

微核分析法在放射损伤研究中的应用

苏州医学院 杜泽吉综述 李延义 郑斯英 肖佩新*审

提要: 微核试验作为染色体损伤的快速测定法正受到人们的重视。由于该法操作简便迅速、实验周期短、技术要求不高等优点,是一个行之有效的细胞损伤的检测方法,因而在放射损伤的诊断、辐射防护剂和增敏剂的筛选、理化因子损伤效应研究及肿瘤防治等方面得到了广泛的应用。

一、微核形成的机理

1. 染色体无着丝粒断片学说

五十年代末,Evans就指出,照射增殖的细胞所产生的大多数染色体畸变,都伴有无着丝粒断片的产生。这些断片由于没有着丝粒,在有丝分裂的后期,不受纺锤丝的牵引,不能被纳入子细胞核内,遂在子细胞浆中演变成微核。

2. 纺锤体功能缺陷学说

Pincus^[1]等在实验中观察到一些“大微核”,作者认为是辐射抑制了纺锤体的形成或损伤纺锤体,使完整的染色体在细胞分裂时也不能进入子细胞核内,在胞浆中形成微核。因其内含有整条染色体,所以比一般断片产生的微核大一些。Hogstedt^[2]和Koichi^[3]的实验结果也证实了较大的微核是来自一个或几个完整的染色体。

3. 微核形成的融合机制

在照射后的淋巴细胞中,存在着主核的1/3乃至主核一半大小的微核。有的学者认为,这些微核是由于畸变的染色体部分在不同条件下融合的结果,这种融合过程是受细胞膜膜性结构的直接作用和生化动力学调控的。

4. 细胞核膜损伤机制

Rugh (1956) 早期的研究结果已阐明了这一观点。最近,黄进中等人通过分析大

量不同形态的微核,进一步说明了核膜受损产生微核的机制。辐射作用于核膜某一部位,使之变薄、穿孔,由于张力作用,使核内容物向外突出,再通过核膜修复等一系列变化,在胞浆中形成了与主核完全分离的微核。

二、微核的检测方法

目前,根据取材的不同和研究目的不同,微核的测定方法很多,现简述如下。

1. 动物骨髓细胞的微核检测法

动物经一定剂量照射,在适当时间内,处死后取其骨髓作涂片,染色后计数嗜多色性红细胞的微核、有核细胞微核以及正成红细胞的微核。其中,嗜多色性红细胞微核分析法,已被认为是一个标准的常规方法^[4]。

2. 外周血淋巴细胞微核检测法

包括甲基纤维素(M.C.)法、明胶浓集法、培养法和浓集低渗法。前两种方法计数是总淋巴细胞的微核率,而培养法是用PHA刺激淋巴细胞后进行的微核计数,所得结果是T淋巴细胞的微核率,可避免不分裂细胞的干扰。浓集低渗法是在M.C.法基础上,加低渗处理,使淋巴细胞核浆分明,便于微核的观察和计数^[5]。

3. 一些改进的微核检测法

人体淋巴细胞微核分析的应用常受到培养时细胞分裂增殖程度的限制。为此,Pin-

cu^[6]等提出了一种斑彩染色程序(Harlequin Staining Procedure)。Morley和Fenech^[7, 8]建立了淋巴细胞浆分裂阻断法,进行微核分析,可避免这种限制。为了更有效地区分微核和一些类似微核的胞浆颗粒, Hayashi等人^[9]用吡啶橙(Acridine Orange, A.O.)荧光染料代替Giemsa,使含有DNA的微核发绿色荧光,而其它颗粒发红色荧光(含RNA)或不发荧光。孔志明等^[10]的实验证明了荧光法和Giemsa法所得结果一致。

三、微核产生的剂量-效应关系

对于细胞中微核产生的剂量-效应关系的研究,已作了大量工作,其结果虽有差异,但总的趋势是统一的,即不同组织细胞,微核发生率在一定范围内均随剂量的增加而增加^[11~15]。

Evans在利用微核测定快中子的相对生物效应时,就得出微核率和照射剂量间存在着直线关系。作者认为,染色体的断裂是一击畸变和二击畸变混合作用所致,因此所产生的微核率应呈现出非线性的剂量-效应关系。Marshall^[14]用0~6Gy γ 线作研究,也认为微核和剂量间是线性平方关系,并在实验中得到证明。关于微核的剂量-效应表达式 $E = bD^n + C$ 是Countryman(1976)等在研究X线效应中提出的,他们的结果n值为 1.2 ± 0.1 ,和Evans的结果($n = 1.3 \sim 1.5$)较为一致。作者认为,大多数染色体畸变都是二击畸变,都伴有无着丝粒断片的产生,所以产生的微核能很好地反映二击畸变。Garriott^[16]等人用全身照射后的小鼠骨髓做实验,结果中子和 γ 线都呈现出线性平方的剂量-效应关系。然而, Aghamohammadi^[17]等人 and 国内一些学者的研究表明,微核的产生和剂量之间的关系是线性的。

在微核实验中,观察微核的时间对剂量-效应的正确判断也有一定影响,因为细胞不

断增殖,有微核的细胞会被“稀释”,微核也可能丢失。一般来讲,整体照射的动物,其骨髓PCE中微核率峰值出现在照后24小时^[16, 18],而照射离体外周血,培养后淋巴细胞微核峰值出现时间一般在72~96小时^[12, 17],即照后经历3~4个细胞周期^[19]。William^[20]对CHO细胞辐射所致微核的研究表明,微核出现的峰值时间是在第一次和第二次分裂之间,即照后24小时左右。总之,细胞的敏感性不同,照射剂量不同,微核峰值时间不是固定不变的。

四、微核和染色体畸变的关系

辐射可引起多种染色体畸变,这些畸变的大部分又是微核产生的基础,所以两者的关系很密切。Heddel^[4]认为,在分裂的细胞群体中,只要产生染色体畸变,就一定产生微核。Neary(1958)观察并比较了相同条件下微核和染色体断片率,发现微核率约为断片发生率的60%。作者认为,辐射产生的断片,有的几个组成一个微核,有的停留在不分裂的细胞中而不表现出来。这就使微核率低于断片发生率。Heddel(1977)和Pincu^[1]分别用扫描细胞分光光度计和染色体随机断裂模型,测定了微核的DNA含量,其结果和从染色体断片间接推算的结论相符,也定量地说明了微核和断片间的关系。Countryman等从染色体畸变形成机理的角度,结合染色体畸变和微核产生的剂量-效应模型、分割照射实验、染色体数目高于正常病人的微核分析,对染色体畸变和微核产生的关系作了理论上的深入研究,结果证明:①两者间的剂量-效应表达式是基本一致的;②两者均有相似的剂量分割效应;③染色体数目高于正常的细胞群,其微核产生也高于正常。这些结论都从不同侧面,阐明了两者的密切相关性。另外,Goetz等人的结果证明了骨髓中有微核的PCE和骨髓细胞染色体畸变也存在一定的相关性。白玉书等人认

为这种相关有两种可能性：①微核产生通过断片与染色体畸变相关；②微核产生通过照射剂量间接地与染色体畸变相关，而本身不一定与染色体畸变有关。

对于两者的关系问题，Hogstedt^[17,21]等人提出了不同看法，他们认为，微核和染色体畸变间的定量关系是不可能存在的。因为不是所有的染色体畸变都产生微核，所看到的微核又有20%不是染色体畸变产生的，而是来自整条染色体，和染色体畸变无关。所以，Aghamohammdi认为，微核试验只能粗略地估计那些可引起细胞死亡的损伤。

对于SCE和微核的关系，Raj^[22]和Larsne^[19]各做了一些实验，虽然结果是SCE随微核率的增高而增加，但它们产生的机理和细胞学意义是不同的，只是各自独立地反映出诱变因子的效应。

五、微核分析在放射损伤研究中的应用

微核分析呈快速测定染色体损伤的方法，虽然它不如染色体畸变分析敏感，但由于此法具有较多的优点，目前在放射损伤及辐射细胞遗传学研究中仍被广泛应用。

1. 作为生物剂量计代替染色体分析

辐射引起的染色体损伤，作为生物剂量计是得到承认的，在职业照射和事故照射的剂量估算方面起着重要作用。微核的产生是基于染色体畸变，理论上是否可以和染色体畸变一样作为生物剂量剂。为了证实这一点，必须要满足：①微核发生率随剂量增加而增高，两者间有定量关系的表达式；②整体效应和离体效应的一致性；③掌握微核形成动力学特点及时间参数。如上所述，对于①、③点的研究结果表明，基本上得到满足。而对于第②点，国外尚无报道，国内有的学者用狗做了在整体和离体条件下， γ 线诱发淋巴细胞微核的比较，证明了整体和离体效应相当一致。最近，杨家宽等利用微核试验，对

我国事故照射5.22Gy的急性放射病病人作剂量估算，结果和测得的物理剂量几乎相等。综上所述，用微核作为生物剂量计是可行的，也是大有希望的。但基于下面三种原因：①剂量-效应不稳定；②缺乏获得最大效应的标准化培养时间；③低剂量时，自发率相对高，不易看出微核与剂量的关系，微核作为生物剂量计尚有一定限制^[23]。

2. 作为放射损伤评价和诊断指标

资料表明，微核发生率和辐射剂量有很好的相关性。所以，受照机体细胞中微核率的高低，可以反映损伤效应的严重程度。受照剂量愈大，损伤愈重，微核率也就愈高。对于某一受照个体，照后不同时间，微核率也有变化。对急性受照病人的随访观察表明，照后初期淋巴细胞微核率最高，后期降低。反映了初期的严重损伤到后期得到一定的修复。因此，外周血中淋巴细胞微核的检测，对于了解机体损伤情况及照后恢复过程有实际意义。在放射损伤诊断方面，微核也起着一定的作用。Rugh在1964年就提出了微核可作为照射的辅助诊断指标。作者认为微核是核碎片，在正常人和动物外周血中很少见到，当受照后，敏感的淋巴细胞遭到破坏，使血中淋巴细胞的微核明显高于正常，剂量愈大，微核就愈多。因此，作者提出，微核的出现可作为是否受到照射的依据及剂量大小的判定标准。我国在1980年发布的《放射病诊断标准及处理原则》中，将外周血淋巴细胞微核显著增加，作为诊断指标，自执行以来，令人满意。所以，在1986年及1988年颁发的放射病诊断标准中，仍将其列入。

3. 作为人群放射敏感性的检测指标及射线工作者健康普查指标

Huber^[24]认为，用染色体畸变分析，很难对较大人群作出放射敏感性的评价，因需大量人力和时间。而用微核方法可避免这些麻烦。敏感性高的人群，微核发生率也高，这对放射线工作者就业前检查是很有意义

的。通过调查和比较不同地区、不同民族、年龄、性别的人群微核率,可为该地区提供微核背景值。另外,在对广大放射线工作者健康普查中,由于工作量很大,微核分析法就更显得重要了。

4. 评价辐射防护剂和增敏剂的作用

骨髓或血细胞的微核率可以检测诱变因子的遗传毒理效应,也可以用于辐射增敏剂和防护药的筛选。Heddle 等人(1975)曾利用小鼠骨髓嗜多色性红细胞微核实验系统,对辐射防护剂作了研究,得出防护剂组的微核率比同一剂量的照射对照组明显降低。Olinici(1978)等人通过Ehrlich腹水细胞的辐射效应,评价了辐射增敏剂Ro-07-0582的增敏效果。结果表明,同一剂量下,增敏剂大大地提高了微核率。上述提示,可用微核实验筛选辐射防护剂和增敏剂。

5. 检测放疗后肿瘤反应及预后

目前对人体肿瘤放疗效果的预测,主要是根据肿瘤位置、大小、临床分型及分级、病人年龄等,但这不够准确。William 等人^[26]用微核分析测定了高LET和低LET对人原发肿瘤培养系统的RBE,从而直接评估肿瘤细胞的放射敏感性,预测肿瘤的放疗效果。这和Midaner^[25]的实验结果一致,Midaner通过实验建立了根据微核率估计的辐射存活和根据细胞克隆生成能力估计的存活之间的定量关系,用细胞的微核率代替繁琐的克隆生成,测定辐射存活效应,进而确定细胞的放射敏感性。

今后,微核分析法随着研究的深入,技术的改进,将会发挥更大的作用。

六、微核试验存在的问题

微核试验虽已广泛应用,但仍存在一些尚未彻底解决的问题。诸如:微核形成机理、准确剂量的剂量-效应关系、整体和离体效应的一致性以及检测微核方法的统一化等。这些问题的解决,有待进一步的动物实验。

参考文献

1. Pincu M, et al; *Int J Radiat Biol* 1985, 47:423
2. Högstedt B and Carlsson A; *Mutat Res* 1985, 156:229
3. Koichi I, et al; *ibid* 1980, 71:127
4. Heddle JA, et al; *ibid* 1983, 123:61
5. Högstedt B; *ibid* 1984, 130:63
6. Pincu M, et al; *ibid* 1984, 139:61
7. Fenech M and Morley AA; *ibid* 1986, 161:193
8. Fenech M and Morley AA; *ibid* 1985, 147:29
9. Hayashi M, et al; *ibid* 1983, 120:241
10. 孔志明,大石英恒; *细胞生物学杂志* 1981, 9:137
11. Muller WU and Streffer C; *Mutat Res* 1984, 125:65
12. Zsuzsanna AB, et al; *Radiat Biol* 1986, 49:719
13. Masatoshi K, et al; *J Radiat Res* 1985, 26:41
14. Marshall I and Bianchi M; *Int J Radiat Biol* 1983, 44:151
15. Marshall I; *ibid* 1983, 44:163
16. Gariott ML, et al; *Mutat Res* 1982, 105:157
17. Aghamohammadi SZ, et al; *ibid* 1984, 130:395
18. Koichi I, et al; *ibid* 1981, 90:163
19. Lasne C, et al; *ibid* 1984, 130:273
20. Willian A, et al; *Cell Tissue Kinet* 1985, 18:247
21. Högstedt B, et al; *Hereditas* 1983, 98:105
22. Raj AS and Heddle JA; *Mutat Res* 1980, 78:253
23. Huber R, et al; *ibid* 1983, 111:105
24. Huber R, et al; 8th International Conference of Radiation Research (1987), 1:230
25. Midaner J, et al; *Int j Radiat Biol* 1980, 38:237
26. William AB, et al; *Radiat Res* 1985, 104:S-290