

流式细胞仪检测电离辐射与 γ -H₂AX 剂量效应关系的方法研究

孙志娟, 范亚光, 石大伟, 田丽丽, 赵永成*, 王继先

(中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192)

摘要: 目的 比较 3 种不同的固定和标记方法在流式细胞仪检测电离辐射与磷酸化 H₂AX (γ -H₂AX) 的剂量反应关系上的差异。方法 用 ¹³⁷Cs 源分 5 个剂量点 (0, 1, 2, 4, 8 Gy) 照射人乳腺癌细胞 (MCF-7), 分别用 70% 乙醇双标、70% 乙醇单标和 2% 多聚甲醛单标 MCF-7 细胞, 应用流式细胞仪检测电离辐射与 γ -H₂AX 剂量效应关系。结果 3 种方法均发现电离辐射与 γ -H₂AX 水平存在剂量反应关系, 即 γ -H₂AX 水平随着电离辐射剂量的增加而增加。拟合剂量反应曲线符合直线方程。乙醇固定双标法的决定系数最大, 为 0.87。结论 应用流式细胞仪乙醇固定双标法检测 MCF-7 细胞电离辐射与 γ -H₂AX 剂量效应关系, 优于乙醇或多聚甲醛单标法。

关键词: γ -H₂AX 电离辐射; 剂量效应关系

中图分类号: R135.99 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)06-0364-04

Methodological study on the dose effects relationship between ionizing radiation and γ -H₂AX by flow cytometry

SUN Zhijuan, FAN Yanguang, SHI Dawei, TIAN Lili, ZHAO Yongcheng, WANG Jixian

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Tianjin 300192, China)

Abstract: Objective To compare the differences among three different methods in evaluating the dose-effect relationship between ionizing radiation and H₂AX by flow cytometry (γ -H₂AX). Methods Human breast carcinoma cell MCF-7 was irradiated with 0, 1, 2, 4 or 8 Gy from ¹³⁷Cesium. Three methods: 70% ethanol-fixed with dual staining, 70% ethanol-fixed with single staining and 2% Paraformaldehyde-fixed with single staining were applied to evaluate the dose-effect relationship between ionizing radiation and γ -H₂AX using flow cytometry. Results The dose-effect relationship between ionizing radiation and γ -H₂AX could be determined by all the three methods while the highest determination coefficient (R) was 0.87 from 70% ethanol-fixed with dual staining method. Conclusions The results suggested that the method of 70% ethanol-fixed with dual staining is better than other two methods in evaluation of dose-effect relationship between ionizing radiation and γ -H₂AX using flow cytometry.

Key words: γ -H₂AX; Ionizing radiation; Dose-effect relationship

内外源性因素 (如电离辐射) 导致 DNA 双链断裂 (DSBs)^[1] 后, 组蛋白 H₂AX 的 ¹³⁹Ser 会被磷酸化^[2-4], 生成磷酸化形式 γ -H₂AX^[5,6]。但是, 目前各实验室在检测 γ -H₂AX 的实验方法上并非一致, 因此需要对不同实验方法所得结果进行比较以建立标准的实验流程。此外, 检测 γ -H₂AX 剂量反应的实验方法是 γ -H₂AX 在其他方面应用的基础, 如 γ -H₂AX 在细胞放射敏感性评价中的应用等。

流式细胞仪已经是临床和科研中常用的仪器, 操作简便、快速, 使用流式检测 γ -H₂AX 显示出很好的

应用前景。但是文献中报道的不同实验室流式检测方法并不相同, 仅流式细胞仪检测前的固定细胞这一步骤就至少有 3 种方法^[7-9]。有研究者发现不同的固定方法和荧光标记流式检测方式 (单标直方图或双标密度等高图) 会影响检测结果^[9], 这对于不同实验室间定量比较检测结果不利。因此我们从这些方法中选取了 2 种使用较多的固定方法 (70% 乙醇和 2% 多聚甲醛) 进行实验, 对比了不同固定条件下进行荧光标记的 γ -H₂AX 剂量反应结果, 以发现不同的固定方法、相同荧光标记程序对 γ -H₂AX 的剂量效应关系的影响。通过对结果分析, 一方面我们可以选择其中较优的实验和检测方法进行后续实验, 另一方面可以为建立标准化的 γ -H₂AX 检测方法提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

收稿日期: 2008-06-30 修回日期: 2008-08-19

基金项目: 中国医学科学院放射医学研究所科技发展基金 (编号: SF0629)

作者简介: 孙志娟 (1982-), 女, 博士研究生, 研究方向: 流式病与卫生统计学。

*: 通讯作者, 研究员, E-mail: zhaoyong60@yahoo.com.cn

鼠抗人 γ -H₂AX (Upstate Biotechnology NY

USA); FITC标记羊抗鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); DAPI (Molecular Probes USA); PI (北京鼎国生物技术有限公司); 乙醇 (>99%, 天津大学科威化学制品有限公司); 4%多聚甲醛 (武汉博士德生物工程有限公司); 胎牛血清 (FBS 中国医学科学院血液研究所生物技术有限公司)。

CO₂ 细胞培养箱 (德国 Heraeus D6450); 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter Altra); ¹³⁷Cs γ 射线照射容器 (Gamma cell 40 Atomic energy of Canada Ltd)。

1.2 细胞培养与照射

人乳腺癌细胞系为本所天津市分子核医学重点实验室保存。细胞在接种后的第二天上午照射, ¹³⁷Cs源剂量率为 15.90 mGy/s, 照射剂量分别为 0、1.0、2.0、4.0、8.0 Gy。

1.3 样品制备

1.3.1 乙醇固定及染色 加 0.3 ml PB于上述离心管中, 涡旋振荡, 同时缓慢加入冷的纯乙醇 0.7 ml 置于 4℃ 至少 30 min。离心弃去乙醇, FBS-T-PB 封闭, 再次离心, 室温放置 10 min。离心弃上清, 一抗 4℃ 孵育过夜。FBS-T-PB 混匀, 2 000 r/min 离心 4 min 弃上清, 重复一次, 弃上清, 二抗 4℃ 孵育 2 h 加 FBS-T-PB 离心弃上清, P 染色 15~30 min。

1.3.2 多聚甲醛固定及染色 加 1 ml PBS于上述离心管中, 涡旋振荡, 同时加入 1 ml 4%多聚甲醛 (因此终浓度为 2%), 置于 4℃ 30 min 离心弃上清, 缓

慢加入冷的纯乙醇破膜。封闭、一抗结合、二抗结合过程同“1.3.1”。

1.4 剂量反应设置

1.4.1 检测结果的显示 FITC单标检测结果使用直方图显示, 横轴为 FITC绿色荧光的对数强度, 代表细胞 γ -H₂AX水平, 纵轴为细胞数。FITC-P 双标检测使用密度图显示结果, 横轴为 P 红色荧光的对数强度, 代表细胞中 DNA 的含量, 纵轴为 FITC绿色荧光的强度, 代表细胞 γ -H₂AX水平, 细胞数目多少用散点表示, 数目越多散点越密集。

1.4.2 门的设置 通常认为前向侧向光图 (a forward scatter versus side scatter plot) 中左下角密集点为细胞碎片和杂质, 而 AUX-Peak图 (a time of flight versus forward scatter plot) 中细胞带左侧部发和斜右下“肚子”部分分别是凋亡细胞和粘连细胞。因此, 我们在前向侧向光图和 AUX-Peak图中设定适当的门以尽量排除细胞碎片、粘连和凋亡的影响。

2 结果

2.1 多聚甲醛固定 FITC单标

图 1 所示为使用多聚甲醛固定、FITC单标的代表性实验的结果。随照射剂量的逐渐增加 (0、1、2、4、8 Gy), 荧光峰向右侧移动 (荧光强度高的一侧), 超过预设荧光强度值的细胞数占总细胞数百分比逐渐增加, 分别为 1.57%、3.85%、11.94%、19.45%、57.15%。数据来自于 5 次重复实验。

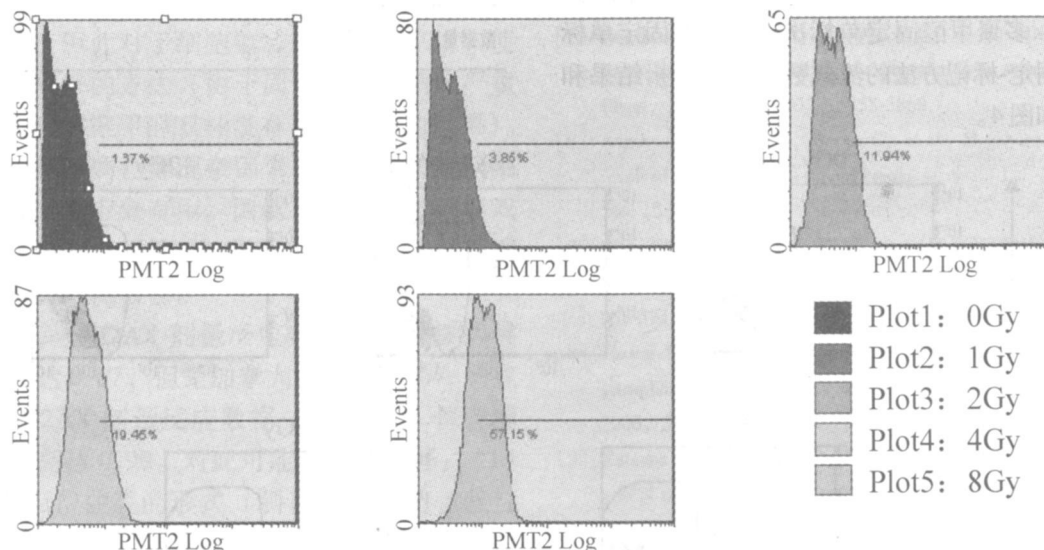


图 1 多聚甲醛固定 FITC单标流式结果

2.2 乙醇固定 FITC单标

图 2 所示为使用乙醇固定、FITC单标的代表性实验结果。随照射剂量的逐渐增加, 荧光峰向右侧移动

(荧光强度高的一侧), 超过预设荧光强度值的细胞数占总细胞数百分比逐渐增加, 分别为 0.91%、1.57%、4.20%、8.60%、22.80%。数据来自于 3 次重复实验。

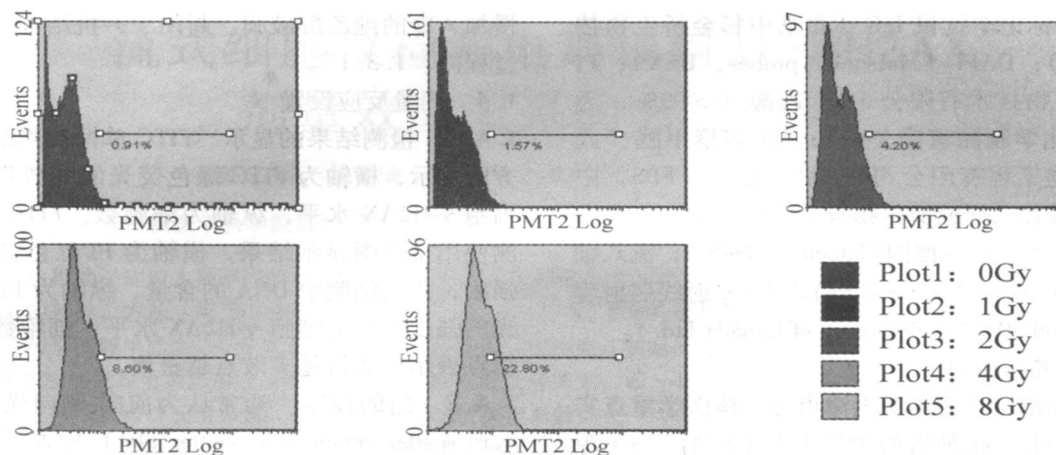


图 2 乙醇固定 FITC单标流式结果

2.3 乙醇固定 FITC-P 双标

图 3所示为使用乙醇固定、FITC单标的代表性实验的结果。随照射剂量的增加，密度图向上方移动（FITC荧光强度高的一侧），进入预设门的细胞数占总细胞数百分比逐渐增加，分别为 2.3%、5.5%、19.8%、60.9%、70.6%。数据来自于 4次重复实验。

2.4 流式数据直线拟合结果

乙醇固定双标、乙醇固定单标和多聚甲醛固定单标的数据均较符合直线方程，针对 3个方程斜率的 F 检验均有统计学意义，确定系数分别为 0.8721、0.7825、0.8371；斜率分别为 6.771（ $P < 0.01$ ）、2.121（ $P < 0.01$ ）、3.508（ $P < 0.01$ ）。可见乙醇固定双标最大，多聚甲醛固定单标次之，乙醇固定单标最小。不同固定标记方法的流式数据拟合分析结果和曲线见表 1和图 4

表 1 γ -H2AX剂量反应流式数据的直线拟合结果

拟合参数		乙醇固定双标	乙醇固定单标	多聚甲醛固定单标
斜率		6.771	2.121	3.508
Y截距		-2.4540	-0.2628	0.4375
X截距		0.3625	0.1239	-0.1247
1/斜率		0.1477	0.4715	0.2851
95%可信区间	斜率	5.493 ~ 8.050	1.418 ~ 2.824	2.862 ~ 4.153
	Y截距	-7.726 ~ -2.817	-2.861 ~ -2.335	-2.224 ~ -3.099
	X截距	-0.9391 ~ -1.469	-1.972 ~ -1.597	-1.560 ~ -1.091
拟合	决定系数 R^2	0.8731	0.7825	0.846
优度	$S_{y \cdot x}$	7.697	3.116	4.412
斜率的非零假设	F值	123.8	43.18	126.4
	自由度 $DF_{y \cdot x}$ DF_d	1.00, 18.00	1.00, 12.00	1.00, 23.00
	P值	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
数据量	重复次数	4	3	5
	数据点	20	14	25

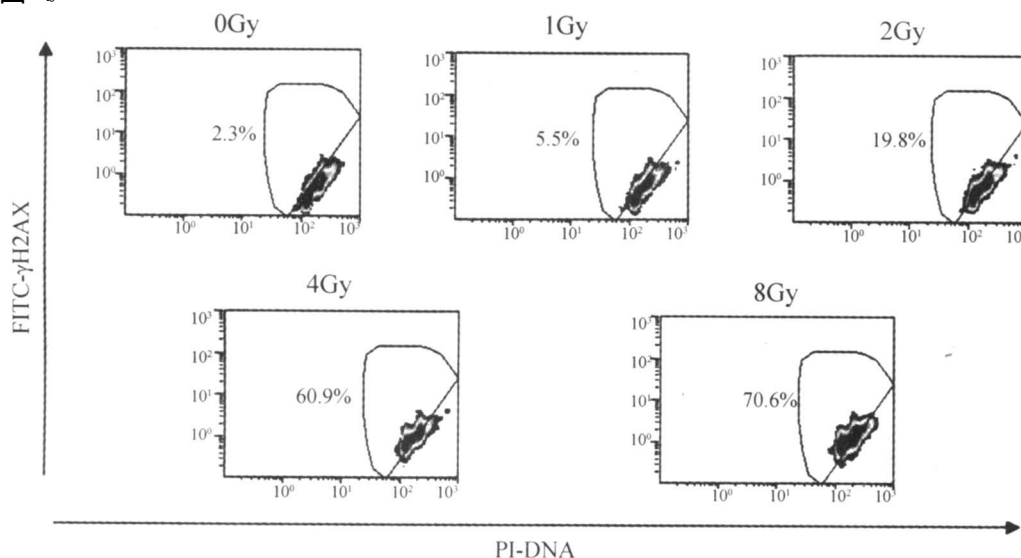


图 3 乙醇固定 FITC-P 双标流式结果

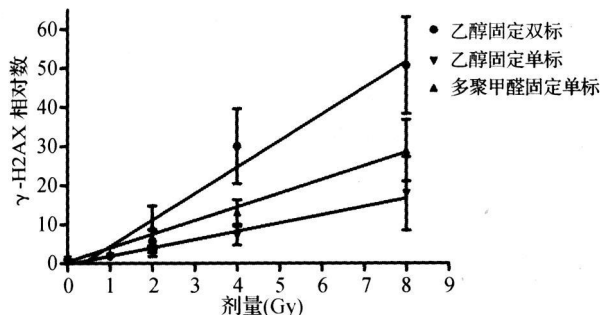


图 4 不同固定标记方法的 γ -H₂AX 剂量反应曲线

3 讨论

本研究中, 我们使用 70% 乙醇和 2% 多聚甲醛两种固定方式进行流式检测, 并对剂量反应结果进行直线拟合, 所得直线方程的确定系数均在 0.8 左右, 表明两种固定方式获得的 γ -H₂AX 剂量反应的直线趋势均较好。不同的固定方式对拟合直线的斜率有所影响。在均使用 FITC 单标时, 多聚甲醛的 γ -H₂AX 剂量反应较乙醇更明显 (剂量反应曲线斜率更大), 而在相同固定方法时 (乙醇), 双标 FITC-P 双参数检测的 γ -H₂AX 剂量反应较 FITC 单参数更明显。这与 Kuroka Y 等人^[9] 的研究结果一致, 他们发现 FITC 单标时乙醇处理较甲醇 γ -H₂AX 剂量反应更明显。但是我们没有发现固定方法与荧光标记的某种搭配会导致检测 γ -H₂AX 水平的下降。

使用乙醇固定双标法检测 γ -H₂AX 辐射剂量反应关系的确定系数为 0.87, 在所研究的几种流式检测方法中最好。此外, 多聚甲醛固定造成的细胞损失较乙醇固定大得多, 因此对于细胞数较少的样品来说, 使用乙醇固定是较好的方法 (由于固定后细胞粘连严重和获得细胞少, 多聚甲醛双标没有可供分析的结果)。双标方法可以排除凋亡等混杂因素, 对于比较不同细胞系间的 γ -H₂AX 十分有用。因此, 应用乙醇固定双标法进行流式检测是适用于 γ -H₂AX 与细胞放射敏感性相关性研究的检测方法。

本研究中, γ -H₂AX 剂量反应数据拟合直线的确定系数虽然可达 0.87, 但是加拿大 Peggy L Olive 研究小组^[10] 对 γ -H₂AX 剂量反应数据 (0~8 Gy) 拟合的直线确定系数高达 0.99, 对此可能有两种解释: (1) γ -H₂AX 剂量反应曲线的形式 (斜率) 是细胞依赖性的。本研究用于检测剂量反应的细胞系是人乳腺癌 MCF-7 与 Peggy L Olive 研究小组使用的不同。不同的细胞, 剂量反应曲线的形式 (斜率) 不尽相同, 大多数细胞是直线的, 但有的细胞是其他形式。(2) γ -H₂AX 剂量反应曲线的形式是时间依赖性的。对于同一细胞系, 在不同时间点的测定数据拟合直线的确定

系数不同, 可能存在一个最佳的时间点最适合测定数据拟合直线。(3) γ -H₂AX 剂量反应实验选在 γ -H₂AX 快速变动的时段, 此时间段内检测时间点微小的差别会造成测定值的差异。(4) 独立重复实验间隔时间较长, 加上肿瘤细胞 γ -H₂AX 本底变异较大, 培养一段时间的 γ -H₂AX 本底存在差异, 也会对 γ -H₂AX 剂量反应实验的重复性有所影响。

总之, 上述各方法均获得了较好的 γ -H₂AX 的电离辐射直线剂量反应关系, 其中乙醇固定双标法的确定系数为 0.87。不同固定方法和标记检测方式对于流式检测 γ -H₂AX 剂量反应有一定的影响, 主要表现在拟合曲线斜率的差异: 乙醇双标 > 多聚甲醛单标 > 乙醇单标。其中, 乙醇固定双标法的辐射剂量反应确定系数最高, 且处理样品细胞损失较少, 可以控制内源性 γ -H₂AX 的影响。

参考文献:

- [1] Takahashi A, Ohnishi T. Does gamma-H2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? [J]. *Cancer Lett* 2005; 229 (2): 171-179.
- [2] Stoff T, O'Discoll M, Rief N, et al. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation [J]. *Cancer Res* 2004; 64 (7): 2390-2396.
- [3] Buma S, Chen B P, Murphy M, et al. ATM Phosphorylates histone H2AX in response to DNA double strand breaks [J]. *J Biol Chem* 2004; 279 (45): 42462-42467.
- [4] Paull T T, Rogakou E P, Yamazaki V, et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage [J]. *Curr Biol* 2000; 10 (15): 886-895.
- [5] Rogakou E P, Pilch D R, Orr A H, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 [J]. *J Biol Chem* 1998; 273 (10): 5858-5868.
- [6] Rogakou E P, Boon C, Redon C, et al. Megabase chromatin domains involved in DNA double strand breaks in vivo [J]. *J Cell Biol* 1999; 146 (5): 905-916.
- [7] Olive P L. Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation [J]. *Methods Cell Biol* 2004; 75: 355-373.
- [8] Huang X, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage [J]. *Methods Mol Biol* 2006; 314: 73-80.
- [9] Kuroka Y, Bindokas V P, Duggan R C, et al. Flow cytometric analysis of phosphorylated histone H2AX following exposure to ionizing radiation in human microvascular endothelial cells [J]. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2006; 47 (3-4): 245-257.
- [10] MacPhail S H, Bamath J P, Yu Y, et al. Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells [J]. *Radiat Res* 2003; 159 (6): 759-767.