

## 重离子射线照射后家蚕胚胎造血器官的修复再生

徐世清<sup>1</sup> 木口憲爾<sup>2</sup> 凌尔军<sup>2</sup> 白井孝治<sup>2</sup> 深本花菜<sup>2</sup> 屠振力<sup>3</sup>

<sup>1</sup> (苏州大学农业科学与技术学院 苏州 215006)

<sup>2</sup> (日本信州大学纤维学部 上田 386-8567)

<sup>3</sup> (日本原子能研究所 高崎 370-1292)

**摘要** 为了研究重离子射线照射后家蚕造血器官的修复再生作用,用碳离子射线局部照射家蚕接近孵化时紧贴翅原基内侧的胚胎造血器官,局部细微手术损伤造血器官,观察了对幼虫造血功能的影响,了解了造血器官的修复程度。100Gy 以上剂量照射,家蚕出现变态困难,幼虫和蛹的生存率下降,眠中、化蛹或羽化时期出现死亡个体等缺血生理障碍,其影响程度随射线剂量增加而加重。200Gy 照射组 5 龄存活幼虫血细胞含量下降,但其中部分个体的血细胞含量接近对照未照射处理,其体内出现了再生的造血器官。家蚕幼虫有很强的修复再生造血器官功能。

**关键词** 重离子射线, 家蚕, 胚胎, 造血器官, 修复再生

中图分类号 Q691, Q965

重离子射线是一类高能宇宙射线,属高传能线密度 (Linear energy transfer, LET) 射线,对植物的诱变效率比 X 射线和  $\gamma$  射线高出 10 倍以上。重离子射线不仅出现在太空,也能够少量抵达地球表面,诱发基因突变,使生物癌变的机会也大大增加,老化加速。重离子射线的另一个特点是照射深度可以控制,射线具有直线前进和集束性,能够形成很小的离子束,甚至达到直径  $1\mu\text{m}$  的水平,能够准确地局部杀灭和除去生物组织中特定的细胞、器官,代替外科手术或药物处理,对生物体内的细胞或组织进行局部细微手术;或者在不破坏细胞结构的条件下,直接影响 DNA 使基因失去活性。因此,重离子射线是研究生物发生、分化或形态形成过程;研究细胞间相互作用;研究细胞内信息传递的有效方法。研究重离子射线对生物的影响,特别是损伤和修复机理具有十分重要的意义。人类大量开展重离子射线对生物影响的研究开始于 90 年代,主要是研究对植物的诱变作用,而对动物的研究目前才刚刚起步。家蚕由于大小适中、温顺好养,蚕卵具有滞育性,以及系统的研究积累和丰富的遗传突变体存在,是一种较好的研究对象。日本从 1998 年开始,以国家先端技术研究项目 (COE), 在世界上率先利用重离子射线研究家蚕的胚胎发生、分化或形成过程,目前已经基本完成对胚胎发育预定圈地图的制

作。本工作在此基础上,利用重离子射线对家蚕胚胎的造血器官进行局部细微手术,研究了家蚕造血功能的影响。

### 1 材料和方法

#### 1.1 家蚕卵

家蚕着色非滞育系统 (pnd p<sup>s</sup>), 幼虫人工饲料饲育,全龄 25 d, 相对湿度 70%—80% 环境继代。产下卵 25 d 保护,产后第 9d, 取接近孵化的点青期 (Stage of head pigmentation) 蚕卵进行试验。为了保证胚胎发育程度的一致性,控制各粒蚕卵到达点青的时间相差 3h 以内。将每只母蛾所产卵 (蛾组) 都分为 2 份,分别作为无照射对照和照射处理,以不同蛾所产卵作为重复比较,重复 3 次 (蛾组)。

#### 1.2 重离子照射

利用日本原子能研究所高崎离子照射研究设施 (TIARA) 的深度控制种子照射装置。将产在投影膜上的蚕卵,固定在特制的材料固定台上,利用自动扫描和聚焦控制装置,确定每个蚕卵的照射部位,照射使用碳离子 ( $^{12}\text{C}^{5+}$ , 18.3MeV/u, 水中射程约 1.2mm), 照射剂量为 50、100 和 200Gy, 剂量率为  $25\text{Gy} \cdot \text{s}^{-1}$ , 圆形照射面积的直径为 250  $\mu\text{m}$  (见图 1 外圆)。用 CR-39 离子飞迹检测器测定,碳离子基本

江苏省出国留学基金 (99-09-23) 资助

第一作者:徐世清,男,1963 年 10 月出生,1997 年浙江大学博士研究生毕业,研究方向特种经济动物遗传及生理,主要从事课题为昆虫的滞育与发育控制,教授

收稿日期:初稿 2002-06-14,修回 2002-07-22

集中在照射的部位,不会散射到蚕卵的其他部位。将蚕卵长或宽各分为 100 等份(坐标值),试验蚕品种点青期蚕卵内胚胎造血器官的坐标位置为 80/50(横轴/纵轴)(见图 1),个体之间的变化范围在 77—83/45—56,以 80/50 为标准,个体之间的变化幅度 $<30\mu\text{m}/50\text{—}60\mu\text{m}$ (横轴/纵轴)。试验用蚕品种的蚕卵,大小为  $1.2\text{ mm}\times 1.0\text{ mm}\times 0.5\text{ mm}$ (长 $\times$ 宽 $\times$ 厚),所以射线照射范围完全可以覆盖造血器官。同时,射线可以穿过蚕卵,照射到位于胚胎对面的造血器官。照射后蚕卵继续用 25 保护,孵化后幼虫人工饲料育,饲养环境 25、相对湿度 70%—80%。观察幼虫及蛹的生长、发育与变态情况,并调查 5 龄幼虫血细胞数的变化。同时,解剖观察造血器官的变化。



Fig.1 The schematic area of the embryonic hemopoietic organ of a silkworm egg.

### 1.3 家蚕幼虫造血器官的体外培养

使用悬滴培养方法,在  $10\mu\text{L}$  添加了 10%家蚕血淋巴的 Grece 昆虫培养液中,倒置悬滴培养 1 个

造血器官。培养温度 25,定时显微观察造血器官的变化和血细胞释放情况。

### 1.4 家蚕幼虫血液中血细胞的变化

使用锋利的昆虫针刺破家蚕幼虫的腹足,收集流出的血液于  $1.5\text{ mL}$  的塑料离心管,快速混匀,取一定量血液用生理盐水稀释,在 THOMA 血细胞计数板上,400 倍显微镜观测统计各种血细胞的数量,计算血细胞含量。

### 1.5 组织切片制作

将家蚕幼虫体壁在造血器官附近撕开,加上 Carnoy 固定液原位固定,取下造血器官生长部位的组织。经乙醇系列脱水后,用石蜡包埋,制成厚  $6\mu\text{m}$  的切片,用德氏苏木精染料(Hematoxylin stain)染色。

## 2 结果和分析

### 2.1 重离子射线照射家蚕胚胎造血器官对发育和变态的影响

家蚕 pnd p<sup>s</sup> 系统点青期卵被 50—200Gy 的碳离子射线照射后,孵化率在 200Gy 组略有下降,但未达到统计显著差异水平。孵化后 48h,100Gy 以上剂量组的幼虫疏毛率比对照有所降低,也未达到显著差异程度。幼虫和蛹的生存率,100Gy 剂量组从 4 龄开始显著甚至极显著地低于同蛾区对照;200Gy 剂量组则从 2 龄开始显著或极显著地低于同蛾区对照。重离子射线照射对幼虫生长和发育的影响随幼虫和蛹的发育而不断加剧,照射剂量越大,症状出现时间越早,死亡率越高。影响最明显的是幼虫蜕皮和化蛹及羽化变态,照射后死亡个体全部发生在变态时期,表现为不能蜕皮(见表 1)。

Tab.1 Effect of local heavy ion beam irradiating hemopoietic organ of embryo on the of the development and metamorphosis of silkworm, Bombyx mori

Mark	Dose /Gy	Hatchability /%	Rate of bristle dispersion /%	Survival rate /%					
				L-1	L-2	L-3	L-4	L-5	P
CK50	0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	92.2±2.2	86.1±4.9
50Gy	50	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	97.4±2.6	87.4±2.6	82.3±3.5
CK100	0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	82.1±3.2	78.2±5.3
100Gy	100	100±0	96.9±3.1	97.7±2.3	97.7±2.3	94.7±0	87.2±10.5 <sup>(2)</sup>	74.7±8.1 <sup>(2)</sup>	56.2±8.1 <sup>(1)</sup>
CK200	0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	86.5±3.8	80.5±5.0
200Gy	200	97.4±2.6	97.2±2.8	97.5±2.5	91.6±8.4 <sup>(2)</sup>	86.4±8.6 <sup>(2)</sup>	70.3±15.0 <sup>(2)</sup>	45.3±8.2 <sup>(2)</sup>	35.3±6.5 <sup>(1)</sup>

Note: The embryonic hemopoietic organs of silkworm pnd p<sup>s</sup> race were local irradiated with carbon ions at head pigmentation stage. The data in table are average value of 3 repeats±standard deviation. <sup>(1)</sup>and <sup>(2)</sup> mean significant difference and limit significant difference respectively. L: larval stage. P: pupal stage. The numbers of 1~5 are larval stage of silkworm. The CK50Gy, CK100Gy and CK200Gy are control plot (no irradiation) of 50Gy, 100Gy and 200Gy irradiation plot respectively.

碳离子局部照射家蚕胚胎，对幼虫和蛹的生长发育速度影响，100Gy 以下照射剂量没有显著影响，200Gy 剂量照射组的 4 龄以后发育经过比对照显著延长（见图 2）。局部照射后家蚕卵孵化

的幼虫外形正常，蚕蛹外型在 100Gy 以下低剂量组正常，200Gy 高剂量照射组出现翅基缺失（见图 3），出现率 25%。翅基缺失的蚕蛹羽化率 51%，羽化蚕蛾无翅（图略）。

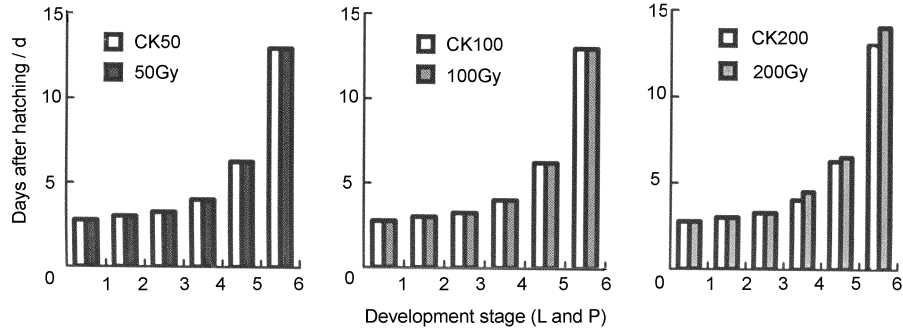


Fig.2 Effect of local heavy ion beam irradiating of hemopoietic organ of embryos on the development of silkworm larva and pupae

Note: The embryonic hemopoietic organs of silkworm pnd p<sup>s</sup> race were locally irradiated with carbon ions at the head pigmentation stage. The rearing temperature is 25 °C, and humidity is 70%~80%. L: larval stage. P: pupal stage. The others are the same as in table1.

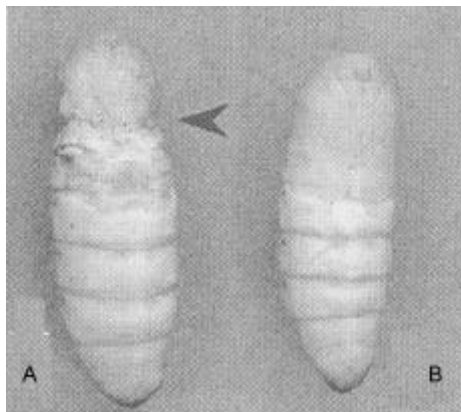


Fig.3 The no-wing pupa developed from local heavy ion beam irradiating of the silkworm embryonic hemopoietic organs Note: A: the no-wing pupa caused by local irradiation of embryonic hemopoietic organs of silkworm pnd p<sup>s</sup> race with 200Gy carbon ions at head pigmentation stage. B: the control pupa.

基完全被射线破坏，但在原来生长造血器官的位置，有造血器官状组织存在（见图 5A），其形状不整，显然遭到射线的严重损坏。体外悬滴培养这种造血器官状组织，培养 70—90h 后在培养基中发现了血细胞，144h 后培养液中有大量血细胞存在（见图 5B）。进一步做成切片观察，确认是造血器官组织（见图 6A）。说明这种造血器官状组织，与正常造血器官一样，能够释放血细胞。由此判断，照射时射线没有偏离，造血器官在照射后能够再生。

### 2.2 重离子射线照射蚕卵造血器官对幼虫造血功能的影响

观察了 5 龄幼虫至吐丝结束一段时间的血细胞含量变化。碳离子照射组在 5 龄前期与未照射组没有明显区别；200Gy 照射组 5 龄后期蚕的血细胞密度平均值比对照显著降低（见图 4），但并不是所有的调查蚕都低，其中部分蚕接近对照蚕。照射组蚕血液中各种血细胞的比例与未照射蚕接近，没有出现预计中的种类差异（结果略）。为了检验是否存在照射偏离了造血器官发生部位的情况，解剖血细胞密度接近对照的蚕，结果在 200Gy 组发现虽然翅原

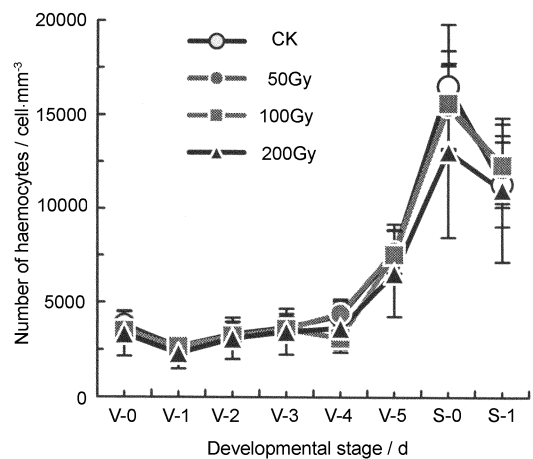


Fig.4 Effect of local heavy ion beam irradiating hemopoietic organs of the silkworm embryos on the hemocyte density of the 5th stage of larvae. Note: The embryonic hemopoietic organs of silkworm pnd p<sup>s</sup> race were local irradiated with carbon ions at the head pigmentation stage. The data in this figure are the average value of 3 repeats ± standard deviation. V: the 5th stage of larva S: the spinning stage.

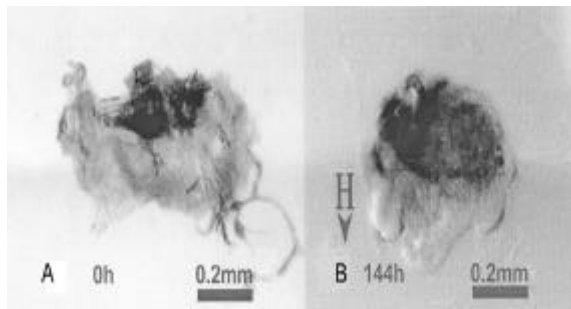


Fig.5 The hemopoietic organs-like tissue of a silkworm larva cultured in the hanging drop medium. Note: The culture tissue was got from 5~4d larva that the embryonic hemopoietic organs of which were locally irradiated with 200Gy carbon ion. The hemocyte density of the larva was comparable to the control plot (no irradiation). The tissue was hanging drop cultured with 10 $\mu$ L grace insect culture medium at 25 $^{\circ}$ . The A(0h) and B(144h) are the hours times after culture. H: hemocyte.

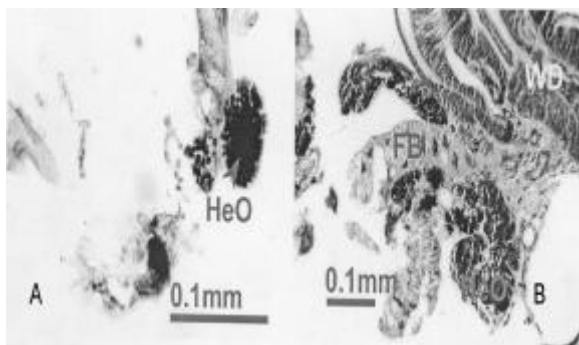


Fig.6 Effect of local irradiation with heavy ion beam on embryonic hemopoietic organs of silkworms. Note: A: The tissue was got from 5~4d larva of the embryonic hemopoietic organs of which were locally irradiated with 200Gy carbon ion. And the hemocyte density of the larva was comparable to the control B: The tissue was got from the control larva (no irradiation). HeO: hemopoietic organs, FB: fat body, WD: wing disc.

### 3 结论

蚕类昆虫的造血器官在各龄食桑期大量生成血细胞,入眠或吐丝时,在激素的作用下,造血器官向循环血液释放血细胞<sup>[1,2]</sup>。这种血细胞释放,是蚕为了清除内部解离组织的需要。文献[3]等用 50Gy 的碳离子射线,照射 4 龄眠中家蚕的造血器官,结果 5 龄幼虫正常生长,并且能够正常化蛹、羽化,但 5 龄中后期血细胞含量比对照降低,血液贮存蛋白质中分子量 24ku 的成分,照射后迅速减少。本试验用 100Gy 以上剂量的碳离子照射孵化前蚕卵胚胎的造血器官,对孵化后幼虫的生长发育产生了十分明显的影响,表现为生命力低下,变态困难,高剂量照射组 5 龄蚕血细胞含量下降等现象,可能与缺乏来自造血器官的血细胞补充有关。我们在照射家

蚕 5 龄幼虫造血器官后,体外培养观察中发现,首先造血器官组织细胞失去再生能力,逐渐死亡,随后组织萎缩;同时还发现,翅原基在接近体表外层完全覆盖造血器官,照射时同样接受到射线的照射,但比造血器官对重离子射线的抵抗力强,用翅原基的存活与否可以检验离子射线对造血器官的损害程度<sup>[4]</sup>。本实验在卵期用 200Gy 的碳离子射线照射胚胎的造血器官位置,得到完全缺失翅原基的幼虫,造血器官照射时被完全破坏的可能性很高。

家蚕循环血细胞的补充,传统的学术观点普遍认为来自造血器官和循环血细胞的分裂。在研究果蝇血细胞变化时,发现循环血细胞还可能来自附着在组织和器官上的贮存血细胞<sup>[5]</sup>。家蚕循环血细胞具有对死亡细胞和外来异物的高度包围和吞噬作用。由于重离子射线的作用特点,家蚕胚胎被局部照射后,照射以外的部位没有受到影响,照射部位也是首先在细胞内部发生变化,初期阶段家蚕个体出现的症状很轻,家蚕依靠循环血细胞增殖或从组织和器官上的贮存血细胞补充,维持循环血细胞的含量,同时循环血细胞就有时间集中清理照射组织的死亡细胞。正常的家蚕造血器官,随幼虫龄期增加,不断增长,由刚孵化时的 25—30 个细胞团块,发育到 5 龄时达到数十万个细胞;伴随着幼虫的生长和发育,造血器官生成血细胞的数量也直线上升<sup>[6,7]</sup>。本试验中碳离子照射后,家蚕的造血器官修复过程如果无法在个体需要得到大量血细胞补充时(如发育变态)完成,个体就出现生存困难,而能够完成修复过程的个体得以存活。

家蚕的再生造血器官可能是循环血细胞附着在完全破坏后的造血器官部位出现的再生,也可能是造血器官内部存活的少量细胞或组织的恢复性再生。本文在 200Gy 高剂量照射组 5 龄存活蚕中发现,没有翅原基而有造血器官状的组织,这种组织应该是再生的造血器官,而且是后一种再生的可能性大,不过目前还没有可靠的方法证实这种再生方式。如果存在循环血细胞附着在完全破坏后的造血器官部位出现再生的现象,对开创创伤修复新方法将有重要的指导意义。

### 参考文献

- 1 赤井 弘. 応動昆, 1969, 13(1): 17-21  
Akai, H. Appl Ent Zool, 1969, 13(1): 17-21
- 2 Kurata S, Komano H, Natori S. J Insect Physiol, 1989, 35(6): 559-565
- 3 Tu Z L, Shirai K, Kanekatsu R et al. J Seric Sci Jpn, 1999, 68(6): 491-500

- 4 徐世清, 木口惠爾, 凌尔军等. 蚕业科学, 2002, 28(3): 194-198  
XU S Q, K. Kiguchi, LING E et al. Acta Sericologica Sci, 2002, 28(3): 194-198
- 5 Lanot R, Zachary D, Holder F et al. Dev Biol, 2001, 230(3): 243-25
- 6 Akai H, Satao S. J Insect Physiol, 1971, 17(18): 1665-1676
- 7 佐藤茂, 赤井 弘. 日蚕雜, 1977, 46(5): 397-403  
Satao S, Akai H. J Seric Sci. Jpn, 1977, 46(5): 397-403

## REPAIR AND REGENERATION OF HEAVY ION BEAM LOCALLY IRRADIATED EMBRYONIC HEMOPOIETIC ORGANS OF SILKWORM, BOMBYX MORI

XU Shiqing<sup>1</sup> Kenji Kiguchi<sup>2</sup> LING Erjun<sup>2</sup> Koji Shirai<sup>2</sup> Kana Fukamoto<sup>2</sup> TU Zhenli<sup>3</sup>

<sup>1</sup> (School of Agriculture and Technology, Soochow University, Suzhou 215006)

<sup>2</sup> (Faculty of textile science and technology, Shinshu University, Ueda 386-8567 Japan)

<sup>3</sup> (Japan atomic energy research institute, Takasaki 370-1292 Japan)

**ABSTRACT** Eggs of silkworm, *Bombyx mori* were irradiated by  $^{12}\text{C}^{5+}$  ions, at the embryonic wings, where the hemopoietic organs attached. Changes in the development of the silkworm larvae and pupae, especially in the repair and regeneration of the hemopoietic organs represented by their morphological and functional characteristics, were observed. The results showed that the silkworm larvae and pupae developed from the irradiated eggs grew with the physiological obstruction due to exsanguinations, such as difficulty in their metamorphosis and their marked lower survival rates. After 100Gy irradiation, some of the larvae and pupae died during the periods of larval molting stages, pupation stage and eclosion stage. With increased doses, the deficiencies in the silkworm development became more significant. After 200Gy irradiation, the average hemocyte density for the 5th larvae decreased markedly, but the hemocyte density for some individuals were comparable to the control, and regenerated hemopoietic organs was found in these larvae. The results suggested that the silkworm larvae might be capable of self-repair and self-regeneration of the hemopoietic organs after the heavy ion irradiation.

**KEYWORDS** Heavy ion beam, *Bombyx mori* silkworm, Embryo, Hemopoietic organ, Repair and regeneration  
CLC Q691, Q965