

淋巴细胞胞浆分裂阻滞微核技术及其应用前景

中国医学科学院放射医学研究所 唐卫生综述 王知权 白玉书*审

提 要:淋巴细胞胞浆分裂阻滞微核法是检测人及动物细胞在Cyt-B作用后形成的双核CB细胞中的微核,它克服了常规培养微核法在细胞动力学上存在的问题,确保检测第一次分裂后细胞中的微核。该法比常规培养微核法准确、敏感,预计不久将有可能取代常规培养微核法。

微核技术作为检测染色体损伤的遗传毒理学短期测试法,已广泛用于对环境中的理化因子的监测。虽然方法简单、快速、可靠,但其敏感性和准确性相对较低。常规培养淋巴细胞微核法是检测全部转化细胞中的微核,其中也包括一部分未转化细胞,这样势必降低方法的敏感性和结果的准确性,为解决这一细胞动力学问题,人们在不断地探索新技术。1974年,Pincu等将5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)掺入到培养的人体外周血淋巴细胞中,用FPG染色鉴别分裂细胞^[1]。八十年代中期,Fenech和Morley首次使用细胞松弛素B(Cytochalsin B, Cyt-B)建立了人淋巴细胞胞浆分裂阻滞微核法(Cytokinesis-block micronucleus method)^[2],简称CB微核法。该方法克服了常规培养微核法的缺陷,并且在研究不同剂量X射线照射后CB细胞微核剂量效应关系、探讨在人外周血淋巴细胞中建立生物剂量计、分析肿瘤病人放射治疗前后CB细胞微核的变化,以及评价理化因子的遗传毒理效应等方面已初步取得了一些有意义的结果。目前,CB微核技术越来越受到人们的重视。

一、CB微核法的原理、方法及影响因素

Cyt-B为杂环化合物,分子式 $C_{29}H_{37}NO_5$,是一种真菌(Helminthosporium dematioidium)的代谢产物,一般情况下比较稳定,溶于二甲亚砜(DMSO)中,4℃

下可贮存三年。Cyt-B具有一种特殊效应,低浓度的Cyt-B有刺激核分裂而抑制细胞质分裂的作用,超过一定剂量,则细胞膜破裂。此外,Cyt-B还能抑制细胞的运动,但用正常培养液洗涤后仍能恢复正常。具体用法是将Cyt-B溶于一定浓度的DMSO中,于-40℃~-70℃保存,作为储存液,需用时融化,用生理盐水稀释成所需浓度的工作液。实验研究证实,Cyt-B不会诱发淋巴细胞微核^[2]。

从染色体无着丝粒断片学说的传统观点来看,这些断片由于没有着丝粒,不能被纺锤体牵向两极,因而不能纳入子细胞中,成为游离于胞浆中的微核。此时阻滞胞质分裂,则出现双核细胞。CB微核技术应用Cyt-B阻止细胞质内微丝的聚合,从而阻滞胞质分裂,形成双核。于培养的细胞第一次分裂结束之前加入Cyt-B,细胞质分裂被阻滞,形成双核细胞,如果二次胞质分裂阻滞,则形成3核或4核细胞。为保证检测第一次分裂后细胞,只记数双核细胞中的微核。

CB微核法是将人体外周血的全血或分离淋巴细胞接种在含有小牛血清、适量植物血凝素(PHA)的RPMI1640培养基中,于37℃恒温培养至细胞进入M₁期时,加入一定浓度的Cyt-B,继续培养至72小时,终止培养。经低渗、固定、制片、Giemsa染色后显微镜下观察,每份标本至少观察1000个胞浆完整的双核CB细胞,记录双核CB细胞中的微核数。近来亦有报道小鼠外周全血、分离淋巴细胞及动物细胞株如CHF细胞、V₇₉

细胞等用于CB微核检测, Cyt-B加入时间及处理时间由受检细胞而定, 制片过程与上述大致相似^[2~5]。记录微核的标准参考Countryman PI和Heddle JA (1976)^[6]及Heddle JA (1978)的方法^[7], CB细胞微核的出现率属泊松分布^[8], 可用相应的统计学方法处理。

CB微核法成败的关键在于要有尽可能多的第一次分裂双核CB细胞 (M_1 双核CB细胞), 记录分析 M_1 双核CB细胞中的微核。

由于Cyt-B具有特殊效应, 在微核实验中, Cyt-B的浓度对观察CB细胞微核具有一定影响。Carter于1967年发现Cyt-B的浓度为 $0.5\mu\text{g/ml}$ 时即可阻止胞浆分裂, $1\mu\text{g/ml}$ 时作用更完全。Wright于1972年报道完全抑制胞浆分裂的浓度为 $2\sim 4\mu\text{g/ml}$, Fenech采用全血分离淋巴细胞培养, 使用浓度为 $3.0\mu\text{g/ml}$ 的Cyt-B得到满意结果^[2]。蒋本荣等^[9]对全血培养CB微核方法学进行探讨时提出, 在全血及 1ml 培养体系的条件下, 当Cyt-B浓度低于 $6\mu\text{g/ml}$ 时, 双核CB细胞很少 ($0\sim 4.0\%$); 浓度达到 $6\mu\text{g/ml}$ 时, 双核CB细胞上升到 $45\sim 51.3\%$; 而高于此浓度, 未见双核CB细胞相应增加, 从而确立 $6\mu\text{g/ml}$ 浓度是获得大量双核CB细胞的最适浓度。这一浓度比Fenech报道的浓度高, 作者认为, 可能是全血培养淋巴细胞间杂有红细胞、粒细胞等, 减少了淋巴细胞与Cyt-B接触的频度, 所以要获得大量的双核CB细胞, Cyt-B浓度要适当增加。

Mitchell和Norman^[10]指出, 对于微核分析必须考虑细胞动力学的影响。实验研究证实, 处于 G_0 期的淋巴细胞经植物血凝素(PHA)刺激后, 进入不同时相^[11], 培养至40小时时, 淋巴细胞处于第一细胞周期; 48小时时, 第一次分裂周期细胞与第二次分裂周期细胞各占 50% ; 66小时时, 80% 的淋巴细胞处于第三分裂周期^[12]。由于培养条件及个体差异等因素影响, 细胞进入 M_1 期的时

间不同, 因此要获得 M_1 双核CB细胞, 加Cyt-B的时间必须在培养的淋巴细胞进入 M_1 期之前。而Köksal等^[13]的研究结果表明, CB细胞微核率不受加Cyt-B时间的影响。

Migliore等^[14]对全血培养和全血分离淋巴细胞培养进行了比较, 提出全血培养是检测化学药物诱发离体血淋巴细胞CB微核的较好方法。微量全血培养操作简单, 且获得的双核细胞多、形态好^[8]。我们在实验中也发现, 全血分离淋巴细胞培养制片后, 有的细胞成堆, 胞浆界限不清, 带来识别上的困难, 以至影响结果的准确性, 而采用全血培养制片后, 细胞胞浆丰富, 形态完整, 分散良好。

Fenech等对40例年龄 $21\sim 84$ 岁的健康人群CB细胞自发微核率进行检测, 发现随年龄的增加, CB细胞自发微核率呈近似指数增加。回归曲线表明, 以每年 4.3% 的比率增加, 从 2% 上升至 100% ^[2]。而Prosser等^[8]对14例年龄 $21\sim 45$ 岁健康人群的自发CB细胞微核率的检测发现, 个体间无明显差异, 自发CB细胞微核率的范围在 $10\sim 18\%$, 并认为年龄对CB细胞微核率无影响。

二、CB细胞微核的剂量效应关系

为了正确评价淋巴细胞微核测定在辐射防护中的应用价值, 首先要了解微核率的剂量效应关系。对于细胞中微核产生的剂量效应关系已进行了大量研究, 并取得一定结果^[15~17], 但仍不甚满意。Prosser^[8]提出了常规培养微核在细胞动力学上的不确定性。CB微核方法的建立, 解决了上述问题。

1985年, Fenech等应用CB微核法对CB细胞微核产生的剂量效应关系进行了研究^[2, 18, 19]。人离体血淋巴细胞经 0 、 1 、 2 、 3 、 4Gy X射线一次性照射后诱发的CB细胞微核数与受照剂量呈直线关系, 剂量效应直线回归方程 $Y = 0.51D - 0.11$ (Y : 500个CB细胞中的微核数; D : X射线剂量)。随

后又研究了不同剂量率(0.5Gy/min, 4Gy/min)的小剂量0、5、10、20、40cGy X射线照射人离体血淋巴细胞诱发的CB微核, 4Gy/min照射组, 最少记录500个CB细胞中的微核, 结果表明, CB法能探测到10cGy X射线照射($P=0.01$), 且所致的微核剂量效应关系呈明显的线性关系; 0.5Gy/min照射组, 于CB细胞中至少记录45个微核, 结果表明, CB微核法能探测到5cGy X射线照射($P=0.028$), 且所致的微核剂量效应关系亦呈线性。局部分次放射治疗的肿瘤患者外周血淋巴细胞CB微核率随照射累积剂量的增加而增大, CB微核率(Y)与等效全身累积剂量(X)间呈线性正比关系, 直线回归方程 $Y=75.8X+49.5$ ($r=0.78$, $P<0.0001$)^[20]。Karmas等^[21]研究了剂量为0.05~4Gy X射线照射时CB微核的剂量效应关系, 得出CB微核率与剂量间呈线性平方关系。

三、CB微核技术的应用前景

1. 为辐射防护提供一个稳定、可靠的生物剂量计

利用生物学指标作为生物剂量计, 必须具备二个条件, 一是与受照剂量有严格的定量关系, 二是整体效应与离体效应的一致性。大量的研究已证实, 电离辐射诱发的淋巴细胞染色体畸变可作为可靠的生物剂量计, 但小剂量照射后染色体畸变率低, 检查数百甚至上千个细胞才有可能获得有统计意义的结果。Pohl-Puling等^[22]实验研究表明, 产生末端缺失明显增加的最低剂量为0.1Gy。淋巴细胞微核用于电离辐射生物剂量计的研究, 具有简便、快速的特点, 已受到人们的重视, 并积累了许多关于辐射诱发淋巴细胞微核的剂量效应关系资料^[15~17], 但常规培养微核由于受到(1)剂量效应关系不稳定; (2)低剂量照射时, 自发率相对高; (3)缺乏获得最大效应的标准化时间等因素的限制, 作为生物剂量计还存在一些问题^[23]。Huber

^[24]提出, 常规淋巴细胞培养微核分析, 测定X射线剂量下限为0.3Gy。Fenech等应用CB微核法与常规培养微核比较, 研究不同年龄健康人的CB微核改变, 确认CB微核法比常规培养法敏感, 且容易探测到0.1Gy X射线照射诱发的微核, 剂量效应间呈良好的线性关系。因此, 灵敏的CB微核技术有希望成为一种稳定、可靠的生物剂量计, 但仍需进一步深入研究。

2. 用于肿瘤患者放疗前、后的监测

淋巴细胞微核用于评估肿瘤细胞的放射敏感性、预测肿瘤的放射治疗效果已取得了可喜的结果^[25]。观察单纯放射治疗的中段食管癌病人, 发现肿瘤患者在放射治疗过程中, 外周血淋巴细胞微核率和累积剂量间呈线性正比关系, 直线回归经最小二乘法处理, 具有显著意义^[26]。由于CB微核法比常规培养微核法灵敏、准确, 更适合肿瘤患者放疗前、后的监测。经局部分次放射治疗的肿瘤患者, 外周血淋巴细胞CB微核率随照射累积剂量的增加而增大, 放疗结束后, CB微核率逐渐下降, 3个月后下降至放疗结束时的91% (± 11); 6个月后下降至72% (± 13); 12个月后下降至57% (± 10)^[20]。因此, CB微核技术为指导肿瘤治疗提供了有益的信息, 对病程的评估有一定的价值。

3. 评价检测因子的遗传毒理效应

Migliore等研究了不同抗肿瘤药物长春花碱(VCR)、丝裂霉素C(MMC)和环磷酰胺(CPA)加 S_0 活化时诱发CB细胞微核率, 结果表明, 对于三种药物, CB细胞微核率均呈剂量依赖性增加。小鼠腹腔注射抗癌药Diaziquone(DIQ)诱发外周血淋巴细胞CB微核, 结果表明, 在给予DIQ2.5~10mg/kg体重范围内, CB细胞微核率亦呈剂量依赖性增加^[4]。

CB微核技术在评价电离辐射的损伤效应, 监测长期接触有害理化因子的高危人群等方面起了很大的作用, 尤其是最近对受检

因子细胞动力学效应的研究引起了人们的重视[3, 21]。

四、结 语

综上所述, 淋巴细胞胞浆分裂阻滞微核技术在辐射防护研究中显示了极大的优越性。

1. CB微核法与常规培养微核法相比, 同样具有方法简单、快速、技术要求不高的优点。

2. CB微核法只记录双核CB细胞中的微核, 它克服了常规培养微核法由于受淋巴细胞转化程度的限制, 不能识别一次核分裂后的细胞, 而造成结果不准确的缺点, 使实验结果的重复性得到明显提高, 为自动化分析提供了有利条件。

3. 避免了各实验室由于实验条件不尽相同, 造成测定结果的差异, 提高了各实验室微核测定结果的可比性, 易于实现检测微核方法的统一化。

4. CB微核法比常规培养微核法更敏感。

但由于该方法建立时间短, 仍有许多问题需要进一步的研究, 如年龄对CB细胞微核率的影响, 微核形成的机理等。由于CB微核法的本底值较高, 不利于研究低LET小剂量电离辐射效应。另外, CB微核法的影响因素较多, Cyt-B价格较贵, 可能限制了它的推广应用。

参 考 文 献

1. Pincu M, et al; *Mutat Res* 1984, 139:61
2. Fenech M and Morley AA; *Mutat Res* 1985, 147:29
3. Erexson GL, et al; *Mutat Res* 1987, 178:117
4. Krishina G, et al; *Mutat Res* 1989, 222:63
5. Doeer CL, et al; *Mutat Res* 1989, 222:191

6. Countryman PI, et al; *Mutat Res* 1976, 41:321
7. Heddle JA, et al; *Cancer Res* 1978, 38:2983
8. Prosser JS, et al; *Mutat Res* 1988, 199:37
9. 蒋本荣等; 军事医学科学院院刊 1990, 14:132
10. Mitchell JC and Norman A; *Int J Radiat Biol* 1987, 52:527
11. Brown RA, et al; *Exp Cell Res* 1980, 126:87
12. Jeffery D, et al; *Radiat Res* 1987, 111:511
13. Koksai G, et al; *Radiat Prot Dosim* 1989, 29:209
14. Migliore L, et al; *Mutat Res* 1989, 227:167
15. Muller WU, et al; *Mutat Res* 1984, 125:65
16. Masatoshi K, et al; *J Radiat Res* 1985, 26:41
17. Marshall I, et al; *Int J Radiat Biol* 1983, 44:163
18. Fenech M and Morley AA; *Mutat Res* 1985, 148:99
19. Fenech M and Morley AA; *Mutat Res* 1986, 161:193
20. Fenech M, et al; *Int J Radiat Biol* 1990, 57:373
21. Karmas C, et al; *Mutat Res* 1988, 199:31
22. Pohl-Puling JP, et al; *Mutat Res* 1983, 110:71
23. Huber R, et al; *Mutat Res* 1983, 111:105
24. Huber R, et al; *Mutat Res* 1983, 111:185
25. Midaner J, et al; *Int J Radiat Biol* 1987, 52:521
26. 云南动物细胞研究所辐射细胞组; 遗传学报 1978, 5:142