

证实, 在电离辐射中最易发生畸变的系列探针。这样, 一方面避免了探针选择的盲目性, 另一方面减少了漏检的染色体畸变数目。另外还要考虑到获得探针的可能性。

五、小 结

荧光原位杂交技术用于辐射的剂量-效应研究, 从现有的资料可以看出, 具有较好的剂量-效应关系, 且对于某些染色体畸变分析的准确性高于常规的分析方法, 与染色体畸变的G带分析, GPA分析等方法, 有较好的一致性。总之, 荧光原位杂交技术有望成为较理想的生物剂量计, 若再与其它分析方法配合, 对评价受照剂量将会有更高的准确性和可靠性。

参 考 文 献

- 1 白玉书. 国外医学放射医学核医学分册, 1990; 14(2):97-101
- 2 蕾开先. 国外医学遗传学分册, 1990; 13(5):230-234
- 3 Hakoda M et al. Mutat Res, 1988; 201(1):39-49
- 4 Langlais RG et al. Science, 1987; 236(4800):445-448
- 5 Pinkel D et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85(23):9138-9142
- 6 Lucas JN et al. Int J Radiat Biol, 1989; 56(1):35-44
- 7 Dutrillaux B et al. Mutat Res, 1985; 152(1):197-203
- 8 Meyne J et al. Mutat Res, 1989; 226(1):75-79
- 9 Stranme T et al. Health Phys, 1991; 60(1):71-76
- 10 Natarajan AT et al. Int J Radiat Biol, 1992; 61(2):199-203

电离辐射诱发哺乳动物生殖细胞染色体畸变

卫生部工业卫生实验所 王 冰综述
河北省放射卫生研究所 肖佩新审

摘 要: 由于核能的广泛应用, 辐射诱发生殖细胞染色体畸变的效应已成为 辐射 遗传学研究的重要课题。各种不同的电离辐射均可诱发生殖细胞内作为遗传基因载体的染色体畸变。两性生殖细胞的畸变可分为结构畸变和数量畸变两大类, 且具有很多常见类型。

生殖细胞染色体畸变是辐射遗传学中非常敏感的指标。由于发生了染色体畸变的生殖细胞有可能通过生殖过程传给子代, 而引起不育、半不育、胚胎早期死亡或遗传缺陷, 特别是某些基因突变能稳定地从一代传给下一代, 以至辐射对本代生殖细胞的遗传效应会在以后的许多世代中得到表现, 从而在一定程度上增加了人群的遗传负荷, 所以这种危害对子孙后代更大。电离辐射诱发的生殖细胞染色体畸变既用来作为估价辐射剂量有用的生物指标, 又是估价辐射远后效应的重要指标。当考虑电离辐射的遗传效应

时, 必须考虑到它对群体的遗传负荷的影响, 从潜在的遗传危险考虑, 探讨生殖细胞染色体畸变具有重要意义。

一、染色体数量畸变

(一)染色体丢失

单体型在人类和小鼠均可导致胚胎死亡。唯一例外是XO畸变, 可能存活, 很少引起不良后果, 同时用适当标志在表型上是可检出的。

1. 雄性生殖细胞

Russell等(1974, 1976年)用X射线

(照射量为 0.1548C/kg ,分单次或两次)诱发性染色体丢失的实验表明:单次或分次照射的效应间无显著差异;精子受照后诱发的X(或Y)染色体的丢失率(据直线性的假定)为 $0.8 \times 10^{-5}/R \cdot \text{配子}$;精原细胞受照后诱发率与对照组无显著差异。

2. 雌性生殖细胞

Russell WL等研究了总剂量为 0.1038C/kg (X或 γ 射线)对诱发雌鼠X染色体丢失的影响,得出结论:诱发X染色体丢失的照射量-频率为非线性关系;随着照射量率的减低,频率不断下降,低照射量率的诱发率极低;存在明显的间隔效应;照射量相对较低($1.29 \times 10^{-2}\text{C/kg}$)而照射量率较高的照射对诱发染色体丢失率微不足道。

Searle在用 2Gy 快中子照射雌性小鼠双线期卵母细胞的研究中,在测定的37例中得到肯定的和推测的XO各一例。

(二)染色体的增加

染色体数的增加是由第一或二次减数分裂不分离所致。辐射效应会导致染色体不分离。

1. 雄性生殖细胞

Szemere和Chandley以 1Gy 或 2Gy X线照射随机繁育的Q系小鼠,发现非整倍体细胞,特别是受照射的前细线期精母细胞不分离的频率 1Gy 为 4.5% , 2Gy 为 6.0% 。减数分裂其它阶段的频率都相对较低。对于三倍体胎鼠,推测是在精母细胞早期照射后产生的。

2. 雌性生殖细胞

Yamamoto等(1973年)认为 $1.29 \times 10^{-3}\text{C/kg}$ X射线辐照即可增加老龄雌鼠中的非整倍体胎鼠的发生率。之后,Gosden和Walters对其实验方法和结论提出了异议。

Uchida等(1974年)利用体外培养卵母细胞的技术,初步证明 $2.58 \times 10^{-3} \sim 7.74 \times 10^{-3}\text{C/kg}$ γ 射线辐照成年雌鼠可诱发不分离。之后,Uchida和Freeman,Russell和

Montgomery及Lüning等(1974~1977年)在此方面做了很多工作,认为不分离随照射量的增加而增加,老龄雌鼠卵母细胞的不分离率比幼龄的高。Uchida等也提出,在人类特别是高龄妇女,因诊断或治疗使母体腹部受X线照射,可导致三体型频率增加,且引起三体型子代的危险度随照射量的增加而增大。

二、染色体结构畸变

(一)倒位

Roderik等(1974,1976年)报道了首例由辐射诱发的小鼠性染色体倒位,并总结了倒位的鉴别方法。在已诱发的臂内倒位中,60%以上简单的常染色体倒位。小鼠雄性生殖细胞减数分裂后期的倒位诱发率低估值为 $3.4 \times 10^{-5}/R \cdot \text{配子}$ 。小鼠染色体均为近端着丝粒,所以大部分是臂内倒位。此外,Evans等(1975年)在受到X射线分次照射精原细胞的雄性小鼠后裔中,发现了一个X染色体倒位,并命名为In(X)1H。

(二)易位

由于易位是导致人类遗传危害的重要因素,故对该畸变在小鼠等实验动物中做了大量研究。自空气干燥法制作哺乳动物精母细胞减数分裂标本技术发明以来(Evans等,1964年),在哺乳类中辐照诱发易位的研究已经发表了大量论文。结果表明,电离辐射对成年鼠、家兔、豚鼠和金黄田鼠等的精子发生的各个阶段,卵母细胞后期以及胚胎时期均可诱发易位。雄性生殖细胞减数分裂后期比前期对辐射更敏感,尤以精子细胞最为显著。

1. 剂量-效应关系

(1)X和 γ 射线辐照

①雄性生殖细胞: Preston等^[1]在精原细胞的辐照实验中,在 $0 \sim 0.129\text{C/kg}$ X射线范围内得到的数据最适方程为: $Y = 1.08 \times 10^{-4}D + 5.00 \times 10^{-7}D^2$ (Y为易位频率,

D为照射量,下同)。在 0.1548C/kg 以上,易位频率下降。在整个剂量范围内出现一个峰形曲线。Pomerantzeva以及Searle等以 $2.58 \times 10^{-2} \sim 3.096 \times 10^{-1}\text{C/kg}$ 的 γ 射线诱发小鼠精原细胞易位,在 $7.74 \times 10^{-2} \sim 3.096 \times 10^{-1}\text{C/kg}$ 范围内的直线方程为: $Y = (0.225 \pm 0.086) \times 10^{-2} + (1.74 \pm 0.21) \times 10^{-5}D$, 并认为,易位产额随剂量率的降低而减少,当低于 $2 \times 10^{-4}\text{Gy/min}$ 时,这种现象已不明显,最低的诱发率可能不小于 $1 \times 10^{-7}\text{Gy}^{-1}$ 。对于雄性生殖细胞的其它时期,Searle曾报道急性X射线照射(性腺剂量 $0 \sim 12\text{Gy}$)成年小鼠诱发精子相互易位,表明精子的易位频率随剂量增加而增加,在较高的照射水平也不会降低,并给出方程 $Y = (2.25 \pm 1.03) \times 10^{-4}D + (3.09 \pm 1.26) \times 10^{-7}D^2$ 。

Fazylov等还研究了辐照诱发新生鼠雄性生殖细胞易位,表明在 $5.16 \times 10^{-3} \sim 1.032 \times 10^{-1}\text{C/kg}$ 范围内照射量-频率呈直线关系。目前虽对胎龄 $12 \sim 13.5$ 天雄性鼠诱发易位的实验结果并不一致,但就新生鼠与成年鼠生殖细胞的敏感性问题,均认为二者几乎无显著差异。

对于其它实验动物如金黄田鼠、豚鼠、兔、中国田鼠和猴,均可诱发精原细胞易位,但剂量-效应关系与小鼠不尽相同。

蔡露等^[2]以 $0 \sim 1.0\text{Gy}$ X射线全身均匀照射小鼠,得出精原细胞染色体易位率与剂量呈直线相关,方程式为: $Y = 0.1174 + 1.9386D$ 。

近年来,Matsuda等和Van Buul还先后用 γ 和X射线(均为 $0 \sim 1.0\text{Gy}$)照射食蟹猴和罗猴诱发精原细胞易位,均得到线性剂量效应关系。这种线性关系大都来自低剂量范围的实验,以往的实验及近年来Matsuda等^[3,4]对大于 1.0Gy 剂量的试验均符合二次方程。因此,目前许多学者(如Matsuda, Van Buul等)认为低剂量范围可能由于细

胞的死亡和生殖细胞生理变化而使剂量效应发生偏斜,将本应符合二次方程关系修饰为一种假线性关系。

②雌性生殖细胞: Gillivod等以 $1.29 \times 10^{-2} \sim 5.16 \times 10^{-2}\text{C/kg}$ X射线辐照小鼠,24h处死,制备卵母细胞的减数分裂染色体标本,在 $1.29 \times 10^{-2}\text{C/kg}$ 组的50个中期细胞中,有2个出现易位。Tsuchida等把核网期卵母细胞与双线期和中粗线期精母细胞的辐射敏感性作了比较,认为按异常细胞的总频率和畸变的类型来看,前者的敏感性略低于后者。

(2)中子辐照和RBE估算值

Muramatsu等用 2MeV 中子8种剂量 $0.24 \sim 2.67\text{Gy}$ 研究了诱发小鼠精原细胞相互易位的RBE值。中子的剂量-效应曲线在 0.94Gy 以下为直线,回归系数为 11.4×10^{-4} ,RBE值为4.2。Valentin以 14.5MeV 中子照射小鼠,剂量分别为 $0.75, 1.5$ 和 2.5Gy (剂量率 0.017Gy/min),精原细胞易位的剂量效应关系符合直线性。Bayrakova等^[5]曾报道以 4.1MeV 钷铍中子源低剂量率(约 $0.8 \times 10^{-3}\text{Gy/min}$)照射雄性小鼠诱发生殖细胞易位,当剂量小于 0.52Gy (3个剂量水平)时,剂量效应关系亦呈直线性,每增加 0.01Gy 则易位增加 3.3×10^{-4} ,剂量超出 0.52Gy 则易位不再增加。

2. 剂量率

在UNSCEAR 1972年报告书中,Searle等曾报道了照射剂量为 6Gy 的 γ 射线辐照,剂量率从 0.83Gy/min 降到 $2 \times 10^{-4}\text{Gy/min}$,易位亦随之减少。Pomerantzeva等指出,从 $1.8318 \times 10^{-1}\text{C}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ 减到 $1.806 \times 10^{-6}\text{C}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ 时,易位产额至少减少一个数量级,在 $7.74 \times 10^{-2} \sim 3.096 \times 10^{-1}\text{C/kg}$ 剂量范围符合直线的剂量效应关系。 $7.74 \times 10^{-7}\text{C}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ ($2.58 \times 10^{-2} \sim 2.3736 \times 10^{-1}\text{C/kg}$)时与 $1.806 \times 10^{-6}\text{C}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ 相比,未发现易位频率降低。Searle等得到精母细

胞诱发易位率为 $1.40 \times 10^{-3} \text{Gy}^{-1}$ ，此结果与前者的结果相近。

Bayrakova等^[6]总结了1985年以前各学者研究雄鼠精原干细胞受 γ 射线外照射的易位数据，指出在阈剂量率水平 $4.6 \times 10^{-2} \text{mGy/min}$ ， γ 射线外照射易位率预期值不超过 $2.36 \times 10^{-6} \text{mGy}^{-1}$ 。又用 0.9Gy 的 γ 射线，6个不同的剂量率（ $6.14 \times 10^{-3} \sim 6.14 \times 10^{-2} \text{mGy/min}$ ）照射小鼠。在高剂量率范围内，易位率（RT）与剂量率（P）符合公式： $RT\% = 0.335 \times P^{0.256}$

3. 分次照射

分次照射对易位频率的影响取决于照射剂量的大小和所用的分隔方式。

(1) 短间隔（小于24h）

根据Preston等^[7]的报道：短间隔照射效应总剂量在 6Gy 以下时，二个剂量间隔照射在2h以上，与一次照射剂量相比较，可出现易位的减少。当间隔等于或超过 $2.5 \sim 4 \text{h}$ ，则易位总数约与单次照射的总和相等。

(2) 中等间隔（24h~数日）

Buul等^[8]以 $1.548 \times 10^{-1} \text{C/kg}$ X射线单次或分次照射雄性小鼠，发现间隔24h的二次照射中，首次剂量的大小影响细胞对第二次照射时的反应程度。Cattanch等的实验支持上述结论。Lyon等以 3Gy γ 射线间隔24h照射精原细胞诱发易位的研究表明：重复照射会暂时增强诱发精原细胞对易位的耐受性。

Buul等^[9, 10]近年来的实验进一步表明：以24h间隔的X射线照射，钟型剂量效应关系曲线发生了改变，若先以小剂量照射，则易位率随着第二次剂量的增加而增加，其增加额超过单次急性照射时低剂量的外推值；若先以大剂量照射，则易位率低于小剂量在前的结果，但仍高于单次照射的结果。这是由于第一次照射剂量既作用于敏感性细胞，又作用于耐受性细胞；而第二次照射剂量主要对敏感性细胞起作用——这归因于精

原干细胞周期动力学的不同。

(3) 长间隔（数周）

Ford (1969年)和Pomerantzeva (1972年)对小鼠的实验表明：长间隔（8周或4周）分次照射诱发的精原细胞易位效应比相同剂量的一次急性照射后要强。

Preston等^[7]在实验（ $1.29 \times 10^{-1} + 1.29 \times 10^{-1} \text{C/kg}$ ）中发现，间隔18h的精原细胞易位产额等于根据预期相加的产额（40.7%比 $2 \times 17\% = 34\%$ ），但间隔48h则降为23.8%，直到间隔4周，仍基本保持在该水平。在大约间隔6周，又重新达到预期相加值（32%比 $2 \times 17\% = 34\%$ ）。作者以总剂量 $7.224 \times 10^{-1} \text{C/kg}$ X射线分7次照射雄性小鼠，每次 $1.032 \times 10^{-1} \text{C/kg}$ ，间隔8周，在这种照射条件下能满足细胞周期恢复的时间，并得到了产额的预期相加值。

UNSCEAR 1977年报告：X射线， γ 射线在精原细胞、精子细胞及卵母细胞中所诱发的染色体易位，其诱发率可表现明显的剂量率和分次照射效应。

三、影响生殖细胞染色体对辐射敏感性的一些因素

生殖细胞染色体对辐射敏感性受到动物种属、品系、基因型及不同发育阶段等多因素的影响。当照射量在 1Gy 以下时（仅比较剂量效应直线的回归斜率b值），以精原细胞染色体易位诱导为例，某些哺乳动物的敏感性依次为：狨猴（Saguinus）>人>仓鼠>食蟹猴、小鼠>兔>猕猴、狨（Callithrix）^[11]。不同遗传背景小鼠在辐射条件下存在着差异。Generoso等^[12]证实了X射线诱导染色体畸变在两个杂系小鼠精原细胞的差异。Buul等^[13]和Cattanach等^[14]也都做了这方面的报道。

对雌性生殖细胞，Tease等的实验表明：受照后四周内排出的卵子较为敏感，而以后再排出的卵子似乎并不敏感。随着照射

后时间的延长, 排卵前卵母细胞最敏感, 且不分离率有降低的趋势^[15, 16]。Russo等^[17]的实验表明: 雄性生殖细胞减数分裂前期是较敏感的, 尤以终变期最敏感, 而这一期和雌性的排卵前期相对应。

用染色体畸变评价辐射的遗传危险度, 其主要优点是较显性基因突变, 特别是隐性基因突变更容易评价辐射遗传效应。而通过对生殖细胞染色体畸变的观察, 对监测辐射所造成的遗传危害提供了直接观察的手段, 使细胞遗传学研究进入新的阶段。

参 考 文 献

- 1 Preston RJ et al. *Mutat Res*, 1973; 19: 215-223
- 2 蔡露等. 中华放射医学与防护杂志, 1988; 8(3):191-195
- 3 Matsuda Y et al. *Mutat Res*, 1984; 129 (3):373-380
- 4 Matsuda Y et al. *Muttat Res*, 1985; 151 (1):121-127
- 5 Bayrakova A et al. *Mutat Res*, 1976;

- 34:159-162
- 6 Bayrakova A et al. *Mutat Res*, 1987; 176(1):53-58
- 7 Preston RJ et al. *Mutat Res*, 1976; 36: 333-344
- 8 Buul PPV et al. *Mutat Res*, 1974; 25: 361-365
- 9 Buul PPV et al. *Mutat Res*, 1980; 70 (1):95-101
- 10 Buul PPV et al. *Mutat Res*, 1984; 127 (1):65-72
- 11 于文儒. 国外医学放射医学核医学分册, 1989; 13(3):110-113
- 12 Generoso WM et al. *Mutat Res*, 1985; 152(2/3):217-223
- 13 Buul PPV et al. *Mutat Res*, 1986; 173 (1):41-43
- 14 Cattanaach BM et al. *Mutat Res*, 1987; 176(1):69-71
- 15 Tease C. *Mutat Res*, 1982; 105(1/2): 95-100
- 16 Tease C. *Mutat Res*, 1985; 151(1): 109-119
- 17 Russo A. *Mutat Res*, 1983; 108(1/3): 359-372

(上接第44页)

光能发射488nm和514nm两种激发光线, 所以在激发兰/绿荧光体如FITC(最大激发波长492nm)时效率很差。不过, 比值测定法的原则允许两种标记的测量效率存在较大的差异, 这是因为可以通过选择标记抗体的比活性使产生的信号比近乎一致。所以, 从这个意义上讲, 氩源激光激活Texas Red的低效率并不是主要的障碍。最初的研究表明, 在非最佳条件下, 当扫描区域为50 μm^2 时, 这种仪器能测到每 μm^2 约25个FITC标记的和/或Texas Red标记的IgG分子。

微点免疫分析还需研究抗体偶联到固相支持物上的机制。通过比较一些以微点方式设计和以常规方法设计时分析的表现, 证实了上面叙述的理论概念。尽管非最佳化, 但比值测定微点分析显示的灵敏度很接近常规的最佳化的IRMA的灵敏度。

总结与结论

由于过去在精密度、灵敏度、精确度等概念上的混乱, 一些错误的概念目前已掺入到一些公认的免疫方法设计的规则中, 特别是习惯上使用超过需要的较大的抗体浓度以获取高的分析灵敏度。

原则上限制在非常小区域上(以微点的形式)的小量感受器抗体分子, 结合使用非常高比活性的“显示”抗体探针来测量感受器抗体上被分析物占据数目的方法, 可获得高的灵敏度。相信微型化的抗体微点分析是下一代分析技术的基础, 对于应用结合分析的所有领域可能具有革命性的效应。

[*Clin Chem* 1991; 37(11): 1955~1967

(英文)秦秋平节译 林 汉校]