

辐射损伤与微核测定

施立明 张锡然

(云南省动物研究所)

在辐射损伤早期诊断以及辐射防护剂评定等工作中,染色体畸变分析即细胞遗传学的方法,由于其灵敏和可靠而受到普遍的重视。但在染色体标本制备以及观察、分析的自动化尚未普及时,现有的中期和后期染色体分析方法的效率仍嫌不高。为此, Heddle 建议用简便而迅速的方法,即检查骨髓细胞微核率来衡量染色体的损伤^[1];因为已经知道微核的形成和染色体的损伤之间有一定的联系。辐射和其它诱变因子(化学的,生物的)诱发的各类染色体畸变中,部分断片能保存一段时间,在间期细胞的细胞质中,表现为一个或多个圆形或杏仁状结构,并有继续合成 DNA 的能力,称为微核^[2]。当前,在化学诱变因子诱变活力的研究中,微核测定正得到广泛的应用^[3,4]。辐射诱发的微核形成,在植物^[5]和人体^[6]方面都已有过报告; Heddle 初步观察了小鼠骨髓有核细胞微核率和照后时间的关系^[1]。本工作较系统地研究微核率和照射剂量、照后不同时间的关系,以探讨微核测定应用于辐射损伤早期诊断的可能性。

材料与方法

采用本所饲养场繁殖的小白鼠,体重为 20—22 克,雌雄两性。⁶⁰Co 射线一次照射。在研究微核率和照射剂量的关系时,照射剂量为 0 (对照), 100, 200, 300 和 400 拉得;剂量率为 57.01 伦/分,照后 24 小时取材制片。在研究微核率和照后时间的关系时,照射剂量为 300 拉得;在照后 12, 24, 48 和 72 小时分别取材制片。每组 4 只动物,到规定时间,脱颈处死,剪取两根股骨,剔去肌肉;用 5½# 针头在股骨两端钻两个小孔,然后用 2 毫升注射器吸取 1 毫升 VI 型治疗血清(武汉生物制品研究所出品),接上 5½# 针头,插入股骨一端小孔中,把骨髓冲洗至离心管内,共冲洗两次。再用吸管仔细打碎骨髓团,1,000 转/分离心 5 分钟,弃去上清液,用管底骨髓作涂片。甲醇固定 15 分钟, Giemsa 染色 12—15 分钟(BDH, pH 6.8 的 Sorensen 磷酸缓冲液稀释 10 倍)。在骨髓涂片中细胞分布良好的区域,分别观察和统计有核细胞、红细胞、多染性红细胞中带有微核的细胞出现率,简称微核率。每种类型的细胞各观察 2,000 个,结果以千分率表示。鉴别的标准,基本上是参照 Matter 等^[7]和 Von Ledebur 等^[2]

的报道。要注意微核和鼓锤的区分。当以大鼠为实验动物时,有时涂片上常散见许多大小、染色和微核相类似的小体,这可能来自于嗜碱性粒细胞的颗粒;常造成区分的困难。但在小鼠的实验中,这种现象很少见到。

结果和讨论

1. 微核率与照射剂量的关系

在 γ 射线照射下,骨髓细胞中出现的微核形态见图 1。表 1 列出了不同照射剂量诱发的骨髓细胞微核率数据;其中,不同照射剂量诱发的有核细胞微核率数据经回归处理,得图 2 中的曲线 1。可以看出,随着照射剂量的增加,有核细胞微核率成直线增加。回归方程为 $y = 0.12x - 1.9$ (y 为微核率, x 为照射剂量)。直线回归的变量分析见表 2。

由于微核的产生多半是一次击中所引起,故在我们的实验中,有核细胞微核率和照射剂量成线性关系是预期的。Pyatkin 等^[8]以中期染色体分析方法,研究肿瘤病人在放射治疗中骨髓染色体畸变率的变化,也发现带有各种畸变染色体的畸形细胞率和照射剂量成线性关系;回归方程为 $Y = 0.21D + 2.7$ (Y 为畸变细胞率, D 为照射剂量)。看来,在一定剂量范围内,骨髓有核细胞微核率的测定,有可能作为辐射损伤早期诊断的一个参考指标。

有核红细胞在最后一次有丝分裂后若干小时排核,由于未知的原因,微核仍残留下来,很容易被察觉。

从表 1、图 2 (曲线 2, 3) 可以看出,骨髓红细胞以及多染性红细胞的微核率和照射剂量的关系曲线呈抛物线形。在 200 拉得以下,随着照射剂量的增加,微核率也随之增加;而当剂量进一步增大时,微核率反而下降。值得注意的是,在相同剂量照射下,红细胞特别是多染性红细胞的微核率要比有核细胞的高。这表明此两类细胞更为敏感些。因此,进一步研究 200 拉得以下的低剂量照射对红细胞、特别是多染性红细胞微核率的影响,对于小剂量辐射损伤的诊断可能是有一定意义的。

2. 微核率和照后时间的关系

Heddle^[1] 曾研究小鼠受 230 伦 X 射线照射后,骨髓有核细胞微核率和照后时间的关系,结果为:从照后 12 小时开始,微核率明显升高,在 2—3 天内保持在

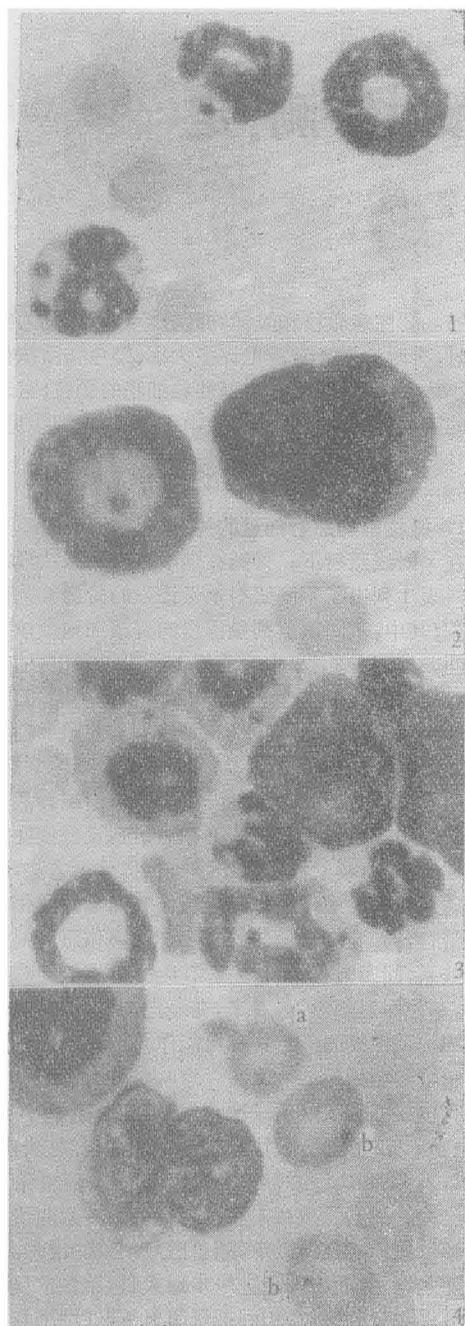


图1 骨髓细胞中的微核形态(照后24小时)
1,2,3——骨髓有核细胞的微核; 4——红细胞(a)和多染性红细胞(b)的微核

较高的水平。我们的实验结果见表3和图3。从中可以看出,骨髓有核细胞、红细胞、多染性红细胞的微核率都是在照后24小时达最高峰,然后迅速下降。在24小时以后,几乎所有多染性红细胞都转化为成熟红细胞,在整个涂片上,蓝灰色的多染性红细胞极为稀少;故在48,72小时两时间点没有统计多染性红细胞

表1 不同剂量 γ 射线对小鼠骨髓细胞微核率的影响*

照射剂量 (拉得)	有核细胞 微核率(‰)	红 细 胞 微核率(‰)	多染性红细胞 微核率(‰)
0(对照)	0.4	2.3	4.2
100	7.1	34.1	46.4
200	19.6	46.5	69.1
300	36.8	37.1	65.6
400	44.5	23.5	55.0

* 照后24小时取材制片,每组数据均为4只雄性小鼠数据的平均数

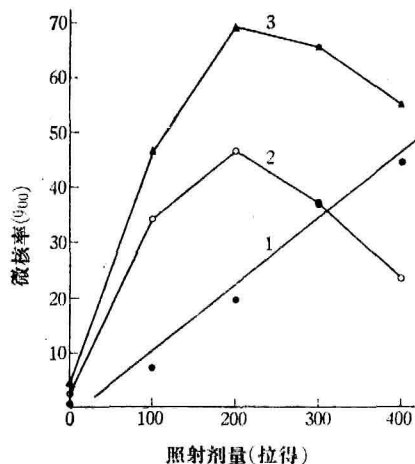


图2 微核率和照射剂量的关系(照后24小时)
1——有核细胞微核率; 2——红细胞微核率;
3——多染性红细胞微核率

表2 直线回归的变量分析

变 异 来 源	平方和	自由度	均 方	F	P
回 归	1,440	1	1,440	17.37	<0.05
距回归线的离差	248.71	3	82.9		
合 计	1,688.71	4			

$$F_{0.05}(1.3) = 10.1$$

表3 300拉得照射小鼠的骨髓细胞微核率和
照后时间的关系*

照 后 时 间, (小时)	有核细胞 微核率(‰)	红 细 胞 微核率(‰)	多染性红细胞 微核率(‰)
对 照	0.6	2.1	2.5
12	7.1	19.6	32.3
24	35.0	30.5	63.7
48	17.6	21.8	—
72	4.0	14.8	—

* 每组数据均为4只雌性小鼠数据的平均数

的微核率。看来,在采用骨髓细胞微核率来诊断辐射损伤时,以照后24小时取材制片较为合适。

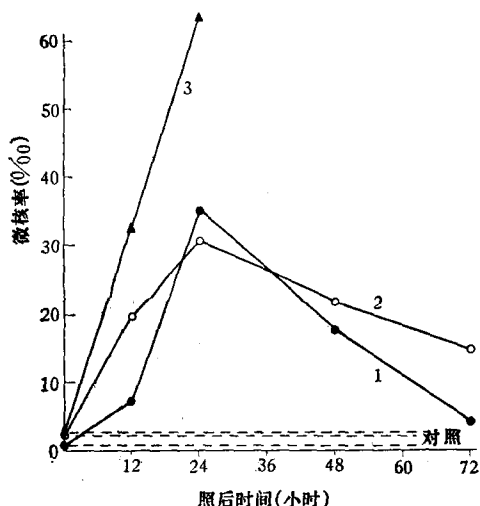


图3 微核率和照后时间的关系(照射剂量300拉得)
1——有核细胞微核率; 2——红细胞微核率;
3——多染性红细胞微核率

Heddle^[1]认为,微核测定与沿用的染色体分析相比较,除了节约时间以外,还有几个优点:(1)在细胞分裂受到抑制的场合,染色体分析常需多次取样以寻求最合适的分析时间,而微核测定一般只要一两次取样就有足够多的细胞可供分析;(2)太高的照射剂量常使中期染色体分析困难甚至不可能进行,而对于微核测定,相对来说困难不那么严重;(3)中期染色体分析时有些畸变类型如间隙(gaps)过多,其可靠性和意义如何,尚不清楚,而在微核测定中就不存在这个问题。此外,对于染色体数较多、不甚适于中期染色体分析的实验动物,仍可应用微核测定^[7]。并且现有的一些资料^[1,3]也表明,在同一实验条件下,微核率和染色体畸变率之间有很好的相关。应当指出,和中期染色体分

析比较,微核测定只能反映少数几种类型的染色体畸变,如断裂、断片或单体互换等^[2],而且出现率也比较低,故微核测定可能不及中期染色体分析的灵敏度高。另外,微核率受个体差异的影响较大。当然,这可能与采用的是非纯系动物有关。但微核测定有个比较突出的优点,就是制片简便、观察迅速。在研究各种诱变因子的细胞遗传学效应以及辐射损伤的早期诊断中,不失为沿用的染色体分析法的一个良好的补充。

小 结

本工作研究了不同剂量 γ 射线对小鼠骨髓有核细胞、红细胞、多染性红细胞微核率的影响,以及微核率和照后时间的关系。结果表明,骨髓有核细胞微核率和照射剂量成线性关系,取材观察时间以照后24小时较为合适。对微核测定和染色体分析的特点进行了比较讨论。在一定剂量范围内,骨髓有核细胞微核率测定,有可能作为辐射损伤早期诊断的一个参考指标。

参 考 资 料

- [1] Heddle, J. A.: *Mutation Res.*, 18, 187, 1973.
- [2] Von Ledeber, M. et al.: *Mutation Res.*, 19, 109, 1973.
- [3] Weber, E. et al.: *Mutation Res.*, 26, 461, 1974.
- [4] Richardson, J. C.: *Mutation Res.*, 26, 391, 1974.
- [5] Evans, H. J. et al.: *Int. J. Radiation Biol.*, 1, 216, 1959.
- [6] Flidner, T. M. et al.: *Blood*, 23, 471, 1964.
- [7] Matter, B. E. et al.: *Mutation Res.*, 12, 417, 1971.
- [8] Pyatkin, E. K. et al.: *Int. J. Radiation Biol.*, 19, 535, 1969.

[本文于1974年11月6日收到]

(上接第48页)

主 要 参 考 资 料

- [1] Kiefer, H. C. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69, 2155—2159, 1972.
- [2] Breslow, R.: *Advances in Chem. Ser.* 100, Bio-inorganic Chem., p. 21—43, 1971.
- [3] Griffiths, D. W., et al.: *Advances in Catal.*, 23, 209—262, 1973.

- [4] Cramer, F., et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 14—20, 1967.
- [5] Glassmeyer, C. K., et al.: *Biochemistry*, 10, 786—792, 1971.
- [6] Klenow, H., et al.: *Eur. J. Biochem.*, 22, 371—381, 1971.
- [7] Traylor, T., et al.: *Chem. and Engineering News*, 5, 14—15, 1973.
- [8] Anfinsen, C. B.: *Science*, 181, 223—230, 1973.