

用CB法研究分次照射时微核的 剂量效应关系

白玉书 张秀霞 关树荣 巫 红

(卫生部工业卫生实验所, 北京)

摘要 每日给家兔一次全身照射1 Gy ^{60}Co γ 线, 共4日, 总剂量4 Gy。照前和每次照射后检查微核。在分次和一次照射后, 微核率随剂量增加而增加, 大部分相应剂量点一次照射高于分次照射。当4 Gy时, 二者差异有非常显著性($P < 0.01$)。曲线拟合表明, 一次照射的微核率适于二次多项式($\hat{y} = a + bD + cD^2$), 分次照射的微核率适于纯二次式($\hat{y} = a + cD^2$)。

关键词 分次照射, 家兔, 微核, 胞质分裂阻断法, 松胞素-B

利用染色体畸变分析估算辐射事故病人的生物剂量, 国内外已有多例实际应用的报道, 取得了较为满意的结果。微核率作为衡量染色体损伤的指标, 在医学和生物学等领域内得到了广泛的应用。用淋巴细胞微核率估算事故条件下的生物剂量, 引起学者们的广泛兴趣。近几年来, 采用胞质分裂阻断法(Cytokinesis-block Method, CB法)^[1], 观察第一次有丝分裂(双核淋巴)细胞中的微核, 使结果更可靠, 为该指标作为生物剂量仪展示了广阔前景。本研究目的是通过动物实验, 观察分次照射外周血淋巴细胞微核的剂量效应关系, 并与一次照射相比较, 为在分次超剂量外照射时估算生物剂量提供依据。

材 料 和 方 法

1. 实验动物分组

实验用12—15周龄, 体重2—3 kg的雄性青紫兰家兔, 随机分组为1、2、3和4 Gy一次照射组和分次照射组。动物照前采血, 作自身正常对照, 每组4—5只动物。

2. 照射条件

将动物固定于特制的木笼内, ^{60}Co γ 线照射剂量率为0.726 Gy/min, 一次全身照射1、2、3和4 Gy, 将受1 Gy照射的5只家兔, 在第一次照射后, 每天(间隔24 h)加照1 Gy, 总剂量为4 Gy。为达到均匀照射的目的, 在照射到一半剂量时, 将动物翻身。

3. 标本的制备和观察

照前和照后90—120 min从家兔心脏取血(肝素抗凝), 采用胞质分裂阻断法(CB法)培养微核。具体方法是: 将0.3 ml全血加到4 ml混合培养液中(3 ml RPMI 1640液, 1 ml新生牛血清, 青、链霉素各100单位/ml, PHA适量), pH 7.2—7.4, 39℃恒温培养到30 h加松胞素-B(Cytochalasin-B), 事先将松胞素-B溶于二甲亚砜中, 配成2.0 mg/ml浓度, -20℃贮藏, 用前融化, 生理盐水稀释, 最终浓度为3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 54 h终止培养, 吸出上清液, 往沉降物中加3 ml 0.075 mol/L KCl, 混合后立即加2 ml新配的固定液(甲醇:冰乙酸=3:1), 混匀后, 10000 r/min离心10 min, 去上清, 重复固定, 10 min离心后沉淀物涂片, Giemsa染色。采用双盲法阅片。只

观察双核淋巴细胞,记录其微核,结果以微核细胞率(‰)及微核率(‰)表示。

结 果

共观察了26466个双核淋巴细胞。微核率和微核细胞率的对照值皆为8.1‰,在分次和一次照射后,上述指标随吸收剂量增加而增加。一次照射所诱发的微核率较分次照射为高(见表1和2),当剂量达4 Gy时,这种差异有非常显著性(见表3)。回归分析表明,一次照射适于拟合二次多项式($\hat{Y} = a + bD + cD^2$),分次照射则适于纯二次式($\hat{Y} = a + cD^2$),见表4。

Tab 1. Micronucleus frequencies of CB cells in rabbits exposed to fractionated wholebody ^{60}Co γ -rays ($\bar{X} \pm \text{SE}$)

Dose (Gy)	Number of cells observed	Frequencies of cell with micronuclei	Micronucleus frequencies
0	12206	8.1 $\pm$ 0.8	8.1 $\pm$ 0.8
1	4000	34.8 $\pm$ 2.9	37.0 $\pm$ 3.0
2	2101	74.7 $\pm$ 6.0	78.1 $\pm$ 6.1
3	2000	78.0 $\pm$ 6.2	87.0 $\pm$ 6.6
4	1113	110.5 $\pm$ 10.0	122.2 $\pm$ 10.5

Tab 2. Micronucleus frequencies of CB cells in rabbits exposed to single wholebody ^{60}Co γ -rays ($\bar{X} \pm \text{SE}$)

Dose (Gy)	Number of cells observed	Frequencies of cell with micronuclei	Micronucleus frequencies
0	12206	8.1 $\pm$ 0.8	8.1 $\pm$ 0.8
1	4000	34.8 $\pm$ 2.9	37.0 $\pm$ 3.0
2	2000	80.5 $\pm$ 6.3	85.0 $\pm$ 6.5
3	2040	93.6 $\pm$ 6.8	101.0 $\pm$ 7.0
4	1006	165.0 $\pm$ 12.8	201.8 $\pm$ 14.2

Tab 3. X^2 test between micronucleus frequencies induced by fractionated and single whole-body gamma irradiations

Dose (Gy)	Frequencies of cell with micronuclei		Micronucleus frequencies	
	X^2	P	X^2	P
2	0.4775	>0.05	0.6600	>0.05
3	3.1413	>0.05	2.3164	>0.05
4	13.3240	<0.01	24.9114	<0.01

Tab 4. The regression formula of micronucleus frequencies

Tape	Single irradiations: $\hat{Y}^*$	Fractionated irradiation: $\hat{Y}$
Frequencies of cell with micronuclei	10.2217 + 20.5859 D + 4.168 D ²	11.6200 + 24.8000 D
Micronucleus frequencies	12.3199 + 13.1010 D + 8.0097 D ²	10.7800 + 27.8200 D

* $\hat{Y}$ Frequencies of cell with micronuclei or micronucleus frequencies(‰)
D Dose(Gy)

讨 论

常规法建立外周血淋巴细胞微核的剂量效应曲线时,一般培养72h收获。众所周知,经PHA刺激后转化的T淋巴细胞,开始进入有丝分裂周期的时间是受培养条件、个体差异和是否接受照射等因素影响的。细胞分裂是微核形成的必要条件,但细胞分裂一方面可能造成微核的丢失,另一方面,微核有DNA形成能力,也可能使微核增加,是一个复杂的过程。因此用控制培养时间观察转化的淋巴细胞中的微核,是不能准确地反映剂量效应关系的。用CB法观察M₁细胞克服了上述缺点,使方法更加完善。

考虑到CB原法培养分离的淋巴细胞手续复杂,在培养到44h时,有部分淋巴细胞已进入M₂期,会影响结果的准确性。在预实验的基础上,本实验采用微量全血培养,30h加松胞素-B,54h收获。这样简化了方法,提高了数据的可靠性,又缩短了培养时间。

微核测定估算事故条件下人员所受的剂量,国内已有报道^[2]。本实验室也作过几例事故病人的剂量估算,与染色体估算的生物剂量基本一致。上述估算的病例皆为比较均匀的一次全身外照射。对分次照射,由于影响因素复杂,尚处于积累资料阶段。

本研究结果,表明一次照射和分次照射诱发的CB细胞的微核率与剂量间存在良好的依赖关系,并发现分次照射微核率比相同剂量一次照射为低。本实验室的另一组实验,研究分次照射染色体畸变剂量效应关系,得到同样的规律。即在低LET辐射,分次照射染色体畸变率比相同剂量一次照射为低,主要是由剂量率效应所决定。有的作者^[3,4]用⁶⁰Co γ 线照射离体人血来研究剂量率效应,引进一个依赖时间的因子(G函数),将急性照射时所建立的染色体畸变的剂量效应曲线用于分次或迁延性照射,使表达式成为 $y = aD + cG(x)D^2$,但尚未见实际应用的报道。本研究表明一次或分次照射诱发的微核和染色体畸变是一致的,同种照射方式,染色体畸变率和微核率高度相关($p < 0.01$),并可用回归方程式表达,可见微核是反映染色体损伤的良好指标。是否能用一次照射离体血所建立的微核的剂量效应曲线,通过某一修正系数,用于估算分次照射生物剂量,有待进一步研究。

柴文、黄绮龙和夏英同志参加部分工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] M. Fenech and A. A. Morley, *Mutat. Res.*, 147, 29(1985).
- [2] 杨家宽,蔡荣妹,邹敏和刘德喜,辐射研究与辐射工艺学报, 6(1), 62(1988).
- [3] M. Bauchinger, E. Schmid and J. Dresch, *Int. J. Radiat. Biol.*, 35, 229(1979).
- [4] D. C. Lloyd, A. A. Edwards, J. S. Prosser and M. J. Crop, *Radiat. Environ. Biophys.*, 23, 179 (1984).

(稿件收到日期: 1990年6月4日)

THE USE OF CYTOKINESIS-BLOCK METHOD TO STUDY THE MICRONUCLEUS FREQUENCIES IN RABBITS EXPOSED TO FRACTIONATED WHOLEBODY ^{60}Co GAMMA-RAYS

Bai Yushu, Zhang Xiuxia, Guan Shurong and Wu Hong

(Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of Public Health, Beijing)

ABSTRACT The changes in the frequencies of micronuclei in CB cells were observed after irradiations of rabbits exposed to single or fractionated wholebody ^{60}Co γ -rays. The frequencies of micronuclei showed a increase with the doses. At the same doses micronucleus frequencies in wholebody irradiations were higher than those in fractionated irradiations. The differences between them were very significant at 4 Gy dose. Micronucleus frequencies in single irradiations gave the best to the second degree polynomial model ($\hat{Y} = a + bD + cD^2$), but micronucleus frequencies in fractionated irradiations gave the best to the quadratic equation ($\hat{Y} = a + cD$).

KEYWORDS Fractionated irradiations, Rabbit, Micronuclei, Cytokinesis-block method, Cytochalasin-B