

UV 辐射对金鱼受精卵和幼胚发育的影响

吴健¹ 戴桂馥¹ 张凤秋² 路磊³

¹ (郑州大学生物工程系 河南 450052)

² (郑州大学离子束生物工程省重点实验室 河南 450052)

³ (郑州大学物理工程学院 河南 450052)

摘要 研究了紫外线(Ultraviolet ray, UV)为辐射源,处理从受精卵到心脏搏动期分别处于5个不同发育时期的金鱼胚胎。通过比较各时期胚胎处理后的出眼率、孵化率和畸形率随剂量的变化关系发现处于原肠期以前的胚胎对小剂量UV照射表现出兴奋效应;而处于原肠期和心脏搏动期的胚胎对UV辐射非常敏感,而且只表现出损伤效应,即使是较低的剂量,损伤作用也很强。此外,UV照射后的原肠期胚胎发育主要结束于眼黑色素形成期以前,而处于心脏搏动期的胚胎接受UV照射后,发育能持续到眼黑色素形成期之后,但是不能孵化出来。

关键词 紫外线, 金鱼, 胚胎

中图分类号 Q5-3, S961, Tu13.8⁺8

紫外线(Ultraviolet ray, UV)是一种非电离辐射,它不仅作为重要的诱变源为人类创造了许多新的生物品种^[1-3],而且还被用于诱导动物孤雌生殖^[4,5]。同时研究UV的生物学效应还能研究生命起源及空间生物学提供一些有益的参考^[6,7]。特别是近年来低剂量辐照存在的兴奋效应(Hormesis)引起了世界范围的广泛关注^[8,9]。本工作在以金鱼为材料,探索选育新品种的研究中发现,低剂量UV处理金鱼受精卵后,也产生了兴奋效应,使孵化率提高。进一步用于不同发育时期的胚胎为材料,详细研究了UV辐射对同时期金鱼胚胎发育与兴奋效应的影响。

1 材料与方法

1.1 亲鱼

近2年龄、性成熟的、体型良好的来自同一品系的黑龙睛金鱼(Carassius auratus)选自郑州郊区某金鱼孵化场。

1.2 受精

在经高锰酸钾消毒的磁盘底铺上尼龙网,通过湿法受精将受精卵均匀散布于网上^[10]。

1.3 UV照射处理

照射实验分5组,分别于受精后约40 min、1.5 h、

3 h、12 h和28 h进行照射处理。接受照射时胚胎发育分别处于受精卵、4—8细胞期、多细胞期、原肠期和心脏搏动期。每组实验所用受精卵或胚胎来自于同一对亲鱼,包括一个对照(照射时间为0s)和7—8个处理。受精卵组的对照和每个处理的样本数量为200—300枚,其余各组每个处理300—400枚。对照和处理的受精卵都连同尼龙网平铺于直径为18 cm的培养皿底部,受精卵朝上,每皿加水3 mL。每组实验的辐射时间分别为:0(对照)、15 s、30 s、1 min、1.5 min(仅受精卵组)、3 min、5 min、10 min和20 min。紫外灯功率为20 W,照射距离为30 cm。光照通量分别约为:0(CK)、0.3 J/cm²、0.6 J/cm²、1.2 J/cm²、1.8 J/cm²(仅受精卵组)、3.6 J/cm²、6.0 J/cm²、1.2 J/cm²、2.4 J/cm²。

1.4 孵化

照射后加水避光孵化5 h,然后于(20±2)°C正常光照下孵化。

1.5 实验结果统计

于受精后5 h统计每个处理的胚胎数,于受精后80 h统计能发育到眼黑色素形成期的胚胎数,110 h统计出鱼数和畸形鱼数。畸形是指破膜后形态和生长发育异常者。文中的各组实验重复3—4次,因变化趋势一致,故采用同一批实验的数据。

出眼率=(发育到眼黑色素期胚胎数/受精卵数)

本课题由河南省重点科技攻关项目(9810500240)资助

第一作者:吴健,男,1961年2月出生,1985年在中国农业大学生命科学院获硕士学位,微生物专业,副教授

收稿日期:初稿 2004-11-10,修回 2005-01-18

$\times 100\%$

孵化率 = (出鱼总数 / 对照或处理的胚胎数)

$\times 100\%$

畸形率 = (畸形鱼总数 / 总的出鱼数) $\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 UV 照射受精卵对胚胎发育的影响

图 1 是不同照射时间的 UV 处理受精卵对其胚胎发育的影响, 结果表明, 照射时间小于 3 min 的各处理组孵化率高于对照组 (照射时间为 0), 畸形率基本相当于对照组, 出眼率和孵化率高于对照组。照射时间为 5 min 时, 出眼率和孵化率又与对照相当, 但随着畸形率升高, 表明损伤效应开始增强。照射时间为 10 min 时, 出眼率和孵化率再次高于对照组, 畸形率则显著高于对照组。这可能是修复机制启动后导致孵化率升高, 但是畸形率也升高。另外, 出眼率和孵化率两条曲线开始出现分离, 说明部分胚胎发育停滞在眼黑色素形成期之后。照射时间为 20 min 时, 不仅孵化率和出眼率大幅度下降, 而且畸形率也显著提高。

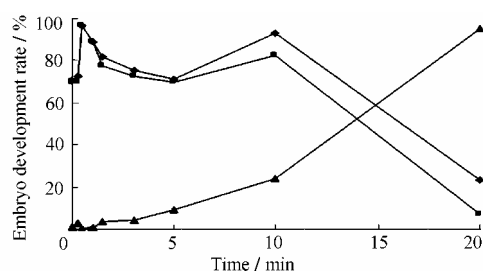


Fig.1 Effects of UV irradiation on fertilized fish eggs
◆ Darkly pigmented eyes rate / %, ■ Hatching rate / %, ▲ Abnormal embryo rate / %

2.2 UV 照射 4—8 细胞期的幼胚对金鱼胚胎发育的影响

图 2 为不同 UV 处理 4—8 细胞期的幼胚对其胚胎发育的影响, 其随照射时间的变化趋势与图 1 相同。出眼率、孵化率和畸形率线随照射时间的变化趋势与受精卵组的结果基本一致。

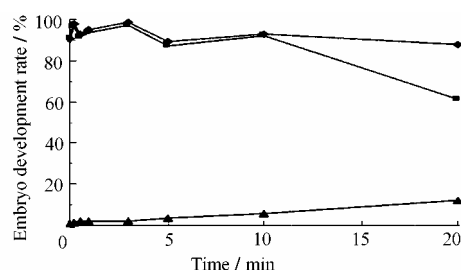


Fig.2 Effects of UV irradiation on embryos at 4-8 cell stage
◆ Darkly pigmented eyes rate / %, ■ Hatching rate / %, ▲ Abnormal embryo rate / %

2.3 UV 照射多细胞期的幼胚对金鱼胚胎发育的影响

UV 处理对发育到多细胞期的胚胎的影响见图 3。照射时间大于 1 min 的各时间点的孵化率始终低于相应剂量下的出眼率, 说明 UV 对处于该发育时期的胚胎的损伤作用的表现与前两个时期相比变得更为敏感。照射时间为 5 min 时, 孵化率和出眼率都再次升高, 但是畸形率并表现出显著提高。照射时间大于 10 min, 出眼率和孵化率显著下降, 同时畸形率明显上升。

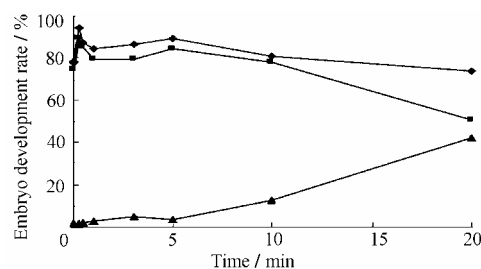


Fig.3 Effects of UV irradiation on embryos at multicellular stage
◆ Darkly pigmented eyes rate / %, ■ Hatching rate / %, ▲ Abnormal embryo rate / %

2.4 UV 照射原肠期的幼胚对金鱼胚胎发育的影响

图 4 为不同的 UV 处理对原肠胚发育的影响。可以看出, 发育到该时期的胚胎对 UV 非常敏感, 这与对前三个发育时期的影响截然不同。不仅未出现短时间照射后孵化率升高的现象, 而且即使很短时间的照射也表现出强烈的损伤效应。随着照射时间的延长, 出眼率和孵化率相随快速下降, 半数致死剂量非常低。说明 UV 对处于该发育时期的胚胎的致死损伤反应迅速, 胚胎发育停滞于眼黑色素形成期之前。而且即便孵化出来的鱼其畸形率也随着剂量的升高而急剧上升。照射时间为 10 min 时, 孵化率不足 10%, 畸形率达 100%。

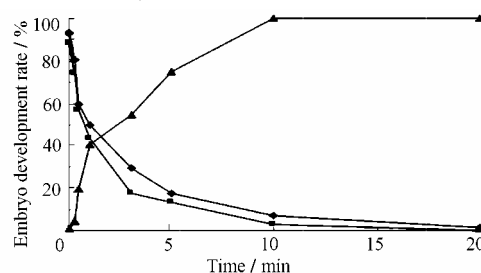


Fig.4 Effects of UV irradiation on embryos at gastrula stage
◆ Darkly pigmented eyes rate / %, ■ Hatching rate / %, ▲ Abnormal embryo rate / %

2.5 UV 照射心脏搏动期的幼胚对金鱼胚胎发育的影响

当胚胎发育进入到心脏搏动期时再接受 UV 辐射, 损伤效应表现得更加强烈 (见图 5)。照射时间为 3 min 时, 孵化率就低于 10%。照射时间大于 5 min,

畸形率达 100%。损伤效应与原肠胚不同的是, 出眼率并未随照射时间升高、孵化率并未随照射时间降低, 且保持在较高水平。说明在该时期接受照射的胚胎仍能继续发育到眼黑色素形成期。

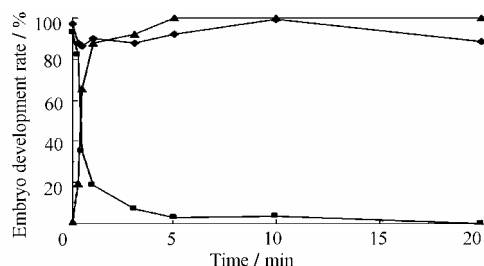


Fig.5 Effects of UV irradiation on embryos at heart beating stage
◆ Darkly pigmented eyes rate / %, ■ Hatching rate / %, ▲ Abnormal embryo rate / %

3 结论与讨论

3.1 发育到原肠期前的胚胎对 UV 照射表现出兴奋效应

UV 处理受精卵和 4—8 细胞期或多细胞期的胚胎, 照射时间 5 min 以下, 总体上不表现出致死致畸损伤, 而是表现出了刺激效应或兴奋效应 (Hormesis) [11-13], 即低照射量对胚胎发育生产有益的作用。早在 1943 年, Southam 就观察到了兴奋效应, 近年来辐射兴奋效应已经成为辐射生物学的热点之一 [12, 14-15]。人们观察到的兴奋效应现象很多, 但关于兴奋效应的作用机理还在进行之中 [16]。研究证明, 低照射量刺激 DNA 聚合酶总活性提高, 促进 DNA 损伤切除修复 [17], 还可以诱导合成一些有保护功能的蛋白 [18]。也有研究认为 [19], 低量辐射诱导的应激蛋白在兴奋效应中起重要作用。低量照射通过 DNA 损伤或其它途径, 活化细胞信号传导通路, 使淋巴细胞 Ca^{++} 增高和 PKC 表达上调。调节蛋白的磷酸化/去磷酸化激活 DNA 修复酶类和诱生保护性蛋白 [20], 这种活性调解是全局性的, 因而有提高卵及胚胎的生存能力和活性的作用。随着兴奋效应被越来越多的研究证实, 一些研究者提出, 毒物和环境评估中采用的高剂量效应外推确定低剂量效应损伤的方法, 应予修改 [14, 21, 22]。但也有研究者指出, 兴奋效应并非普遍存在, 仅因为发现一些兴奋效应现象就修改风险评估方法, 并不合适 [23]。

3.2 UV 照射发育到原肠期和心脏搏动期的胚胎未表现出兴奋效应

1990 年 Davis 等 [21] 提出了 U 型或倒 U 型剂量效应曲线作为风险评估方法。本研究, 发育到原肠期前的胚胎细胞确实表现出了对 UV 照射的倒 U

型剂量效应曲线, 并且未观察到显著的畸变率增加趋势。然而, 原肠期及心脏搏动期胚胎细胞都表现出对 UV 损伤的敏感性, 同时畸变率大幅增加。本研究结果表明, 不同照射量的 UV 照射下的孵化率曲线是兴奋效应——损伤效应的综合体现。在低照射量时损伤效应很小, 主要表现为兴奋效应, 随着照射量的增大, 损伤效应逐渐增强并占主导地位。在原肠期及心脏搏动期, UV 对胚胎的损伤效应非常强烈, 以至于兴奋效应完全被损伤效应所掩盖。

本研究中值得注意的是, 处于不同发育时期的胚胎对 UV 辐射损伤效应敏感性显著不同。在原肠期以前损伤效应小, 不仅表现在孵化率高, 而且还表现在畸形率未增加。可以推测, 在原肠期以前进行低照射量处理时, SOS 等错误倾向修复机制尚未启动, 却激活了 DNA 无错修复和某些生理保护机制, 这种保护机制的作用效果就是兴奋效应。对于胚胎发育后期功能分化的细胞, 上述生理保护机制减弱, 使细胞敏感性增加, 导致损伤效应明显增强。但是, 使这种保护机制减弱的原因有待进一步研究。

造成上述现象的另一种可能, 是在原肠期以前细胞分化程度低, 胚性强, 可替代性强, 一旦某一细胞遭受损伤, 可自动进入凋亡程序 [24], 由另一细胞代替其功能, 仍然可发育成所需的组织、器官, 结果表现出死亡率和畸形率低的效应。而兴奋效应是另一独立效应。在原肠期及心脏搏动期细胞分化程度高, 细胞的 UV 损伤难以替代, 因而表现出死亡率和畸形率显著增加。

3.3 原肠胚和处于心脏搏动期的胚胎对 UV 致死效应的反应速度不同

虽然 UV 辐射对处于原肠胚和心脏搏动期的胚胎都存在强烈的致死致畸损伤。但是, 致死效应的反应速率却显著不同, 原肠胚接受 UV 照射后, 致死效应反应迅速, 胚胎发育较早停滞。而处于心脏搏动期的胚胎接受 UV 后, 胚胎发育几乎都停滞于眼黑色素形成期之后, 孵化以前。这可能由于心脏搏动期胚胎已经有一定的器官分化, UV 对该时期胚胎的损伤实质上是对某个或某些器官中的组织或细胞的损伤, 不会立刻引起胚胎发育的终止, 因此能进一步发育一段时间, 但是仍不能孵化, 即使孵化出来, 畸形率也非常高。

从本文结果可以看出, 兴奋效应并不是在所有细胞中都可以表现出来的。深入研究这一现象可能会有助于理解兴奋效应的机理。同时也为关于替代线性无阈值 (Linear No-Threshold model, LNT) 理论的争论提供了一个新的参考实例。显然对未来的职业辐射卫生标准理论依据尚需更深入的研究。

参考文献

- 1 陶金莉, 沈亚领, 魏东芝, 等. 微生物学通报, 2004, **31**(2): 45-48
TAO Jinli, SHEN Yaling, WEI Dongzhi, *et al.* Microbiol-
ogy, 2004, **31**(2): 45-48
- 2 杨劲松, 李斌, 陈文学, 等. 热带作物学报, 2003, **24**(2):
77-80
YANG Jingsong, LI Bin, CHEN Wenxue, *et al.* Chinese J
Tropical Crops, 2003, **24**(2): 77-80
- 3 陈冠群, 杨东靖, 杜连祥, 等. 食品与发酵工业, 2004,
29(3): 19-21
CHEN Guanqun, YANG Dongjing, DU Lianxiang, *et al.*
Food Ferment Ind, 2004, **29**(3): 19-21
- 4 赵峰, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 海洋水产研究, 2003, **24**(4):
26-31
ZHAO Feng, YANG Aiguo, LIU Zhihong, *et al.* Mar
Fisheries Res, 2003, **24**(4): 26-31
- 5 刘俊平, 安志兴, 张涌. 动物医学进展, 2004, **25**(2):
109-110,125
LIU Junping, AN Zhixin, ZHANG Yong. Prog Vet Med,
2004, **25**(2): 109-110,125
- 6 Rettberg P, Horneck G, Strauch W, *et al.* Advance in
Space Research, 1998, **22**(3): 335-339
- 7 Cockell, Charles S. Planetary and Space Science, 2000,
48(2-3): 203-214
- 8 Olivieri G, Bodyncote J, Wolf S. Science, 1984, **223**
(4636): 594-595
- 9 LIU S Z, Cai L, SUN S Q. Int J Radiat Bio, 1992, **62**(2):
187-190
- 10 王楚松. 水产养殖, 1995, (2): 19-21
WANG Chusong. J Aquaculture, 1995, (2): 19-21
- 11 Calabrese E J, Baldwin L A. Hum Exp Toxicol, 2000,
19(1): 41-47
- 12 Calabrese E J, Baldwin L A. Hum Exp Toxicol, 2000,
19(1): 85-97
- 13 Calabrese E J, Baldwin L A. Trends Pharmacol Sci, 2001,
22(6): 285-291
- 14 Jayjock M A, Lewis P G. Hum Exp Toxicol, 2002, **21**(7):
385-389
- 15 Bonner W M. Mutat Res, 2004, **568**(1): 33-39
- 16 Christiani D C, Zhou W. Hum Exp Toxicol, 2002, **21**(7):
399-400
- 17 Liu S Z, Cail. SUN J B. Acta Biol Hungarica, 1990,
41(1-3): 149-157
- 18 Liu S Z, Li X K. Proc Int Symp BELLE to radiation and
Related Agents(ISBELLES'93), Changchun, China, 1993,
77-72
- 19 Smith-Sonneborn J, Calabrese C J. Eds Boca Raton:
Lewis publishers, 1994, 243-254
- 20 Liu S Z, Wei L, Sugahara T, *et al.* " High levels of natural
radiation" Elsevier Science BV. 1997, 341-353
- 21 Davis J M, Svendsgaard D J. J Toxicol Environ Health,
1990, **30**(2): 71-83
- 22 Brophy M O. Hum Exp Toxicol, 2002, **21**(7): 391-393
- 23 Axelrod D, Burns k, Davis D, *et al.* Int J Occup Environ
Health, 2004, **10**(3): 335-339
- 24 Lesser M P, Krese V A, Barry T M. J Exp Biol, 2003,
206(22): 4097-4103

Effects of UV-C irradiation on development of goldfish embryos

WU Jian¹ DAI Guifu¹ ZHANG Fengqiu² LU Lei³¹(Department of Biotechnology, Zhengzhou University, Henan 450052)²(Key Lab. of Ion Beam Biotechnology, Zhengzhou University, Henan 450052)³(College of Physics, Zhengzhou University, Henan 450052)

ABSTRACT Goldfish embryos at five different developmental stages, from fertilized eggs to heart beating stage, were irradiated by UV rays, and hatching rate, darkly pigmented eye rate and abnormal embryo rate of the irradiated embryos were investigated. Being subjected to very low amount (≤ 3 min.) of the UV irradiation, the embryos earlier than gastrula stage showed hormesis. However, the embryos at gastrula or heart beating stage were very sensitive to UV irradiation, showing just damage effect, which was very strong even at very low amount of the UV irradiation. The results also showed that development of the gastrula embryos irradiated by the UV rays stopped before darkly pigmented eye stage, whereas embryos irradiated at heart beating stage by the UV rays could develop to the darkly pigmented eye stage, though they could not hatch out.

KEYWORDS UV radiation, Goldfish, Embryo

CLC Q5-3, S961, Tu113.8⁺8