论著

文章编号:1000-5404(2008)22-2124-04

低剂量X射线辐照小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的研究

褚 群[1],杨录军[1],庞学利[2],曹 佳[1] (第三军医大学:[1]军事预防医学院卫生毒理学教研室,[2]西南医院肿瘤科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨嗜多染红细胞微核率(frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes, fMNPCE)的流式细胞术检测法能否作为1种自动化方法用于检测早期生物低剂量辐照后遭受的遗传损害。**方法** 每天1次按0.05、0.10、0.40 Gy 3个低剂量X射线辐照小鼠,连续4次,各剂量各时间点为一动物辐照组;每次辐照20 h后采用流式细胞术检测骨髓fMNPCE,观察各时间点和剂量点的微核率动态变化,同时以传统显微镜方法作为对照进行比较。**结果** 流式细胞术和显微镜方法均在第1天的0.05、0.10、0.40 Gy辐照组检测到骨髓fMNPCE显著升高($P<0.05$),以后3 d的各剂量辐照组fMNPCE升高更为显著($P<0.01$);2种方法检测结果显示均有较好的剂量、时间依赖性,并呈显著正相关性($r=0.984$, $P<0.01$)。**结论** 骨髓fMNPCE可作为低剂量辐射条件下的辐射生物计量检测指标,并可用流式细胞术自动化检测。

关键词: X射线;嗜多染红细胞;微核;流式细胞仪

中图法分类号: R329-33;R331.22;R818.03 **文献标识码:** A

Automatic measurement of frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow after low-dose X-ray irradiation

CHU Qun[1], YANG Lu-jun[1], PANG Xue-li[2], CAO Jia[1] ([1]Department of Hygiene Toxicology, College of Preventive Medicine, [2]Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate whether flow cytometry used in measuring the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (fMNPCE) can be applied as an automatic method for the early detection of low-dose irradiation caused genetic damage. **Methods** BALB/c mice were irradiated with X ray at three single low-dose (0.05, 0.10, 0.40 Gy respectively) for consecutive 4 days, and the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (fMNPCE) 20 h after each irradiation in bone marrow cells were detected with either flow cytometry or traditional microscopy as control method. **Results** Both flow cytometry and microscopy exhibited significantly increased fMNPCE ($P<0.05$) after irradiation of 0.05, 0.10, 0.40 Gy on the first day and in the following 3 days. The fMNPCE detected by flow cytometry and microscopy showed a significant time- and dose-dependent manner and a positive correlation ($r=0.984$, $P<0.01$). **Conclusion** Flow cytometry for measuring fMNPCE can be used as an automatic bio-dosimetry under low-dose irradiation.

Key words: X ray; polychromatic erythrocytes; micronucleus; flow cytometry

微核实验自20世纪70年代中期创建以来,检测方法不断得到发展,其中自动化检测是该领域最具前景的发展方向[1,2]。随着核技术和放射技术在临床诊疗、能源开发、农业等领域中的广泛应用,人群多次、频繁地接触放射物变得越来越普遍。在早期快速、准确地检测出受辐照人员的辐射剂量,评估辐射危险度对其早期诊断和救治至关重要。我室前期采用吖啶橙染色方法结合单激光流式细胞术(Acridine orange-flow cytometry, AO-FCM)对微核自动化检测方法进行了初步研究[2],证实对大辐射剂量具有良好的诊断价值。本实验以模拟人频繁接触辐射线建立动物模型,采用流式细胞术检测小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率(frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes, fMNPCE),重点对低剂量、多次辐照的情况下,AO-FCM微核自动化检测方法是否仍能适用进行探讨,使这一方法更加完善。

基金项目: 国家杰出青年基金(30125037);全军医学科研"十五"计划杰出青年基金(01J014)
Supported by National Science Fund for Distinguished Young Scholars (30125037) and the Medical Research Project of the "Eleventh Five-Yean Plan" of PLA(01J014)

作者简介: 褚 群,女,山东省枣庄市人,硕士研究生,主要从事遗传毒理学方面的研究。E-mail: chuhaiqing325@126.com

通信作者: 曹 佳,E-mail: caojia@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2008-04-22;**修回日期:** 2008-06-10

1　材料与方法

1.1　实验动物与分组

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 124 只,体质量(20 ± 2)g,由本校实验动物中心提供。动物在标准环境下饲养 1 周,适应环境后进行实验。将 96 只小鼠换随机单位组设计分为 12 个不同剂量的辐照组,每组 8 只。另外,设阴性对照组 20 只,每次辐照 5 只,辐照 4 次;阳性对照组 8 只,每次辐照 2 只,辐照 4 次。

1.2　主要试剂和配制方法

环磷酰胺(Cyclophosphamide, CP,上海华联制药有限公司),小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所),戊二醛(中国医药集团上海化学试剂公司),EDTA-Na_2(中国成都化学试剂厂),吖啶橙、十二烷基硫酸钠(SDS)、Triton X-100 购于 Sigma 公司。

固定液:含 30 μg/ml SDS、体积分数 1% 戊二醛的索伦森缓冲液(Sorensen's buffer, 0.05 mol/L, pH 6.8);溶液 A:将 0.1 ml Triton X-100、8 ml 1.0 mol/L HCl 及 0.877 g NaCl 溶入 100 ml 蒸馏水中;溶液 B:由 37 ml 0.1 mol/L 无水柠檬酸、63 ml 0.2 mol/L 磷酸氢二钠、0.877 g NaCl、34 mg EDTA-Na_2 及 0.6 ml 1 mg/ml AO 水溶液组成[2]。

1.3　主要仪器和设备

流式细胞仪(XL 型,装备 15mW 氩离子单激光器,美国贝克曼库尔特有限公司),荧光显微镜(BX60 型,日本 Olympus 公司)。

1.4　各组处理方法

将小鼠装入特制的笼子内,用 X 射线(直线加速器产生)照射,照射距离 3.5 m,剂量率为 5 cGy,电子线 6 Mev。按 0(阴性对照组,施以假照射)、0.05、0.10、0.40 Gy 低剂量 X 射线辐照小鼠,连续 4 d。除阴性对照组外,各剂量辐照组在第 1、2、3、4 天的累积剂量分别为 0.05、0.10、0.15、0.20 Gy;0.10、0.20、0.30、0.40 Gy;0.40、0.80、1.20、1.60 Gy,共 12 个累积剂量点。每天各辐照组辐照处理后(含阴性对照组)20 h 采样检测。阳性对照组给予环磷酰胺,100 mg/kg,腹腔注射,24 h 后进行采样检测。

1.5　流式细胞术

1.5.1　采样　　颈椎脱臼法处死小鼠,取双侧股骨,用 1 ml 注射器吸取 400 μl 小牛血清将骨髓冲出,反复吹打制成悬液。每只动物的骨髓细胞逐一采样、固定、染色和检测。

1.5.2　细胞固定与染色　　取 0.2 ml 细胞悬液加入 5 ml 固定液,颠倒混匀后固定 5 min,300 × g 离心 5 min,去上清,细胞沉淀混悬于 0.2 ml 索伦森缓冲液(0.06 mol/L,pH 7.2)中。加入 0.4 ml 溶液 A 与 1.6 ml 溶液 B,在使用前置于冰上暗处,轻轻混匀,细胞于冰上暗处染色 30 min。300 × g 离心 5 min,去上清,细胞沉淀重新混悬于 0.5 ml 索伦森缓冲液。

1.5.3　流式细胞术(FCM)检测分析　　骨髓细胞经固定与染色后进行 FCM 自动化检测和分析。检测速度为(1 500 ± 500)个/s,每个样本检测 400 000 个细胞。采用 FCM 分析软件 WinMDI 2.8 进行分析。当分析 fMNPCE 时,在 DNA 荧光方向设置一阈值窗口,利用 WinMDI 统计功能,计算 fMNPCE、正染红细胞微核率(frequency of micronucleated normochromatic erythrocytes,fMNNCE)。按照前期我室报道的方法[3],联合应用 FS 与 FL1 区分正染红细胞(NCE)、含微核的正染红细胞(MNNCE)、嗜多染红细胞(PCE)、含微核的嗜多染红细胞(MNPCE)。

1.6　显微镜法检测 fMNPCE

将小鼠骨髓细胞涂片按常规方法固定后,Giemsa 染色,盲法阅片计数,每个样本计数 1 000 个 PCE[1]。

1.7　统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行分析。各剂量组和时间点的微核率结果之间均进行单因素方差分析;流式细胞术检测结果与显微镜方法检测结果的比较采用线性相关性分析。

2　结果

2.1　流式细胞仪检测小鼠骨髓 fMNPCE、fMNNCE

根据显示联合应用 FL1 与 FSC 2 个参数能够很好的区分各个细胞群,与阴性对照组相比,经环磷酰胺(CP)和 X 射线处理后,有核细胞所在区域的细胞密度下降,MNPCE 以及 MNNCE 所在区域的细胞密度增加,而阴性对照组的检测结果则显示 PCE 以及 NCE 的右侧没有出现明显的细胞群。阴性对照组和阳性对照组的 fMNPCE 分别为(2.11 ± 0.82)、(15.62 ± 1.64),差异显著(P < 0.01)。经 X 射线处理 20 h 后,随着剂量和辐照次数的增加,0.05 Gy 剂量组 fMNPCE 值由(3.01 ± 0.55)‰增至(13.77 ± 1.66)‰;0.10 Gy 剂量组由(4.58 ± 0.83)‰增至(17.71 ± 2.19)‰;0.40 Gy 剂量组由(11.12 ± 1.73)‰增至(22.17 ± 3.48)‰;每个剂量组的结果都显示出良好的剂量-效应和时间-效应关系(P < 0.05,P < 0.01,图 1、表 1)。fMNNCE 平均值也呈现相同的变化(表 2)。阴性对照组和阳性对照组的 fMNNCE 分别为(1.35 ± 0.59)、(3.21 ± 0.39),差异显著(P < 0.01)。

表 1　FCM 检测 X 射线照射后不同累积剂量小鼠骨髓 fMNPCE(‰, n = 8, $\bar{x} \pm s$)

剂量(Gy/次)	辐照次数			
	1	2	3	4
0.05	3.01 ± 0.55[a]	4.72 ± 0.95[b]	10.26 ± 2.09[b]	13.77 ± 1.66[b]
0.10	4.58 ± 0.83[cd]	6.42 ± 0.75[d]	11.77 ± 2.33[d]	17.71 ± 2.19[d]
0.40	11.12 ± 1.73[e]	16.43 ± 1.33[f]	21.85 ± 3.52[f]	22.17 ± 3.48[f]

a: P < 0.05,与阴性对照组(2.11 ± 0.82)比较; b: P < 0.01,与 0.05 Gy 剂量的其他辐照次数值比较; c: P < 0.05,与 0.05 Gy 剂量辐照 2 次值比较; d: P < 0.01,与 0.10 Gy 剂量的其他辐照次数值比较; e: P < 0.01,与 0.10 Gy 剂量辐照 4 次值比较; f: P < 0.01,与 0.40 Gy 剂量的其他辐照次数值比较

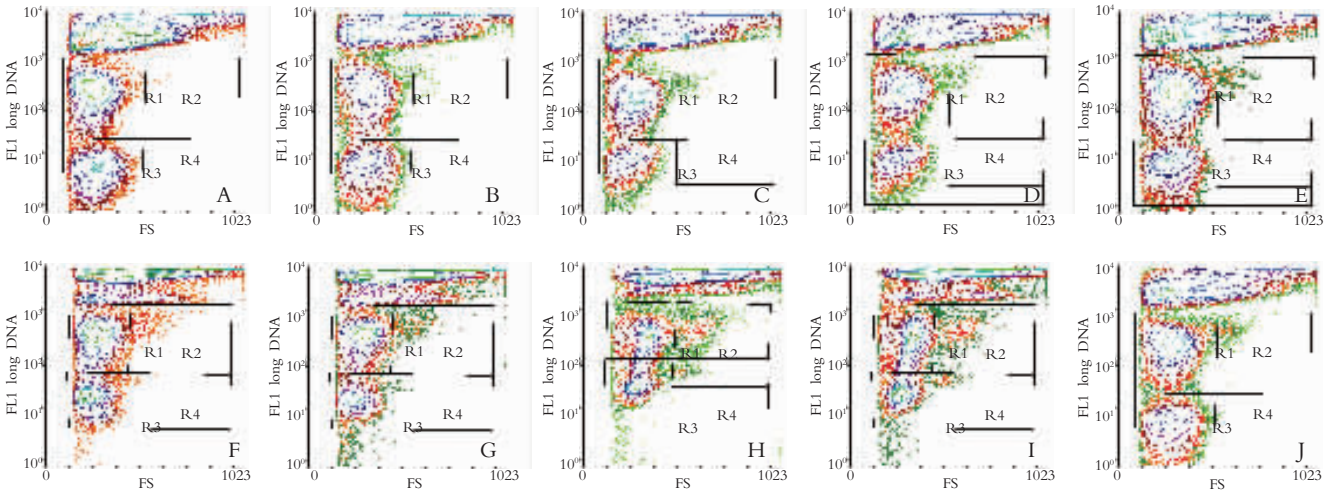
表 2　FCM 检测 X 射线照射后不同累积剂量小鼠骨髓 fMNNCE(‰, n = 8, $\bar{x} \pm s$)

剂量(Gy/次)	辐照次数			
	1	2	3	4
0.05	1.25 ± 0.30[a]	1.59 ± 0.36[b]	3.02 ± 0.54[b]	3.33 ± 0.72[e]
0.10	1.80 ± 0.29[d]	2.09 ± 0.64[d]	3.04 ± 0.55[d]	4.56 ± 0.95[d]
0.40	1.83 ± 0.44[e]	2.88 ± 0.34[e]	6.98 ± 1.42[e]	6.41 ± 0.91[e]

a: P < 0.05,与阴性对照组(1.35 ± 0.59)比较; b: P < 0.01,与 0.05 Gy 剂量且少于自身辐照次数的组别比较; c: P < 0.01,与 0.05 Gy 剂量辐照 1 次和 2 次值比较; d: P < 0.01,与 0.10 Gy 剂量的其他辐照次数值比较; e: P < 0.05,与 0.40 Gy 剂量的其他辐照次数值比较

2.2　显微镜人工方法检测骨髓 fMNPCE、fMNNCE

骨髓 PCE 经 Giemsa 染色后,细胞形态完整,形状以圆形或椭圆形为主,颜色显青蓝色,其中微核的颜色与有核细胞的细胞核颜色相同,常为紫红色或红色。PCE 内的微核大小不一,



R1:嗜多染红细胞;R2:含微核的嗜多染红细胞;R3:正染红细胞;R4:含微核的正染红细胞 A~I:分别为0.05、0.10、0.15、0.20、0.30、0.40、0.80、1.20、1.60 Gy累积剂量点;J:阳性对照

图1 X射线辐照后20 h小鼠骨髓细胞流式细胞术检测中各细胞群的窗口设置和分布

数量为每个细胞内1~2个,易于分辨。有核细胞的细胞质染成青蓝色,细胞核较大,成熟红细胞的细胞质染成桔红色[1]。骨髓细胞以有核细胞占多数,其次是PCE,成熟红细胞较少。同流式细胞仪检测结果一样,人工显微镜检测的结果显示fMNPCE与X射线处理剂量之间呈良好的剂量-反应关系及时间-效应关系(表3),阴性对照组和阳性对照组的fMNPCE分别为(1.49±0.54)、(13.8±1.97),差异显著($P<0.01$)。

表3 显微镜法检测X射线照射后不同累积剂量小鼠骨髓fMNPCE(‰,$n=8$,$\bar{x}\pm s$)

剂量(Gy/次)	辐照次数			
	1	2	3	4
0.05	2.26±0.59[a]	3.46±0.76	7.58±1.55[b]	10.59±1.72[b]
0.10	3.08±0.61[c]	4.35±0.50[d]	7.40±1.19[d]	13.21±1.78[d]
0.40	7.35±1.34[e]	13.55±1.3[f]	17.21±2.84[f]	18.11±3.12[f]

a:$P<0.05$,与阴性对照组(1.49±0.54)比较;b:$P<0.01$,与0.05 Gy剂量的其他辐照次数值比较;c:$P<0.05$,与0.05 Gy剂量辐照2次值比较;d:$P<0.01$,与0.10 Gy剂量的其他辐照次数值比较;e:$P<0.01$,与0.10 Gy剂量辐照4次值比较;f:$P<0.01$,与0.40 Gy剂量的其他辐照次数值比较

2.3 FCM检测结果与显微镜方法检测结果的比较

用2种方法检测所得经不同处理后,小鼠骨髓fMNPCE的全部数据之间具有正相关性($r=0.984$,$P<0.01$,图2)。

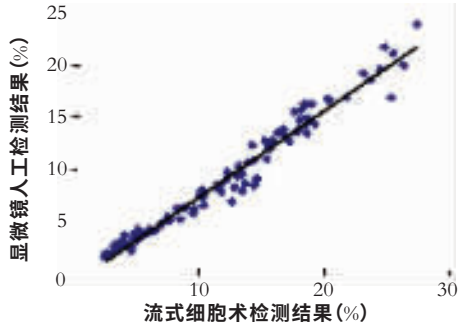


图2 显微镜人工方法和流式细胞术检测X射线照射后小鼠骨髓fMNPCE的相关性分析

3 讨论

我室采用Criswell等[3]建立的AO-FCM,已成功地对大剂量X射线诱导的小鼠的骨髓PCE和NCE的微核率进行了检测,结果显示流式细胞术的显示窗口及细胞群分布状态与Crswell等[3]基本一致。本研究主要是将剂量前移,采取低剂量、多次辐照,观察该方法是否可以更敏感地检测出低剂量放射损害。结果显示出良好的剂量-反应关系和时间-效应关系[3]。

结果显示小鼠接受0.05~0.10 Gy的低剂量辐照后,fMNPCE没有统计学差异。但接受多次辐照,累积剂量达0.15 Gy时,小鼠fMNPCE值急剧升高,与0.10 Gy出现显著性差异。可能因小鼠骨髓受到多次X射线损伤,达到自身耐受剂量阈值,使大量处于不同发育阶段红细胞受损[3],显微镜方法在低剂量0.05 Gy时能够检测出fMNPCE增加,无统计学意义。FCM却都能检测到良好的剂量反应关系并检测出fMNPCE出现轻度增加,这为FCM比显微镜方法更敏感、结果更可靠提供了实验依据[3]。实验结果0.4 Gy同时显示接受多次辐照后,微核率不再显著升高但保持在高平台水平,这一结果与我室前期工作结果相似[2],我们认为可能是随着X射线辐照累积剂量的增加,骨髓造血系统遭受反复辐照后受到破坏,出现PCE生成减少,从而导致含微核的PCE生成也减少。

从低剂量辐射FCM检测结果与显微镜法比较发现,FCM检测结果的fMNPCE值较高,可能2种方法判断PCE和NCE标准不同。人工显微镜工作量大,很难同一标准下阅片,从而低估MNPCE的实际值,降低微核实验的真实性。FCM法检测时,不成熟红细胞含

RNA,与 AO 结合,发出荧光,FCM 能够检测所有含 RNA 的荧光。Criswell 等[3]曾使用流式分选功能,对认定为 MNPCE 的区域进行分选和显微镜观察,结果 95% 以上细胞为含微核的细胞,证明流式仪方法是可靠的。

本实验对小鼠在低剂量、多次辐照后小鼠骨髓 fMNPCE 检测的结果显示,FCM 用于检测生物体遭受 X 射线低剂量辐射后的骨髓红细胞微核率具有灵敏性,FCM 检测骨髓红细胞微核率作为辐照后早期遗传损害的生物学指标具有应用价值。

参考文献:

[1] 曹　佳, 林　真(日本), 余争平. 微核试验——原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M]. 北京:军事医学科学出版社,2000.

[2] 胡冰冰, 杨录军, 刘胜学, 等. 流式细胞仪检测 X 射线诱导小鼠骨髓红细胞微核率的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(22): 2232 - 2234.

[3] Criswell K A, Krishna G, Zielinski D, *et al*. Validation of a flow cytometric acridine orange micronuclei methodology in rats[J]. Mutat Res, 2003, 528(1 - 2): 1 - 18.

(编辑　张　维)

文章编号:1000-5404(2008)22-2127-01

个案与短篇

经纤支镜冷冻取出支气管内义齿 1 例

杨　丽,王　霞,吴国明　　(第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

1　临床资料

患者,男性,64 岁。因"刺激性咳嗽、咯血、发热 13 d"入院。患者于 13 d 前睡觉时突然出现呛咳。之后逐渐出现刺激性咳嗽,咯血及发热,体温达 39.6 ℃。查体:右下肺呼吸音降低,未闻及干湿啰音。胸片示右主支气管走形区可见金属高密度影,右下肺部分不张伴感染(图 1),结合病史考虑系患者假牙及其牙套。入院后行纤支镜检查,见右中间支气管开口及管腔被一肉芽组织完全堵塞。用冷冻术去除表面肉芽,暴露出义齿及其固定器。将冷冻探头与义齿凝固,连成一体,使其与纤支镜镜身一并取出(图 2)。复查胸片示异物消失,病情好转。



图 1　义齿误入右主支气管患者的 X 线胸片



图 2　误入患者右主支气管的 4 颗义齿及其固定器

2　讨论

支气管异物早期明确诊断和治疗十分重要。纤支镜取异物的方法患者痛苦小,经济方便,疗效好[1]。常用的纤支镜下取异物的工具为异物钳,但需根据异物的性质及部位不同而采取不同的方法。对于质地硬、体积大、尤其表面有肉芽生长的异物(如本例中的 4 颗义齿),采用纤支镜异物钳则不能取出。因为异物钳不能直接钳出有肉芽生长的义齿,且不能将坚硬的义齿夹住。本例患者所采用的纤支镜引导下冷冻取异物的方法可去除其表面肉芽,将冷冻探头与巨大义齿一并凝固,连成一体,与纤支镜镜身一并取出,从而避免取异物时因异物巨大或肉芽生长困难而采取手术治疗。因此,经纤支镜冷冻法对于取出支气管内异物是一种可靠的方法,尤其对于常规异物钳取支气管内牙齿、花生等不易夹住的异物时,具有独特的优越性,值得进一步在临床工作中推广。

关键词: 异物;支气管;纤支镜

中图法分类号: R768.4　　**文献标识码:** B

参考文献:

[1] 陈圣光. 纤支镜取支气管异物体会[J]. 临床肺科杂志,2007, 12(1): 26.

(编辑　王　红)

作者简介:杨　丽,女,重庆市人,电话:(023)62008457;E-mail:E - mail:yangli_018@ sina. com

通信作者:吴国明,E-mail:guoming_wu@ sina. com

收稿日期:2008-09-27;**修回日期:**2008-10-10