

CNIC-00613  
SMC-0076

CN930037

# 中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

$^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  射线诱发人淋巴细胞熟前凝集  
染色体断片的剂量效应研究

DOSE RESPONSE CURVE FOR PREMATURELY  
CONDENSED CHROMOSOME FRAGMENTS OF HUMAN  
LYMPHOCYTES AFTER  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  RAY EXPOSURE

*(In Chinese)*



原子能出版社

中国核情报中心

China Nuclear Information Centre



高锦声，教授，苏州医学院辐射与医学遗传学研究室主任，中国优生协会秘书长。1956年毕业于南京师范大学生物系。

Gao Jinsheng: Professor, director of radial and medical genetic division, Suzhou Medical College, general secretary of National Eugenic Association. Graduated from the Biology Department of Nanjing Normal University in 1956.

CNIC-00613

(SMC-0076)

## $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线诱发人淋巴细胞熟前凝集 染色体断片的剂量效应研究

高锦声 郑斯英 鲍虹

(苏州医学院)

### 摘 要

研究用熟前染色体凝集(PCC)技术观察了 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线诱发人淋巴细胞熟前凝集染色体断片的剂量效应关系。同时与常规细胞遗传学方法作比较,获得了两者的效应( $\dot{Y}$ )、剂量( $D$ )线性方程。两者曲线方程斜率比 $K_{\text{PCC}}/K_{\text{M}_1} \approx 28$ 。结果表明,PCC技术与常规细胞遗传学方法相比有快速、简便、灵敏、准确等优点。并讨论了PCC技术在辐射损伤研究中的意义。

**DOSE RESPONSE CURVE FOR PREMATURELY  
CONDENSED CHROMOSOME FRAGMENTS OF HUMAN  
LYMPHOCYTES AFTER  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  RAY EXPOSURE**

*(In Chinese)*

Gao Jinsheng Zheng Siying Bao Hong  
(SUZHOU MEDICAL COLLEGE)

**ABSTRACT**

The dose-effect relationship of premature condensed chromosome fragments in human lymphocytes irradiated by  $^{60}\text{Co}$  gamma ray was studied by PCC method (premature condensed chromosomes). In addition, The conventional cellular genetics method was also used in the study. The response curve, effect ( $\dot{Y}$ ) and dose ( $\dot{D}$ ), of both methods can be represented by two linear equations. The ratio of two slopes,  $K_{\text{PCC}}/K_{\text{M}}$ , is about 28. Comparing with conventional method, the PCC method has many advantages such as faster, simpler, more sensitive and accurate. The PCC method used in the studying of radiation damage is also discussed.

## 引言

电离辐射诱发淋巴细胞染色体畸变可作为检测辐射损伤的可靠生物指标。然而,常规细胞遗传学方法只限于分析分裂中期的染色体。熟前染色体凝集(premature chromosome condensation, PCC)技术的建立为研究细胞间期的染色体开辟了途径<sup>[1]</sup>。尤其在 1983 年, Pantelias 等<sup>[2]</sup>用化学制剂作为促融剂后,简化了操作步骤,使 PCC 技术在辐射损伤研究中得到广泛运用,近年来该技术已成为辐射研究中令人瞩目的新方法。本研究采用 PCC 技术探索低剂量<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线诱发人淋巴细胞熟前凝集染色体断片的剂量效应关系,同时与常规细胞遗传学方法作比较,进一步论证 PCC 技术在辐射损伤研究中的优越性,期望在小剂量事故照射中,较为精确估算出生物剂量。

## 1 材料与方 法

### 1.1 血源及照射条件

由苏州市中心血站提供两名不吸烟健康献血员,各取静脉血约 20 mL,肝素抗凝,按所要照射剂量点 0、12.5、25、50、75 及 100 cGy 分装成 6 小瓶,采用苏州医学院附属第一医院<sup>60</sup>Co治疗机(Tormer) $\gamma$ 点源垂直照射,剂量率为 70 cGy/min。照射时标本周围温度用热风机维持在(37 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C。照后各剂量点血样本分成两份,一份进行 PCC 标本制备,另一份用于常规细胞遗传学检查。

### 1.2 PCC 制备

#### 1.2.1 外周血分离

上述照射后抗凝血 1~2 mL 加适量生理盐水稀释,然后用密度为 1.077 的淋巴细胞分离液分离淋巴细胞。

#### 1.2.2 诱导细胞制备

采用分裂中期中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞作为诱导细胞,单层贴壁培养于含 10%~15%小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,当细胞处于对数生长期时,加入秋水仙胺,使最终浓度为 0.25  $\mu$ g/mL,继续培养 10~12 h,收集脱落的分裂中期细胞,所获得的细胞在 90%以上。

#### 1.2.3 促融剂配制

聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG),分子量 4000,取适量 PEG,加热溶解后以等量的 D-Hank 氏液稀释,用 5.6%NaHCO<sub>3</sub>调酸碱度 pH 至 7.8~8。PEG 最终浓度为 50%,每次使用前重新配制。

#### 1.2.4 细胞融合及镜检

将分裂中期细胞与淋巴细胞按 1:2 配比充分混匀,离心,尽量弃去上清液,缓缓加入上述新配制的 50%PEG 0.25 mL,混匀,作用 1 min 后,逐滴加入 D-Hank 氏液 2.5 mL,离心,弃上清液,加入 2 mL 含 10%小牛血清 1640 培养液,在 37 $^{\circ}$ C 水箱箱中孵育 45 min,至此细胞融合及 PCC 诱发已完成,以下同常规染色体收获、低渗、固定、滴片、Giemsa 染色。镜检观察分散好,可计数 G<sub>1</sub>-PCC,超过两倍体数计为断片。

### 1.3 常规细胞遗传学染色体检查

将受照后另一半血按常规分置于含 PHA 的 RPMI-1640 培养液中,培养 24 h 后加 BrdU,最终浓度为 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,放入黑袋避光继续培养,共培养 48 h,收获前 3~4 h 加入秋水仙素,最终浓度为 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。然后低渗、固定、制片。将玻片置于温度为 52~54 $^{\circ}\text{C}$  水浴箱铝板上,片上浸满 2 $\times$ SSC 液,30 W 紫外线灯照射 30 min,照后用水冲洗、Giemsa 染色、镜检。按 Crossen 等<sup>[3]</sup>标准区分各分裂期细胞,计数第一次分裂期细胞,并记录其染色体畸变,同时计数第二次分裂细胞。

## 2 结果

人外周血淋巴细胞与分裂中期 CHO 细胞融合后产生  $G_1$ -PCC,经 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线照射后形成  $G_1$ -PCC 断片,不同剂量 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线诱发的  $G_1$ -PCC 断片及常规法第一次分裂中期( $M_1$ )染色体畸变列于表 1。可见随着照射剂量增加,断片数也相应增加。而  $G_1$ -PCC 计数的细胞数尽管远比常规法少,但畸变率高。且从表 1 发现,常规法中将双着丝粒体及环作为二次击中畸变单独统计,剂量效应线性关系不明显,若将双着丝粒体及环作为二次断裂计入总断裂数,则与剂量之间有明显线性关系,用最小二乘法原理配合加权回归分析,畸变( $\bar{Y}$ )和剂量( $D$ )符合直线方程, $\bar{Y} = a + bD$ ,其方程分别为:

$$\begin{aligned} \bar{Y}_{\text{PCC}} &= 0.2286 + 0.0297D & r &= 0.99 & P < 0.001 \\ \bar{Y}_{M_1} &= 2.8798 \times 10^{-3} + 1.0504 \times 10^{-3}D & r &= 0.98 & P < 0.001 \end{aligned}$$

两者剂量效应回归方程斜率比为  $K_{\text{PCC}}/K_{M_1} \approx 28$ ,曲线见图 1。

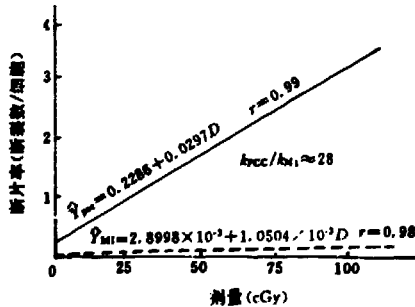


图 1 PCC 技术及常规细胞遗传学的剂量效应曲线

另发现随着 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线剂量增大,进入第二次分裂中期的细胞( $M_2$ )依次减少。未见进入第三次分裂中期的细胞。见表 2,两变量呈负相关, $r = -0.990$ 。

表 1 不同剂量<sup>60</sup>Co-γ射线诱发 G<sub>1</sub>-PCC 断片及第一次分裂中期 (M<sub>1</sub>) 细胞染色体畸变

剂量 (cGy)	G <sub>1</sub> -PCC			M <sub>1</sub>			
	观察细胞数	断片数	断片率±SE	观察细胞数	断片数	双+环	总断片率±SE
0	140	33	0.24±0.04	1200	3	0	0.0025±0.0014
12.5	120	66	0.55±0.08	1200	19	1	0.0175±0.0043
25	95	101	1.06±0.09	1200	32	6	0.0367±0.0070
50	108	192	1.78±0.10	1200	50	6	0.0517±0.0073
75	137	301	2.26±0.12	1200	57	15	0.0725±0.0089
100	93	318	3.42±0.15	900	69	19	0.1189±0.0131

表 2 不同剂量<sup>60</sup>Co-γ射线对淋巴细胞周期影响

剂量(cGy)	第一次分裂细胞数(M <sub>1</sub> )	第二次分裂细胞数(M <sub>2</sub> )	M <sub>2</sub> /M <sub>1</sub> +M <sub>2</sub> (%)
0	1200	399	24.95
12.5	1200	282	19.03
25	1200	260	17.81
50	1200	197	14.10
75	1200	172	12.54
100	900	88	8.91

### 3 讨论

本实验采用处于分裂期诱导细胞与间期外周血淋巴细胞融合,融合过程中,间期细胞染色质提前凝集成细长的染色体,故 PCC 技术可直接观察间期细胞染色体的改变,细胞不需要培养。用该技术检测<sup>60</sup>Co-γ射线诱发间期染色体的辐射损伤,以 G<sub>1</sub>-PCC 断片作为生物指标,结果发现对射线非常敏感,在剂量仅为 12.5 cGy 时,G<sub>1</sub>-PCC 断片数比零剂量点对照组已有明显增加,且随着射线剂量的增加,G<sub>1</sub>-PCC 断片数也相应增加,两者之间呈良好的线性关系,也不存在畸变修复或丢失现象,畸变检出率高。用回归分析,获得效应( $\hat{y}$ )剂量(D)符合直线方程: $\hat{y} = 0.2286 + 0.02969D$ ,  $r = 0.99$ 。国外资料表明采用 PCC 技术进行小鼠离体和 in vivo 实验研究,所获得的两者剂量效应关系发现,每细胞 PCC 断片数(Y)与剂量(D)均符合回归方程  $y = a + bD$ ,且统计学处理表明两者之间无显著性差异<sup>[4]</sup>,说明 PCC 技术完全具备作为生物剂量计条件,建立离体人淋巴细胞受照剂量效应曲线,对用于事故受照情况下估算全身平均剂量极有价值。

常规细胞遗传学方法限于分析分裂中期细胞的染色体,间期细胞要进入有丝分裂必须在植物血凝素刺激下培养 48 h,在这期间不可避免将受到各种理化和生物因素影响。从本实验结果已经发现,随着射线剂量增大,进入第二次分裂周期的细胞数依次减少,证明辐射延缓了细胞周期。严重受损细胞在培养过程中可死亡,而受损轻微的则修复,故分析分裂中期细胞染色体畸变误差较大,不能完全反映细胞辐射损伤情况。实验结果证明,PCC 技术的畸变检出率远远高于常规法,在所选用最小剂量点 12.5 cGy 时,是常规染色体组的 30 倍,回归方程斜率比  $K_{PCC}/K_{M_1} \approx 28$ 。说明 PCC 技术在辐射损伤研究中的敏感性比常规法高得

多。Bertsche<sup>[5]</sup>发现,X线照射 Muntjac 细胞及 V79-S181 细胞系后,用 PCC 技术测得的染色体畸变率比常规法所获得的染色体畸变率分别大 6 和 40 倍。另外 PCC 技术在检测意外紧急事故照射时,时间可大大缩短,因细胞融合 PCC 诱发完成约需 2 h,然后制片观察结果,这样在获得欲测血样后,当天就能获得结果,而常规法至少需 2~3 天。

PCC 技术检测辐射损伤敏感性高,可用于小剂量生物剂量测定。常规分析染色体畸变是公认的一种生物剂量仪,在剂量测定中已广泛应用,但大部分是研究大剂量(1~5 Gy)范围剂量效应关系<sup>[6]</sup>,小剂量有关资料则很少,且在小剂量辐射情况下,要获得正确数据,需计数的细胞数达数千至上万。Cornforth<sup>[7]</sup>指出,用 X 线照射衍生的正常人成纤维细胞,PCC 技术可测得 X 线剂量最低达 3~5 cGy 的辐射损伤效应。Maille<sup>[8]</sup>等用 PCC 技术,在增大实验用血(各剂量达 10 mL)和增多观察细胞数(平均 500 个左右)情况下,发现可测出离体人淋巴细胞 X 线损伤的最小剂量为 6 cGy。本实验选用的最小剂量为 12.5 cGy,用血量 1~2 mL,观察 100 个左右细胞,结果发现检出 G<sub>1</sub>-PCC 断片数明显高于零剂量点,与常规染色体畸变率相比高出 30 倍,本实验所采用的低剂量 12.5~100 cGy 范围内,PCC 技术检测获得的剂量效应有良好的线性关系,可见 PCC 技术在低剂量辐射损伤研究中检出畸变率高,敏感性好。

综上所述,PCC 技术与常规细胞遗传学方法相比有快速、简便、灵敏、准确等优点,尤其在低剂量辐射损伤研究中有着重要作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Johnson RT. et al. *Nature*, 1970, 226, 717
- [2] Pantelis GE. et al. *Somatic Cell Genetics*, 1983, 9(5), 533
- [3] Crossen PE. et al. *Exp. Cell Res.*, 1977, 104, 453
- [4] Pantelis GE. et al. *Radiat. Res.*, 1984, 99, 140
- [5] Bertsche U. et al. *Radiat Environ Biophys.* 1988, 27, 201
- [6] 金瑞珍. *辐射防护*. 1988. 8(4/5), 391
- [7] Cornforth MN. et al. *Science*, 1983, 222, 1141
- [8] Maille HD. et al. *Health Physics*, 1986, 51, 672



**<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线诱发人淋巴细胞成熟的凝集**

**染色体断片的剂量效应研究**

原子能出版社出版

(北京 2108 信箱)

原子能出版社激光照排中心排版

北京市海淀区三环快速印刷厂印刷

☆

开本 787×1092 1/16 · 印张 1/2 · 字数 7 千字

1992 年 6 月北京第一版 · 1992 年 6 月北京第一次印刷

ISBN 7-5022-0693-0

TL · 427

# CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT



This report is subject to copyright. All rights are reserved. Submission of a report for publication implies the transfer of the exclusive publication right from the author(s) to the publisher. No part of this publication, except abstract, may be reproduced, stored in data banks or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of the publisher. China Nuclear Information Centre, and/or Atomic Energy Press. Violations fall under the prosecution act of the Copyright Law of China. The China Nuclear Information Centre and Atomic Energy Press do not accept any responsibility for loss or damage arising from the use of information contained in any of its reports or in any communication about its test or investigations.

ISBN 7-5022-0693-0  
TL · 427

P.O.Box 2103

Beijing, China

**China Nuclear Information Centre**