

表 电离辐射后哺乳类细胞在60分钟内 DNA 单链断裂修复的百分率

细 胞	剂量(拉德)	单链断裂 修复%	作	者
胸腺细胞	1000	93.2±8.4	本	文
胸腺细胞	2000	70.4±5.7	本	文
胸腺细胞	3000	55	Karran及 Ormerod(1973)	
胸腺细胞	1万	20.6±4.7	本	文
胸腺细胞	3万	25.6±5.6	本	文
胸腺细胞	50万	22	Lennartz等 (1975)	
V79细胞	1万	96.5±1.2	本	文

复的百分率总结于表中,此表还包含来自文献的供比较的资料。增生状态中的V₇₉细胞在我们的条件下照射1万拉德后,单链断裂显示出一种接近完全的修复。

讨 论

与培养的增生细胞相反,非分裂的受照射胸腺细胞只有有限的修复辐射引起的DNA单链断裂的能力。一次1万拉德的剂量使大部分修复能力遭到破坏。但增生的小鼠淋巴瘤细胞即使在5万拉德照射后,单链断裂仍能完全修复。Karran和 Ormerod(1973)

以及Lennartz等(1975)也报导过胸腺细胞中单链断裂的一种有限的修复。后一研究发现带有5'磷酸和3'OH末端基团的单链断裂较易修复。

蛋白质, RNA或DNA合成的抑制剂不能阻止受照射细胞中单链断裂的早期修复。只有氧化磷酸化即ATP合成的抑制剂,如二硝基苯酚或KCN能有效地阻止单链断裂的接合。而且,在甲苯化(tolunized)细菌的细胞和艾氏腹水癌细胞分离的核中, DNA单链断裂的修复除了多聚酶及连接酶作用所必需的三磷酸脱氧核糖核苷和DNA之外,还需要ATP的存在。

我们认为在受照射的胸腺细胞中, DNA链断裂的修复需要ATP的这种情况也可能存在,在1万拉德或更高剂量照射后其修复能力的降低可能是由于ATP的丧失。Klouwen(1964)在将胸腺细胞照射500拉德后,确实见到ATP和ATP合成的这种损失,而在小鼠淋巴瘤肉瘤细胞, ATP含量不受影响,不过DNA单链断裂修复需要ATP的机制仍待研究。

[Gartner Ch等, Int J Radiat Biol 32 (3): 293, 1977 (英文) 徐承熊译 陆如山校]

断奶小猎犬骨髓成灶单位 (CFU-c 和 PFU-c)

量对急性全身γ线照射的反应

尽管研究小鼠脾造血灶在介电离辐射对造血效应上有重大贡献,然而这种效应在其他动物和包括人在内的较大动物中是了解不多的。因为很需要研究长寿命动物模型的辐射反应,作者选择了小猎犬作为研究辐射造血效应的对象。在这方面,作者对技术的发展很感兴趣,该技术不但可作造血损伤敏感的生物剂量仪,同时还能对辐射诱发白血病的小猎犬的造血祖细胞群变化进行研究。

为此目的,作者采用甲基纤维素作为支

持骨髓的培养系统,它可以同时定量测定粒-单核细胞灶(成灶单位—CFU-c)和“候补的”(Candidate)基质祖细胞群(成斑单位—PFU-c)。本文将报导受急性全身照射的断奶猎犬的粒-单核细胞和成纤维细胞群剂量效应关系。

材料和方法

动物和照射条件:动物为出生60天断奶小猎犬。用⁶⁰Co-γ线照射,把装有动物的

45×23×23厘米的有机玻璃盒放于钴源下的一个胶合板台上,源距台表面121.9厘米。剂量仪位于盒内,距台表面10.2厘米。2只动物同时照射,平均剂量率为2.37伦/分,总剂量分别为50、100、250、400和586伦,4只假照动物作对照,每一剂量组照射了3只狗。照前24小时每只动物静脉注射⁵⁹Fe5微居里。

骨髓样品的收集:照后24小时先给动物静脉注射2000单位灭菌肝素,然后用过量的硫苯妥钠麻醉,在无菌条件下取出肱骨,取其骨干,用加有14.3单位的灭菌肝素的Tc199把骨髓冲洗到消毒离心管中,使冲洗出来的骨髓先后通过18、22和23号针头,制成骨髓悬液,用电子血球计数器计数骨髓细胞。制备骨髓图片,并用Wrights-Leishman及Giemsa染色,分类500个细胞。取1毫升骨髓悬液进行⁵⁹Fe活性的γ计数。

骨髓培养技术:把5×10⁵骨髓有核细胞放入35×10毫米的塑料培养皿中,每皿中含1毫升培养基(其组成为:含1.36%甲基纤维素的Tc199培养基,加有50%热灭活的胎牛血清和1%容积的L-谷氨酰胺),每100毫升Tc199中加1000单位青霉素、1000微克链霉素和2.5微克二性霉素B,加入10%的1:3稀释的热灭活受照射兔血清作为灶刺激素源(血清是取自雄性幼兔,在X线照射400伦后24小时,于53℃下热灭活1.5小时,经0.45微米的滤器过滤)。对每个被检查的骨髓作了5~8次重复培养,在37℃有5%CO₂存在的孵育箱中培养7天。培养物用新亚甲兰染色

后在54倍镜下计数悬液的粒-单核细胞灶和贴壁的成纤维细胞斑(含40或更多细胞者)。

骨髓细胞的测定:照前24小时每只狗注射⁵⁹Fe5微居里,照后24小时活杀,冲洗出两侧肱骨骨髓,并用电子血球计数器计数有核细胞,求出每毫升骨髓有核细胞数,再用γ计数器测定这个定量骨髓1毫升样品的⁵⁹Fe活性。此外,对全身有代表性的骨骼用全身计数器分别计数⁵⁹Fe的活性,对γ和全身计数器二者都采用同一标准,把全部材料换算成相当于全身的量。应用以下公式可计算出每根骨的骨髓有核细胞数:

$$\text{有核细胞数/骨} = \frac{\text{脉冲数/分/骨(全身计数器)} \times R \times \frac{\text{有核细胞数/毫升骨髓}}{\text{每分钟脉冲数/毫升骨髓}}}{1}$$

式中R=⁵⁹Fe γ计数器的标准计数与⁵⁹Fe全身计数器标准计数之比。

为使动物之间大小差别标准化,把每个骨的绝对值换算为每克组织的绝对数。

表1 γ射线照射后24小时对断奶小猎犬骨髓细胞的影响

照射剂量 (伦)	平均值±1SD (有核细胞/克骨×10 ⁶)	平均 (占对照的%)
0	2.98±0.96	100
50	3.55±1.03	120
100	2.06±0.45	69
250	1.53±0.43	52
400	1.22±0.62	41
586	0.70±0.18	23

表2 γ线照射后24小时对断奶小猎犬骨髓分类的影响(计数500个细胞以百分率表示)

照射剂量 (伦)	动物数	粒系统	红系统	红/粒	淋巴系统
0	4	41.0±3.3 ^a	37.7±4.5	1.09	15.3±3.4
50	3	41.0±9.5	43.1±13.3	0.95	11.2±5.5
100	3	45.7±8.1	31.6±9.1	1.45	14.0±3.2
250	3	59.6±5.5	27.0±2.5	2.21	7.7±3.0
400	3	67.0±5.4	16.7±6.5	4.01	9.4±2.1
586	3	71.6±3.0	15.4±4.1	4.65	7.5±1.1

a 平均值±1SD

结 果

将全部被检骨加以平均求出每克骨组织有核细胞数,其结果列于表1。从表1可见其剂量效应关系,高剂量组影响最大,为对照组的23%,各长骨骨髓有核细胞的活存在曲线相当一致,而肋骨骨髓似稍敏感。

骨髓分类结果如表2所示,在高剂量组粒比红(M/E)增加了三倍多,看来几乎全部是由于红系细胞的减少所致。在该剂量下,红系比粒系敏感。在照射100伦或更高剂量时,红系和淋巴系统同样敏感。

用CFU-c/肱骨表示CFU-c的结果列于表3,同时也列出了PFU-c的结果。可见形成灶和斑的祖细胞的活存特点是有显著差异的。CFU-c的 D_{37} 为70伦。

表3 γ 线照射后24小时对断奶小鼠犬骨髓成灶的影响(以每克骨灶总数表示)

照射剂量 (伦)	动物数	CFU-C ^a (每克骨 $\times 10^5$)	PFU-C ^a (每克骨 $\times 10^4$)
0	4	3.15 \pm 1.35	1.26 \pm 0.91
50	3	1.66 \pm 0.52	1.41 \pm 0.42
100	3	0.81 \pm 0.53	0.80 \pm 0.30
250	3	0.16 \pm 0.08	0.88 \pm 0.21
400	3	0.08 \pm 0.05	1.93 \pm 2.20
586	3	0.01 \pm 0.01	0.89 \pm 0.19

a 平均值 \pm 1SD

讨 论

造血的现代概念认为CFU-c是代表粒-单核细胞定向的祖细胞,来源于多能造血干细胞,(脾成灶单位或CFU-s)。多种实验证明CFU-c与CFU-s是性质不同的群体。

本实验CFU-c辐射活存率的 D_{37} 约为70伦,这和文献分别报导的小鼠CFU-c和CFU-s的 D_{37} 相似。这也说明CFU-c对辐射损伤最敏感。因此,CFU-c检查,可作为小猎犬辐射损伤敏感的生物测量仪。以前曾有

报告,认为对这些小猎犬同时进行过的淋巴细胞刺激实验(LST)对确定辐射损伤是不太敏感的。根据骨髓分类发现淋巴和红系统成分对射线同样敏感,而粒系成分对辐射抗力较大。

应该认识到,虽然在辐射对造血干细胞的作用方面积累了大量的材料(主要是对小鼠CFU-s检查),但在辐射对造血基质成分的作用方面却了解很少。因此,这里报告PFU-c的结果更为重要。

根据作者已往的工作认为PFU-c并不是和CFU-c或CFU-s来自同一祖细胞,这种断判也得到现代研究的支持,即证实了有Ph¹慢性白血病患者(Ph¹+CML)成纤维细胞灶中缺乏Ph¹染色体以及人的男女造血嵌合体的骨髓成纤维细胞为受体型。

作者设想,成纤维细胞斑是来自造血基质的骨髓祖细胞。有必要重申,骨髓基质成分是通过提供微环境影响和产生骨髓内灶刺激素来实现造血调节的。Friedenstein等根据体外实验,提出成纤维细胞与骨髓基质成分的关系,即担负传递造血微环境诱导信息的细胞就存在于骨髓成纤维细胞灶内。

虽然对PFU-c精确的 D_{37} 还未测出,但本实验结果却说明了成纤维细胞成分的祖细胞具有很强的抗放射性。作者已往研究的结果——小鼠PFU-c的 D_{37} 为400伦,是支持上述论点的。

总之,本实验结果进一步证实了已往的研究工作,即CFU-c和PFU-c的辐射活存特性完全不同。PFU-c很可能与造血干细胞和(或)祖细胞无密切关系,而与基质成分更接近。该实验也确定了甲基纤维素培养系统和CFU-c检查可以作为狗的放射损伤敏感的生物剂量仪,同时又可对抗辐射的祖细胞群进行研究。

[Wilson F D et al, Rad Res 74: 289
297, 1978 (英文) 白玉书节译 常世琴
刘及校]