

表 3 对大动物的辐射防护作用(静脉注射)

化合物	狗	恒河猴
MEA	无效	无 效
AET	无效	有效(有毒性)
WR 2721	有效	有效(口服无效)
WR 2529	毒性大	有效(也保护猪)
WR 3689	有效	
WR 44923	有效	
WR 77913	有效	
WR 168643	有效	无效(低于MTD时)

最后作者总结和比较了上述化合物在小鼠和大动物中的辐射防护作用(表2和3), 并建议对陆军计划中发现的五个辐射防护剂做进一步研究。这些新化合物保护正常组织是否比对实体瘤组织更好些, 以及对各种辐射敏感的正常组织的保护程度都有待在实验动物中进一步比较观察, 以确定这些化合物是否可能应用于临床放射治疗。

(杜德林节译 朱王葆校)

## 短周期实验法比较人、小鼠、小鸡成纤维样细胞之间的辐射敏感性

Diatloff-Zito C et al, Int J Radiat Biol 39(4): 419~430, 1981 (英文)

不同种类动物, 包括啮齿动物, 常被用来改进肿瘤放射治疗的研究。但就临床实践而言, 一些动物模型是否适用, 却尚未得到明确证明。由动物外推到人的正确性也还有待检验。按每份额高能中子剂量函数的皮肤损伤来测定其对活体的r.b.e.的实验表明, 象人、小鼠、猪和大鼠等不同种类动物的反应是相等的。采用另一个方法, 即观察成纤维细胞群体培养物生命期, 作者业已证明细胞对电离辐射的反应依赖于细胞的种属。对小鼠成纤维细胞, 其永久细胞株的建立加快, 对小鸡第二期细胞则其生命期缩短, 对同期人胎肺成纤维细胞的分裂能力没有影响。

体外集落形成能力试验被广泛用于评价电离辐射在细胞水平的致死效应, 并用作比较研究。如人胎和小鸡等不同正常二倍体成纤维细胞株的存活曲线已经建立。但就作者所知, 还没有一个实验室把不同种类动物成纤维细胞用同一方法同时进行系统的研究, 以比较它们之间的放射生物学参数。

本研究目的是采用几个短周期方法, 包括集落形成能力(CFA), DNA单链断裂修复(SSB修复)和潜在性致死损伤修复(PLD修复), 来比较人、小鸡和小鼠未转化的成纤维细胞株的放射敏感性, 并探讨这些参数的相互关系。

### 材料与方法

1. 细胞培养: 将白来亨鸡胚的成纤维细胞培养于添加5%胎牛血清, 2%鸡血清和16 $\mu$ g/ml庆大霉素

的Eagle's MEM液中。人胎肺纤维细胞, MRC-5和HF-19, 以及新生小鼠肺成纤维细胞, 培养于含1%胎牛血清和16 $\mu$ g/ml庆大霉素的Eagle's MEM液中。

为了避免衰老引起生长能力下降, 小鸡和人体细胞分别在经过7和35次传代培养之前使用。鼠细胞培养物也在细胞显示衰老征象, 即出现自发性转化(约在该种细胞的第九次培养)之前使用。因此, 不同种属的细胞于不同的阶段使用, 每例都符合生命期的第二阶段。

2. 存活曲线: 预实验表明, 小鸡、人胚和小鼠肺成纤维细胞无性繁殖的能力是较低的, 并且随着培养密度的不同而变化。为了获得最大的无性繁殖能力, 我们采取了文献介绍的滋养细胞技术。在本实验中, 小鸡和小鼠培养物的细胞总密度(滋养细胞+待测生活能力的细胞)为 $8 \times 10^3$ 细胞/cm<sup>2</sup>, 人的细胞培养物为 $4 \times 10^3$ 细胞/cm<sup>2</sup>。经5千拉德<sup>137</sup>Cs  $\gamma$ 线处理后失活的滋养细胞加入待测细胞中, 在室温下, 以86拉德/分的剂量率进行照射。照后培养瓶在含有5%CO<sub>2</sub>的空气中孵育14天, 并在第七天更换一次生长培养基。固定培养物, 以结晶紫染色, 计数细胞含量在50个以上的集落个数。对照细胞群的培养效率, 人一般为60%、小鸡12%、小鼠1%。每一存活曲线各进行5~7次实验。

3. 潜在性致死性损伤的修复, PLD用来表示由

辐射诱发的致死性损伤,但在照后一定条件下,这种损伤又是可以恢复的。在细胞聚集处,观察了生长受抑细胞的PLD修复。细胞在盛有上述合适培养基的塑料培养瓶中生长聚集。然后用含有0.5%胎牛血清的McCoy培养基将上清液换掉,使其在休止期保持4天。再将培养物在室温下受照,以便在零小时获得 $10^{-3}$ 左右的存活率,接着移至37℃培养。细胞在照后不同时间(从2~24小时)用胰酶(0.25%胰蛋白酶)的改良Dulbecco盐溶液)消化,并按上述方法培养细胞。在15天固定,计数集落数。在含有 $^3\text{H}$ -TdR(0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ )的培养液中孵育24小时,以放射自显影法测定细胞在照射时的标记指数,小鼠和人为2~5%,小鸡约为10%。在平稳期,小鸡、人和鼠细胞的培养效率分别为13、60和1%。每细胞株进行四次实验。

4. DNA修复的分析:按照碱性蔗糖梯度法测定DNA单链断裂的修复。将新鲜培养基加到聚合的细胞培养物中以诱发DNA合成,10小时后再加入浓度为0.5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -TdR。24小时后,用含有非放射性的胸腺嘧啶核苷(10  $\mu\text{g/ml}$ )的完全培养基将上清液换掉,并留置45分钟。再换一次上清液,此平皿在0℃暴露于 $^{137}\text{Cs}$ 源下,以1300拉德/分剂量率照射5千拉德。将玻璃纤维园盘自平皿中取出,并置于37℃避光的完全培养基中,使DNA发生修复。其后,于不同时间将该园盘上的细胞溶解于0.4ml pH12.4的碱性溶液中,在暗处5~6小时,碱性溶液含NaOH0.45M、NaCl 0.9M和EDTA0.1M,然后使其在pH12.4的碱性蔗糖梯度溶液(含NaOH0.5M、NaCl 0.9M和EDTA0.003M)中成层。以40,000rpm在12℃离心120分钟。

收集玻璃纤维园盘上的组分,干燥后,用液体闪烁光谱仪测定放射性,实验重复4~5次。用碱性蔗糖梯度法测定的DNA复原,平均在90%以上。

## 结 果

培养的小鸡、人和鼠成纤维细胞的存活曲线各不相同。本文应用单次击中多靶公式来配合细胞的存活曲线。小鸡和人细胞存活曲线各自的 $D_0$ 值为217和88拉德,外推数为2.4和3.4。小鼠细胞的存活曲线缺乏肩部,其 $D_0$ 值为171拉德,外推数为0.7(图1)。小鸡和人成纤维细胞的 $D_q$ 值分别为160和120拉德。因此,在存活曲线的开始部分,放射敏感性的次序为小鼠>人>小鸡。超过300拉德以后,根据 $D_0$ 值,放射敏感性变成人>小鼠>小鸡。

对小鸡、人和小鼠成纤维细胞,在分别照射1100、600和900拉德时,分析PLD修复动力学,则存活水平

各自为 $2 \times 10^{-3}$ ,  $9.5 \times 10^{-4}$ 和 $1.8 \times 10^{-3}$ (图2)。照射后存活率随着时间的推移而增加。而且小鼠细胞在照后4小时,人和小鸡细胞在照后6小时趋于稳定。在照后6到24小时之间培养的三种细胞的存活率没有显著差异。小鸡、人和小鼠成纤维细胞PLD修复的程度各不相同,因为活存细胞的比值分别增加14、29和3倍。

根据碱性蔗糖梯度测定结果,分析了照射后的DNA修复。对照小鸡的DNA,由于沉淀效率的不同,出现两个峰。照射5千拉德后,受照细胞DNA(零分时)一个峰的沉淀效率降低,30分钟后此峰分成2个明显的部分,一部分向梯度的顶迁移,而另一部分移向对照DNA的相同区域。60分钟后,分子量的峰接近梯度的顶,而分子量重的峰与对照DNA的沉淀相同。

人的成纤维细胞中,对照DNA的沉淀为单一峰,5千拉德诱发的DNA断裂,30分钟之内即完全修复。

5千拉德照射的小鼠成纤维细胞中,低分子量DNA通常在照后立即出现,但偶或有一短暂延迟。在该剂量下即使迟至照后2小时仍无恢复可见。

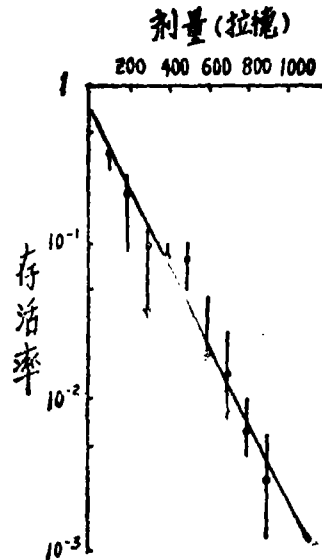


图1 小鼠肺成纤维细胞在指数生长期的存活曲线。垂直柱表示95%可信范围(t测验)

## 讨 论

本文测定了三种不同种系动物受照成纤维细胞的CFA、SSB以及PLD的修复。无性繁殖效率,从小鼠的0.5~1%到人的40~60%,相差100倍之多。这或许不是由于组织来源引起的,因为小鼠和人细胞均

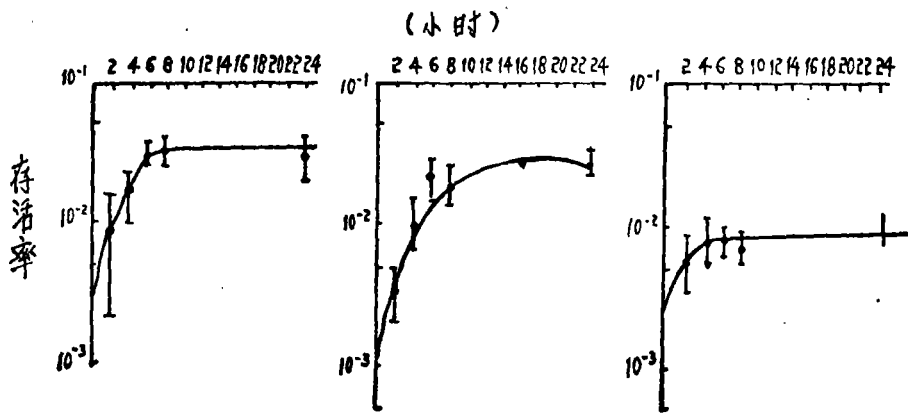


图2 小鸡、人和小鼠静止期成纤维细胞分别受1100、600和900拉德照射后,在不同时间培养的细胞潜在致死损伤(PLD)的修复。左图,小鸡,中图,人,右图,小鼠。

来自肺组织。尽管采用滋养细胞技术,小鼠成纤维细胞的培养效率在早期传代培养时仍很低。所以采用小鼠细胞,是因为在其自发性转化前,与其放射敏感性有关的资料相当缺乏。假定培养效率的较大变化并不引起放射生物学研究结果的偏差,那么种间的放射敏感性的差异才能被接受。已确证,人的成纤维细胞无性繁殖效率和X线的敏感性之间不存在相关性。鉴于小鼠成纤维细胞的对比资料缺乏,因此本文不能完全排除因其低的培养效率给上述结果可能带来的影响。

小鸡、人和小鼠成纤维细胞的存活曲线表明,根据CFA测定的放射敏感性,在不同种属的细胞之间是有区别的。小鸡细胞的 $D_0$ 值(217拉德)比小鼠的(171拉德)高,而小鼠的 $D_0$ 值又高于人的(88拉德)。Resnick曾报道,当把CFA结果按每细胞核来统一化DNA的量时,发现在单一细胞系统中电离辐射对体外细胞的致死效应是相同的。为了解释这些资料,提出了关于修复和失活的一般机制。我们按每细胞核DNA的量来统一化本文的数据,结果表明其反应仍不完全相同。当在相应的阶段(第Ⅰ期)进行测量时,小鸡、人和小鼠成纤维细胞SSB修复的效率也各不相同。此外,不完全只是 $D_0$ 值,也取决于细胞对DNA的SSB修复能力。人细胞的 $D_0$ 值最低,但SSB可以修复,而小鼠细胞尽管其 $D_0$ 值为171拉德,却没有可以测知的此型修复。5千拉德照射后SSB修复能力完全丧失颇为意外,因为这种修复在其他作者所建立的鼠细胞株中已经得到证明。

对本文结果的一种可能解释是,在小鼠肺成纤维细胞中自发显现的单链DNA的碱性敏感点,由于辐射所致断裂的稀释而影响了SSB修复的检测。但是SSB修复的缺如似乎与该细胞的品系关系不大,因为

用Balb/C, CBA和DbA<sub>2</sub>鼠肺成纤维细胞也获得了相同结果。小鸡的成纤维细胞情况更为复杂,它们的辐射耐受性最大,一部份DNA发生修复,而另一部分仍保持DNA的低分子形态(未修复)。这可能是由于存在着修复能力不同的细胞,或者是在相同的细胞中有两种不同类型的DNA。如果是前者,辐射最敏感的细胞,可能符合于未修复的DNA。但是存活曲线并未显示有两个不同辐射敏感性细胞群体的存在。如果是后者,可能系Williams等所报道的相当于一种与细胞死亡有关的特殊DNA的降解物。

另一种可能性是,某一DNA峰产生于沉淀的异常物质,但是用<sup>14</sup>C-标记蛋白水解酶和用<sup>3</sup>H-TdR标记DNA的双标记实验表明,在本实验的梯度中,没有发现共沉淀的DNA蛋白质。因此,本文的不同种属成纤维细胞DNA的SSB修复和CFA之间没有明显相关性。DNA的SSB修复在电离辐射所致细胞死亡中的作用是一个有争论的课题。

小鸡和人的静止期成纤维细胞的PLD修复能力显得比鼠细胞的大,此种差异看来似乎与其细胞周期的不同阶段无关。从流动微荧光计(flow microfluorometry, FMF)显示,像人和小鸡的成纤维细胞一样,平稳期的鼠成纤维细胞具有G<sub>1</sub>期细胞DNA含量的特性。在非建立的小鼠成纤维细胞中,低水平的PLD修复,与在啮齿类细胞株中所证明的DNA修复的其它报道相符,例如小鼠、田鼠、大鼠比在人细胞株中所观察的低得多。

我们的结果也表明,不同种属的平稳期成纤维细胞如照后立即培养,比呈指数生长的细胞具有更高的辐射敏感性。这和用其它一些细胞株所得的结果一致,因为在这些细胞株中发现平稳期细胞的敏感性与上述

类似,而且多半比生长中的细胞的辐射敏感性要高。

我们前段工作和本文的结果表明,电离辐射的长期和短期效应(CFA、SSB修复、PLD修复)依细胞种系不同而变化。另外,急性和迟发效应之间无明显相关性。小鸡成纤维细胞确实对电离辐射的致死效应具有最大抗性,尽管它们的生命期由于电离辐射的照射而缩短。 $D_0$ 值最低的第二期人胎成纤维细胞的生命期,在群体细胞培养中不受 $5 \times 100$ 拉德电离辐射的影响,在单细胞培养物中也不受600拉德照射的影响。 $D_0$ 值介于小鸡和人细胞之间的小鼠细胞,电离辐射使得细胞的无限分裂能力增强(Macieira-Coelho等

1976)。本文用三种不同种类的细胞得出的结果与Ban等(1980)所报道的相符,表明人胎成纤维细胞对电离辐射的急性和迟发效应,在反应类型和敏感性这两个方面都完全不同。

### 结 论

CFA、SSB修复和PLD修复,根据细胞的动物种属不同而异,相互之间没有确定的关系。辐射的近期和远期效应看来没有任何相关性。我们提出,不同的分子损伤和/或修复机制,可能是由于细胞的这些功能的差异所致。

(褚芳摘译 罗厚良校 肖佩新审)

## 低水平辐射效应

Archer VE; Nuclear Safety 21(1):68~77, 1980 (英文)

本文述及核装置正常操作可能出现的低水平辐射效应,而不涉及破坏、盗窃或事故释放放射性物质。

毫无疑问,大剂量电离辐射能引起各种各样的躯体效应及遗传效应,但是低于现行辐射标准而接近本底的低水平辐射也可引起许多同样的效应。其主要不同点是后者发生率很低,以致不易与通常的疾病相鉴别。为此而使用大量的实验动物是不实际的,但有大量人群受不同水平的辐射,故用敏感的流行病学方法可能发现这些效应。

低水平电离辐射引起损伤的大多数类型都涉及到具有遗传特性的细胞,对体细胞的损伤可能引起各种恶性疾病(白血病、癌或各种器官的肉瘤),如损伤生殖细胞,可能引起有害的突变(先天畸形及婴儿、胎儿死亡率增加),人的这类损伤特征之一是损伤发生和表现出来所经历的时间较长。诱发的显性突变第一代可以看见(但很少),对于较普遍的隐性突变,可能经历许多代也未显示出来,而诱发癌可能数年或数十年也未见出现。慢性照射剂量率越低,潜伏期越长,由于时间延迟给流行病学提出了一个困难问题。辐照后10年或15年内对接受辐照人群的研究可能会得到阴性结果,从而可能会得出一个安全的假判断。染色体畸变的检查及婴儿死亡率的观察已被推荐作为敏感的方法以解决长潜伏期的问题,但其价值尚未被证实。

### 关于Hanford核工厂的研究

人们对位于华盛顿Richland汉福特核工厂工作人员及附近居民的死亡率作了一系列的分析,最先认

为Columbia河下游居民死亡率升高,另一作者认为那种看法是错误的。Milham使用检查死亡证件的方法,他报告了胰、肺、骨、结肠癌较多。以后他采用比较死亡率的方法,以该工厂1949~1971年死亡人数为基础,最早研究使用了841份死亡证件,而最近研究数量增加至3365份,这些研究证实增加的死亡是由于网状内皮组织癌和胰腺癌的关系,也提示增加的死亡数可能与辐照量增高有关。接着该作者使用了更为精确的方法,即病例-对照研究法与寿命表分析,试图测定辐照与某些癌症死亡率之间的关系,这些研究发现外照射与胰腺癌和多发性骨髓瘤之间统计学上有明显关系。另一组用病例-对照研究法报告了辐照与肺、胰、网状内皮系统的肿瘤及所有癌之间均有关系,根据这些材料计算出不同部位的肿瘤,其辐照加倍剂量变动于0.8~6.1拉德之间,一个用回归模型作的寿命表分析,计算其加倍剂量在15~30拉德之间。

对于所看到的辐射效应,存在两方面的争论。其一,认为白血病是晚期辐射损伤的主要表现;其二,认为算出的诱发癌的加倍剂量(0.8~6.1拉德)是不合理的。因为人生命的前30年从本底辐射接受的剂量就在3~4拉德之间。以后的观察指出诱发成年人癌的最小加倍剂量是3拉德或更大。关于白血病,在1940~1949年开业的放射科医生的恶性肿瘤主要类型是多发性骨髓瘤而不是白血病,他们接受的辐照与Hanford工厂工人相似——相当小的剂量延续许多年。如本底辐射能在许多部位引起相当大比例的癌,则大多数报告提出其加倍剂量为6~30拉德是合理的。