DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.05.002

γ-射线诱发人淋巴细胞微核形成与细胞周期关系的初步研究*

刘胜学 曹佳 杨录军 程天民** 钱频 庞学利*** (第三军医大学预防医学系分子毒理实验室)重庆,630038

提 要 本研究用γ-射线诱发人外周血淋巴细胞微核(MN),使用细胞周期控制、BrdU免疫荧光染色、松胞素B(CB)阻滞胞质分裂等技术,研究人淋巴细胞微核形成与细胞周期间的定量关系。结果:①G_0期和G_1期淋巴细胞照射组和对照组相比,微核率(MNF)和微核细胞率(MNCF)均无明显变化($P>0.05$)。②S期和G_2期淋巴细胞照射组和对照组相比,MNCF均明显增加($P<0.01$)。(3)M期淋巴细胞照射组与对照组相比,MNF与MNCF分别增加90多倍和70多倍。结论:在人淋巴细胞周期中S期和G_2期可形成MN,但M期是形成MN的主要阶段。

关键词 人淋巴细胞;细胞周期;微核;γ-射线;BrdU掺入

中图法分类号 R329.24

近年来,微核实验已广泛用于环境中各种理化因子的致癌、致突变评价,以及用于人群健康的监测[1,2]。但是有关微核(Micronuclei,简称MN)形成机制,至今仍有许多细节尚不清楚。本研究以人外周血淋巴细胞为材料,研究不同剂量γ-射线照射后,淋巴细胞MN形成与细胞周期之间的定量关系,以了解MN形成的机理。

1 材料与方法

静脉血样均采自本室3名健康男性工作人员(26~32岁)。使用本校西南医院^{60}Co治疗机室温下照射血样,剂量率0.45 Gy/min。

1.1 G_0期淋巴细胞MN

每个血样照射后,均分为两组,一组在室温下(15℃±)放置1.5 h,另一组在37℃下放置5 h,然后按薛开先介绍的方法制片[3],Giemsa染色。镜下计数1000个淋巴细胞及其MN/血样,计算微核细胞率(Micronucleus cell frequency,简称MNCF)和微核率(Micronucleus frequency,简称MNF)。由于外周血淋巴细胞为不分裂细胞,属G_0期,本组未加培养基和PHA,故放置1.5 h和5 h后仍属G_0期。

1.2 G_1期淋巴细胞MN

血样照射后,按常规方法培养,24 h收获细胞,低渗制片[4]。染色与镜检同前。由于本组已加入RPMI1640培养基和PHA,淋巴细胞开始转化。但人淋巴细胞在PHA刺激后第一次分裂期不早于24 h[4],以及辐射可诱发细胞分裂延迟,故本组培养时间限制在24 h,转化细胞均应属于G_1期。其判断标准是:细胞体积较G_0期细胞增大约1倍,胞质增多,胞核疏松,可有核仁出现。

1.3 S期、G_2期淋巴细胞MN

血样照射后,培养至44h时收获细胞。在培养至38~40 h时加入终浓度为0.08~0.12 μg/ml的秋水仙素,以阻滞细胞进入下一个细胞周期。于收获细胞前20 min加入终浓度为30 μmol/L的溴脱氧尿苷(Bromodeoxyuridine,简称BrdU)作脉冲掺入,制片同上。

BrdU免疫荧光染色参见Kramer的方法[5]。第一抗体使用小鼠BrdU抗体(Serva),第二抗体使用抗人FITC抗体(Sigma),PI配染细胞核,荧光显微镜观察。镜下BrdU掺入的淋巴细胞和MN(S期)显示黄绿色荧光(FITC荧光),未掺入BrdU的淋巴细胞和MN(未在S期)显示红色荧光(PI荧光),分别计数和计录之。

1.4 M期淋巴细胞MN

血样照射后,细胞培养同前,但在培养40 h时加入终浓度为6 μg/ml的松胞素B(cytochalasin B,简称CB),72 h收获细胞,制片和染色均同G_1期。由于CB能阻止胞质分裂,但不影响胞核分裂[6],因此人淋巴细胞在完成第一次有丝分裂后(M期),两个姊妹核将出现在同一胞浆里,出现特有的双核细胞。镜下仅计数双核细胞及其MN,即为细胞第一次有丝分裂(M期)MN形成情况。

2 结果

2.1 G_0期MN发生率

G_0期MNF和MNCF结果见表1。经方差分析$P>0.05$,说明随着辐射剂量的增加,G_0期MNF和MNCF与对照相比并无相应地增加,放置1.5 h和5 h结论相同。证明G_0期细胞不能形成MN。

* 全军"八五"青年科学基金资助项目

** 防原医学教研室 重庆,630038

*** 附属西南医院肿瘤科 重庆,630038

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　辐射诱导的人淋巴细胞 G_0 期 MN 发生率

Tab 1　MN frequencies in G_0 phase of human lympocytes induced by irradiation

Dose (Gy)	No. of groups	No. of lymphocyte scored	1.5 h		5 h	
			MNF(‰)	MNCF(‰)	MNF(‰)	MNCF(‰)
0	3	3000	3.00±0	2.67±0.58	0.33±0.58	0.33±0.58
0.1	3	3000	2.33±0.58	2.33±0.58	1.00±1.00	1.00±1.00
0.5	3	3000	2.33±3.21	2.00±2.65	0.67±0.58	0.67±0.58
1.0	3	3000	3.00±1.73	2.67±1.15	2.00±3.46	1.00±1.73
3.0	3	3000	5.00±2.65	3.00±2.00	0.67±1.15	0.67±1.15
5.0	3	3000	6.33±2.52	5.67±2.89	1.50±1.05	1.33±0.58

2.2　G_1 期 MN 发生率

G_1 期 MNF 和 MNCF 结果见表 2。经方差分析 $P>0.05$，说明 G_1 期辐射剂量组与空白对照相比，无显著差异，G_1 期淋巴细胞也不能形成 MN。

表 2　辐射诱导的人淋巴细胞 G_1 期 MN 发生率

Tab 2　MN frequencies in G_1 phase of human lymphocytes induced by irradiation

Dose (Cy)	No. of groups	No. of lymphocyte	MNF(‰)	MNCF(‰)
0	3	3000	2.00±1.00	1.67±0.58
0.5	3	3000	1.67±1.53	1.33±1.15
1.0	3	3000	3.67±1.53	3.33±1.53
3.0	3	3000	2.67±1.53	2.67±1.53
5.0	3	3000	2.67±2.08	2.67±2.08

2.3　S、G_2 期 MN 发生率

由于是在收获前作短暂(20 min)脉冲 BrdU 掺入，故掺入细胞(主核掺入)应为 S 期细胞，而未掺入细胞且体积较 S 期掺入细胞大 1 倍者(4N)应为 G_2 期细胞，分别计数 S 期、G_2 期细胞和 MN 数及 BrdU 掺入情况，结果见表 3。与对照组相比，照射组的 MNCF 有显著地增加($P<0.01$)见表 4。可见，S 期、G_2 期淋巴细胞可形成 MN。

表 3　S、G_2 期 MN 的 BrdU 标记情况

Tab 3　The distributions of MN labelled with BrdU in S and G_2 phase of human lymphocytes

Treatment	S phase (yellow)				G_2 phase (red)		
	No. of MNs	No. of labelled MN (yellow)	No. of unlabelled MN (red)	Special kind[1)]	No. of MNs	No. of labelled MN (yellow)	No. of unlabelled MN (red)
Control	29	6	22	1	32	0	32
5 Gy	82	22	58	2	101	1	100

1)Two MNs in one cell, one labelled (yellow)and another unlabelled(red)

表 4　辐射诱导的人淋巴细胞 S、G_2 期 MN 发生率

Tab 4　MN frequencies in S, G_2 phase of human lymphocytes induced by irradiation

Cell cycle	Treatment	No. of groups	No. of lymphocyte scored	No. of micronucleated cell	MNCF (‰)
S	Control	3	1546	29	18.60±4.16
	5 Gy	3	2422	82	31.27±5.76**
G_2	15.60±5.24	Control	3	2145	32
	5 Gy	3	2613	101	37.93±4.88**

**：$P<0.01$

2.4　M 期 MN 发生率

本组双核淋巴细胞的 MNF 及 MNCF 见表 5。照射后，MNF 和 MNCF 均随剂量增加而极显著地增加($P<0.001$)，并且与剂量呈良好的正相关性(相关系数 γ 均大于 0.99)。结果表明 M 期可产生大量 MN。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表5 辐射诱导的人淋巴细胞M期MN发生率

Tab 5 MN frequencies in M phase of human lymphocytes induced by irradiation

Groups	dose (Gy)			
	0	1.0	3.0	5.0
MNF(‰)	12.33±4.04	113.33±25.38	419.00±30.51	1144.33±37.58
MNCF(‰)	10.33±2.08	101.33±24.54	359.33±23.44	769.00±17.35

3 讨论

MN主要由染色体断片或细胞分裂时滞后丢失的整条染色体形成，MN必须通过细胞分裂(M期)才能形成，这是目前学术界比较普遍的看法[1]。但是，近年来有部分学者观察到间期细胞核有核芽突形成、延伸、连丝断裂，直至形成"典型"MN(形态上)的一系列中间过程[7,8]，国内薛开先还证实MN可在G_0、G_1、S、G_2、M期各阶段直接形成[4]，这提示可能还存在其它一些MN形成途径。本研究利用一些细胞周期研究的新技术，对MN形成与细胞周期的关系进行了更深入的研究。

我们对G_0和G_1期MN的定量分析表明，不管照射剂量增大，还是孵育时间延长，照射组MNF、MNCF与空白对照组相比均无明显变化。说明G_0和G_1期均不能形成MN。这与薛开先的结果并不一致[4]。他在4 Gy照射人外周血后，同样放置1.5 h和5 h，发现MNF有显著的增加($P<0.01$)；培养24 h的G_1期，MNF增加更显著。但增幅也仅是从对照的0.25‰～0.33‰增加到1.29‰～2.45‰。由于凋谢小体(apoptosis bodies)与MN在形态上有些类似[9]，故这中间是否有凋谢小体被误记为MN，尚不清楚。

BrdU是TdR的结构类似物，可替代TdR掺入到DNA链中。由于我们仅作了20 min的脉冲标记，故掺入了BrdU的细胞核和MN必然正处于S期，而此时未掺入而胞体又大于掺入细胞1倍者则应是G_2期细胞。在我们的结果里，MNCF在S和G_2期都显著增加($P<0.01$)。这说明S期和G_2期细胞有MN形成。1978年Jensen[10]在研究小鼠骨髓嗜多染红细胞细胞动力学时，曾推测体内红细胞MN形成于S期和G_2期。本实验在体外人淋巴细胞严格控制细胞周期的情况下，从定量上再次证实了间期细胞S和G_2期可形成MN。

S期和G_2期细胞属于间期细胞，细胞尚未分裂。因此，该阶段MN难以用染色体断片和染色体丢失形成来解释，而只能设想是以核芽突形式直接形成。但是，在主核标记的S期细胞里，仅有27%的MN同时被标记，而高达73%的MN未被标记，这似乎又与MN以核芽突方式形成相矛盾。在此合乎逻辑的解释可能有2种：①部分MN具有自己的细胞周期，并与主核不同步。因而当主核被标记时，MN尚未开始DNA合成。②另一种可能是MN虽与主核同步，但仅部分MN具有DNA合成能力，这样也可解释部分MN被标记、部分MN未被标记的现象。非常有趣的是，我们还在G_2期细胞中观察到1个标记MN，这正好说明了该MN不仅与主核不同步，而且还落后于主核进行DNA合成，从而支持了我们上述的分析。

对于在有丝分裂期MN的形成数量，双核细胞观察法证实，随着辐射剂量的增加，MNCF得到了大幅度提高，并且呈现很好的正相关性，并可由此而建立很好的剂量－MNCF曲线回归方程(未显示资料)。在同样5Gy照射剂量下，其MNCF比对照组高出70多倍，即使排除可能在S、G_2期形成的MN(31‰～38‰)，M期形成的MN细胞数仍高达700‰以上，远远高于S期和G_2期形成的MN细胞数。因此，我们的结果从定量上证实了M期是MN形成的的主要阶段。说明经过有丝分裂，以染色体断片和细胞分裂时滞后丢失的整条染色体形成MN，的确是MN形成的最主要方式，但实验也证实间期细胞的S期和G_2期可有少量MN形成，从而间接证实了MN以核芽突方式形成途径的存在。在三个阶段(S期、G_2期、M期)所形成的MN，其生物学意义有何区别？还有待进一步研究。

参考文献

1 Heddle JA, Cimico MC, Hayashi M et al. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past Present and Futrre. Environ Mole Mutagen, 1991;18:277

2 曹 佳, Kliesch U, Nüsse M 等. 1,3－丁二烯多次吸入染毒后小鼠红细胞微核率的流式仪检测的研究. 第三军医大学学报, 1994;16(4):235

3 薛开先. 人体末稍血微核测试法的研究. 动物学研究, 1984;5(3):225

4 薛开先, 季国芳, 孙玉洁等. 人体全血辐射处理后不同放置和培养时间对微核率的影响. 遗传学报, 1986;13(5):397

5 Kramer J, Schaich－Walch G, Nusse M. DNA synthesis in radiation－induced micronuclei studied by BrdU labelling and anti－BrdU antibodies. Mutagenesis, 1990;5(5):491

6 Fenech M. The cytokinesis－block micronucleus technique:

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mut Res, 1993; 285:35

7 王天宇,杨丽君,周皓白.离体照射人外周血淋巴细胞诱发微核机理的探讨.中华放射医学与防护杂志,1983;3(5):28

8 Cao J, Zhuo JB. The significance and studies of mechanisms of micronucleus formations and several quantitative parameters measurements. Environ Mole Mutagen, 1989; 14(15): 33

9 张平夏.细胞程序死亡与T细胞发育.国外医学:免疫学分册,1993;3:136

10 Jensen D, Ramel C. Factors affecting the inductions of micronuclei at low doses of X－rays MMS and dimethylnitrosamine in Mouse Erythroblasts. Mut Res, 1978; 58:51

(收稿:1995-05-06;修回:1995-08-10)

Preliminary study of the relationship of cell cycle with micronucleus formation of human lymphocytes induced by gamma rays

Liu Shenxue, Cao Jia, Yang Lujun, Cheng Tianmin, Qian Pin, Pang Xueli (Laboratory of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The quantitative relationship of cell cycle with the micronucleus formation of the lymphocytes of human peripheral blood induced with gamma ray irradiation were studied with the control of cell cycle, bromodeoxyuridine (BrdU) immunofluorescent staining and blockade of cytoplasm division with cytochalasin B (CB). It was found that 1. The micronucleus frequency (MNF) and micronucleated cell frequency (MNCF) of C_{10} and C_{11} phases of the irradiated lymphocytes were not significantly different from those of the control ($P>0.05$); 2. The MNCF of S and C^{12} phases of irradiated lymphocytes was significantly higher than that of the control ($P<0.01$) and 3. The MNF and MNCF of M phase of irradiated lymphocytes were 90 times and 70 times higher than the control respectively. These findings suggest that a part of micronuclei can be formed in S and C^{12} phases of human lymphocytes and M phase is the main stage of micronucleus formation in the whole cell cycle.

Key words Lymphocyte/human; cell cycle; miconuclei; gamma rays; bromodeoxyuridine labelling

个案与短篇

虹睫炎糖皮质激素治疗引起酮症酸中毒一例报告

Report of a case of diabetic ketoacidosis induced by yglucocorticoids treatment of iridocyclitis

陈少军 王 一 (第三军医大学附属西南医院眼科)重庆,630038

患者,女性,28岁,农民。左眼红痛,畏光,流泪伴视物模糊3 d,1994年4月7日来我院求治。检查:左眼视力0.04,结膜混合充血(＋＋＋),角膜后kp(＋＋),前房Tyn(＋＋＋),虹膜纹理不清,指测眼压Tn,诊断为左眼急性虹睫炎。治疗:结膜下注射地塞米松2.5 mg加混合扩瞳剂(内含肾上腺素0.1 ml)0.4 ml,口服强的松10 mg 3/d,淡炎痛25 mg 3/d。结膜下注射后当时患者无任何不适,嘱次日门诊复查未至。3 d后患者因昏迷被抬入我院,以"高血压危象"收入心内科,当日内分泌科会诊后,急查血糖为28.6 mmol/L,尿酮体(＋＋＋＋),诊断为糖尿病酮症酸中毒,转入该科抢救。患者清醒后追问病史,否认有糖尿病史及糖尿病的临床表现,诊断为隐性糖尿病,现患者已康复出院。

讨 论

虹睫炎的病因可以为感染,也可以是一种过敏性反应;可以仅为眼部病变,也可以是全身病变的并发症之一。治疗原则为散瞳,激素消炎和抗菌控制感染。该患者的虹睫炎为隐性糖尿病的眼部并发症之一,眼科治疗所用皮质激素为正常治疗量,但因患者有隐性糖尿病,而皮质激素,肾上腺素均为升糖激素,故因总量大而引发血糖急剧升高,最后发展至酮症酸中毒[1,2]。本例患者的治疗体会是:(1)使用激素前要详细询问有无禁忌病史,如高血压,糖尿病,消化道溃疡,精神病,结核等病史,特别是糖尿病易忽视年轻患者;(2)对疑有糖尿病的患者应查血糖和尿糖及隐性尿糖试验;(3)注意观察用药后的反应,及时处理。

关键词 虹睫炎;酮症酸中毒

中图法分类号 R773.1

参考文献

1 池芝盛.糖尿病学.北京:人民卫生出版社,1982:261

2 罗华英.糖尿病酮症酸中毒——附153例分析.安徽医学,1992;2:13

(收稿:1994-09-18;修回:1995-07-28)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net