

用集落形成技术反应胚肝定向干细胞形成集落的生理特性,而利用 $^3\text{H-TdR}$ 的参入实验则表明胚胎时期造血细胞的代谢功能,两者彼此呼应,相互衬托具有重要作用。

从不同细胞数量对 $^3\text{H-TdR}$ 参入实验发现,随着细胞数量的增加,其参入活性亦明显增加。在 $5 \times 10^4$ — $1 \times 10^6$ 个细胞/毫升的范围内,放射性核素的计数/分与植入的细胞数量之间呈线性关系。与我们以前的动物实验的规律是相似的<sup>[4]</sup>。其次,从这种线性关系上可以发现细胞浓度为 $1 \times 10^6$ 个/毫升时, $^3\text{H-TdR}$ 参入良好,对选择最适培养浓度是有利的。

一些资料表明<sup>[1,9]</sup>,在正常生理条件下,胚肝在红细胞生成过程中发挥较大的作用,在5个月以后,代谢率出现迅速下降。其标记指数分别为:骨髓45%、胸腺40%、肝脏38%、脾脏30%。虽然各种细胞均匀地处于周期的不同时期,而从形态学和自显影证明 $^3\text{H-TdR}$ 参入计数的变化反映了各种造血组织的代谢功能和生理特性。 $^3\text{H-TdR}$ 参入计数高的样品,表明细胞处于幼稚阶段,也提示干细胞的数量较多,能够合成较多的DNA,故增殖代谢旺盛, $^3\text{H-TdR}$ 参入计数低者,表明细胞处于成熟阶段,增殖能力差。

在胚胎发育时期,肝、脾、胸腺、骨髓都是造血器官,而且大部分淋巴细胞仍处于未成熟阶段,故对胚胎细胞移植所引起的GVH反

应比移植同种骨髓为轻<sup>[10-12]</sup>。我们所选的以前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ 引产的胎儿与自然流产及剖腹产的胎儿造血组织的功能相同。 $\text{F}_{2\alpha}$ 无毒性,安全,因此可提供胚胎移植的干细胞,如果各个医院都能采用前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ 引产,结合干细胞的收集与冷冻措施,在移植物的来源和细胞数量方面都是乐观的。采用引产后的新鲜组织培养效果则更好。

### 参 考 文 献

- [1] Hassan M. M. et al., 1979, *Brit. J. Haematol.*, 41:477—487.
- [2] Moor M. A. S. et al., 1970, *J. Cell Physiol.*, 75:181—192.
- [3] Moor M. A. S. et al., 1967, *J. Exp. Med.*, 126:715—726.
- [4] 汪涛等, 1981, 细胞生物学杂志, 3(1): 32—34.
- [5] 汪涛等, 1979, 生理学报, 31(4):328—335.
- [6] 苏州医学院卫生系第三教研组, 1978, 生物化学与生物物理学报, 10(1):51—58.
- [7] Squires D. J. P., 1975, *Brit. J. Haematol.*, 29:89—97.
- [8] Boyum A. et al., 1972, *Blood*, 40:163—171.
- [9] Rowley P. T., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:984—988.
- [10] 吴祖泽, 1980, 中华血液学杂志, 1(1): 56—58.
- [11] Thomas E. D. et al., 1975, *New Eng. J. Med.*, 292:832—841.
- [12] Gale R. P. et al., 1976, *Lancet*, 2:921.

## 体外辐射对淋巴细胞微核出现率的稳定性研究

王天宇 杨丽君

(南京医学院七〇九研究组)

在辐射损伤、药物筛选、肿瘤防治等有关课题研究领域内,应用微核率观察其效应,已经受到了研究工作者的广泛重视<sup>[1-8]</sup>。我们在人外周血细胞体外经受 $^{60}\text{Co}\gamma$ -线不同剂量照射、不同培养时相观察的微核出现率效应的研

究中<sup>[9]</sup>,从受检对象的实验资料的统计分析看到,无论是作为总体或是作为分开的个体,在所选定的评价指标( $Y_{\text{I}}$ 、 $Y_{\text{总}}$ 、 $Y_{\text{淋}}$ )上,其淋巴细胞微核率与一定的辐照剂量之间,均呈正比线性关系。为了更确切地了解细胞微核指标稳定

性问题,我们进行了这方面的实验观察工作。现将有关研究结果报告如下。

**材料和方法**

为了考察细胞微核指标稳定性问题,我们在同年度间隔半年时间,进行了两次总体设计完全相同的实验。按照辐射遗传学要求,将所选取的6名健康男性个体分作两组: I (ABC), I (ADEF), 其中A个体在两次实验研究之中都有。以离体血作为研究样本,在恒温(37±0.5℃)条件下,以江苏省肿瘤防治研究所 Canada<sup>60</sup> 钴点源治疗机,源距瓶底血膜100厘米作

垂直照射,剂量率在第一次实验为70.05拉德/分,第二次实验为64.59拉德/分。两次实验条件中除受照时的剂量率略有差别外,其它均相同,所有培养用液体均系一次配定的。实验中,采用微量血细胞培养方法<sup>[10]</sup>,经0—500拉德不同剂量照射的血样本各自分装入下列统一的培养体系:

- RPMI-1640(日本产) 4.0毫升
- pH 调测至 7.35
- 2% PHA (广州医药工业研究所) 0.1毫升
- 小牛血清(上海市食品公司) 1.0毫升
- 肝素抗凝全血 0.3毫升

**表1 实验 I (ABC) 取样, 50 小时培养物细胞微核观察统计\* (百分率±泊松标准误)**

组别	受照剂量 (拉德)	观察淋巴 细胞数	微核出现数						总的微核出现率	出现微核的淋 巴细胞率
			I	II	III	IV	V	VI		
			Y <sub>I</sub>							
1	0	8000**	9 0.112±0.038	1					11 0.138±0.041	10 0.125±0.040
2	10	12000	68 0.567±0.069	3	1				77 0.642±0.073	72 0.600±0.071
3	30	12000	144 1.200±0.100	5	2			1	166 1.383±0.107	152 1.267±0.103
4	50	10250	261 2.546±0.158	15		1			295 2.878±0.168	277 2.702±0.162
5	80	12000	444 5.700±0.176	25					494 4.117±0.185	469 3.908±0.180
6	150	9100	744 8.176±0.300	69	7	1			907 9.967±0.331	821 9.022±0.315
7	300	10000	1623 16.230±0.403	323	48	2	1		2426 24.260±0.492	1997 19.970±0.447
8	500	7100***	1216 17.127±0.491	383	87	12	1	1	2302 32.422±0.676	1700 23.944±0.581

\* 微核出现数中 I、II……VI,表示每个淋巴细胞中查见的微核数分布。统计项 Y<sub>I</sub>、Y<sub>总</sub>、Y<sub>淋</sub>中所列百分率±泊松标准误,表2、表4均同此例说明。

I
Y <sub>I</sub>
9
0.112±0.038

表1中“ I ”为淋巴细胞胞质中含有一个微核的细胞数。

“ 9 ”为8000只淋巴细胞中见到含有一个微核的细胞9只。

“ 0.112 ”为%(均值)。

“ ±0.038 ”为标准误。

\*\* A、B、C 每份样本计数细胞达4000个为限。对照组培养物缺C,因加液不慎翻倒。

\*\*\* 除500拉德照射组A样本只观察计数到800个淋巴细胞外,其它均计数至2000个以上。23瓶培养物中计数淋巴细胞达4000个的共17瓶,占73.91%。

混匀后放入 37℃(隔水式)温箱直立静置培养 50 小时,每瓶培养物中加入 0.5 微克秋水仙素溶液后,继续恒温 4 小时,应用本实验室建立的细胞经低渗膨胀的微核制片观察法,进行细胞微核的制片操作<sup>[11]</sup>。其要点为:①加入培养底物约三倍量的 0.06M KCl(经 37℃ 预温)的溶液,混匀后在 37℃ 水浴中 8—10 分钟,作低渗处理。②低渗结束时即滴入 1:3 的甲醇冰醋酸固定液约 1.0 毫升,轻吸均匀后低速离心。③留取沉淀下来的培养物,在加入上述新鲜配制的固定液后,适时打散培养物细胞,使其均匀分布。制得的细胞微核片经 Giemsa 染色后,油镜下顺序检查,观察,分析,记录。统计资料用百分率±泊松标准误差出,数值列至小数点后三位,进位法参考有关文献,所列分析项目均用最小二乘方加权回归配线法作实验研究配线<sup>[12,13]</sup>。

## 结果和讨论

实验资料以在淋巴细胞中查见一个微核的出现率( $Y_I$ ),并把同剂量组所观察到的总的微核出现率( $Y_{总}$ )及出现微核的淋巴细胞率( $Y_{\#}$ ),共列作三项统计指标,且以其统计值作实验配线。实验 I (ABC)与实验 II (ADEF)各自作为样品总合的统计资料及三项主要指标的配线方程比较,见表 1、2、3 所列。对间插在两次实验之中的个体 A 的观察资料,以同样的三项主要指标作了统计分析比较,见表 4、5 所列。此外,实验中的 B、C、D、E、F,作为分开的个体,我们也作了观察资料的统计及其对三项主要指标的配线方程比较。

结果具有相对地稳定性。以 50 小时培养物

表 2 实验 I (ADEF) 取样, 50 小时培养物细胞微核观察统计\*

组别	受照剂量(拉德)	观察淋巴细胞数**	微核出现数						总的微核出现率	出现微核的淋巴细胞率
			I	II	III	IV	V	VI		
			$Y_I$						$Y_{总}$	$Y_{\#}$
1	0	15100	37 0.245±0.040	2					41 0.272±0.042	39 0.258±0.041
2	10	15500	61 0.394±0.050	1					63 0.406±0.051	62 0.400±0.051
3	30	16000	127 0.794±0.070	1					129 0.806±0.071	128 0.800±0.071
4	50	16000	163 1.019±0.080	8	2				185 1.156±0.085	173 1.081±0.082
5	80	16000	435 2.719±0.130	30	3				504 3.150±0.140	468 2.925±0.135
6	150	16000	1194 7.462±0.216	137	13	2			1515 9.469±0.243	1346 8.412±0.229
7	300	10950	1531 13.982±0.357	247	28	8	2	VI*** 1	2159 19.717±0.424	1817 16.594±0.389
8	500	13800	2411 17.471±0.356	560	188	42	9	5	4338 31.435±0.477	3215 23.297±0.411

\* 注同表 1。

\*\* A、D、E、F 每份样本计数细胞达 4000 个为限。此栏中,实验 I (ADEF),淋巴细胞观察数均计数达 2000 个以上。32 瓶培养物中计数其淋巴细胞达 4000 个的共 24 瓶,占 75.00%。

\*\*\* 此剂量组 A 观察到有一个淋巴细胞胞质中含 8 个微核。

表3 两次实验三项主要指标的配线方程比较\*  $Y = a + bD$

细胞微核 指标	实验 I (ABC) 微核指标的统计分析				实验 II (ADEF) 微核指标的统计分析			
	$b \pm S_b$ $\times 10^{-4}$	配合 适 度			$b \pm S_b$ $\times 10^{-4}$	配合 适 度		
		$\chi^2$	df	P		$\chi^2$	df	P
$Y_I$	$4.36 \pm 0.38$	2.289	5	$0.75 > P > 0.50$	$3.68 \pm 0.34$	1.976	5	$0.90 > P > 0.75$
$Y_{总}$	$6.59 \pm 0.42$	1.508	5	$0.95 > P > 0.90$	$5.34 \pm 0.65$	3.541	5	$0.75 > P > 0.50$
$Y_{淋}$	$5.44 \pm 0.34$	1.432	5	$0.95 > P > 0.90$	$4.44 \pm 0.44$	2.220	5	$0.90 > P > 0.75$

\* 方程中系数 a 经验证  $a = a_0 = 0$ , Y 值以百分率表示。D 指受照剂量, 以拉德计。

表4 两次实验中 A 样本细胞微核观察中三项主要指标统计\*

组 别	受照 剂量 (拉德)	观察 淋巴 细胞 数	实验 I A			实验 II A			
			$Y_I$	$Y_{总}$	$Y_{淋}$	$Y_I$	$Y_{总}$	$Y_{淋}$	
1	0	4000	7 $0.175 \pm 0.066$	7 $0.175 \pm 0.066$	7 $0.175 \pm 0.066$	4000	12 $0.300 \pm 0.087$	12 $0.300 \pm 0.087$	12 $0.300 \pm 0.087$
2	10	4000	22 $0.550 \pm 0.117$	24 $0.600 \pm 0.122$	23 $0.575 \pm 0.120$	4000	23 $0.575 \pm 0.120$	23 $0.575 \pm 0.120$	23 $0.575 \pm 0.120$
3	30	4000	51 $1.275 \pm 0.178$	69 $1.725 \pm 0.208$	57 $1.425 \pm 0.189$	4000	36 $0.900 \pm 0.150$	36 $0.900 \pm 0.150$	36 $0.900 \pm 0.150$
4	50	4000	106 $2.650 \pm 0.257$	118 $2.950 \pm 0.272$	111 $2.775 \pm 0.263$	4000	40 $1.000 \pm 0.158$	43 $1.075 \pm 0.164$	41 $1.025 \pm 0.160$
5	80	4000	137 $3.425 \pm 0.293$	153 $3.825 \pm 0.309$	145 $3.625 \pm 0.301$	4000	109 $2.725 \pm 0.261$	134 $3.350 \pm 0.289$	120 $3.000 \pm 0.274$
6	150	4000	312 $7.800 \pm 0.442$	369 $9.225 \pm 0.480$	339 $8.475 \pm 0.460$	4000	291 $7.275 \pm 0.426$	384 $9.600 \pm 0.490$	335 $8.375 \pm 0.458$
7	300	4000	704 $17.600 \pm 0.663$	1030 $25.750 \pm 0.802$	855 $21.375 \pm 0.731$	2800	376 $13.428 \pm 0.692$	498 $17.786 \pm 0.797$	428 $15.286 \pm 0.739$
8	500	800	174 $21.750 \pm 1.649$	368 $46.000 \pm 2.398$	256 $32.000 \pm 2.000$	4000	723 $18.075 \pm 0.672$	1377 $34.425 \pm 0.928$	985 $24.625 \pm 0.785$

\* 注同表1。

为例, 在 0、10、30、50、80、150、300、500 拉德各剂量照射条件下, 对我们选定的三项主要指标(即  $Y_I$ 、 $Y_{总}$ 、 $Y_{淋}$ )采用最小二乘方加权回归法配线, 结果反映了在实验中所列辐射剂量范围内, 均与受照剂量呈良好的正比线性关系, 表 3、5 所列各配线方程的配合 适 度 均 相 当 满 意, 对系数 b 作 u 检验也明确地肯定了这一

点。

研究表明: 实验 I (ABC) 与实验 II (ADEF) 作为各自实验的取样(A、B、C; A、D、E、F)总体, 其 50 小时培养所观察到的结果是相当的。也就是说, 人离体血细胞经  $^{60}Co\gamma$ -线不同剂量照射后, 50 小时培养物, 在两次 总 体 设计完全相同的实验之间, 其淋巴细胞微核出

表5 两次实验中A样本三项主要指标的配线方程比较\*  $Y = a + bD$ 

细胞微核 指 标	实验 I <sub>A</sub> 微核指标的统计分析				实验 II <sub>A</sub> 微核指标的统计分析			
	$b \pm S_b$ $\times 10^{-4}$	配合 适 度			$b \pm S_b$ $\times 10^{-4}$	配合 适 度		
		$x^2$	df	P		$x^2$	df	P
$Y_I$	$5.14 \pm 0.31$	1.082	5	$0.97 > P > 0.95$	$3.73 \pm 0.31$	1.550	5	$0.95 > P > 0.90$
$Y_{总}$	$7.05 \pm 0.67$	5.217	5	$0.50 > P > 0.25$	$5.66 \pm 0.52$	3.283	5	$0.75 > P > 0.50$
$Y_{淋}$	$6.05 \pm 0.42$	1.273	5	$0.95 > P > 0.90$	$4.54 \pm 0.43$	1.704	5	$0.90 > P > 0.75$

\* 注同表3。

现率, 在应用培养物细胞经低渗膨胀的微核制片观察条件下是稳定的。两次实验中,  $Y_I$ 、 $Y_{总}$ 、 $Y_{淋}$  指标相对应的配线方程比较分析, 没有显著性差异。反映了一致的规律性。它们不仅都符合直线方程  $Y = a + bD$  的模式, 在进一步统计运算后<sup>[12]</sup>, 实验 I (ABC) 与实验 II (ADEF) 这两次实验中相对应的统计指标 ( $Y_I$ 、 $Y_{总}$ 、 $Y_{淋}$ ) 均可以归并为统一的直线回归方程, 方程表式如下:

$$Y_I = 0.6545 + 0.0376D^*$$

$$Y_{总} = -0.7190 + 0.0678D$$

$$Y_{淋} = 0.0805 + 0.0508D.$$

(\*D: 表示受照剂量, 以拉德计。)

本实验研究证实了细胞微核指标(文中指  $Y_I$ 、 $Y_{总}$ 、 $Y_{淋}$ ) 在群体抽样中, 其离体血细胞经受一次较大剂量率照射后的两次实验观察(时间相隔半年), 与受照剂量之间的关系, 具有相对的稳定性; 间插在两次实验研究中的A样本, 其统计资料的分析, 也反映了这种相对稳定性特征。由此, 我们认为, 在辐射损伤、药物筛选、肿瘤防治等有关课题研究领域内, 应用细胞微核率观察其效应是应该肯定的, 是很有价值的, 也是值得推荐的。

在实验资料的分析中, 以  $Y_I$ 、 $Y_{总}$ 、 $Y_{淋}$  指标统计比较, 无论作为总体的 ABC、ADEF 以及 ABC 加 ADEF, 或者作为个体的 A、B、C; A、D、E、F, 均能以最小二乘方加权回归法配线, 系数 a 经检验均为  $a = a_0 = 0$ , 都符合  $Y = bD$  的直线模式方程, 其配合适度均相当满意。以

这 30 条配线方程来检验 A、B、C; A、D、E、F 的各受照剂量点的观察值(并考虑其泊松标准误差的点漂移因素)的落在实验配线 b 系数的 95% 可信限区内符合数的百分率。我们发现, 从统计资料的分析看到, D、E 在六人 7 次实验样本中所反映出来的符合数的百分率, 都处于较低的状态, A、B 的符合数的百分率则偏高。这种差异性明显地存在于个体之间。从间插在两次实验中的个体 A 样本资料统计分析中, 我们也可以看到这种误差问题的实际存在(见表 4, 5)。要是我们以实验 I<sub>A</sub> 的配线方程来估算 II<sub>A</sub> 的受照剂量, 用实验 II<sub>A</sub> 的配线方程来估算 I<sub>A</sub> 的受照剂量, 拿  $Y_{总}$  这一指标来说, 其剂量估算的误差变动范围在 99—137 拉德之间(以 500 拉德点为例); 其误差约在 20% 左右。若综合  $Y_I$ 、 $Y_{总}$ 、 $Y_{淋}$  三者考虑, 在实验 I<sub>A</sub> 与实验 II<sub>A</sub> 之间, 其剂量估算误差约在 20—25% 左右。基于本实验研究资料, 我们认为, 在应用细胞微核指标时, 也不能忽视存在着的个体差异因素和剂量估算中的误差问题。

## 参 考 文 献

- [1] 施立明等, 1979, 动物学报, 25(3):230., 26(2):121.
- [2] 邓承宗等, 1976, 遗传学报, 3(2):164.
- [3] 程文英等, 1981, 遗传, 3(3):11.
- [4] 白玉书等, 1981, 中国核学会辐射研究与辐射工艺学会第一届代表会议论文摘要汇编, 8:9.
- [5] Heddle, J. A. et al., 1975, Rad. Res., 61: 350.