

性小鼠精原细胞的干细胞, 以比较他们诱发的遗传学效应。

实验用CBA和C57Bl杂交的2~2.5月龄的子1代雄鼠。以 ^{137}Cs 为 γ 射线源进行慢性照射, 剂量率分别为 2.7×10^{-6} 、 5.8×10^{-6} 和 $9.4 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$; 另一组为急性照射, 剂量率为 4.5Gy/分 。累积剂量为1.5、2.1、3.0和 4.5Gy 。慢性照射后1个月和急性照射后45天, 将小鼠颈脱臼杀死。按Evans等1964年介绍的方法制备睾丸标本, 用以分析第1次减数分裂精母细胞中期染色体的相互易位。按Pomerantseva等1980年介绍的方法制备副睾涂片, 以观察各种头部异常的精子数。每只鼠观察200个以上中期染色体和300个以上精子细胞。

结果表明, γ 射线慢性照射时相互易位率比急性照射时明显下降。在剂量率为 $2.7 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$, 总剂量为 3Gy 的慢性照射组内, 有1只鼠的易位率较高(19%), 作者认为, 其原因可能是存在一株带有易位的细胞克隆。由于有两种剂量率的实验连续照射1.5~2年, 所以, 还研究了年龄对辐射效应的影响。18月龄和年青小鼠受到 3Gy 照射者, 18月龄小鼠的易位率较低, 但无统计学意义。急性一次照射在剂量为4~ 9Gy 时, 效应维持在最大水平, 而各低剂量率的慢性照射, 其易位率在较大的剂量范围内呈线性上升, 但上升的幅度小。

文内数据表明, 剂量率为 $9.4 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$ 和 $5.8 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$ 的各剂量组的易位率, 有随累积剂量降低而下降的趋势。而最低剂量率($2.7 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$)的易位率平均值比上述两个剂量率诱发的易位率还高。作者认为, 在低剂量率条件下突变量增加, 可能与①修复活性改变, ②对射线最敏感的精原细胞的死亡率下降有关。

当剂量率为 $5.6 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$ 时, 受到 3Gy 照射后精原细胞数减少37%, 而Oakberg等在剂量率为 $7 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$ 条件下照射相同剂量, 精原细胞数没有受到影响。同特定位点突变发生率的数据相反, 在上述低剂量率条件下进行照射时, 易位率比最低值增加。这种增加, 只有在长期(约2年)照射 3Gy 后才能显示出来。在总剂量为 1.5Gy 的实验组内, $2.7 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$ 诱发的易位率低于另外两个剂量率组。低剂量率照射 3Gy 小鼠的易位率增加可能是慢性照射加速衰老所致。在本实验中, 未照射的老年动物的易位率没有增加, 而Pacchierotti等在1983年发现老年(2岁以上)动物的易位率有统计学意义的增加。文内数据还表明, 在 $2.7 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$ 条件下照射 3Gy 的动

物, 以及相同年龄的对照组动物, 睾丸的重量均有所减轻, 提示易位率的增加可能与加速老化有关。

对头部异常精子(ASH)的观察表明, 只有剂量率为 $9.4 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$ 时, 各剂量组ASH出现率的增加有意义。增加的程度与累积剂量无关, 其数值与一次急性照射 3Gy 时接近。这些数据还表明, ASH检查结果和易位率不同, 剂量率为 $9.4 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$ 的慢性照射和相同剂量的急性照射相比, 所诱发的损伤程度没有减轻。在剂量率为 2.7×10^{-6} 和 $5.8 \times 10^{-6}\text{Gy/分}$, 总剂量为 $1.5 \sim 3\text{Gy}$ 时, ASH出现率也有增加的趋势。以上结果提示, 精子头异常和染色体相互易位的诱发过程的性质是不同的。

(黄进忠摘 张卿西校)

068 一种改良的淋巴细胞微核检测法 [Pincu Met al; Mutat Res 139(2):61, 1984(英文)]

人体淋巴细胞微核试验的应用常受培养时细胞分裂增殖程度的限制。辨别不清细胞是否经过分裂是试验误差的重要原因。本文报道一种改良的差别染色程序(charlequin staining procedure), 以便按细胞核的颜色很容易地鉴别出经培养而分裂的细胞。实验证明, 微核只出现在分裂过的细胞。因此, 若除去未分裂的细胞数, 将明显地提高微核试验的准确性。

方法: 取健康成人静脉血, 经 ^{60}Co 源体外照射。进行全血微量培养。剂量率: 80rad/min 。培养液组成: RPMI1640、15%小牛血清、1%PHA和抗生素。BUdR原液用RPMI1640配制, 4°C 避光保存。培养液中BUdR的最终浓度为 $4 \times 10^{-4}\text{M}$ 。每个培养瓶中5ml培养液加0.3ml血。培养物于 37°C 、避光孵育76小时。有些培养物收获前2小时滴加乙酰甲基秋水仙碱。

培养结束, 离心收集细胞。于 0.075M KCl溶液中新悬浮细胞5分钟。用Carnoy氏液固定。将细胞滴于载玻片上, 空气干燥。用差别染色法染色。未加BUdR的细胞应用碱性品红Schiff试剂进行Feulgen染色。

在光学显微镜下进行观察和计数。细胞可分三类。(1)小而深染的未转化细胞;(2)具有淡红色核的转化细胞;(3)呈现兰色核的转化细胞。其中只有最后一种细胞结合了BUdR。在微核试验中, 不计数第一类细胞, 只计数后两种细胞。以含微核细胞数与总细胞数之比计算微核的产额。除大剂量照射外, 通常每个细胞只含一个微核, 故微核产额可以每千个细胞的微核数或每千个细胞中含微核的细胞数表示。

根据染色体的形态特征,可将中期细胞分为第1、2、3次分裂的细胞。应注意,高浓度BUdR将引起大量姐妹染色单体交换,有时难于区别第1次与第3次分裂。

以第2和第3次分裂的细胞数来估算细胞分裂对微核产额的影响。假设每一细胞分裂周期使微核产额下降一半,那么,估算能形成微核细胞的细胞数,则以兰色细胞数乘以2倍的第2次分裂的细胞百分数与4倍的第3次分裂的细胞百分数之和。

结果:在5个人的33份血培养中,共计数469个微核,其中459个微核存在于兰核细胞内(占98%)。进一步证明兰色细胞是分裂增殖的淋巴细胞。其微核也染成兰色,很有助于识别。

为了比较在兰色细胞和总细胞中的微核检测方法,我们用不同剂量照射了血标本并计数了微核、兰色细胞及总细胞数。讨论了BUdR在培养液的最佳浓度,以及细胞培养时间、PHA浓度对两种方法试验结果的影响。通过分析细胞染色体畸变率与微核率之间的关系,说明了细胞分裂对微核产额的影响。

总之,从微核试验的细胞计数中除去经培养而未分裂的细胞数是合理的。而增加培养液中BUdR的浓度高达 $4 \times 10^{-4} M$,经差别染色方法处理,很容易识别出这种未分裂的细胞。改良后的淋巴细胞微核检测法与常规方法相比较具有下列优点:因为计数细胞约可减半而快速;不受淋巴细胞分裂增殖程度变化的影响;更准确地识别微核;以及微核率与染色体畸变率更趋一致。

(杨恩普摘 高凤鸣校)

069 高热处理哺乳动物细胞后,照射或不照射时DNA单链断裂的发生情况 [Jorritsma JBM et al; Radiat Res 98:198~208, 1984(英文)]

高热是否可以直接或间接诱发DNA单链断裂,文献意见尚不一致。Lunec等报告,高热处理的细胞未检测到DNA单链断裂。Dikomey等指出,高热或45℃以上处理的细胞,在37℃培养4~24小时便可出现DNA单链断裂。自从 3H -胸腺嘧啶核苷(3H -TdR)用于实验细胞的DNA标记以来,认为DNA单链断裂可以由 3H 的内照射而诱发。

为了探讨DNA单链断裂的原因,本文报告了EA(Ehrlich ascites)和HeLa S₃细胞在高热下处理后,X线照射与不照射时DNA单链断裂的发生情况。验证了是高热本身的直接或间接作用,还是标记DNA的 3H -TdR的 3H 内照射诱发DNA单链断裂。同时也讨论了高热与辐射诱发的DNA单链断裂修复抑

制的关系。

EA细胞培养在RPMI1640培养基内。HeLa S₃细胞培养在Joklik's改良的最低必需液体培养基内。在含有5μM和2μM甲基 3H -TdR的培养基内分别标记EA和HeLa S₃细胞。用philips-Müller Mg300X线机(200kV,15mA,剂量率6Gy/分)照射。以羟基磷灰石法解链后测定DNA单链断裂。在X线照射前,将试验细胞分为42℃、43℃、44℃、45℃4组加热处理。45℃组再分为0、15、30、45、60分钟5组加热。计数含有50个以上细胞的集落数。

将45℃加热的EA细胞和HeLa S₃细胞,分别放入三种不同比放射性 3H 标记的培养基内(每细胞每分钟衰变数为0.09~0.12, 0.35~0.45, 1.9~2.5)培养,其DNA单链断裂无显著差异。Mitchel和Birnboim也在非放射性同位素标记的白细胞实验中检测出DNA单链断裂。由此,可除外 3H 内辐射诱发DNA单链断裂的可能性。

当EA或HeLa S₃细胞在42℃、43℃、44℃、45℃各组加热1~5小时,观察到DNA易变碱基的损伤同DNA单链断裂是相等的。45℃加热处理后,X线照射前在37℃培养1小时,细胞的DNA单链断裂的修复能力仍未恢复,仍处于一个多少恒定的水平上。此时,能检出的存活细胞仅为1~5%。这表明,高热抑制DNA单链断裂的修复,可能是DNA分子本身对热的直接吸收或是累及细胞另外的热敏感成分而间接引起的DNA损伤。高热处理的细胞,因为蛋白质的吸收而使修复酶很少能接近细胞的DNA,结果可以导致DNA修复抑制。蛋白质的构形变化和伴随出现的细胞核骨架的吸附也可能改变与细胞基质相关联的修复酶活性,从而进一步抑制DNA的修复。高热损伤溶酶体后,可导致水解酶的释放,从而引起DNA损伤。作者认为,只有在高温处理的细胞群体中含有大量的热杀死细胞时,DNA单链断裂的修复才受到显著抑制。

未加热的细胞,用6GyX线照射后的修复曲线呈双相。半修复时间分别为4和45分钟。其中快组分相对比为0.8,慢组分为0.2。高热处理的细胞,随受热时间的增加,快组分相对重量比值减少,直至消失。快组分的消失完全归因于受热细胞群体中死亡细胞的增加。这是由于细胞的存活率与高热诱发的单链断裂的修复抑制密切相关的结果。

将45℃加热60分钟的细胞和37℃培养的细胞按不同比例(100%, 75%, 50%, 25%, 0%)混合后X线照射,在实验的修复曲线中,可见一定程度的