

$^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射离体人血诱发的淋巴 细胞染色体畸变—剂量关系的研究

放射医学研究室

黄祥寿 张爱珍 陈杏凤 赵茜芬

应用人体外周血染色体畸变对事故受照人员进行剂量估算,在放射剂量学中是一种比较灵敏和可靠的生物学方法。业已证明,离体照射人血与全身辐照所引起的淋巴细胞染色体畸变与剂量之间的关系是一致的。因此,利用离体照射人血所得到的染色体畸变—剂量曲线,可以估算各种事故条件下人员所受的辐射剂量。这种生物剂量仪不但可以辅助物理剂量的测定,而且在某些复杂情况下用物理方法难以准确估计剂量时,更显示其优越性^(1~5)。虽然WHO已统一了染色体分析方法,但各实验室所得的剂量—效应曲线常有差别,本研究的目的是建立本实验室条件下的染色体畸变量与辐射剂量之间的刻度曲线,用以估算事故受照人员的吸收剂量。

材料与 方法

一、血样和照射条件 选取血库助血员5人(4男1女),每人早晨常规静脉取血20ml(肝素抗凝),平均分装于8支消毒的密封试管中。取每份血样的1管作对照,其余7管在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 条件下,用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线分别照射25、50、100、200、300、400和500 rad,剂量率为 35.2rad/min 。应用法莫(Ione X型)剂量仪,将探头(电离室)与受照血样放在一起,自动控制照射剂量,通过电视屏,观察照射场的情况。

二、血细胞体外培养和制片 照射结束后2小时,从每支试管抽取 $0.2\sim 0.3\text{ml}$ 血加到5ml培养液中(RPMI 1640液4ml,小牛血清1ml,PHA $200\mu\text{g/ml}$,青、链霉素各 100u/ml), $\text{pH}7.3\sim 7.4$, 37°C 恒温培养47小时加秋水仙素($0.06\mu\text{g/ml}$),52小时收获细胞。培养物用 0.075M KCl溶液低渗处理,以甲醇—冰醋酸(3:1)混合液预固定和固定,气干法制片,Giemsa染色。

三、染色体畸变分析和数学统计处理

1.在显微镜下选择染色体分散良好的细胞进行分析。本实验要求染色体着丝点的数目为 46 ± 2 个。记录断片、微小体、无着丝点环、着丝点环、双或多着丝点体、易位、四倍体细胞和染色体型畸变细胞。双或多着丝点体及着丝点环的伴随断片,为互换畸变的一部分,不另计数。多着丝点体按“着丝点数目减1,等于双着丝点体数”的关系计入双着丝点体项内。四倍体细胞的畸变,取其半数作统计。所有观察到的畸变,均经2~4人复核确定。

2.按不同照射剂量组,以畸变数/细胞为单位,分别计算断片、双着丝点体、双着丝点体+着丝点环(简称双+环)、易位、四倍体细胞和畸变细胞率6项数据(5例血样的均值)。实验资料用电子计算机(CROMEMCO)作逐步回归分析,演算并推导畸变—剂量的最优回归方程式。

结 果

^{60}Co γ 线照射离体正常人外周血淋巴细胞所诱发的各类结构畸变,几乎全是染色

体型畸变。本实验共分析6,369个中期分裂细胞,所见的各种畸变的自发畸变率很低,它们均随照射剂量递增而升高(见表1)。实验数据用电子计算机作逐步回归分析表

表1 ^{60}Co γ 线照射离体人淋巴细胞诱发的染色体畸变(%) (均数 $\pm$ 泊松标准误)

(rad剂量)	分析细胞数	断片	双着丝点体	双+环	易位	四倍体细胞	畸变细胞
0	865	0.12 $\pm$ 0.01	0	0	0	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01
25	968	1.14 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.02	0	0.10 $\pm$ 0.01	1.45 $\pm$ 0.04
50	1000	2.60 $\pm$ 0.05	1.80 $\pm$ 0.04	1.90 $\pm$ 0.04	0.50 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.02	4.00 $\pm$ 0.06
100	825	2.55 $\pm$ 0.06	3.64 $\pm$ 0.07	3.76 $\pm$ 0.07	0.36 $\pm$ 0.02	0.85 $\pm$ 0.03	6.18 $\pm$ 0.09
200	787	9.91 $\pm$ 0.11	10.94 $\pm$ 0.12	11.44 $\pm$ 0.12	1.78 $\pm$ 0.05	2.29 $\pm$ 0.05	15.50 $\pm$ 0.14
300	770	35.45 $\pm$ 0.21	34.68 $\pm$ 0.21	35.97 $\pm$ 0.22	3.64 $\pm$ 0.07	4.42 $\pm$ 0.08	48.70 $\pm$ 0.25
400	631	70.91 $\pm$ 0.32	59.33 $\pm$ 0.29	63.24 $\pm$ 0.30	8.25 $\pm$ 0.11	4.05 $\pm$ 0.08	63.24 $\pm$ 0.30
500	463	109.94 $\pm$ 0.49	116.85 $\pm$ 0.50	122.68 $\pm$ 0.51	15.77 $\pm$ 0.18	9.29 $\pm$ 0.14	81.86 $\pm$ 0.42

表2 实验资料的畸变—剂量关系的回归分析

畸变类型	回 归 方 程 式	相关系数(R)
断片/细胞	$Y=0.015381-0.000485D+0.000005D^2$	0.998745
双/细胞	$Y=0.13485-0.000041D^{1.75}+0.000013D^2$	0.997302
双+环/细胞	$Y=0.018231-0.000045D^{1.75}+0.000014D^2$	0.997847
易位/细胞	$Y=-0.001105+0.000235D-0.000018D^{1.75}+0.000034D^2$	0.998968
四倍体/细胞	$Y=0.002461+0.000002D$	0.966492
畸变细胞/细胞	$Y=0.002710+0.00076D^{1.5}$	0.990373

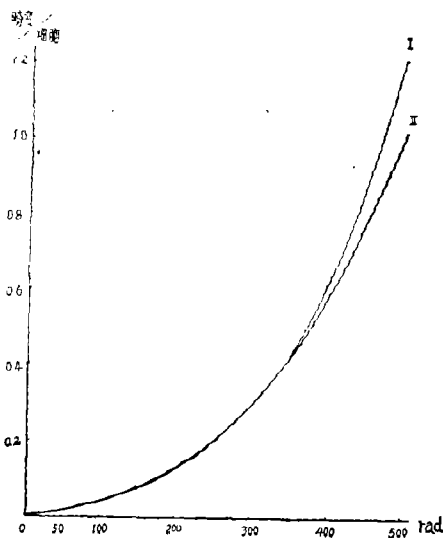


图1 双着丝点体加环(I)与双着丝点体(II)和照射剂量关系的曲线

明,四倍体细胞与剂量是直线相关,其余呈二次幂函数关系,其回归方程式及相关系数值列于表2。

估算放射生物剂量,常用双着丝点体或双+环这两项指标,其剂量—效应曲线见图1。

讨 论

一、使用电子计算机对染色体畸变的剂量效应作逐步回归分析,其优点是能迅速推导出最优的回归方程式。表2所列的6个回归方程式,拟合度优良,除四倍体细胞率的相关系数为96.6%外,其余均在99%以上。

二、在一个畸变细胞中若共存有双着丝点体等及多个断片,计数时首先扣除伴随断

片, 剩余者列为断片畸变, 以尽量满足不对称互换畸变的配套。循此原则分析1,103个双着丝点体, 其中194个缺乏伴随断片, 后者为前者的17.59%, 提示标本中有相当数量的畸变细胞已经历了2次或多次分裂, 这与文献报道^(6,7)及我们以前的实验结果是一致的⁽⁸⁾。

三、双着丝点体和着丝点环等不对称互换畸变, 可以阻止正常细胞的分裂, 它们在后期能形成“桥”, 从而严重阻碍了两个子细胞的分离。如果两个子细胞不能分离, 则形成四倍体细胞, 可含有重复的畸变(图

2、3)。因此, 四倍体细胞的出现, 既与染色体畸变有关, 又是培养细胞已经历2次或多次分裂的指标⁽⁹⁾。染色体标本中的双核淋巴细胞是越过中期到达末期的分裂细胞, 它们的出现与辐射效应、加秋水仙素时机失宜及细胞分裂速度过快诸因素有关。对同一份血样而言, 上述四倍体细胞和双核淋巴细胞率以及双着丝点体不伴断片率的数据比较一致。但是, 不同个体的血样之间, 这三项指标存有起伏, 而此供血者个体的差别, 与其细胞免疫功能(淋巴细胞转化率)有密切关系(表3)。

表3 供血者染色体标本中有关指标的比较

供血者	淋巴细胞转化率(%)*	双核淋巴细胞率(‰) (个/淋巴细胞)	四倍体细胞率(‰) (个/中期细胞)	双/双+断×100%
甲	75.10	0.65	7.05	25.39
乙	52.30	0.98	4.40	28.91
丙	39.50	0.29	1.96	11.28

* 利用染色体标本测定淋转率的方法可参见文献(9)

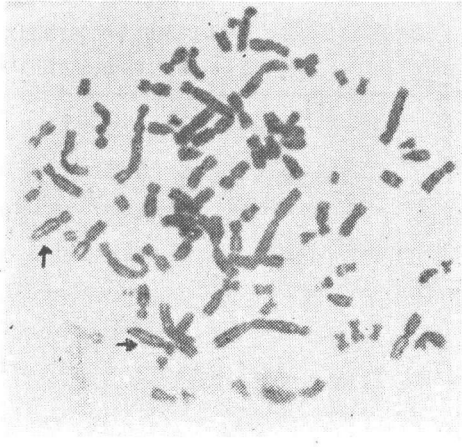
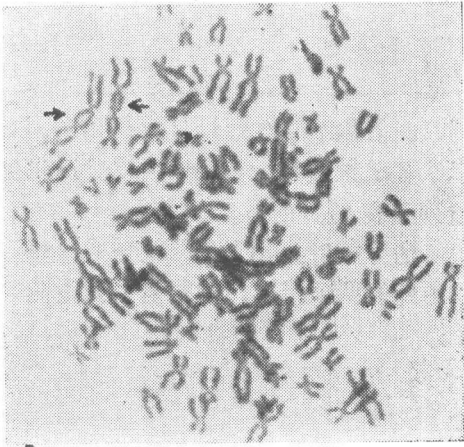


图2、3 四倍体细胞, 分别含有复制的双着丝点体及三着丝点体(箭头所示)

Crossen等人用放射自显影结合SCD(姐妹染色单体差别染色)法研究了PHA刺激的人体淋巴细胞的增殖过程, 指出细胞进入S期的时间在24~48小时之间, 存在着个体差异, 原因是各个体对PHA的刺激效应具有不等的快反应和慢反应的细胞群

⁽¹⁰⁾。表3数据表明, 供血者甲和乙, 淋转率正常和高于正常(52.30%和75.10%), 其四倍体细胞、培养双核细胞和双着丝点体不伴断片均相当高。而供血者丙的淋转率只有39.50%, 淋巴细胞对PHA刺激反应弱, 可能是慢反应的细胞占优势, 以致其余三项

指标都呈低水平。

值得注意的是供血者的淋转率与染色体型畸变细胞率之间存在负的依赖关系(见表4),即照射前淋转率高者,各剂量组的畸变细胞率都低,反之亦然。表3和表4的数据表明,血淋巴细胞对PHA的反应强者

(如供血者甲),细胞增殖周期短,体外培养52小时经历第2次细胞分裂的机率较大,不稳定畸变和畸变细胞丢失的机会较多,因此,畸变细胞率明显低于供血者丙(200~500rad, $\chi^2 > 10.828$ $P < 0.001$)。在放射细胞遗传学领域里,WHO推荐书指出,

表4 供血者血样的淋转率和染色体型畸变细胞率的关系

剂 量 (rad)	供血者甲		供血者乙		供血者丙	
	淋转率	畸变细胞率	淋转率	畸变细胞率	淋转率	畸变细胞率
0	75.1	0	52.3	0	39.5	0
100	60.2	2.5	51.7	5.3	41.5	6.0
200	55.0	4.5	42.0	11.0	33.2	17.2
300	57.9	17.0	28.9	83.5*	32.0	51.5
400	37.0	32.5	46.5*	70.0	29.8	73.1
500	41.0	69.5	28.7	86.9	24.3	94.1

* 数据经再三复核

机体血淋巴细胞免疫反应的程度,可改变畸变细胞的数目⁽¹⁾,我们的资料证实了此论点。作为纠偏措施,在选择供血者作染色体畸变的剂量刻度曲线时,应尽可能包括各种免疫反应类型的对象,分别计算各类个体的和混合平均的畸变系数,这对正确估算个体的放射生物剂量是有意义的。

(本研究的数据承浙江大学电子计算机系胡希明老师用计算机作逐步回归分析,本文承包金良主任审阅修改,特此致谢)。

参 考 文 献

1. Buckton K E and Evans H J, Eds. Methods for the analysis of human chromosome aberrations, Geneva: WHO, 1973: 11.
2. Evans H J and Lloyd D C, Eds. Mutagen-induced chromosome damage in man. Edinburgh: Edinburgh University Press, 1978: 177.
3. 周焕庚 郑斯英. 北京: 原子能出版社, 1978: 216.
4. 金瑾珍, 等. 辐射防护 1983; 3(2): 87.
5. 白玉书, 等. 中华放射医学与防护杂志 1982; 2(3): 44.
6. 周焕庚, 等. 生物化学与生物物理学报 1977; 9(2): 147.
7. 吴永祥, 等. 核防护 1980; (2): 10.
8. 黄祥寿, 等. 浙江医科大学学报 1983; 12(5): 233.
9. 赵荫芬, 等. 全国放射医学与防护学术会议资料, 1980.
10. Crossen P E, et al. Exp Cell Res 1979; 118: 437.

铜宫内节育器

王宸熙, 等. 铜IUD对兔子宫内腔mRNA体外翻译的影响. 浙江医科大学学报 1985; 14(2): 55.

本文报道了测定正常和放置铜丝(取自宫内节育器)子宫内腔的铜含量, 二者有显著性差别. 提取了上述二种内腔的总mRNA并比较了它们在麦胚无细胞体系中蛋白质翻译产物的差别, 发现放铜内腔mRNA的翻译产物分子量相当于64K, 32K, 21K及18K的蛋白质明显减少, 而分子量为23K的蛋白质明显增加. 讨论了这种增加或减少的蛋白质可能是引起宫内铜丝节育器的避孕机理.

^{60}Co γ 线

黄祥寿, 等. ^{60}Co γ 线照射离体人血诱发的淋巴细胞染色体畸变. 染色体畸变 1985; 14(2): 58.

本文报道用不同剂量 ^{60}Co γ 线照射离体血液后淋巴细胞染色体畸变的结果. 染色体断片、双着、着环、易位、四倍体细胞和总畸变率均随照射剂量增加而升高. 用电子计算机处理数据表明, 四倍体细胞与剂量呈线性回归($R=0.965492$), 其余均为幂函数关系($R>0.990373$). 在观察到的1103个双着丝点体中, 有194个无伴随的断片, 占总数17.59%. 比较不同供血者的血样, 双核淋巴细胞率、四倍体细胞率和D/D+F比率越高者, 其总畸变细胞率就越低, 这种情况往往发生在淋巴细胞转化率低的供血者. 资料表明人体的免疫反应程度可影响到畸变细胞数目.

月经血量

刘子贻. 还原性物质对月经血量测定的干扰及其纠正. 浙江医科大学学报 1985; 14(2): 53.

通常应用5%NaOH提取中性高铁血色原(棕色)来测定月经血量, 但在抽提液中往往出现另一种色泽, 红色. 为了阐明这种红色造成多大的测定误差和如何消除这种误差, 就必须研究这种色泽的实质. 将葡萄糖(10mg/ml)作为一种还原剂加于抽提液中, 其色泽就逐渐地自棕色转变为红色, 红色抽提液的吸收曲线与棕色者很不相同. 已发现除性条件下葡萄糖、抗坏血酸等还原剂的存在可使棕黄色高铁血色原还原为亚铁血色原, 使546nm(Hallberg法)和568nm(Shaw法)处吸光度增大, 成为主要的误差来源. 检查溶液在495与545nm处的读数, 当 A_{495}/A_{545} 时可判定亚铁血色原的存在, 以水稀释并充分振荡可使亚铁血色原分解氧化为高铁血色原, 从而完全避免由此造成的误差.

肿瘤

徐学儒, 等. 柠檬桉叶挥发油的抑瘤作用及毒性试验. 浙江医科大学学报 1985; 14(2): 49.

本文研究了柠檬桉叶挥发油的抑瘤作用及毒性, 发现本品对小鼠EC的抑瘤率为67.5~33.9%; S_{180} 为36.2~32.8%; 大鼠W256为32.7~31.4%. 放射自显影实验证明本品能明显抑制EC腹水瘤细胞的DNA合成.

急性毒性试验: 口服 $LD_{50}=1.49\text{ml/kg}$ (按原油计, 下同); 静注 $LD_{50}=0.19\text{ml/kg}$.

亚急性毒性试验表明, 除发现本品对口腔、咽喉粘膜有刺激反应外, 其余项目, 如血液、肝、肾功能、EKG、24心、肺、肝、肾、脾、胃、肠、淋巴结、膀胱等脏器病检中, 均未见明显异常.

CHROMOSOME

⁶⁰Co Gamma Ray

ABERRATION

Wang Xiangshou, et al. Studies on Relationship between Radiation Dosage and Chromosome Aberration Rate Induced by ⁶⁰Co Gamma Ray in Human Lymphocytes in Vitro. *J Zhejiang Med Univ* 1985; 14(2): 58.

Chromosome aberration of human lymphocytes following different doses of ⁶⁰Co Gamma ray (25~500 rad) was studied in vitro. The yields of fragments, dicentric, centric rings, reciprocal translocations and the percentage of quadripleid cells and total aberrant cells all increased with the enhancement of radiation dosage. By means of a computer, a linear regression relationship between radiation dosage and quadripleid cells ($R=0.986492$) was revealed; the others that fitted well to the power function equation were even higher ($R>0.980373$). 194 dicentric without appropriate fragments were observed among 1103 dicentric, the percentage being 17.59. In comparison with various samples, it was found the higher the rate of double nuclear lymphocytes, quadripleid cells and the ratio of D/D+F, the lower the percentage of total aberration. Such results usually occurred in donors with higher lymphoblastoid transformation. The data indicated that the immunological reaction of each individual might alter the number of cells with chromosome aberration.

TUMOR

VOLATILE OIL FROM

EUCALYPTUS CITRIODORA

Xu Xuern, et al. Antitumor Activity and Toxicity of Volatile Oil from *Eucalyptus Citriodora*. *J Zhejiang Med Univ* 1985; 14(2): 49.

This paper reports a study on the antitumor activity and toxicity of the volatile oil from *eucalyptus citriodora*. The results demonstrated that the tumor inhibitory rate was 67.5~38.9% in Ehrlich ascites carcinoma, 36.2~62.8% in Sarcoma 180, 32.7~61.4% in Walker 256 respectively. It was shown in autoradiography that this substance could strongly inhibit the DNA synthesis of tumor cells of Ehrlich ascites carcinoma.

In acute toxicity test, the LD₅₀ was 1.49ml/kg by intragastric administration and 0.19ml/kg by intravenous administration.

In subacute toxicity test, no obvious abnormality, with the exception of stimulation of the mucosa of oralcavity and throat, was observed during the examination of blood, EKG, function of the liver and kidney and in the pathological examination of the heart, liver, kidney, spleen, stomach, ureter, gall bladder and pancreas.

COPPER INTRAUTERINE ENDOMETRIAL mRNA DEVICES

Wang Zhengxi, et al. Effect of Copper IUD on in-Vitro Translation of Rabbit Endometrial mRNA. *J Zhejiang Med Univ* 1985; 14(2): 55.

This paper reports the significantly different copper levels of the rabbit endometrium measured in copper wire wearers and non-wearers (the copper wire taken from copper-IUD). The two kinds of endometrial mRNA described above were extracted and their difference of translation production in the wheat-germ cell free system compared. A remarkable reduction in the translation production of molecular weight of 64K, 23K, 21K and 18K protein was revealed. But the molecular weight of 28K protein showed a significant increase. The authors discussed the possible antifertility effects of Cu-IUD by the decrease or increase of these proteins.

REDUCING AGENTS MENSTRUAL BLOOD LOSS HEMOCHROMOGEN

Liu Ziyi. Interference of Reducing Agents in Determination of Menstrual Blood Loss and Correction. *J Zhejiang Med Univ* 1985; 14(2): 53.

In determining menstrual blood loss, 5% NaOH is usually used to extract ferrihemochromogen (brown color), but another distinctly different color, a red one, is often found in the extract. The study of the nature of this red color is key to clarifying the degree of the error it brings about and to the way for its correction. It has been found that in alkaline condition, the presence of reducing agents, e. g. glucose, ascorbic acid etc, might reduce the brown ferrihemochromogen to red ferrohemochromogen, the absorbance of which at 548nm (Hallberg's method) and 550 (Shaw's Method) is higher than that of the extract in brown color and thus constitutes the main source of error in the determination of menstrual blood loss. According to the absorbance of the extract at 495 and 515nm, it is easy to decide whether the ferrochromogen is present or not: A_{495}/A_{515} would undoubtedly indicate its presence. When diluted with water and shaken thoroughly, the ferrohemochromogen might be oxidized to ferrihemochromogen.