

离体照射全血后 SCE、染色体 和其随体联合的变化

刘锦文 程国栋 张儒林 么燕玉

(河北省放射医学研究所)

摘要: 本文以两种不同剂量(0.5 和 1.0 Gy)照射外周血,作了三个不同时间的培养(51、72、96 小时),用 BudR-Giemsa 标记染色体,观察细胞周期变化、姊妹染色单体交换(SCE)率、染色体畸变和随体联合等。结果表明受照后细胞分裂周期有些变化,SCE 率变化不大,与培养时间和剂量都无明显关系;双着丝粒染色体畸变与培养时间呈负相关,与剂量呈正相关;随体联合 SA_c 和 DG_c 指标都随剂量增加而降低,随体联合的形式 C/T 比值变化不大,尚符合随机分配的遗传基本原则。

关键词 随体联合,染色体畸变,BudR-Giemsa 标记染色体,姊妹染色单体交换。

前 言

人的 5 对端着丝粒染色体(13、14、15、21 和 22)于特殊的节段上(短臂上)携带能转录 γ RNA 的 γ DNA 序列(18 S 和 28 S),通称核仁组织区(NORs)亦叫随体。在细胞分裂中期,可见到这些染色体短臂彼此靠近(两个或两个以上的染色体)命名为随体联合,是一个很紧密的核蛋白复合物的联合,已为放射自显影所证实。

随体是核仁组织区,表现转录 γ RNA 的基因活性,参与核的形成,很受人们重视,对它的结构与功能以及随体联合率与遗传性疾病和先天性疾病的关系等等作了较多研究。但目前涉及到随体联合与辐照剂量关系的资料较少。为此,本文应用离体外周血,以不同剂量照射和三种时间培养,采用 BudR-Giemsa 标记染色体观察了 SCE、随体联合与染色体畸变的变化。

材 料 与 方 法

1. 材料来源与分组

23 岁女性非吸烟的健康者,提供肝素抗凝的 25 ml 静脉血。分为三个时间(51、72、96 小时)的血培养,每个时间内又分三个组: 0 剂量组(对照组)和 0.5、1.0 Gy 组(剂量组),总计为 9 组。

2. 照射

将血分装在圆形塑料小瓶(长 5.2 cm,直径 1 cm)内,每瓶约 2~2.5 ml,置塑料保温瓶内,保持在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 。以 ^{60}Co γ 射线源,距离源中心 150 cm 处,剂量率为 39.0 rad/min,分别照射 0.5 和 1.0 Gy (Farmer 剂量仪测量)。

3. 血细胞培养与 BudR 加入

照射血与未照射血同在室温下静置 2 小时后,以 0.2~0.3 ml 全血分装于每瓶 4 ml RPMI

1640 培养液(含小牛血清 25%)中, 37℃恒温培养。24 小时后加入 BudR, 使其培养液最终浓度为每毫升含 10 μg。分别继续培养到 51、72 和 96 小时。

4. 染色体制备与 BudR-Giemsa 标记

以标准常规方法制备染色体样品。应用改进简化的 Perry 和 Wolff 描述的技术, 作 BudR-Giemsa 标记染色体。主要程序为: 制备的染色体样品在室温下老化 2~3 天。用 2×SSC 磷酸缓冲液, 在 56~58℃恒温水浴箱中孵育, 同时用 30 W 紫外线灯光照分化样品, 再用温蒸馏水(20℃左右)冲洗, 空气干燥, Giemsa 染色。

5. 染色体观察

载体编号, 双盲法阅片, 油镜下每组观察 400 个轮廓完整分散好的中期分裂细胞。

(1) 细胞周期的计算 根据 DNA 复制过程中 BudR 掺入的原理, 按公认的中期分裂细胞周期待分类法, 进行一、二、三期和三期以上的分类。为了计算方便, 三期以上划入三期计算。以百分率表示各期分裂细胞的多少。

(2) 姊妹染色单体交换(SCE_s)率 观察可记数 SCE_s 的二期分裂细胞。计算每个细胞交换率。

(3) 染色体畸变 主要是依据 WHO 建议标准^[1]观察各类畸变, 并记录所处的细胞周期。

(4) 随体联合 按照 Cohen 和 Shaw 的标准^[2]记录联合的端着丝粒染色体(除外 Y 染色体)。条件是: ① 染色体随体末端指向共同点。② 染色体随体末端之间距离不大于该细胞 G 组染色体长臂的长度。③ 染色体紧密配对, 称作紧密型或是直线型, 联合之间距离约小于一个染色单体宽度。联合的形式: ① 记录 DD、DG、GG 等各种联合; ② 二期分裂细胞中的随体联合要区分 cis 位(顺式位)以 C 表示。或是 trans 位(反式位)以 T 表示。前者表现是一条浅染的染色单体与另一条浅染的染色单体相对, 称为亮对亮(或是深染与深染相对, 称暗对暗)。后者为暗亮交叉相对, 即是暗对亮(或是亮对暗)。三期分裂细胞(不含三期以上)中的随体联合要区分四种联合位: C、T、3/4 染色单体浅染以 3/4 W 表示、全部染色单体浅染以 AW 表示。

按照 Zang 和 Back 的方法分析随体联合, 以下列参数表示: ① SA_c: 每个细胞的平均随体联合, 是以观察的中期分裂细胞去除观察到的随体联合总数(SA₀)。② DG_c: 每个细胞的平均联合染色体数, 是以联合的染色体总数除以观察的中期分裂细胞。③ DSA_r: 在 SA₀ 中 D 组染色体的频数, 是以联合的 D 组染色体总数除以联合的染色体总数。

结果与讨论

1. 细胞分裂周期

用 BudR 掺入观察辐照导致细胞分裂周期变化, 特别是在低剂量下的变化是人们所关注的问题。本文观察分析 9 组 3600 个中期分裂细胞, 结果表明: 对照组一期分裂细胞随培养时间延长而减少, 二、三期(含三期以上)的分裂细胞, 随培养时间的延长而增多, 符合细胞增殖动力学规律。在 51 小时培养中的细胞分裂变化, 对照组与 0.5 Gy 组比, 0.5 Gy 组一期分裂细胞多, 二、三期分裂细胞少, 两组间差异显著($P < 0.001$)符合细胞受照后细胞分裂延迟的变化规律。但是在 1.0 Gy 组表现相反, 一期分裂细胞少, 二、三期分裂细胞多, 两者间差异显著($P < 0.001$)。72 小时培养中的对照组与剂量组中的细胞分裂变化, 相同于 51 小时培养中的对照组和 1.0 Gy 的细胞变化。96 小时培养的细胞分裂变化是剂量组的一、二期分裂细胞比对照组中少, 三期分裂细胞

胞比对照组中多, 两组间亦有显著性差异($P < 0.001$)(见表1)。总之, 这些剂量组的细胞分裂变化, 多数(5:1)不符合细胞受照后细胞分裂延迟效应。

2. 姊妹染色单体交换(SCE_s)率

以 BudR 标记姊妹染色单体交换, 作为探测化学突变剂导致 DNA 损伤-修复已广为应用, 但是用其探测辐射导致 DNA 损伤-修复, 特别是在低剂量下, 国内外报导不一致^[3~6]。本文观察结果, 在 0 与 1.0 Gy 剂量组中的 SCE 率与培养时间似有随时间延长而增加趋势, 但无统计上的差异性。三个培养时间中的对照组与剂量组亦无明显差异(见表2)。为此, 在此剂量下, 不能作为探测辐射导致 DNA 损伤-修复的指标。

表 1 分裂细胞在各期中占的百分比(%)

Table 1 Percent ratios of division cells in various phases

培养时间(小时) culture time (h)	细胞周期 cell cycle	剂 量 (Gy) Dose(Gy)		
		0	0.5	1.0
51	1	66.25±4.07(265)	70.00±4.18(280)	58.00±3.81(232)
	2	31.50±2.80(126)	28.50±2.67(114)	37.50±3.06(150)
	3	2.25±0.75(9)	1.50±0.61(6)	4.50±1.06(18)
72	1	32.50±2.85(130)	5.75±1.25(23)	8.00±1.41(32)
	2	16.50±2.03(66)	19.00±2.18(76)	20.25±2.25(81)
	3	51.00±3.57(204)	75.25±4.34(301)	71.75±4.23(287)
96	1	8.50±1.46(34)	6.50±1.27(26)	6.75±1.30(27)
	2	15.00±1.94(60)	8.25±1.44(33)	8.00±1.41(32)
	3	76.50±4.37(306)	85.25±4.62(341)	85.25±4.62(341)

注: () 为实际观察数; 表中数据以 $M \pm SD$ (泊松) 表示

表 2 不同培养时间不同剂量二期分裂细胞 SCE_s 率

Table 2 SCE frequencies of the second division cells in different culture times and radiation doses

剂 量 (Gy) Dose(Gy)	时 间 (小时) Time (h)		
	51	72	96
0	5.86±2.77	10.03±3.31	8.04±2.93
0.5	7.18±2.66	7.64±2.77	7.80±3.05
1.0	5.98±2.13	10.20±3.69	8.44±3.23

注: 数据以 $M \pm SD$ 表示; 每组记录观察 50 个细胞。

3. 染色体畸变

染色体畸变作为“生物剂量仪”确定培养时间和标记计数各期细胞至关重要。本文表 3 结果表明: 双着丝粒染色体畸变与剂量呈正相关($r = 1 \sim 0.982$), 而与培养时间呈负相关($r = -0.974 \sim -0.950$), 即随培养时间延长而减少, 故一定要严格控制培养时间。由于畸变可见于各个分裂细胞周期, 在 51 小时培养中也能见到二期的畸变细胞, 很难说是由于此次照射的结果。较长的 72 或 96 小时培养, 仍可发现一期的畸变细胞, 反映了细胞的不同步性。为此, 观察畸变时, 应按国际原子能委员会(IAEA)^[6]提出的染色体畸变观察, 作为“生物剂量仪”要标准程序化, 用 BudR

监测计数只选一期有丝分裂细胞, 其培养时间应于一期分裂细胞的高峰值时固定细胞。

表 3 不同培养时间不同剂量染色体畸变

Table 3 Chromosomal aberrations in different culture times and radiation doses

剂量 (Gy) Dose (Gy)			0			0.5			1.0		
畸变 Aberration			dic	fr	a	dic	fr	a	dic	fr	a
培养时间 (小时)与 细胞周期 Culture time(h) and cell cycle	51	1				3	2	8	5	13	15
		2	---	---	---	1	1	3	2	---	2
		3	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		总 Total	---	---	---	4	3	11	7	13	17
	72	1	---	---	---	---	1	1	---	1	1
		2	---	---	---	---	1	1	2	2	3
		3	---	---	---	2	2	5	2	2	5
		总 Total	---	---	---	2	4	7	4	5	9
	96	1	---	---	---	1	2	2	---	1	1
		2	---	---	---	---	2	1	1	2	2
		3	---	---	---	---	5	6	2	3	9
		总 Total	---	---	---	1	9	9	3	6	12

注: 1, 2, 3 分别表示第一次, 第二次和第三次细胞周期; “总”为 1, 2, 3 次细胞周期之和; “dis”为双着丝粒染色体, “fr”为断片“a”为畸变细胞。

4. 随体联合

经观察分析的随体联合, 三个不同培养时间的对照组 DSA_r 值, 分别为 0.710、0.657、0.738 与 DiLernia 等人^[7]提出的 D 组染色体随体联合和 G 组染色体随体联合是相依的两个参数, $DSA_r + GSA_r = 1$, 按随机分配原则 DSA_r 是 0.6, GSA_r 是 0.4, 相比较是稍高些。与他们所作正常对照值 0.697~0.670 相比, 本文的数值(三个不同培养时间的结果)变异范围也稍大些, 对照组与剂量组间没有规律性减低。但是在 SA_c 和 DG_c 指标上(见表 4), 96 小时培养的对照组和剂量组都比 51 或 72 小时培养的对照组和相应的剂量组为低, 且有显著性差异($P < 0.01$), 这可能是由于培养时间延长所引起。为此, 以随体联合为检查指标, 不宜采用长时间的培养(96 小时)。51 或 72 小时培养中的剂量组和对照组, SA_c 值的降低, 剂量组高于对照组, 差异显著($P < 0.01$)。分析 51 小时培养的剂量组与对照组中不同细胞周期的 SA_c 变化, 结果表明一期分裂细胞的 SA_c 与剂量关系, 符合随剂量增大而 SA_c 减少的变化规律。

随体联合是检查核仁组织区变化的一个重要参数, 在 PHA 刺激下人淋巴细胞有丝分裂的染色体随体联合频数, 可很好的反映核仁数量变化。DiLernia 等人^[7]发现受 x 线照射的淋巴细胞 D 组染色体随体联合降低。本文结果表明辐射使 SA_c 和 DG_c 减低是符合核仁功能组织区随机损伤的假说。由于一期分裂细胞的 SA_c 与剂量呈很好的相关性, 如进一步研究有可能成为另一种“生物剂量仪”。

5. 随体联合的形式

在减数分裂时, 非同源染色体的随机分配排列是遗传的基本原则之一。本文观察的 51 和 72 小时培养的二期分裂细胞 250 对联合, C/T 比值 0.85~1.53(见表 5)尚属于正常范围。这是和 Bobrow 等人^[8]观察的 110 对联合 C/T 比值为 4.8(91:19)以及他们提出的“随机分配的遗传基本

表 4 SA_c 和 DG_c 的观察值
Table 4 Observed values of SA_c and DG_c

培养时间(小时) Culture time (h)	项 目 Item		剂量 (Gy) Dose(Gy)			r 值 r value
			0	0.5	1.0	
51	SA_c	1	0.611 ± 0.048	0.475 ± 0.041	0.366 ± 0.040	-0.99798
		2	0.781 ± 0.079	0.614 ± 0.073	0.353 ± 0.049	
		3	0.444 ± 0.222	0.500 ± 0.289	0.556 ± 0.176	
		总 Total	0.663 ± 0.041	0.515 ± 0.036	0.370 ± 0.030	
	DG_c		1.415 ± 0.059	1.090 ± 0.052	0.773 ± 0.044	-0.99997
72	SA_c		0.743 ± 0.043	0.490 ± 0.035	0.438 ± 0.033	
	DG_c		1.563 ± 0.063	1.013 ± 0.050	0.913 ± 0.078	
96	SA_c		0.260 ± 0.026	0.255 ± 0.025	0.283 ± 0.027	
	DG_c		0.515 ± 0.036	0.523 ± 0.036	0.535 ± 0.036	

注: 1, 2, 3 分别表示第一、二、三次细胞周期; “总”为 1, 2 和 3 次细胞周期之和; 每组观察 400 个中期分裂细胞; 数据以 $M \pm SD$ 表示。

表 5 二期分裂细胞随体联合形式
Table 5 Types of satellite associations in the second division cells

培养时间(小时) Culture time (h)		51			72		
剂 量 (Gy) Dose (Gy)		0	0.5	1.0	0	0.5	1.0
形式	C	39	29	20	18	12	14
Type	T	36	19	19	14	13	17
C/T 比值 C/T ratio		1.08	1.53	1.05	1.29	0.92	0.82

表 6 三期分裂细胞随体联合形式
Table 6 Types of satellite association in the third division cells

联合形式 Association Type	剂 量 (Gy) Dose (Gy)			预 期 值 Expected value
	0	0.5	1.0	
C	9(10)	9(11)	5(7)	6.25
T	5(5)	4(5)	7(10)	6.25
AW	11(12)	7(8)	8(12)	20
3/4 W	22(23)	22(26)	15(21)	12.5
总计 Total	47(50)	42(50)	35(50)	50

注: () 为 50 个细胞计算值, 72 小时培养。

原则的例外”论点是不同的。72 小时三期分裂细胞四种形式联合共 124 对, 联合的各种形式与其相应的预期值相比, 对照组与剂量组未见规律性变化(见表 6)。据此, 可以说联合的分配排列形式尚符合于随机分配的遗传基本原则。

小 结

(1) 本文以两种不同剂量、三个不同培养时间, 用 BudR-Giemsa 标记染色体, 观察 SCE、染色体畸变与随体联合。

(2) 观察的细胞周期有些变化, 从大多数(5:1)剂量组上看, 并未发现分裂细胞周期延迟。

(3) 在不同培养时间中的和不同剂量中的 SCE_s 率都无明显差异。

(4) 染色体畸变符合剂量与效应相关性, 非稳定型畸变随培养时间延长而减少。畸变存在于分裂细胞的各期, 表现了细胞分裂的不同步性。

(5) 随体联合: SA₀ 和 DG₀ 表现出随剂量增加而减少的变化。如进一步研究, 有可能成为另一种“生物剂量仪”。

(6) 随体联合形式: C/T 比值未见异常改变, 尚符合随机分配的遗传基本原则。

参 考 文 献

- [1] K. E. Buckton and H. J. Evans, *Methods for the Analysis of Human Chromosome Aberration*, p. 13~25, WHO, Geneva. (1973).
- [2] M. M. Cohen, M. W. Shaw, *Ann. Hum. Genet.*, 31, 129~139(1967).
- [3] 程雅丽, 高沛永, *遗传*, 5, (2), 18~20(1983).
- [4] A. M. V. Duncan, H. J. Evans, *Int. Radiat. Biol.*, 43 (2), 175~178(1983).
- [5] B. Beek, *Hum. Genet.*, 57 (1), 75~77(1981).
- [6] M. Bianchi, N. O. Bianchi, J. G. Brewen, K. E. Buckton, L. Fabry, P. Fischer, M. Kucerova, A. Leonard, R. N. Mukherjee, P. C. Gooch, et al, *Mutat. Res.*, 96, 233(1982).
- [7] R. Diletnia, C. Crimando and G. Pacehetti, *Hum. Genet.*, 61, 42~47(1982).
- [8] M. Bobrow, J. Heritage, *Nature Lond.*, 288, 5786, 79~81(1980).

(1984 年 9 月 27 日收到)

CHROMOSOME ABERRATION AND SATELLITE ASSOCIATION OF HUMAN BLOOD CULTURES BY ⁶⁰Co γ -RAY IRRADIATION IN VITRO

Liu Jinwen, Cheng Guodong, Zhang Rulin, Yao Yanyu

(*Institute of Radiation-Medicine of Hebei Province, Shijiazhuang*)

ABSTRACT The change of cell division cycle, the sister-chromatid exchange frequency, chromosome aberration and satellite association are studied by using the BudR-Giemsa Labeling chromosomes. They are carried out after radiation of human peripheral blood in two different doses (0.5 and 1.0 Gy) under the condition of three continued culture times (51, 71 and 96 hr).

The results show that the cell division cycle is apparently changed, a few changes of SCE frequency have not bearing on both culture time and dose, the chromosome aberration has negative correlation with the culture time but positive correlation with dose, the SAc and DGc indexes of the satellite associations are decreased with the dose increase, the satellite association type ratio, C/T is not changed greatly corresponding to the random allocation of genetic basic principle.

KEY WORDS Satellite association; Chromosome aberration; BudR-Giemsa labeling chromosome; Sister chromatid exchange.