

氟化合物对人血淋巴细胞 分裂周期的影响*

龚曼丽 饶用清 陈冠英

吴唯唯 赵紫兰 沈磊

(北京医科大学, 北京)

摘要 本文用 FPG 法分染, 观察不同活度的 ^3H -TdR 及 ^3H -UdR 加入人血淋巴细胞后连续培养, 氟化合物对细胞周期的影响结果表明, 两种氟化合物均可导致细胞分裂周期延缓, 其延缓效应随加氟活度的增加而更为明显, 其延缓程度 ^3H -UdR $>$ ^3H -TdR。由于培养液中存在 BrdU, 它对二种氟化合物掺入细胞的影响不同, 所以细胞的吸收剂量也不一样, 因此两种化合物致细胞周期延缓程度上有差异。氟化合物对细胞增殖速度有影响, 表现为细胞增殖速度指数(PRI)及分裂指数(MI)随剂量增加而下降。

关键词 氟化合物, 人血淋巴细胞, 细胞周期, 增殖速度指数

本实验室曾比较研究了六种氟化合物诱发人外周血淋巴细胞染色体畸变与剂量关系^[1], 发现用 ^3H -TdR 或 ^3H -UdR 处理细胞时, 如活度高达 10^5Bq/ml , 分裂细胞已很少, 畸变率很高, 它们的吸收剂量均已超过 8 Gy。如此高的吸收剂量, 细胞肯定会有死亡。至于是否对细胞分裂周期有影响, 国外有报道, 国内尚未见到。本文用荧光—姬姆萨法(FPG), 就上述两种氟化合物对细胞分裂周期的影响作初步探讨, 并比较了它们的辐射效应。

材料与 方法

(1) 培养及制片 全部实验用血取自同一健康成年男性静脉血, 0.3 ml 肝素抗凝全血加入到含有 4 ml RPMI 1640(日本)培养液, 1 ml 小牛血清, 2.5 mg PHA(广州)的培养基中。在开始培养的同时加入最终浓度为 $8\mu\text{g/ml}$ BrdU(Sigma), 并分别加入新标定的不同活度(3.7×10^3 , 7.4×10^3 , 1.48×10^4 和 $3.7 \times 10^4\text{Bq/ml}$)的 ^3H -TdR 及 ^3H -UdR。37℃避光培养 48、52、72 h, 收获前 6 h 加秋水仙素(最终浓度为 $0.03\mu\text{g/ml}$)。常规法制片, 然后用 FPG(Fluorescence Plus Giemsa)法染色^[2]。

(2) 细胞分裂周期 根据 DNA 复制过程中 BrdU 掺入情况, 将细胞分为第 1、2、3、4 期的细胞分裂周期(简称 M_1 , M_2 , M_3 ……)^[2], M_3 以后的各期分裂细胞包括在 M_3 内。每个氟活度点分析 800 个中期分裂细胞, 分别计算出各期分裂细胞占分析细胞数的百分数。

(3) 分裂指数(MI) 计数 2000 个有核细胞中见到的中期分裂细胞, 以百分数表示。

(4) 吸收剂量估算 见另文详细报道^[3]。

结 果

表 1 显示, 加不同活度氟和未加氟的离体血在培养 48 h 后, 80% 以上的分裂细胞都是第 1 期的。当两种氟化合物活度增至 $3.7 \times 10^4\text{Bq/ml}$ 时, 95% 以上都是第 1 期分裂细胞。培养 52 h

* 中国科学院科学基金资助课题

后, 在高活度($3.7 \times 10^4 \text{ Bq/ml}$)时, $^3\text{H-TdR}$ 组和 $^3\text{H-UdR}$ 组的 M_3 细胞分别由 1.0% 和 0.5% 降至 0。培养 72 h, $^3\text{H-UdR}$ 组的 M_1 细胞升高及 M_3 细胞下降都比 $^3\text{H-TdR}$ 组的明显。实验结果表明, 随着加氚活度的增加, M_1 细胞比例明显增高, M_2 、 M_3 细胞相应减少, 尤其 M_3 细胞减少更为明显, 说明两种氚化合物均可导致细胞分裂周期的延缓, 但在程度上不完全相同, $^3\text{H-UdR} > ^3\text{H-TdR}$ 。

如用估算的吸收剂量代替加氚活度分析各时相分裂细胞的分布。由表中可见, $^3\text{H-TdR}$ 吸收剂量 52 h 约为 48 h 的 1.8 倍, 72 h 约为 48 h 的 9.5 倍。 $^3\text{H-UdR}$ 的吸收剂量 52 h 约为 48 h 的 1.5 倍, 72 h 约为 48 h 的 3.5 倍。但 $^3\text{H-UdR}$ 48 h 的吸收剂量约为 $^3\text{H-TdR}$ 的 3—4 倍; 52 h 约为 2.9—3.5 倍; 72 h 约为 1.2—1.5 倍。随着培养时间的延长, 吸收剂量增加, 致使细胞分裂周期延缓效应加大。两种化合物在效应程度上的不同, 主要是由于在细胞周期不同时间, 氚掺入到细胞内的量不同引起的。

从表还可见, 分裂指数及细胞增殖速度指数(PRI)^[4]随着培养时间的延长, 吸收剂量的增加, 均有明显下降。

Tab 1. The relationship between absorbed dose and yields of M_1 , M_2 and M_3 cells observed when blood exposed to different radioactivities of $^3\text{H-TdR}$ or $^3\text{H-UdR}$

Tritiated compounds		$^3\text{H-TdR}$					$^3\text{H-UdR}$			
Radioactivity (Bq/ml)		0	3.7×10^3	7.4×10^3	1.48×10^4	3.7×10^4	3.7×10^3	7.4×10^3	1.48×10^4	3.7×10^4
Cells scored		800	800	800	800	800	800	800	800	800
48 h	Absorbed dose (CGy) $\bar{X} \pm \text{SD}$	0	2.2 ± 0.6	4.2 ± 1.0	8.1 ± 2.0	18.0 ± 4.4	7.3 ± 0.7	15.0 ± 1.5	30.0 ± 3.0	73.0 ± 7.3
	M_1	79.5	81.5	84.5	89.5	95.3	84.7	86.0	92.3	99.5
	M_2	20.5	18.5	15.5	10.5	4.7	15.3	14.0	7.7	0.5
	M_3	5.7	4.6	4.2	3.9	2.4	4.9	4.1	2.4	1.5
	PRI*	1.21	1.19	1.16	1.11	1.05	1.15	1.14	1.08	1.01
52 h	Absorbed dose (CGy) $\bar{X} \pm \text{SD}$	0	4.1 ± 0.9	7.5 ± 1.6	14.0 ± 3.0	32.0 ± 6.7	12.0 ± 3.2	23.0 ± 6.4	45.0 ± 12.0	111.0 ± 30.0
	M_1	52.9	58.0	60.0	62.0	70.0	67.2	71.5	80.5	98.7
	M_2	44.2	40.0	38.0	37.0	30.0	31.0	27.2	19.0	1.3
	M_3	2.9	2.0	2.0	1.0	0	1.8	1.3	0.5	0
	PRI*	5.2	4.7	4.6	4.3	2.9	4.1	3.5	1.8	1.3
72 h	Absorbed dose (CGy) $\bar{X} \pm \text{SD}$	0	22.0 ± 9.0	41.0 ± 17.0	75.0 ± 31.0	171.0 ± 71.0	28.0 ± 6.2	54.0 ± 12.0	106.0 ± 24.0	261.0 ± 59.0
	M_1	15.6	24.5	31.3	38.3	58.3	31.3	38.5	45.7	69.8
	M_2	37.1	34.8	35.5	37.5	28.0	34.2	31.5	38.0	23.0
	M_3	47.3	40.7	33.2	23.7	13.7	34.5	30.0	16.3	7.2
	PRI*	6.0	5.9	5.7	4.4	3.4	5.3	4.6	2.5	1.6
72 h	PRI*	2.32	2.16	2.02	1.85	1.55	2.03	1.92	1.71	1.31

$$\text{PRI (Proliferating Rate Index)} = \frac{1 \times M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3}{100}$$

讨 论

自从采用 Perry 和 Wolff^[5]首建的 FPG 分染法后, 使之可能较为正确地区分各期分裂细胞。

细胞分裂周期可受多种因素影响,如培养液成份和个体差异等^[2]。电离辐射可导致细胞分裂周期的延缓^[6]。Purrott 等用 PHA 刺激的淋巴细胞加 FPG 染色法证实, G_0 期细胞受 x 线照射引起有丝分裂延迟 1 h/Gy^[7]。本实验利用体外培养法研究氚化合物对人血淋巴细胞分裂周期的影响。这样既可排除体内的各种因素的干扰,又可了解氚化合物对细胞周期及对细胞增殖速度的影响,并可探索剂量与效应之间关系,为估算人体接受内照射剂量提供一定的参考资料。

我们的实验结果证明,在培养的各个时相(48, 52, 72 h)均可见到 ^3H -TdR 及 ^3H -UdR 有使细胞分裂周期延缓的作用,其延缓效应随加氚活度的增加而越趋明显,二者之间呈正相关关系。

关于 ^3H -TdR 活度对细胞增殖的影响,朴长青等用 $\text{C}_3\text{H}/10\text{T}_{1/2}$ 细胞实验,每毫升培养液含 $1.85 \times 10^4\text{Bq}$ ^3H -TdR 对细胞增殖有一定的抑制作用,每毫升培养液含 $3.7 \times 10^4\text{Bq}$ 以上时,细胞完全失去增殖能力,逐渐死亡^[8]。Le Motte 等用 BALB/3T3 细胞试验,每毫升培养液含 ^3H -TdR $3.7 \times 10^4\text{Bq}$ 以上时,导致 97% 的细胞死亡,而存活的 3% 则为未被标记的细胞^[9]。用淋巴细胞实验,当培养液中 ^3H -TdR 及 ^3H -UdR,活度至 $3.7 \times 10^4\text{Bq/ml}$ 时,分裂细胞极少^[1]。本次实验结果证明,活度在 $3.7 \times 10^4\text{Bq/ml}$ 时,分裂指数及细胞增殖速度指数下降明显,但尚未完全丧失增殖能力。造成这种差别的因素可能有:细胞类型及其对辐射的敏感性、采用的方法和培养液的种类等条件。Morimoto 等^[10]报道,用染色体分染术与放射自显影相结合的实验证实,活度大于 $3.7 \times 10^3\text{Bq/ml}$ ^3H -TdR 标记会使淋巴细胞周期减慢,有丝分裂指数及转化细胞的百分数也相应的下降,活度大于 $0.74 \times 10^4\text{Bq/ml}$ 的 ^3H -TdR 以明显的剂量依赖方式影响各代细胞分裂的分布。表现为 M_1 细胞增加,而 M_3 细胞减少,本文结果与其基本一致。Morimoto 还认为,细胞周期这样异常的延长,是 ^3H -TdR 辐射引起 G_2 期延长造成的。A. Pollack 等^[11]用流式细胞计 (FCM) 分析说明 $1.85 \times 10^4\text{Bq/ml}$ ^3H -TdR 处理 18 h,会使 $G_2 + M$ 期的细胞比例增加,说明细胞繁殖受到抑制。

本实验结果证明两种氚化合物致细胞分裂周期延缓效应在程度上的不同,主要是由于氚在细胞周期不同时间掺入到细胞内的量不同引起。因为在加氚培养的同时,在培养液内已存在 BrdU。BrdU 本身是一种卤化嘧啶核苷,是 DNA 长链中胸苷的类似物,在含有 BrdU 培养液中繁殖细胞, BrdU 在 DNA 复制中可作为 DNA 合成的前体,取代胸苷以同样的途径掺入到新合成的 DNA 核苷酸链中。这样使 ^3H -TdR 的掺入量减少,而对 ^3H -UdR 的掺入量影响小,对细胞分裂周期的延缓作用程度显示有差别。有关 BrdU 对 ^3H -TdR 及 ^3H -UdR 掺入细胞内量的影响问题已另有报道^[3]。

本实验结果证明,如果引起相同的延缓效应, γ 或 X-线外照射所需的剂量为 1 Gy,则氚内照射的吸收剂量只需 0.01—0.1 Gy,说明在剂量相同的情况下,氚内照射引起的效应要远比 γ 或 X-射线外照射大得多,这与核素氚进入细胞内代谢的复杂性及持续照射有关。

参 考 文 献

- [1] 饶用清, 龚曼丽, 陈冠英, 赵紫兰, 中华放射医学与防护杂志, 7(5), 329(1987)。
- [2] 龚曼丽, 金瑾珍, 刘秀林, 北京医学院学报, 16(2), 183(1984)。
- [3] 陈冠英, 龚曼丽, 饶用清, 吴唯唯, 沈磊, 中华放射医学与防护杂志, (1989)
- [4] L. Lamberti, P. Bigatti Ponzetto and G. Ardito, Mutat. Res., 120, 193(1983)。
- [5] P. Perry and S. Wolff, Nature(London), 251, 156(1974)。
- [6] 金瑾珍, 刘秀林, 龚曼丽, 辐射防护, 5(4), 273(1985)。
- [7] R. J. Purrott, N. Vulpis and D. C. Lloyd, Mutat. Res., 69, 275(1980)。
- [8] 朴长青, 葛淑清, 杨媛, 实验生物学报, 18(4), 463(1985)。
- [9] P. K. Le Motte, S. J. Adelstein and J. B. Little, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7763 (1982)。

[10] K. Morimoto and S. Wolff, *Nature*, 288, 604 (1980).

[11] A. Pollack, C. B. Bagwell and G. L. Irvin, III Radiation from tritiated thymidine perturbs the cell cycle progression of stimulated lymphocytes, *Science* 203, 1979, p. 1025.

(稿件收到日期: 1988年12月16日)

EFFECT OF TRITIATED COMPOUNDS ON CELL CYCLE IN HUMAN LYMPHOCYTES IN VITRO

Gong Manli, Rao Yongqing, Chen Guanying, Wu Weiwei, Zhao Zilan and Shen Lei
(Beijing Medical University, Beijing)

ABSTRACT Human lymphocytes were treated with varying radioactivities of ^3H -TdR and ^3H -UdR in vitro and using the fluorescence plus Giemsa (FPG) technique to estimate the effects of tritium on the cell cycle. The results indicated that two kinds of tritiated compounds delayed the cell cycle of the proliferating lymphocytes in culture. The effects of delaying cell cycle were markedly increased with increasing the radioactivities of tritium. According to the efficiency of delaying cell cycle, when the radioactivity/ml of the medium was as high as $3.7 \times 10^4 \text{ Bq/ml}$, two compounds could be arranged in decreasing order as follows: $^3\text{H-UdR} > ^3\text{H-TdR}$. The amount of tritium incorporated into cells could be affected by BrdU in the medium. Absorbed doses were increased with increasing time of culture. From the absorbed doses it could be seen that the different extent of delaying cell cycle between the two tritiated compounds could be due to different amount of tritium incorporated into cells. The results demonstrated that the tritiated compounds could affect lymphocyte proliferating rate. The cell proliferating rate index and mitotic index were decreased with increasing the absorbed dose.

KEY WORDS Tritiated compounds, Human lymphocytes, Cell cycle, Proliferating rate index