

放射線對細胞之生物效應

方錫經

台北醫學院應用物理學科

引言

細胞為構成生物體之基本單位，而去氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid DNA) 是細胞最重要的成分。凡生物體之遺傳情報，全被細胞內之DNA所主宰(1)，此種遺傳情報以DNA之複製 (Duplication) 過程中，由細胞製造與自己相同之DNA而相傳於下一代。在這複製過程中DNA的塩基排列 (Base sequence) 成為原型，而新的DNA分子即可以陸續合成(1)。

DNA之合成是在細胞世代 (Cell generation) 之所謂S期 (Synthetic period. DNA合成期) 中所形成 (3,7,8,15,18,19)，而在小白鼠L細胞 (L-Strain mouse cells) 的S期平均有6-7小時(2)。假定所有的生命現象均依存於DNA的遺傳情報時，則由一個細胞開始增殖而成的群體 (Colony) ——亦可認為結合體 (Colum) ——在遺傳形質上也都是屬於同一類而且是純粹者(3)。因此在群體內的所有細胞集團的DNA合成期 (S期) 之長短都相等，而且應該有同調化 (Synchronization)。

由同調培養法 (16,20,22)。所得的同調性細胞集團，經過一世代之後，大部分被破壞 (1,14)。此乃因細胞在一方面雖有同一遺傳情報而藉細胞反覆分裂之過程中可以複製DNA，但在另一方面因細胞分裂之機構受到細胞內外某種破壞因素，或有擾亂因素存在所致(6)。因此研究DNA合成期的同調性修飾因素並明瞭DNA複製與細胞分裂之調節機構，即以能揭曉惡性腫瘤之異常增殖之謎底為主要目的之一。

吾人用無秩序增殖而能發育成群體的小白鼠L細胞(2)做為研究對象，觀察在DNA合成時之同調性與增殖樣式之關係。

材料及方法

(一)細胞：小白鼠L細胞No.929(2)係大阪大學微生物病研究所所提供。

(二)培養液：含有小牛血清20%的有Difco心臟浸出培養液 (Difco heart infusion broth) 0.005%，鏈黴素 (Streptomycin) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，青黴素 (Penicillin) 100 unit/ml 的組織培養用滅菌合成培養液F₁(9)。

(三)群體形成法：切片用玻璃兩片並排 (間隔0.5cm) 於直徑9cm之培養皿。經高壓高溫滅菌取培養液10ml，注入於該培養皿內，然後加小白鼠L細胞一小群於該液中均勻混合，在顯微鏡之下觀察使該細胞數成為40個/ml，然後置於二氧化碳培養裝置 (含CO₂5%的空氣) 內以37°C培養七週。

(四)無秩序培養 (Random culture)：由靜態單層培養法 (Stationary monolayer culture) (20)容易獲得。在這種培養之下，細胞不能造成群體，而這細胞與前述群體所形成之細胞顯然不同。它經無秩序培養，多數變為細長形。

(五)DNA合成期之細胞的觀察：細胞培養後，在七小時加³H-Thymidine 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ (5) 於培養液內，經20分後用Krebs-Ringer液 (葡萄糖加添成為PH值7.4為止) 洗滌五次。然後以10%中性佛爾馬林 (Formalin) 固定DNA合成期之細胞。再經酒精系列使它脫水，俟自然乾燥後，使用感光乳劑 (Sakura NR-M₂) 應用浸漬法 (Dipping method) 作成放射線相片 (4,11,12) (Autoradiograph)，放置於暗箱 (常溫) 中。其曝露時間為10日。經過顯像，定像處理後用蘇木紫-伊紅 (Haematoxylin-eosin) 染色之。

取任意選出的標本，置於倍率100及1000之顯微鏡之下觀察，找出群體並作顯微攝影。如果有DNA

合成期中之細胞，即因 ^3H -Thymidine 放射能與感光乳劑結合而游離出銀粒子，而在相片上顯出陰影。因此在相片上有陰影之細胞記明符號（如圖一）。同樣，經無秩序培養之細胞（非群體形成者），亦同樣方式記明，並比較兩者之同調性。

(六)同調比 (Synchronous DNA synthetic ratio) 之計算：算出各群體中的 DNA 細胞數目。若觀察到有三個以上所形成的細胞集團時，吾人把它假定為「有同調性」，而命名為「同調集團」。

細胞經增殖成群體者與無秩序繁殖者之同調比，可以用下式表示之。

$$\text{同調比} = \frac{\text{成同調集團之細胞數}}{\text{群體中之全細胞數}} \times 100$$

* 若為無秩序集團時，即指該倍率之下可看到的全細胞數目。

結果及討論

L 細胞經培養七日後發育成為密集之群體。細胞核呈紡錘狀，有時與 DNA 結合的銀粒子亦與此種細胞核內共在。惟在 G_1 期 (DNA 合成準備期) 與 G_2 期 (有絲分裂準備期) 中就不能認出呈紡錘狀細胞核之存在 (3, 7, 8, 15, 18, 19)。另在相片上呈圓形之細胞也有若干存在。這是 M 期 (分裂期) 的細胞 (8, 15)。

大部分之 DNA 合成細胞群是由三個以上之細胞而成。群體內的同調集團之位置，在培養期中甚為不穩定，有時在群體的周邊，有時在中心部分。由 Ambrose (2) 等之研究斷定此親近抑制 (Contact inhibition) 之現象不存在於 DNA 合成期之 L 細胞群體。至於七日後之培養的 DNA 合成細胞之分佈如何尙在檢討中。

代表性的小白鼠 L 細胞，無秩序增殖集團之放射線相片 (Autoradiograph) 在圖一，二，三表示之。於圖一，二可知，要在放大率 100 倍之顯微相片中，識別細胞核上所存在的銀粒子則稍有困難。如放大率為 400 及 1000 倍時，銀粒子就容易觀察到。因此對個別的群體，先攝成倍率 100 倍之顯微相片並在相片上記錄群體之位置，當所攝之相片上記錄完成時，按照所記錄之位置，在顯微鏡下 1000 倍再找出同一群體，而

將細胞核內俱有 10 個以上銀粒子者記上符號 (如 (圖一，三))。結果在 20 枚標本之中呈同調性集團者有 51 個而無秩序集團亦同樣檢查方式分別計算其同調比。結果如表一與圖四所示。

據表一及圖四所知其群體形成集團之同調比在 21-40 之間，而無秩序集團即在 11-30 之間。這表示群體增殖比無秩序增殖保持有良好之同調性 (2)，而在細胞增殖形式上兩者有不同之同調性亦應無異議。

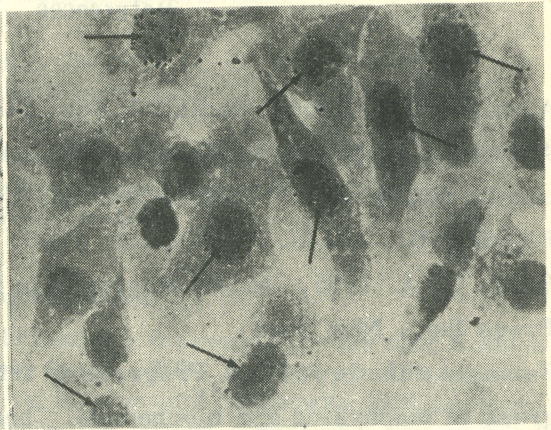
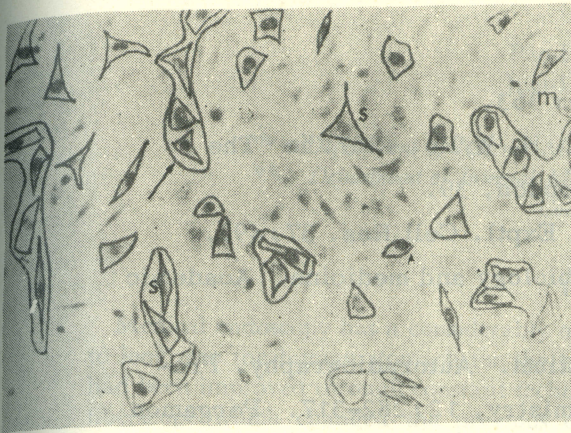
結 論

為明瞭 DNA 合成期之同調性與增殖樣式關係，可以增殖為群體與無秩序集團之小白鼠 L 細胞為材料，用 ^3H -Thymidine 作成放射線相片，而觀察 DNA 合成期之細胞，計算其同調比，同時比較兩者之細胞同調性之次數分佈。結果發現增殖為群體者比無秩序培養者，容易維持同調性。

本篇研究報告係本人在日本長崎大學醫學部求學時，在該大學放射線生物物理學之主任教授——岡島氏指導之下所完成者，茲衷心誌謝。

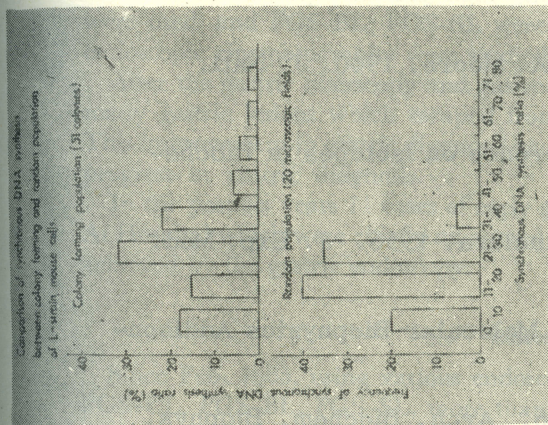


圖一：培養開始後第七日之小白鼠 L 細胞群體之顯微鏡相片 ($\times 100$)，H-E 染色。
S 為 DNA 合成期細胞，為與 G_1 、 G_2 期區別，在細胞的輪廓以粗線圍成。m 為分裂期細胞， \uparrow 為 DNA 合成同調細胞集團。



圖二：小白鼠L細胞無秩序增殖集團之顯微鏡相片
(x 1000)，H-E染色。
S：DNA合成期細胞。
m：在分裂期中之細胞。
↑：DNA合成同調細胞集團。

圖三：小白鼠L細胞之放射線相片×1000
，H-E染色。



圖四：小白鼠L細胞群體與無秩序集團
的DNA合成之同調性比較。

Classes of Synchronous DNA Synthesis ratio	Frequency ratio of Synchronous DNA Synthesis	
	Colony forming Population	random population
0 - 10	17.6	20
11 - 20	15.7	40
21 - 30	31.4	35
31 - 40	21.6	5
41 - 50	5.9	-
51 - 60	3.9	-
61 - 70	2.0	-
71 - 80	2.0	-

表一：群體集團與無秩序集團之同調比次數比較。

SUMMARY

For the purpose to understand the relationship between the synchronization of DNA synthetic period and the form of multiplication of cells, both the colony and the group of random of L-strain mouse cells are used in the experiment. By making ^3H thymidine into autoradiograph, the cells of DNA synthetic period is observed. By computing the synchronous ratio and comparing the distribution of frequency of both the colony and the group of random, it is concluded, that the multiplication of cells of the colony is easier to maintain its synchronization than the group of random.

References

1. Alexander, P. 1961. *Radiation Res.* 14: 363.
2. Ambrose, E. J., D. M. Easty, and J. A. H. Wylie. 1967. in "The cancer cell in vitro". Butterworths, London, 39.
3. Blondel, B., and L. J. Tolmarch. 1965. *Exptl. Cell Res.* 37:497.
4. Boyd, G. A. 1955. *Autoradiography in biology and medicine.* Academic Press Inc., New York.
5. Faria, A. L. de. 1962. *Progress in tritium. Autoradiography. Progress in biophysics and biochemical Chemistry*, 12:282-317. Pergamon Press.
6. Feughelman, M. 1955. *Nature* 175:834.
7. German, J. 1964. *J. Cell Biol.* 20: 37.
8. Gilbert, C. W., S. Muldal, and L. G. Iajtha. 1965. *Nature* 208:159.
9. Ham, R. G. 1963. *Exptl. Cell Res.* 29:515.
10. Lerman, L. S. and L. J. Tolmarch. 1951. *Biochim. Biophys. Acta* 33: 371.
11. Mendelson, M. L.; F. C. Dohan, and H. A. Moore. 1960. *J. Natl. Cancer Inst.* 25:477.
12. Pelic, S. R. 1951. *Ciba Foundation Conference on Isotopes in Biochemistry.* J. and A churchill Ltd., London.
13. Puck, T. T., P. I. Marcus, and S. J. Cieciura. 1956. *J. Exp. Med.* 10:273.
14. Setlow, R. B. and E. C. Pollard. 1962. *Molecular Biophysics Addison-wesley.* Reading. 1962.
15. Shen, S. R. C., and R. R. Schmidt. 1966. *Arch. Biochem. Biophys.* 115: 13.
16. Sinclair, R. and D. H. Bishop. 1965. *Nature* 205:1272.
17. Stelow, R. B. and B. Doyle. 1954. *Biochim. Biophys. Acta* 15:117.
18. Stubblefield, E. and G. C. Mueller. 1962. *Cancer Res.* 22:1091.
19. Tayler, J. H. 1967. *J. Biol. Chem.* 242:1314.
20. Terasima, T. and L. T. Tolmarch. 1963. *Exptl. Cell Res.* 30:344.
21. Whitfield, T. F. and R. H. Rixon. 1959. *Exptl. Cell Res.* 18:216.
22. Whitmore, G. F. and S. Gulyas. 1966. *Science* 151:691.
23. Whitmore, G. F., O. C. P. Stanners, J. E. Till, and S. Gulyas. 1961. *Biochim. Biophys. Acta* 47:66.