

电离辐射对作业人群外周血淋巴细胞 DNA 的损伤

班永宏, 陈敏, 姜秋霞

(江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210028)

摘要: 目的 分别利用单细胞凝胶电泳技术 (SCGE) 及染色体畸变试验观察电离辐射对作业人群外周血淋巴细胞 DNA 损伤作用和染色体损伤效应。方法 观察不同辐射剂量下外周血淋巴细胞 DNA 迁移长度及迁移率, 同时观察不同剂量组下染色体畸变率及微核率。结果 各组染色体畸变率及微核率差异没有显著性 ($P > 0.05$); 接触射线的作业人群, 彗星细胞率及 DNA 迁移长度明显超过对照组; 同时, 随着辐射剂量的加大, 细胞 DNA 损伤级别亦有加重趋势。结论 SCGE 技术可以检测电离辐射对作业人群的早期损害。

关键词: 电离辐射; 单细胞凝胶电泳; 染色体畸变; 微核; DNA 损伤

中图分类号: R146 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2002)06-0331-03

Study on DNA damage induced by ionizing radiation in workers' blood lymphocytes

BAN Yong-hong, CHEN Min, JANG Qiu-xia

(Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210028, China)

Abstract: Objective In order to investigate that the DNA damage and the frequency of chromosome aberration induced by ionizing radiation, the single cell gel electrophoresis (SCGE) and chromosome aberration test were carried out. **Methods** The length and rate of DNA migration of blood lymphocytes were analyzed in different dose exposed workers. The frequency of chromosome aberration and micronucleus were observed also. **Results** There was no significantly different both the frequency of chromosome aberration and micronucleus at the different doses ($P > 0.05$). The significantly different length and rate of DNA migration were exhibited in varied ionizing radiation between the observed and control groups ($P < 0.05$), and the level of DNA damage was increasing after exposed to more ionizing radiation. **Conclusion** These findings suggest that the technique of SCGE could be used to detect the earliest biological damage by ionizing radiation in exposed workers.

Key words: Ionizing radiation; Single cell gel electrophoresis (SCGE); Chromosome aberration; Micronucleus; DNA damage

早在 20 世纪初就有接触射线引起恶性肿瘤的报道, 直到 20 世纪 60 年代, 人们才对辐射引起的危害有了逐渐深入的认识, 在工作中注意辐射防护, 严重的辐射损伤才较为少见。在低剂量的长期作用下, 寿命缩短及遗传损害并没有明显的增加, 但是存在一个潜在的辐射危害就是其致癌作用^[1]。本研究采用 SCGE 技术检测探伤作业人群外周血淋巴细胞 DNA 断裂损伤, 并与早期检测方法染色体畸变和微核试验进行比较, 为研究电离辐射对作业人群早期损伤提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试剂和药品

细胞培养液 RPMI 1640, Gibco 公司产品。胎牛血清, 上海浦东开发区高桥兽医站生产。正常熔点琼脂糖 (NMA)、低熔点琼脂糖 (LMA) 和溴化乙锭 (EB)

均为华美公司进口分装。二甲基亚砷 (DMSO), 江苏南新助剂厂生产。曲拉通 (Triton X-100), 上海化学试剂站进口分装。

1.2 主要仪器设备

德国 HERAEUS 型 CO₂ 细胞培养箱, 日本 OLYMPUS BX-60 万能落射式荧光显微镜, 重庆光学仪器厂生产的 XDS-1 型倒置生物显微镜, 上海医用电子仪器厂生产的 DY-1 型电泳仪, 水平电泳槽 (自制), 全磨砂 Dakin 载玻片。

1.3 方法

1.3.1 对象 选择接触电离辐射的探伤工人 31 名, 男性, 年龄 (36.5 ± 8.4) 岁, 个人接触剂量为 (764.77 ± 392.50) μSv; 以非接触者 25 例为阴性对照, 男性, 年龄 (34.8 ± 3.6) 岁, 文化层次与生活背景等与接触组基本一致。

1.3.2 外周血淋巴细胞染色体畸变与微核试验

取外周抗凝血 0.5 ml 于 RPMI1640 培养液中, 加入植物血凝素 37℃ 培养 54 h, 收获前 4 h 加入秋水仙

收稿日期: 2002-08-09; 修回日期: 2002-10-18

作者简介: 班永宏 (1964-), 男, 检验师, 从事化学毒物对人体早期损害的检测工作。

素,使之终浓度为 0.15 μg/ml, Giemsa 染色,油镜下观察 100 个细胞染色体数目及结构,计算染色体畸变率。同时进行细胞微核实验,取静脉血 0.5 ml 于 0.5 ml 肝素钠 (200 μg/ml),加入 0.3% 甲基纤维素 0.16 ml, 37 °C 培养 0.5 h, 吸取上清液, 2 000 r/m 离心 5 min, 沉淀物推片, 甲醇固定 15 min, Giemsa 染色, 油镜下观察 1 000 个细胞出现的微核数, 计算微核率。

1.3.3 SCGE 实验 参照 Singh 等和秦春华等人介绍的方法^{2,3}, 并加以改进。采静脉血 0.5 ~ 1 ml 进行淋巴细胞分离, 取 120 μl NMA (0.5%) 浇注 Dakin 载玻片上为第一层胶, LMA (0.5%) 和细胞混悬液为第二层胶, 再于第二层胶上铺一层 LMA (0.5%), 形成三明治样凝胶。置 4 °C 冰箱冷藏裂解至少 1 h。置电泳液中 20 min, 然后在 25 V 和 300 mA 条件下电泳 30 min。中和后以溴化乙锭染色, 荧光显微镜下测量 DNA 迁移长度 (length of migration, μm), 同时观察计数 100 个细胞 DNA 受损的程度, 细胞损伤分级按 DNA 迁移长度为标准, 迁移 25 ~ 35 μm, I 级; 35 ~ 45 μm, II 级; 45 ~ 55 μm, III 级; > 55 μm, IV 级。

1.4 统计分析

采用 SPSS10.0 统计软件对各组染色体畸变率及微核率进行 *t* 检验, 同时对各组 DNA 迁移长度进行方差分析, 并采用 Dunnett 模块对组间均数进行两两比较。

2 结果

2.1 电离辐射对作业人群外周血淋巴细胞染色体畸变率及微核率的影响

由表 1 可见, 无论是观察组与对照组之间, 还是观察组组间, 染色体畸变率及微核率差异均没有显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 电离辐射对作业人群外周血淋巴细胞染色体畸变率及微核率的影响

组别	辐射剂量 (μSv)	例数	染色体畸变率 (%), $\bar{x} \pm s$	微核率 (%), $\bar{x} \pm s$
对照组		25	0.15 ± 0.06	0.64 ± 0.64
观察组	< 1 000	27	0.19 ± 0.11	0.93 ± 0.68
	≥ 1 000	4	0.20 ± 0.09	0.75 ± 0.50

2.2 电离辐射对作业人群外周血淋巴细胞 DNA 损伤效应

由表 2 可见, 接触电离辐射的探伤工人外周血淋巴细胞彗星细胞率明显高于对照组, 并且随着接触剂量的

增大, 彗星细胞百分率增高。探伤工人 DNA 的迁移长度与对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 接触高剂量电离辐射的 DNA 损伤效应与低剂量相比, 差异同样存在显著性 ($P < 0.05$)。

表 2 电离辐射对外周血淋巴细胞 DNA 迁移的效应

组别	辐射剂量 (μSv)	例数	淋巴细胞计数	DNA 迁移的细胞率 (%)	DNA 迁移长度 μm ($\bar{x} \pm s$)
对照组		25	2 500	6.67	5.87 ± 1.54
观察组	< 1 000	27	2 700	33.79 *	22.96 ± 0.41 *
	≥ 1 000	4	400	75.00 *	44.63 ± 2.66 *#

注: DNA 迁移长度包括核直径。

* 与对照组相比, $P < 0.05$ 。# 观察组之间比较, $P < 0.05$ 。

2.3 电离辐射引起作业人群外周血淋巴细胞 DNA 损伤的分级

由表 3 看出, 随着电离辐射剂量的增大, 细胞 DNA 损伤比例明显增加, 同时细胞损伤级别程度也增大。

表 3 电离辐射对外周血淋巴细胞 DNA 损伤程度 (%)

组别	辐射剂量 (μSv)	损伤级别				
		0	I	II	III	IV
对照组		93.33	6.67	—	—	—
观察组	< 1 000	67.21	18.34	12.06	2.51	0.88
	≥ 1 000	25.00	23.21	19.64	8.04	24.10

3 讨论

多种因素, 包括物理的 (如电离辐射和紫外线)、化学的 (如多种氧化剂及三氯乙烯、丙烯酰胺等) 以及混合性的因素 (如老龄化、吸烟等) 均可引起 DNA 单链断裂 (single strand break, SSB), 虽然偶尔的 SSB 不会影响 DNA 分子的连续性, 但却会影响 DNA 的遗传行为。单细胞凝胶电泳技术 (single cell gel electrophoresis assay, SCGE), 又称为彗星试验 (comet assay), 是由 Ostling 等⁴ 于 1984 年首次提出, 后经 Singh^[3] 等进一步完善的一种在单细胞水平上检测 DNA 的损伤与修复的方法。它不仅能快速、简便、灵敏地检测单个细胞 DNA 单、双链断裂损伤, 还可以检测 DNA 切除修复缺陷、DNA 交联以及氧化性损伤等多种类型的 DNA 损伤, 国内外不少学者已将其用于研究理化毒性因素对 DNA 的损伤、修复及生物学监测等, 是探讨化学物质致癌机制的有效工具^[3]。

电离辐射可以通过直接作用引起生物体内分子水平的变化,特别是生物大分子的改变,如核酸、蛋白质等,另外电离辐射作用于水分子,引起其电离和激发,形成一些化学性质非常活泼的产物,如激发态的水分子、氢自由基、水合电子等;其最终结果都是引起细胞内的 DNA 损伤,从而使正常细胞发生突变^[6]。本研究采用单细胞凝胶电泳技术观察电离辐射对人群外周血淋巴细胞 DNA 断裂损伤作用,发现电离辐射对细胞 DNA 有明显的损伤作用,引起拖尾现象,并随着接触剂量的加大, DNA 迁移更加明显。而染色体畸变率及微核率与对照组相比,差异没有显著性,即使在高剂量组差异亦没有显著性。由此可见,SCGE 技术可以灵敏地检测电离辐射对人体外周血淋巴细胞 DNA 的损伤效应,较染色体畸变率及微核率有更高的敏感性,而且操作简便,能检测单细胞水平

的 DNA 损伤,可以作为职业有害因素对人体健康影响的早期生物学检测手段,对保护职业人群的健康有着重要的意义。

参考文献:

- [1] 何凤生. 中华职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 982-1021.
- [2] Singh N B, Tice R R, Stephens R E et al. A microgel electrophoresis individual fibroblasts cultured on microscope slides [J]. *Mutat Res*, 1991, 252: 289.
- [3] 秦春华. 化学物致突变致癌检测技术 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1996. 132-140.
- [4] Osting O, Johanson K J. Microelectronphoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells [J]. *Bioche Biophys Res*, 1984, 123: 291.
- [5] 何惧, 刘玉清. 单细胞凝胶电泳技术的研究进展与应用 [J]. *国外医学卫生学分册*, 1997, 24 (2): 85-89.
- [6] 朱寿彭, 李章. 放射毒理学 [M]. 第 2 版, 北京: 原子能出版社, 1992. 63-86.

高压氧治疗急性磷化氢中毒 18 例分析

Analysis on the effect of hyperbaric oxygen therapy in 18 patients with acute phosphine poisoning

汤建, 冉秀荣

(河南省商丘市第三人民医院, 476000)

磷化氢为固体磷化铝吸收空气中潮气后自行分解产生的气体,因具有高效杀虫作用而用作粮食熏蒸剂,使用不善时能导致吸入中毒。我们用高压氧抢救治疗急性磷化氢中毒 18 例,收到满意效果,现分析如下。

1 临床资料

本组男 13 例,女 5 例,年龄 21~33 岁。均为粮食储备库工人,在工作时中毒,发病后当即脱离中毒环境。住院治疗 8 例,门诊治疗 10 例。住院 8 例系一同工作时集体中毒,在当地曾静脉滴注维生素 C、三磷酸腺苷、辅酶 A 等治疗,症状趋于加重,发病 7 h 后转入我院。另 10 例病人系中毒后立即来我院就诊。全部病例均有头痛、头晕、恶心、呕吐、胸闷、无力等症状,腹痛 4 例,精神恍惚 2 例,抽搐 1 例。18 例病人高压氧治疗前查心电图 ST-T 压低、T 波低平 1 例, I 度房室传导阻滞 1 例,高压氧治疗前均未进行实验室检查。

高压氧治疗采用面罩给氧,氧舱内压为 0.2 MPa,吸纯氧 90 min。所有病人接诊后立即行高压氧治疗。住院 8 例入院 24 h 后给予第 2 次高压氧治疗,同时继续给予营养支持疗法;门诊 10 例高压氧治疗 1 次,未进行其他治疗。

2 结果

接受高压氧治疗 1 次后 16 例症状全部消失,2 例尚有轻度头晕,2 h 后亦消失。住院 8 例病人高压氧治疗 2 次后查心电图、肝功能及尿常规无异常,血常规检查血红蛋白及红细胞均正常,白细胞 $< 4.0 \times 10^9/L$ 4 例, $5.0 \times 10^9 \sim 9.0 \times 10^9/L$ 4 例, $N 0.54 \sim 0.73$ 。门诊 10 例病人高压氧治疗结束后症状消失,未接受进一步的检查。

3 讨论

磷化氢通过呼吸道吸入引起中毒后,对呼吸道及胃肠道均有刺激作用,并很快经血流分布到脑、肝、肾、心等重要器官,引起中枢神经系统、呼吸系统、心血管系统及肝、肾的损害。磷化氢中毒后,患者应迅速脱离中毒环境,到空气新鲜处。磷化氢吸入中毒尚无特殊解毒药物,通常采用综合治疗方法。本组采用以高压氧为主的治疗措施,取得满意效果,其原理有待于探讨,可能为动脉血氧分压增高使毛细血管内氧容易向组织内弥散,迅速增加组织供氧,组织细胞有氧化代谢增强,对抗磷化氢对组织的损害。高压氧治疗应尽早采用,当组织细胞因能量代谢障碍而坏死后,高压氧治疗效果会受到影响。

在磷化氢中毒尚无特殊治疗方法的情况下,通过本组病例观察表明,高压氧作为一种治疗方法有应用价值。本组只观察了轻度中毒患者,对重度中毒的治疗效果尚有待观察。

收稿日期: 2001-12-24; 修回日期: 2002-04-22