

广岛和长崎受原子弹爆炸幸存者中辐射剂量与染色体畸变之间的关系

引言

在我们以前报告的第一篇材料内已经指出，在广岛和长崎受原子弹爆炸存活下来的人中，辐射引起的外周血淋巴细胞染色体畸变一直持续很多年；畸变细胞的频率与每个个体所接受的照射剂量成正比。结果表明，对辐射诱发的畸变细胞的计数乃是评价人们晚期体细胞辐射效应的一个有用的指标。

本文详细地叙述染色体分析的结果。样品来自广岛和长崎受原子弹爆炸而存活下来的人的外周血培养淋巴细胞，进一步得到了有关晚期体细胞辐射效应的详细资料，阐明了染色体畸变与剂量、受照射时机体的年龄、原子弹辐射成份等因素的关系。

材料和方法

样品的选择：

选自广岛和长崎受原子弹爆炸而存活下来的居民，他们接受的照射剂量是不一样的。

上述人员中，不论何时凡是接受过放射治疗或放射性同位素照射过的均除外，培养不佳、每一例有丝分裂细胞低于30个者也不计在内。这样对广岛649例和长崎403例进行了细胞遗传学观察。

对照组分两组：(1)在原子弹爆炸时不住在广岛和长崎的居民；(2)在爆炸时远离这两地的居民，估计他们所接受的辐射剂量小于一拉德。其余估计接受一个拉德以上，统称为照射组，分为以下6个组：1~99拉德，100~199拉德，200~299拉德，300~399拉德，400~499拉德和500拉德以上。

本研究所用材料的起迄时间自1968年1月至1969年11月(广岛)；1968年1月至1971年3月(长崎)。

方法：

按照Moorhead等氏的方法(略加改良)培养外周血。肝素抗凝过的血液置于室温数小时，以分离含有白血细胞的血浆。1毫升血浆+8毫升培养基+1毫升小牛血清与抗生素，培养前新加0.1毫升PHA(植物凝集素)，总共培养52小时。在收获

前两小时加入秋水仙素，使浓度为0.4 γ /毫升培养物。接着以1%柠檬酸钠低渗，甲醇-冰醋酸(3:1)固定，火焰干片，姬姆萨染液染色。

本研究用的培养时间是52小时(包括最后秋水仙素处理的两小时)，目的是为了观察的大多数中期细胞为体外第一次分裂的细胞。

为了避免人为误差，所有涂片和显微镜观察都在不知道个体接受照射剂量的情况下进行的。每一例分析100个细胞，但是少数例子分裂相少，只观察30个中期细胞。

在显微镜下直接把染色体分为A-G组。把所有染色体结构重排明显的或者有怀疑的细胞用显微镜照相摄下来，以供更详细的核型分析，染色体畸变最后至少有两个资格较老的细胞遗传学家来分析确定。

本研究只观察到染色体型的畸变。不过，注意到这个事实，即细胞在第一次有丝分裂中的染色单体型畸变在第二次或者在以后的细胞分裂中可能常常重演为“诱导了的”染色体型的畸变出现。

主要根据UNSCEAR和Lea氏报告来区分染色体畸变类型。

不对称性互换包括双着丝点和环，对称性互换是指相互易位和臂间倒位。此处“缺失”这个定义，主要是在染色体组内也许由于中间或末端缺失而导致丢失无着丝点染色体为特征。中间缺失包括微小断片和可能出现的无着丝点环，都叫做无着丝点(acentrics)。

臂内倒位，为无着丝点环的对应物，用普通Giemsa染色方法不能鉴别。这些畸变无疑也一定包含在正常细胞内。

这样观察到的畸变分为如下6种类型：双着丝点、环、相互易位、臂间倒位，无着丝点断片和缺失。前4种叫做互换畸变，后2种不包括在互换内，而分别计入总的畸变里。

结 果

(一) 与辐射剂量相关的染色体畸变细胞数

发现约有1/5被检查人员(139/649-广岛与72/403-长崎)在细胞学检查前一年之内接受过胃肠道荧光镜诊断,但初步经统计学分析,比较了接受荧光镜诊断与没有接受荧光镜诊断的染色体畸变细胞的频率,并未发现两者之间有任何明显的差异,所以本文把这两组的材料合并在一起分析。

这两城市由辐射引起的细胞染色体畸变主要是互换型(双着丝点、环、相互易位和臂间倒位),它们随着照射剂量的增加而增加。在广岛,这种畸变细胞频率的增加在1~99拉德的剂量组内已经观察到。而在长崎,这种畸变细胞随着照射剂量的增加而增加的趋势不这么明显,在低剂量范围内增加是相当缓慢的,而高于300拉德时增加就急剧上升。

这两城市对照组之间的值没有差异,但是在照射组的每个剂量组内,畸变细胞的频率广岛比长崎高。从剂量-畸变效应的曲线图象看,这两地也是不同的,广岛的曲线近似呈直线状态,而长崎的曲线似乎呈指数状或剂量的平方状。然而根据互换和总的畸变来说,这种趋势是一回事。

把两城市的受害者分为两个年龄组,一组是在原子弹爆炸时小于30岁,另一组大于30岁,目的是要观察互换畸变率上是否存在着相对的年龄差异:对两个年龄组的每一个剂量组又进行了比较。这两城市对照组的畸变细胞数似乎年龄大的比年龄小的稍高一点,但统计学上差异不明显。以对照组而言,两个年龄组之间没有差异。虽然这样比较可能显得相当粗糙,但若更细分年龄组则会导致每个年龄组例数不够,势必不能详细评价与年龄有关的染色体辐射敏感性。

(二) 染色体畸变的类型和频率

正如前面所描述的那样,大部分观察到的染色体畸变是互换型,就这点而言,似乎值得去测定受照射人这种占优势的畸变。本节是叙述受原子弹爆炸而存活者的染色体畸变类型和频率。因为这来自两城市的材料大致是相似的,所以此处只分析取自广岛的资料。

所有观察到的能鉴别的染色体畸变分为6种不同的类型,而且依据不同的剂量测定了每种畸变的每个细胞的畸变率。

在对照组和照射组内都观察到含有5种以上性质不明的互换畸变细胞,前者占观察细胞数的

0.02%(5/24414),后者占0.03%(11/35564)。这些细胞称之为多畸变细胞,不计在内。

在每个畸变组内,每个细胞的畸变率显然是随着照射剂量的增加而增加的。在6种畸变类型内,所有各个剂量组相互易位均占优势,而且是构成剂量-畸变关系的主要因素。

与占优势的对称性畸变相反,不对称互换的频率很低,虽然其剂量-畸变关系仍然是明显的。为了更清楚地证明对称性畸变为主,计算了这两种畸变类型的比率。在低剂量(1~99拉德)内,大约有80%的互换是对称性互换,随着照射剂量的增加,这种互换率也随之而逐渐增加,当剂量达到400或400拉德以上时,对称性互换竟达到最大值~95%左右。

另一个有关剂量方面的有趣特点是,每个畸变细胞的畸变数也是随着剂量的增加而增加的,这就可以认为,接受剂量越高,所诱导细胞的畸变也就越复杂。

辐射引起的染色体断裂及其以后又形成的互换畸变似乎是随机的。因此,可以设想,关联到一个特定染色体互换畸变的可能性是与它的相对长度成正比的。根据这个假设,作了如下分析:把所有能识别的畸变染色体按照染色体组(A-G)进行分类。这样根据每种畸变类型的染色体频率来测定每个染色体组的观察值,预期值是从中期染色体的相对长度推算得来的(1968年芝加哥会议上的报告)。然后对每种染色体畸变类型的观察值与预期值进行卡方(χ^2)测验。在此分析内,只选用照射组,而且把这些数值根据性别又分别作了详尽的叙述。

实验结果表明,观察到的双着丝点频率与预期值的频率在统计学上无差异,对女性而言,观察值与预期值之间相差30%尚无显著差异,而对男性来说,两者之差达5%时便认为有差异,至于相互易位,两个性别的观察值和预期值之间有统计学上的差异。这种差异是由于在B、D和E组内染色体观察频率增加,而在C和F组内染色体观察频率减少而造成的。

至于臂间倒位,对较长的染色体(如A组和B组)来说,观察值明显高于预期值,而中等长度或较短的染色体(如C-G组)臂间倒位的频率是颇低的。

染色体形成臂内互换,如环和倒位,可以用该染色体的长臂和短臂长度的简单函数来表示,即 $p \times q$ 。预期值可以用下面的公式来计算:

$$p_i q_i / \sum p_i q_i$$

p_1 和 q_1 分别代表染色体长臂和短臂的长度。对于形成倒位的观察值与预期值之间的差异应用这个公式计算就大大降低了,虽然统计学上差异还是显著的。这发现提供了对染色体越长,形成臂内交换的可能性越大的认识。对着丝点环来说,则无论应用哪种比较方法都得不到明确的结论,因为环的数目和臂间倒位相比数目太少了。

(三) 细胞分裂和染色体畸变

非对称性染色体畸变,可引起细胞有丝分裂紊乱,因在后期和末期结构的缺失最终导致细胞死亡。所以,由于在有丝分裂中染色体物质分离不均等而形成的那些具有染色体数目不平衡的细胞,能作为测定那些在体内经诱发互换畸变之后至少经过一次以上有丝分裂的细胞频率的一个好的指标。

按照Buckton和Pike氏分类法,把带有双着丝点和/或环的细胞分成两组:(1)伴有一对无着丝点断片者,叫做 X_1 细胞;(2)不伴有无着丝点断片者,或同时存在两对相同来源的无着丝点断片者,叫做 X_2 细胞。 X_1 细胞可被认为在畸变诱发之后尚未经过细胞分裂,而 X_2 细胞在受照射之后至少经历过一次以上的分裂,引起无着丝点部分不均等分离。本文比较了不对称互换的 X_1 细胞和 X_2 细胞,结果指出,对每个剂量组,观察到的 X_1 细胞达75~90%。

讨 论

过去的报告已经清楚地证明,在人和哺乳动物身上,许多体内和体外由电离辐射诱发的体细胞和生殖细胞染色体畸变与所接受的剂量有密切的关系。广岛和长崎受原子弹爆炸而活下来的人,他们受到大剂量急性全身照射,是唯一受到中子和 γ 射线混合照射的大量人群。引用新近的证据可说明,染色体互换畸变在体细胞中可持续20年以上。并且,这些资料表明,是存在着辐射剂量-染色体畸变关系的。这样的关系由本研究内对所有辐射诱发的各种已知类型的染色体畸变的观察得到证实,其接受剂量越大,则畸变细胞内染色体畸变越复杂。

本研究最重要的特征之一是广岛和长崎照射组之间畸变细胞的频率有差异,每个剂量组的畸变值,广岛比长崎明显高,而两城市的对照组畸变细胞的频率是相似的。从观察频率和照射剂量关系的曲线图象来看,广岛的似乎呈直线的,而长崎的则趋向于剂量的平方,这种差别可归之于这两地之间辐射性质不同而引起的。因为中子成份广岛比长崎明显高,在长崎空气剂量的主要成份是 γ 射线。大

量的实验证据表明,中子的剂量-畸变效应曲线是线性的,而 γ 射线的效应曲线接近于剂量的平方,而且中子诱发的染色体畸变率比 γ 射线或X线诱发的高。

正当开始培养之前,受电离辐射的那些细胞内,不对称互换畸变被认为是评价剂量-畸变效应的一个敏感指标。该指标对受到全身照射的人来说,如果培养的血液样品在照射后即刻就取的话,也是适用的。Buckton等报告,在那些志愿者接受2百万电子伏X射线全身低剂量(17~50拉德)照射,结果观察到接收剂量与不对称互换数目之间有一个很好的关系,虽然个体与个体之间有差异。他们进一步指出,无论在整体照射或离体照射时,即使是低剂量,一般都能得到满意的重复。Ishihara等从研究因事故而受到铯-137 γ 射线照射的人中得到相似的结果,而且他们试图用带有双着丝点和环的细胞去测定个体的吸收剂量(根据Sasaki介绍的公式)。

与不对称互换的用途相反,对称性畸变例如相互易位和臂间倒位,用以估价剂量-畸变效应是十分靠不住的,因为要检出这样的畸变有困难,而且识别畸变的标准不同,使用显微镜的经验也不一样,这都可影响观察者去检出这些互换类型。但是,在20年前原子弹爆炸而受到照射的人中,对称性互换细胞总是比不对称互换细胞占大多数,这是因为不对称互换细胞在受照射后经过有丝分裂从体内淋巴细胞群体中被排除掉,并假定,辐射诱发的对称性畸变和不对称性畸变的机率是相等的,那么对称性互换的淋巴细胞比不对称互换的淋巴细胞有利于正常的有丝分裂。虽然,我们还没有直接的证据来证明不对称互换的细胞在体内淋巴细胞群体中随着时间的过去而消失,但是在人和猪的一些实验证据支持这一点。

所以,辐射诱发的对称性互换比不对称互换在剂量-效应关系方面可能是更为敏感的指标,特别是在细胞学检查之前已经受到照射很多年的人中。应当强调,必须建立一套标准化规范的体制去识别对称性染色体畸变。

尽管对观察辐射很久之后的对称性畸变细胞和不对称性互换细胞群体的下降有困难,然而Sasaki和Miyata指出,辐射诱发的染色体畸变的这两种类型可以作为评价广岛原子弹爆炸存活者吸收剂量的敏感指标,也可引用体外高能X线辐射实验得来的公式对所观察的染色体畸变外推来评价个体的吸

收剂量。

年龄差异也看作是影响诱发细胞染色体互换畸变的辐射敏感性的另一个重要因素。Curtis氏用整体辐射试验小鼠再生肝细胞时发现,诱发染色体畸变的频率日龄大的比日龄小的鼠高。Sasaki和Tomura报告,照射人离体的淋巴细胞,诱发染色体互换畸变的辐射敏感性在生后不到一个月的婴儿内升高,然后随着年龄增大而下降,直至1~2年内才稳定下来。

在本研究内,对两个年龄组(受原子弹爆炸照射时一组大于30岁,另一组小于30岁)作了比较,具有互换细胞的频率在这两个年龄组之间统计学上无明显差异,但我们觉得,就从这粗糙的年龄分组内说年龄对染色体辐射敏感性无影响的结论还不够成熟。另一个因素值得考虑,即是否在任何年龄都会从体内淋巴细胞群体内排除畸变细胞,但目前尚缺乏资料。

从我们的培养时间判断,大部分观察到的中期细胞是在体外进行第一次分裂的细胞(X_1 细胞),而少量细胞是在体外经过第二次或更多次分裂的细胞(X_2 细胞)。尚有一些比例不明的细胞可能在体内早已进行了分裂。

一种可能的有关在体内存在 X_2 细胞的解释是,在原子弹爆炸时受到急性全身照射的人中,血液细胞由于活跃的有丝分裂而重新被增殖,可能在急性辐射症状出现之后恢复期内业已发生。所以大部分具有不对称畸变的细胞在有丝分裂时将会有染色体分离不均等,从而在体内导致细胞死亡或产生 X_2 细胞。在原子弹爆炸或核试验落下灰而受到严重照射的人中,体内存在着诱发了染色体畸变的淋巴细胞的同源物(Clones),这看来是能支持体内产生 X_2 细胞的证据。

大部分具有不对称互换的细胞是 X_1 细胞。这种细胞可能以休止状态在淋巴细胞群体内停留很多年,而不进行分裂(正如最初由Fitzgerald氏所解释的那样)。

本资料提供了生物学上一些有趣的现象,其中之一为产生互换畸变的数目是与有关染色体的

相对长度成正比,这点特别对双着丝点更为适用。正如前面所述的那样,在体内从淋巴细胞群体内排除具有双着丝点或环的细胞的数量似乎差不多随着剂量的增加而成比例的,但是,我们的资料表明,发生这种细胞消失可能是没有规则的,这样参予双着丝点形成的染色体也是随意的。

相互易位也有一个趋势,即染色体越长,它们形成互换的频率越高。不过在这些畸变类型内,C-组染色体的互换频率与预期值相比时相当低。若这样观察,要识别C-组的个别染色体的畸变却有困难,而且最能使观察值与预期值之间有统计学差异。

此处所指的“缺失”,被认为是由于不完全交换或末端和/或中间缺失而产生的,在这些染色体上丢失了一部分无着丝点的片断。因为在剂量和这些畸变的频率之间有一个正关系,所以这样的缺失好象是由于不完全交换而引起的;而以后经过细胞分裂,无着丝点缺失片断看来就从细胞中丢失掉。

近来发展了一些新技术,如Q-、G-和C-带方法,这些方法使我们能更正确地识别辐射引起的结构上重排的异常染色体,因为这种染色体用我们当今所用的常规染色方法不能检出的,而用这些新技术便可鉴别出来。例如,除了那些用普遍方法可以鉴别的以外,再用胰酶姬姆萨显带技术于受到大剂量照射的广岛人外周血培养淋巴细胞中,就能识别某个异常染色体,例如在离着丝点等距点上有一个交换的臂内倒位的染色体,和在两个染色体之间相等长度上相互易位的染色体。况且用普通方法对简单相互易位的互换畸变的鉴定实际情形要复杂得多,所涉及的染色体要超过两个以上。所以,在本研究内所观察到的对称性互换的细胞数多半是低估了的。

这些新技术单独或结合使用,就能更进一步详细地分析染色体的异常结构,去决定辐射诱发染色体畸变细胞在生物学和临床上的意义,特别是关系到辐射引起人晚期体细胞效应中可能发生癌瘤的病因学问题。

(A. A. Awa等: J Radiat Res 19: 126~140 (1978) 张耀平译 王修竹 詹江海校)