

混合辐照饲料喂养大鼠的骨髓 多色性红细胞微核细胞率观察

杨家宽 林伟琦 蔡荣妹 崔胜庆

(上海医科大学 上海市放射医学研究所)

摘要 本文用两组辐照饲料对 Wistar 大鼠进行了110天和150天喂养,观察其骨髓多色性红细胞(PCE)的微核效应。一组为混合辐照饲料组,辐照饲料占80%;另一组为辐照蔬菜组,辐照蔬菜占总饲料的3%,辐照剂量为2 KGy,是实际需要的辐照剂量2倍以上。同时设有普通饲料的阴性对照组,和用环磷酰胺处理或给以全身整体照射的阳性对照组。微核测定采用 Giemsa 染色法、Harris 苏本精复染法和荧光染色法,两批实验均表明,在本实验条件下,不论是喂养混合辐照饲料还是辐照蔬菜,都未见到大鼠骨髓 PCE 微核细胞率有所增高。

关键词 混合辐照饲料;辐照蔬菜;微核;卫生安全性。

前 言

辐照保藏食品是和平利用原子能的一个重要方面。辐照处理作为食品保藏的方法之一,有许多独特的优点,有着巨大的经济效益和社会效益。四十余年来,国内外进行了广泛而深入的研究。在辐照食品的卫生安全性研究方面做了大量的工作^[1~2]。

由 Schmid 等人创立的哺乳动物骨髓多色性红细胞(PCE)微核测定已被公认为经典的微核测定方法^[3],在筛选未知的潜在致突变物中是一个简便、可靠的指标。

Hossain 等在1976年首次将微核测定用于辐照食品卫生安全性研究^[4],随后不少作者也都采用这一指标来观察辐照食品有无致突变作用^[5~12]。混合辐照饲料的动物喂养研究可以阐明较多问题,但这种研究不多^[13~14]。

本文采用了三种染色方法对连续110~150天食用混合辐照饲料的大鼠骨髓 PCE 微核细胞率进行了观察,现将结果报道于下。

材 料 与 方 法

一、实验动物

实验动物系上海医科大学营养卫生教研室饲养的 Wistar 大鼠,体重212~559g,共80只,雌雄各半。先后观察过两批,每批40只。

第一批为喂养110天的实验观察,分为4个组(每组用大鼠10只):

(1) 混合辐照饲料组 动物食用的辐照饲料按重量计算占整个饲料的80%,包括米、面粉、黄豆、菜干、鱼粉、香肠和牛肉干;

- (2) 辐照蔬菜组 仅菜干进行照射, 占饲料重量的3%;
- (3) 阴性对照组 除饲料未进行辐照外, 其饲料组成及处理等均和辐照饲料组相同;
- (4) 阳性对照组 在动物处死前30小时和6小时分别给予腹腔注射环磷酰胺一次, 剂量均为50 mg/kg体重, 其它条件均和辐照饲料组一样。

第二批实验喂养150天。分组情况同第一批, 唯一不同的是阳性对照组处理, 这批动物在处死前24小时以 ^{60}Co γ 线进行全身照射, 照射剂量为2 Gy。

二、饲料组成

每100 g饲料中, 含米36 g、面粉17 g、黄豆10 g、菜干3 g、鱼粉10 g、香肠2 g、牛肉干2 g、蛋粉14 g、花生油2 g、鱼肝油1 g、食盐1 g、碳酸钙1 g、酵母粉1 g。另外加入维生素B₁0.5 mg、B₂0.8 mg和pp 4 mg。其营养成分中蛋白质热量占20%左右, 热量为 $(380\sim400) \times 4.184 \text{ KJ}/100 \text{ g}$ (380~400千卡/100 g)饲料。

三、饲料处理

将各成份制备成粉状, 120℃烤干2小时, 待凉后储存于密封塑料桶中, 以后按上述比例掺和, 最后加入油料、酵母、碳酸钙及各种维生素等, 置入电动搅拌机中搅拌混合约20 min使其均匀。

四、辐照处理

辐照源为 ^{60}Co γ 线。香肠、牛肉干照射8 KGy, 鱼粉照射8 KGy, 菜干照射2 KGy, 米、面粉和黄豆照射0.3 KGy。照射后贮存3个月以上才供食用。

五、标本制作

放血致死的大鼠取出左侧股骨, 用小牛血清冲出髓液, 1500 rpm离心5 min, 以沉降物制作骨髓涂片。采用三种染色方法:

- (1) 常规的Giemsa染色法;
- (2) Harris苏木精液复染 在Giemsa染色涂片中对见到的带有微核的每一个PCE做一标记, 后用盐酸酒精脱色, 再以Harris苏木精液复染, 计数微核阳性的细胞;
- (3) 荧光染色法 基本参照Hayashi等人方法^[15]。吖啶橙染色液系Fluka进口分装试剂, 工作液为0.1%的吖啶橙生理盐水溶液1份和PH为6.8的磷酸缓冲液15份, 于室温下染色3 min, 在Nikon XF-EFD-II型荧光显微镜(激发滤片B)油镜下进行观察计数。

Giemsa染色中, 每只大鼠观察2张涂片, 每片计数1000个PCE, 记录含有微核的PCE数, 分别由2名工作人员进行计数, 结果取其两者的均值。荧光法观察时, 每组观察8只大鼠的骨髓涂片, 每只动物计数1000个PCE。均以%进行表示。计数时观察者都不了解该涂片为何组动物的标本。

- (4) 统计处理 采用反正弦平方根转换后进行方差分析, 以比较各组间有否统计学差异。

结果与讨论

喂养110天的大鼠骨髓PCE微核细胞率结果见表1。

第一批喂养110天的观察结果表明, 不论是Giemsa染色法还是苏木精复染法, 环磷酰胺处理的阳性对照组得到预期的阳性结果, 其PCE微核细胞率显著高于其它三组, 而另外三组间的PCE微核细胞率则没有显著差别。

第二批实验喂养150天的观察结果如表2、表3所示。

表 1 实验开始后 110 天各组大鼠的骨髓 PCE 微核细胞率

Table 1 Incidence of polychromatic Erythrocytes with Micronuclei in Bone Marrow of Rats in Various Groups on 110th Day Following Beginning of Experiment

组 别 Groups	动物数 No. of rats	计数 PCE 数 No. of PCE counted	Giemsa 染色 Giemsa staining		Harris 苏木精复染 Harris hemotoxylin restaining	
			微核细胞数 No. of PCE with MN	微核细胞率 Incidence of PCE with MN(%)	微核细胞数 No. of PCE with MN	微核细胞率 Incidence of PCE with MN(%)
混合辐照饲料组 Mixed irradiated foods	10	20000	28	1.4±0.5	10	0.5±0.2
辐照蔬菜组 Irradiated vegetables	10	20000	31	1.6±0.4	18	0.9±0.3
普通饲料对照组 General foods negative control	10	20000	32	1.6±0.2	15	0.8±0.2
环磷酰胺对照组 Cyclophosphamide positive control	10	20000	340	17.0±2.0**	327	16.4±1.9**

**和其它组比较, $p < 0.01$,Compare with other groups, $p < 0.01$,

表 2 实验开始后 150 天各组大鼠的骨髓 PCE 微核细胞率

Table 2 Incidence of Polychromatic Erythrocytes with Micronuclei in Bone Marrow of Rats in Various Groups on 150th Day Following Beginning of Experiment

组 别 Groups	动物数 No. of rats	计数 PCE 数 No. of PCE Counted	Giemsa 染色 Giemsa staining		Harris 苏木精复染 Harris hemotoxylin restaining	
			微核细胞数 No. of PCE with MN	微核细胞率 Incidence of PCE with MN(%)	微核细胞数 No. of PCE with MN	微核细胞率 Incidence of PCE with MN(%)
混合辐照饲料组 Mixed irradiated foods	10	20000	40	2.0±0.4	23	1.2±0.3
辐照蔬菜组 Irradiated vegetables	10	20000	37	1.8±0.2	19	1.0±0.3
普通饲料对照组 General foods negative control	10	20000	17	0.8±0.2	11	0.6±0.2
整体照射对照组 Whole body irradiation positive control	10	20000	254	12.7±1.7**	243	12.2±1.7**

**说明同表①。

In the same meaning as in table 1.

表 3 实验开始后 150 天各组大鼠骨髓 PCE 微核细胞率(荧光染色法)

Table 3 Incidence of Polychromatic Erythrocytes with Micronuclei in Bone Marrow of Rats in Various Groups on 150th Day Following Beginning of Experiment (Acridine Orange Fluorescence Staining)

组 别 Groups	动物数 No. of rats	计数 PCE 数 No. of PCE counted	微核细胞数 No. of PCE with MN	微核细胞率 Incidence of PCE with MN (%)
混合辐照饲料组 Mixed irradiated food	8	8000	13	1.6±0.5
辐照蔬菜组 Irradiated vegetables	8	8000	11	1.4±0.4
普通饲料对照组 General foods negative control	8	8000	8	1.0±0.3
整体照射对照组 Whole body irradiation positive control	8	8000	107	13.4±1.8**

**说明同表①。

In the same meaning as in table 1,

表2、表3的数据说明, 喂养150天的实验结果和第一批喂养110天的实验结果类似, 即不论混合辐照饲料组或辐照蔬菜组, 还是普通饲料组, Giemsa染色或是Harris苏木精复染, 均显示三组动物的微核细胞率没有显著差别, 荧光染色法也获得同样结果。整体照射2 Gy的阳性对照组, 以上三种测定均显示出这组大鼠的骨髓PCE微核细胞率较另外三组显著增高, 达到了阳性对照组的要求, 这正是我们所预料的。

如上所述, 两批实验一致表明, 无论是辐照蔬菜组(辐照蔬菜占全部饲料3%), 还是辐照饲料占整个饲料80%的混合辐照饲料组, 三种染色方法观察所见都说明其骨髓PCE微核细胞率和普通饲料对照组没有显著差异, 这表明在本实验条件下, 两组辐照食品均对大鼠骨髓多色性红细胞没有致突变效应。这和迄今为止的所有国内外有关研究结论相符。不少作者研究指出, 辐照马铃薯^[4]、辣椒^[5]、洋葱^[6]、鸡肉、鱼、枣^[7]、小麦^[8]、鲭鱼^[9]、猪肉^[10]、酒^[11]、蘑菇^[12]、葡萄糖^[13]等等, 无论对大鼠、小鼠或是中国地鼠的微核效应都是阴性结果。

辐照全饲料微核观察报道仅见到一篇^[14]。辐照饲料包括麦粉、花生饼、鱼粉、绿豆粉、干酵母等, 照射剂量分75000 R和200000 R两组, 但每组仅为3只小鼠, 喂养时间只有7天, 结果为阴性。本文辐照蔬菜组照射剂量为2 KGy, 是实际需要的照射剂量2倍或更高; 混合辐照饲料组的辐照饲料比例高达80%, 为人们今后可能实际食用的比例8倍以上; 喂养期间分别为110天和150天, 每组动物8—10只; 微核测定方法除经典的Giemsa染色外, 另采用了可以排除微核假阳性的Harris苏木精复染方法, 还建立了1983年国外推荐应用的荧光方法, 都表明这两组辐照食品对大鼠骨髓PCE微核没有致突变效应。由于我们改虑了相当的安全系数, 故有理由推测人体食用辐照食品是不会引起微核细胞率增高的。李珏声等进行的辐照花生仁人体3个月试食观察, 表明对外周血淋巴细胞微核细胞率确实没有增高^[15]。我们对78名90天连续食用35种辐照食品的志愿者(辐照食品占总膳食中比例为60.3%), 除了用浓集法观察外周血淋巴细胞微核率外, 还采用了比较敏感的培养微核法, 同样没有见到微核细胞率有所增高^[17]。

关于微核染色方法, 一般使用的是Giemsa等常规染色方法。但我们根据以往对外周血淋巴细胞微核的观察, 发现有假阳性^[18]。这次研究中, 采用了Harris苏木精复染法, 也首次发现骨髓PCE常规Giemsa染色中有假阳性现象; 但此法比较费时。荧光法可以清晰地识别多色性红细胞及其中存在的微核, 也能轻易地区分肥大细胞颗粒等假阳性物质和具有DNA成分的微核结构, 值得今后推广应用。

承上海医科大学卫生统计教研組主任张照寰付教授对统计分析给予热情指导, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] P. S. Elias, in "Recent Advances in Food Irradiation", Edited by P. S. Elias & A. J. Cohen, Elsevier Bioch Press, pp 235-245, 1983.
- [2] Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, WHO Tech. Rept. Ser. No. 659, Geneva, 1981.
- [3] J. A. Heddle, M. Hite, B. Kirkhart, J. T. MacGregor, G. W. Newell, M. F. Salamone, Mut. Res., 123, 61 (1983).
- [4] M. M. Hossain, J. W. Huismans, J. F. Diehl, Toxicology, 6, 243 (1976).
- [5] R. C. Chaubey, B. R. Kavi, P. S. Chauban, P. S. Sundaran, Acta Aliment., 8, 197 (1979).
- [6] S. N. Goud, O. S. Reddi, P. P. Reddy, J. Barna, Int. J. Radiat. Biol., 41, 347 (1982).
- [7] H. W. Renner, U. Graf, F. E. Würigler, H. Altmann, J. C. Asquith, P. S. Elias, Food Cosmet et Toxicol., 20, 867 (1982).

- [8] J. W. Tesh & A. K. Palnor, Food Irradiat. Inf., 10, 183 (1980).
[9] P. S. Chauban, INIS Atomindex, 14, 742017 (1983).
[10] 王瑞淑, 吴紫华, 周洪明, 曾令福, 张银柱, 吴柯, 《中华医学会第一届全国食品卫生学术会议交流资料》, 四川医学院, 1981.
[11] 史纪兰, 黄权光, 《第二届全国辐射研究学术会议论文摘要汇编》, 上册, 078, 1982.
[12] 张淑俭, 核技术, 4, 25 (1986).
[13] M. Aravindashan, R. C. Chaubey, P. S. Chauban, K. Snndaram, 《国际辐射保藏食品论文集》, pp 32, 四川省原子核应用技术研究所情报室, 1980.
[14] P. P. Reddy, & O. S. Reddi, Int. J. Radiat. Biol., 39, 217 (1981).
[15] M. Hayashi, T. Sofuni, M. Ishidate Jr., Mut. Res., 120, 241 (1983).
[16] 李珏声, 潘焜华, 林荣坤, 张秀珍, 孙建方, 钟进义, 尹占莉, 王建华, 张灿, 食品卫生学进展, 2, 56 (1984).
[17] 上海放射医学研究所, 上海医科大学公共卫生学院, 中国科学院上海原子核研究所, 本刊(待发表).
[18] 杨家宽, 程文英, 蔡荣妹, 罗伟华, 徐萍, 核防护, 3, 64 (1980).

(1985年10月7日收到)

OBSERVATION ON THE INCIDENCE OF POLYCHROMATIC ERYTHROCYTES WITH MICRONUCLEI IN THE BONE MARROW OF RATS FED MIXED IRRADIATED FOODS

Yang Jiakuan Lin Weiqi Cai Rongmei Cui Shengqing
(Shanghai Medical University, Shanghai Institute of Radiation Medicine)

ABSTRACT This paper deals with the observation of micronuclear incidence in PCE bone marrow of Wistar rats. Two groups of rats were fed irradiated foods for 110 days and 150 days respectively. One was fed irradiated foods, in which irradiated foods occupied 80% of total food. Another was that in which irradiated vegetables being added in 3%. The radiation dosage was 2 kCy (200000 rads)..

In addition, there were negative control rats fed general foods and positive rats treated by cyclophosphamide or whole body irradiation with 2 Gy (200 rads). In this experiment, Giemsa staining, Harris hemotoxylin restaining and acridine orange fluorescence staining were used. From the results, it was indicated that the incidence of PCE with micronuclei in bone marrow of rats was not increased in the animals feeding mixed irradiated foods or in irradiated vegetables.

KEY WORDS Mixed Irradiated Foods; Irradiated Vegetables; Micronuclei; Wholesomeness.