南 250100)

摘要:用强度为 $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $120 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $150 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的中波红斑效应紫外线(UVB)分别照射小鼠脾淋巴细胞 5 min、15 min、30 min, 采用单细胞凝胶电泳法(SCGE)检测 UVB 照射对细胞 DNA 的损伤, 结果照射 5 min 和 15 min 时, DNA 损伤程度与照射强度呈正相关; 而照射 30 min 时, $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 组 DNA 损伤程度最高, $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $120 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 组损伤程度有所降低, 而 $150 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 组又出现了高 DNA 损伤。认为通过 SCGE 来检测 UVB 照射对小鼠脾淋巴细胞的损伤程度, 可广泛应用于环境毒理学中对 DNA 具有损伤作用的分析, 为环境生物学研究辐射对生物体的影响提供借鉴。

关键词: UVB; 单细胞凝胶电泳; 脾淋巴细胞; 小鼠

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2009)06-0859-03

Detecting the Degree of DNA Damage in Mouse's Spleen Lymphocytes Irradiated by UV-B

ZHAO Hai-bin, ZHANG Nan, LIU Jie, ZHANG Le, SHI Yong-xiang*

(School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: In this study, various intensities ($30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, $120 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, $150 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) of UV-B were used to irradiate mouse spleen lymphocytes for 5 min, 15 min, and 30 min. Then single-cell gel electrophoresis (SCGE) was utilized to detect the damage grade of DNA in spleen lymphocytes. The results showed that high intensity UV-B irradiation led to severe DNA damage of spleen lymphocytes after 5 min and 15 min's irradiation; however, when the irradiation time was 30 min, the DNA damage grade was the highest at $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ and it decreased from $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ to $120 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, then it came to another peak at $150 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Here we adopt SCGE to detect DNA damage after irradiation of spleen lymphocytes by UV-B, which will be widely used to analyze DNA damage in environmental toxicology and offer a reference to study irradiation effects in environmental biology.

Key words: UV-B; single-cell gel electrophoresis; spleen lymphocytes; mouse

近半个世纪以来,人类活动不仅带来了工业的发达、经济的发展和物质产品的极大丰富,同时也给环境带来了巨大负面压力。但由于环境污染衍生的环境效应具有滞后性,发现时污染已经发展到了相当严重的地步。如给生态系统造成沙漠化、森林破坏等直接影响。而危害更大的是给生态系统和人类社会造成间接的危害,如日趋严重的全球性气温升高,大气层中臭氧被破坏,平流层臭氧日渐减少(Zepp *et al.*, 2003)。由此而导致的到达地面的紫外线辐射强度增加,尤其是中波红斑效应紫外线(UVB)的增加,对地球生态圈造成了严重危害:促使植物死亡、南北极冰山以及陆地生态圈中产生了更多 CO、NO 和卤代物(Häkkinen *et al.*, 2001)。更加严重的是

氯和溴扩散又会导致臭氧层变薄(Jankowski *et al.*, 1997; Malloy *et al.*, 1997),形成恶性循环。因此,研究 UVB 对生物体的作用具有重要的理论和现实意义。

本文通过单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis assay, SCGE, 又称彗星试验)来检测 UVB 照射对小鼠脾淋巴细胞的损伤程度,可广泛应用于环境毒理学中对 DNA 具有损伤作用的分析,为环境生物学研究辐射对生物体的影响提供借鉴。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物及小鼠脾淋巴细胞的提取

C57BL/6 品系小鼠,购自中国科学院上海实验动物中心,生产许可证号:SYXK(沪)2007-0005。采

收稿日期:2009-01-05

基金项目:国家自然科学基金(30570199);山东省优秀中青年科学家奖励基金(2006BS03043);山东省自然科学基金(2007ZR01286)资助项目

作者简介:赵海滨(1984~),男,硕士研究生, E-mail: hbzhao@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shiyx@sdu.edu.cn

用淋巴细胞分离液提取小鼠脾淋巴细胞,依照试剂盒说明书操作。

1.2 分组

将提纯的淋巴细胞分为对照组和 5 组照射 UVB,照射强度分别为 $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $120 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $150 \mu\text{W}/\text{cm}^2$,照射时间为 5 min、15 min、30 min。

1.3 碱性单细胞凝胶电泳 (SCGE) 检测 UVB 对 DNA 的损伤

1.3.1 预制盖玻片 将盖玻片放入硫酸-重铬酸钾清洗液中浸泡 1~2 h,流水冲洗 1 h,晾干,放入 95% 乙醇备用,临用前放入无水乙醇中浸泡 5 min 后取用。

1.3.2 铺胶 向载玻片的磨砂端滴加 $100 \mu\text{l}$ 浓度为 0.75% 的 NMA,并加盖预制盖玻片,于 4°C 中放置 5~10 min,待 NMA 冷凝后取下盖玻片,备用;将经过激光照射处理的小鼠脾淋巴细胞 $30 \mu\text{l}$ 与 $90 \mu\text{l}$ 0.5% LMA 混匀。取 $100 \mu\text{l}$ 混合液铺于载玻片上并加盖盖玻片于 4°C 放置 10 min 后取下盖玻片,最后再铺一层 NMA。

1.3.3 裂解 将铺好胶的载玻片放入一平皿,加入 50~100 ml SCGE 裂解液,以覆盖过载玻片 0.5 cm 为准。裂解 2 h。

1.3.4 解旋、电泳 小心取出载玻片,放入电泳槽。向槽中缓缓注入碱性电泳缓冲液 (pH13),静置 40 min 使双链 DNA 解旋。电泳电流 200 mA,电压 25 V,电泳 20 min。

1.3.5 中和、染色 电泳结束后将载玻片放入中和缓冲液中中和两次,每次 15 min。中和结束后,向每个载玻片滴加 $30 \mu\text{l}$ EB 并加盖盖玻片,染色 20 min。

1.3.6 结果观察 在荧光显微镜下观察实验结果,激发光为波长 540 nm 的绿光,得到黑色背景、红色 DNA 彗星图像,拍照。

1.4 CASP 软件分析

单细胞凝胶电泳结果图用 CASP 软件(下载地址: <http://www.casp.of.pl>)分析,得到“彗尾”部分 DNA 占总 DNA 的百分数。根据“彗星”尾部 DNA 量占细胞总 DNA 的比例,将 DNA 损伤程度分为 5 级:0 级:即正常细胞, DNA 损伤 $<5\%$;1 级:低度损伤, $5\% \sim 20\%$;2 级:中度损伤, $20\% \sim 40\%$;3 级:高度损伤, $40\% \sim 90\%$;4 级:重度损伤, $>95\%$ 。

2 结果

5 组强度不同的 UVB 照射淋巴细胞 5 min 后,

检测断裂的 DNA 尾占总 DNA 的比例分别为:1.74%、9.18%、9.76%、42.62%、40.23%、44.98%;照射 15 min 后,检测到断裂的 DNA 尾占总 DNA 比例分别为:1.05%、8.32%、15.33%、44.15%、42.42%、50.17%;照射 30 min 后,断裂的 DNA 尾占总 DNA 比例分别为:23.14%、66.78%、63.78%、38.04%、31.96%、56.48% (图 1)。将上述分别称为 A 组(照射时间为 5 min)、B 组(照射时间为 15 min)、C 组(照射时间为 30 min)。在这 3 组中,对照组 DNA 损伤程度在各组中均是最低,照射时间为 5 min 和 15 min 的两组中,随着照射强度的增加, DNA 损伤程度加大。照射时间为 30 min 组中, $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 组 DNA 损伤程度最高。随着照射强度的加大, $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $120 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 组损伤程度有所降低,而 $150 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 组又出现了高 DNA 损伤,整个曲线呈现先上升后下降,最后又明显上升的趋势。

平行比较 3 组,由图 1 可得出:当照射强度均为 $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 和 $60 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 时, C 组 DNA 损伤程度明显高于 A、B 两组;照射强度为 $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $120 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 时, C 组 DNA 损伤程度反又低于 A 组和 B 组;至照射强度为 $150 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 时, C 组淋巴细胞 DNA 损伤程度高于照射时间相对较短的 A、B 两组,且 3 组中淋巴细胞 DNA 均呈现重度损伤。A、B 两组的比较中可看出,照射时间为 5 min 的 A 组中,淋巴细胞 DNA 损伤程度在各照射强度下均低于照射时间为 15 min 的 B 组。

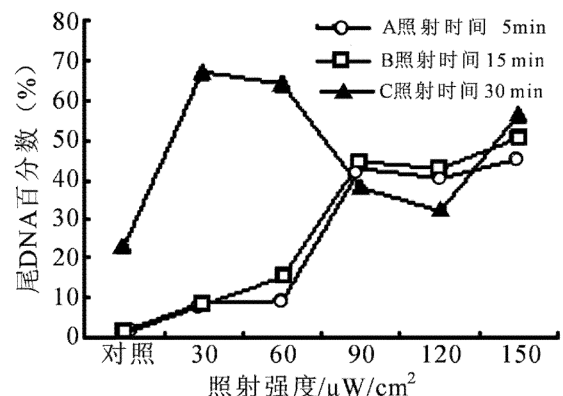


图 1 UVB 不同照射时间、照射强度与 DNA 拖尾占细胞总 DNA 比率的关系

Fig. 1 The connection between irradiation time, intensity and percent DNA in the comet tail

3 讨论

UVB 照射能有效诱导具有生长刺激作用的酶类如鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的表达上调。ODC 广泛

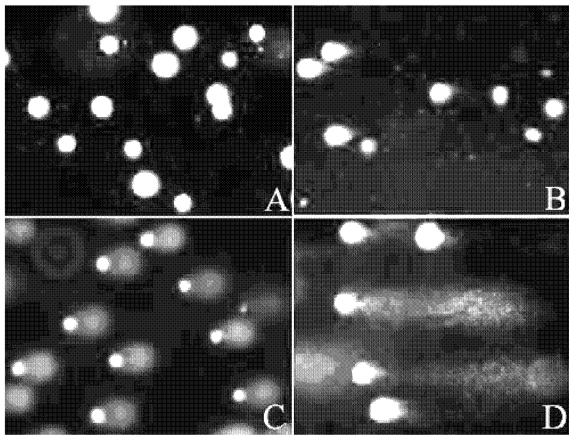


图 2 断裂的 DNA 在电场作用下电泳结果呈彗星 (A)~(D)
UVB 照射后出现的 DNA 不同程度损伤单细胞凝胶电泳图

Fig. 2 Comet tails of split DNA in the effect of electrical field
A~D: various damage grade in the SCGE electrophoregram of DNA irradiated by UV-B

分布于人体组织内,是细胞中控制多胺生成的关键酶之一,而多胺则是细胞增殖调控的重要因素,对肿瘤发生发展起重要作用。凡是生长旺盛的组织(如胚胎、再生肝及肿瘤组织尤其是恶性肿瘤组织)ODC 的活性升高(Trump *et al.*, 2003)。ODC 具有超常转变率和对于刺激的迅速反应性。实验证明,抑制 ODC 的活性可以减少多胺的生成,从而抑制肿瘤的生长,达到治疗的目的。正常范围内,UVB 的照射可促使一些重要反应发生,并增加细胞因子的生成。磷酸脂酶(PTEN)的活化也与 UVB 的照射有关。PTEN 是继 p53 以后呈现最高突变率抑癌基因表达产物,它可通过延长细胞周期而减弱细胞增殖(Moon *et al.*, 2004)。磷脂酶还具有快速的膜修复作用,因为过氧化的脂质在被作为过氧化酶的底物之前必须首先被磷脂酶分解。人皮肤在接受中等剂量的 UVB 照射后 p53 蛋白水平升高(Bunz *et al.*, 1998; Lesser *et al.*, 2003)。在本实验 C 组中,90 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 和 120 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 强度的 UVB 照射淋巴细胞致尾 DNA 占总 DNA 分别为 38.04% 和 31.96%,均低于 30 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 和 60 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 强度的 UVB 照射所致 DNA 损伤率(66.78% 和 63.78%)。这可能与 UVB 对生物体的生长刺激作用有关,即在合适的能量范围内,UVB 的照射对生物组织细胞有积极作用。

单细胞凝胶电泳方法的建立为在单个细胞 DNA 水平上检测外界物质或环境对细胞生存、生长的影响提供了极大的方便。它可简便快速地得到评价结果,并且不需要复杂的仪器和设备(Anderson *et*

al., 1998);对荧光显微镜要求不高,即便是在倒置荧光显微镜下也可进行结果观察;不仅可检测 DNA 是否有损伤,还可对 DNA 损伤进行定量分析;应用 CASP 软件(Końca *et al.*, 2003)可依据 DNA 尾距对 DNA 损伤程度进行分级;所需细胞量少,在实验材料较少时,也可开展此项工作;实验过程中无放射性元素,消除了对实验人员的伤害。Van 等(1997)比较了单细胞凝胶电泳技术与微核技术后总结指出,虽然微核技术可以检测出染色体失常,即染色体组或基因组突变,而不仅仅是可修复的 DNA 断裂和碱变性位点,可将单细胞凝胶电泳与微核技术结合起来,来阐释基因组毒剂的诱变性的机制和有效应的最低剂量。

本文通过 SCGE 来检测 UVB 照射对小鼠脾淋巴细胞损伤程度,并通过 CASP 软件加以定量分析,可广泛应用于环境毒理学中对 DNA 具有损伤作用的分析,如紫外线、电离辐射、氧自由基等因素造成 DNA 的损伤,可为环境生物学研究辐射对生物体的影响提供借鉴。

4 参考文献

- Anderson D, Yu TW, McGregor DB. 1998. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure[J]. *Mutagenesis*, 13(6): 539~555.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage[J]. *Science*, 282(5393): 1497~1501.
- Cook PR, Brazell IA. 1976. Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA[J]. *Nature*, 263(5579): 679~682.
- Häkkinen J, Pasanen S, Kukkonen JV. 2001. The effects of solar UV-B radiation on embryonic mortality and development in three boreal anurans (*Rana temporaria*, *Rana arvalis* and *Bufo bufo*) [J]. *Chemosphere*, 44(3): 441~446.
- Jankowski J, Cader AB. 1997. The effect of depletion of the earth ozone layer on the human health condition[J]. *Int J Occup Med Environ Health*, 10(4): 349~364.
- Końca K, Lankoff A, Banasik A, *et al.* 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay [J]. *Mutat Res*, 534(1-2): 15~20.
- Lesser MP, Kruse VA, Barry TM. 2003. Exposure to ultraviolet radiation causes apoptosis in developing sea urchin embryos [J]. *J Exp Biol*, 206(Pt 22): 4097~4103.
- Levin JM, Cook PR. 1981. Conformational changes induced by salt in complexes of histones and superhelical nuclear DNA [J]. *J Cell Sci*, 50: 199~208.
- Malloy KD, Holman MA, Mitchell D, *et al.* 1997. Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in antarctic zooplankton [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(4): 1258~1263.

(下转第 866 页)

