

雌性小鼠受小剂量 γ 射线照射导致非整倍体胚胎和显性致死的研究

姚素艳 张朝阳 戴连连 高长文

(卫生部工业卫生实验所, 北京)

摘要 本文报道低龄雌鼠受到0.15—1.56 Gy, 0.05 Gy/min ^{60}Co γ 射线照射后, 过一定时间与正常雄鼠同笼。在胚胎满9.5—11 d时活杀孕鼠, 观察其染色体异常胚胎发生率及显性致死突变率与剂量的关系。结果表明, 在剂量为0.15 Gy时, 其非整倍体胚胎发生率未见增加; 在0.50 Gy以上时, 似随剂量增加而增加。但三体胚胎的剂量效应关系不明显。观察到的显性致死突变率与受照剂量呈直线相关。在上述剂量范围内, 显性致死突变率为5.59%。显性致死突变的效应比非整倍体胚胎的效应高。

关键词 胚胎, 非整倍体, 显性致死突变, ^{60}Co γ 射线

小剂量低剂量率的电离辐射, 能否诱发生殖细胞染色体数目异常及显性致死突变率增加, 是许多学者感兴趣的问题。生殖细胞染色体数目异常和显性致死突变, 都是辐射诱发的机体效应与遗传效应的重要方面, 而生殖细胞染色体数目及结构异常均可导致遗传效应的发生。王明东等^[1]曾观察了X线诱发精母细胞染色体畸变与显性致死突变之间的关系。胚胎细胞染色体数目异常与显性致死之间的关系未见报道。随着核工业、核电站及医用放射性核素应用的日益发展, 及妇女在以上行业中就业量的不断增加, 人们对接受小剂量电离辐射能否导致流产率及其后代异常率增加存有疑虑, 尤其是非整倍体胚胎问题, 且学者们的观点不同。据文献报道^[2], X线照射雌鼠较敏感阶段的生殖细胞能够显著地增加非整倍体胎儿的频率, 而Strausmanis^[3]等的实验结果没有观察到这种增加。人的流行病学资料表明^[4], 低剂量X线照射妇女, 可导致新生儿Down's综合征发生率增加; 而原子弹爆炸后幸存者的后代中却未发现类似的增加。为了探讨小剂量电离辐射的损伤规律, 本文研究了雌鼠受到不同剂量 γ 线照射后, 其非整倍体胚胎率及显性致死突变率与剂量的关系。

材 料 和 方 法

(1) 实验动物 本文选用中国医学科学院实验动物繁育场生产的NIH纯种小鼠(合格证号为京动字第3707 M 17), 9—11周龄。每个剂量组雌雄各约100只, 分为对照组和5个剂量组。

(2) 照射方式 用中国计量科学研究所的 ^{60}Co 源对雌性小鼠实施 γ 线急性全身外照射。剂量率为0.05 Gy/min, 共6个组分别为0、0.15、0.50、0.70、1.07和1.56 Gy。在照射期间, 将每只小鼠装在 $2.3 \times 2.5 \times 9.5 \text{ cm}^3$ 的有机玻璃小盒中。为了避免鼠间相互屏蔽, 将大盒(包括10—20个小盒)立位放置在照射架上, 小鼠在盒内不能自由移动。

(3) 显性致死突变率 在雌鼠受照后7—12 d, 通过检查性周期, 选择动情期的雌鼠与正常

本研究属国家核安全技术研究, “七五”科技攻关课题“核电站电离辐射对人群影响的卫生学评价”的分题

雄鼠合笼。当孕鼠胚胎满 9.5—11 d 时, 将其脱颈处死, 观察其胚胎的大小、形状、体色, 以判断活胎或死胎; 必要时在解剖显微镜下观察。按照下列公式计算显性致死突变率:

$$\text{显性致死突变率} = \frac{\text{受照组(活胎仔数/总胎仔数)}}{\text{对照组(活胎仔数/总胎仔数)}} \times 100\%$$

(4) 胚胎细胞染色体标本的制备 取出处死孕鼠胚胎后, 按下列方法制备染色体标本: ① 将剥离出的单个胚胎分别置于盛有生理盐水的小平皿中, 在离心管口处剪碎并冲入离心管底部。加入含胰蛋白酶(最终浓度 0.6 mg/ml)的 BSS 液(Earles' 盐溶液), 消化 5 min; ② 再加入含秋水仙素(最终浓度 15—20 $\mu\text{g/ml}$)的 BSS 液, 37℃ 恒温箱中孵育 1.5 h; ③ 离心后用 0.075 mol/L 的 KCl 低渗, 再按常规染色体标本制备方法固定、制片及染色。

(5) 染色体标本的分析 每个剂量组(除个别组外)分析 300 胎以上。每胎分析 20—80 个分散好的中期细胞, 记录亚二倍体[每个细胞均为 39 条染色体及具有 39 和 40 条染色体的嵌合体(39/40)], 超二倍体(即三体: 每个细胞均为 41 条染色体及 41/40 的嵌合体)、多倍体(染色体数为 60, 80 及 60/40、80/40), 并记录染色体结构异常, 主要是平衡易位携带者(每个细胞中均具有一条不能配对的大染色体)。每个异常细胞均记录坐标, 以便核对。对于嵌合体, 为了尽量减少制片过程中人为造成的亚二倍体, 采取扩大细胞数的方式来减少人为的误差, 即每胎在分析的 40—80 个细胞中, 85% 以上的细胞染色体数为 39。显著性检验的方法为 χ^2 检验。

结 果

(1) 染色体数目及结构异常 非整倍体胚胎的发生率, 在 0.15 Gy 剂量组未发现增加, 在 0.50 Gy 以上时有随剂量增加而增加的趋势(见表 1)。从各不同剂量水平来看, 非整倍体胚胎发生率与受照剂量呈直线关系(见图 1)。

Tab 1. Dose-response relationship of aneuploid fetuses after γ -irradiation

Dose (Gy)	Number of fet- uses analysed	Number of hypodiploid fetuses (%)			Number of hyperdiploid fetuses (%)			Total (%)	P
		39 chr- om./cell	39/40 chr- om./cell	Total	41 chr- om./cell	41/40 chr- om./cell	Total		
Control	469	0	2	2(0.43)	0	0	0	2(0.43)	
0.15	475	1	0	1(0.21)	0	0	0	1(0.21)	
0.50	438	0	1	1(0.23)	2	2	4(0.91)	5(1.14)	<0.05
0.70	304	0	1	1(0.33)	2	0	2(0.66)	3(0.99)	>0.05
1.07	182	0	3	3(1.65)	0	0	0	3(1.65)	<0.01
1.56	347	1	4	5(1.44)	1	1	2(0.58)	7(2.02)	<0.05

Tab 2. Frequencies of polyploid in variant groups

Dose (Gy)	Number of fet- uses analysed	Polyploid (%)			Total (%)
		60 chrom./cell	60/40 chrom./cell	80/40 chrom./cell	
Control	469	1(0.21)	1(0.21)	0	2(0.43)
0.15	475	3(0.63)	0	0	3(0.63)
0.50	438	0	0	0	0
0.70	304	0	0	1(0.33)	1(0.33)
1.07	182	0	0	1(0.55)	1(0.55)
1.56	347	1(0.29)	0	0	1(0.29)

Tab 3. Frequency of dominant lethal mutations induced by low doses of γ -irradiation in female mice

Dose (Gy)	Number of pregnant females	Number of Total fetuses	Number of living fetuses	Number of dead fetuses	Frequency of dom. leth. mutations (%)
0	63	518	499	19	
0.15	83	653	627	26	0.33
0.50	74	480	459	21	0.73
0.70	49	398	369	29	3.76
1.07	87	482	452	30	2.65
1.56	60	533	469	64	8.66

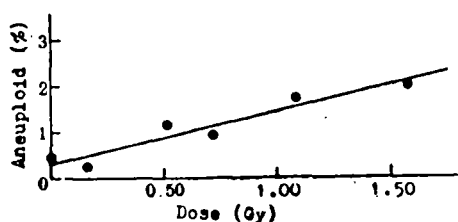


Fig 1. Dose-response relationship of aneuploid fetuses

$y_1 = 0.32 + 1.14 D$, 式中 y_1 为非整倍体胚胎的发生率, D 为剂量(Gy), $r_1 = 0.96 (P < 0.05)$ 。其中亚二倍体的贡献较大。如果以三体为指标, 在 0.50 Gy 以上的各剂量组中其发生率均高于对照组, 但剂量效应关系不明显。主要是分析胎数还不够多, 尤其是对照组和 1.07 Gy 剂量组。

关于多倍体, 在大多数剂量组中都有发现, 但其频率与剂量的关系不明显(见表 2)。在 1.07 Gy 剂量组中观察到 3 胎平衡易位携带者, 其中 2 胎出自同一只母鼠。

(2) 显性致死突变 由表 3 (前表中胎数少于此表, 因为除死胎外, 有部分染色体标本, 尤其是迟胎质量不太好, 和时间所限, 部分染色体标本亦未分析) 可见, 不同剂量组的显性致死突变率随剂量的增加而增加, 呈直线相关。 $y_2 = -1.22 \times 10^{-2} + 5.5868 \times 10^{-2} D$, $r_2 = 0.91 (P < 0.05)$ 。 y_2 为显性致死突变率。显性致死的效应高于非整倍体胚胎的效应。

讨 论

(1) 染色体数目异常 在一个细胞中, 某一对染色体的数目发生了改变而产生了非整倍体, 或整套染色体数目发生了改变而产生了多倍体。非整倍体主要是由于减数分裂时染色体不分离造成的(有时有丝分裂也发生不分离)。在胚胎中观察到的非整倍体, 有双亲中生殖细胞染色体不分离形成的三体 and 单体, 有早期卵裂错误形成的嵌合体及由于罗伯逊易位等形成的非整倍体。据文献报道^[6], 人类常染色体及性染色体三体, 其来源大部分是原发不分离, 小部分是由易位而来, 如 21 三体, 92.5% 是单纯三体, 4.8% 是易位而来, 2.7% (有报道为 11—13%) 是嵌合体。多倍体是由于细胞分裂器受损伤而出现的内有丝分裂或多极分裂所致。

(2) 非整倍体胚胎率与剂量的关系 目前国际上多用观察受精卵或卵母细胞 M II 的方法, 来研究辐射诱发卵母细胞非整倍体的问题, 而以胚胎的非整倍体率为指标的资料相对较少。因为观察非整倍体胚胎的实验工作量大, 费时费力。由于妊娠早期大部分异常胎仔已被淘汰而导致阳性率降低。但这种方法更接近于实际。观察超单倍体的方法阳性率较高, 即使在低剂量水平上也可查到超单倍体率的增加。Tease^[6] 用 0.10—0.50 Gy X 线照射老龄和低龄雌鼠排卵前的卵母细胞, 观察到超单倍体率增加, 且剂量效应关系为直线。在本文的实验结果中, 0.15 Gy 剂量组的非整

倍体胚胎率未发现增加。Speed^[7]等指出, 使用0.02和0.16 Gy之间X线照射表明, 这种低剂量范围X线不能使低龄雌鼠的后代非整倍体胚胎率增加, 这和本文的结果有相似之处。Hansman等^[8]用0.05—0.30 Gy X线照射雌鼠, 发现0.20和0.80 Gy组的超单倍体率明显增加。本文的实验结果中0.70 Gy组的非整倍体胚胎率虽高于对照组, 但无统计学意义, 而0.50、1.07及1.56 Gy时则发生率显著高于对照组。当然由于射线种类及观察指标不同, 结果会有差异。

(3) 显性致死突变率与剂量的关系 显性致死突变可由辐射诱发的基因突变, 染色体数目改变及结构畸变所致, 可导致胚胎早、晚期死亡。因染色体数目异常而导致的胚胎死亡还占一定的比率。在人的自发流产胎中, 常染色体三体和X单体占20%以上, 并占染色体异常的全部流产胎的70%以上。在大约0.4%的新生儿中带有性染色体和常染色体的数目异常^[9]。显性致死突变的表达方法, 不同学者用的方法不同。用植入前或植入后丢失可以表示显性致死突变率, 但由于黄体记数的确切性有限, 故王孝铭等^[10]认为应用产前死亡的数据计算显性致死突变率。Edwards^[11]及吴骋等^[12]则用植入活胎来估算。本文比较了用植入活胎数及用死胎数估算的方法, 认为用植入活胎数估算显性致死突变率为好。本文中0.15—1.56 Gy剂量范围内一次性⁶⁰Co γ 线照射雌鼠, 估算的显性致死突变率为5.59%。

实验结果表明, 不同剂量 γ 线照射雌鼠, 其胚胎细胞染色体非整倍体和显性致死突变率均随剂量增加而增加, 呈直线关系。二类观察指标均反映出小剂量低剂量率的电离辐射, 对生殖细胞产生的辐射损伤效应。比较非整倍体胚胎率及显性致死突变率的回归方程, 可见后者高于前者。这是因为诱导的非整倍体胚胎只是辐射损伤效应的一部分, 染色体多倍体、染色体结构异常及基因突变等因素均可提高显性致死突变率。

本文在魏履新教授指导下进行, 陈德清副教授对本文提出了宝贵的修改意见, 胡家成、欧向明、罗素明及戴向前等同志提供了实验帮助, 在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 王明东, 杨宝辰, 金玉珂, 白求恩医科大学学报, 15(1), 19(1989).
- [2] H. J. Evans, M. F. Lyon and A. Czeizel, *Mutat. Res.*, 175(4), 263(1986).
- [3] R. Strausmanis, I. B. Henrikson, M. Holmberg and C. Rönnbäck, *Mutat. Res.*, 49(2), 269(1978).
- [4] E. Alberman, Anun, *Hum. Genet.*, 36, 195(1972).
- [5] 夏家辉, 李麓芸等译, 国外医学遗传学分册, 1—2, 17(1986).
- [6] C. Tease, *Mutat. Res.*, 95, 287(1982).
- [7] R. M. Speed and A. C. Chandley, *Mutat. Res.*, 84(2), 409(1981).
- [8] I. Hansman, J. Jenderny and H. D. Probeck, *Hum. Genet.*, 61, 190(1982).
- [9] 任灿军, 周白鸣译, 电离辐射与效应, 联合国原子能辐射效应科学委员会1977年向联合国大会的报告及附件(下), 第584页, 原子能出版社, 1986, 北京第一版。
- [10] 范耀山, 王孝铭主编, 现代基础医学讲座, 医学遗传学分册, 黑龙江省出版局, 哈尔滨, 1982, 第225页。
- [11] R. G. Edwards and A. G. Searle, *Genet. Res.*, 4, 389(1963).
- [12] 吴骋, 王又明, 陈小衡, 中华放射医学与防护杂志, 1(4), 1(1981).

(稿件收到日期: 1990年7月16日)

FREQUENCIES OF ANEUPLOID AND DOMINANT LETHAL MUTATIONS IN YOUNG FEMALE MICE INDUCED BY LOW DOSES γ -RAYS

Yao Suyan, Zhang Chaoyang, Dai Lianlian and Gao Changwen

(Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of Public Health, Beijing)

ABSTRACT Relationship between aneuploid, dominant lethal mutations and doses in young female mice induced by low doses γ -rays was examined. The results suggest that the frequencies of aneuploid of embryos were not found increase at 0.15 Gy, but increases at over 0.50 Gy after irradiation in groups. The frequencies of aneuploid and dominant lethal mutations were increased with increasing doses and fitted linear relationship. The dose-response relationship of trisomic was not significant. The frequency of dominant lethal mutations induced by ^{60}Co γ irradiation is 5.59%. The effect of dominant lethal mutation is higher than that of the aneuploid.

KEYWORDS Embryo, Aneuploid, Dominant lethal mutations, γ -rays

上接第209页 (Continued from p 209)

THE EFFECTS OF METRONIDAZOLAMIC ACID ON THE RECOVERY FROM X-RAY INDUCED POTENTIALLY LETHAL DAMAGE IN V_{79} CELLS

Yang Lixi and Zheng Xiulong

(Second Military Medical College, Shanghai)

ABSTRACT In this paper it is reported that the recovery from 6—12 Gy X-ray irradiation-induced potentially lethal damage (PLD) in plateau-phase V_{79} cells, following incubation for 2—6h postirradiation was observed. The survival ratio was 1.5—2.0. While using nontoxic concentration below 4 mmol/L of metronidazolic acid (CM), the significant inhibiting effects of CM on 6—12 Gy X-ray induced PLDR was evaluated. The repair inhibition factor (RIF) ranged from 1.31—46.30. However, the CM treatment with a 6 h incubation following 12 Gy radiation showed the highest RIF which were 14.03, 28.16 and 46.30 for 0.5, 1.0 and 2.0 mmol/L CM respectively. These results indicate that CM strongly inhibits radiation induced PLDR and the effectiveness depends on CM concentration, postirradiation incubation time and the radiation doses, suggesting that CM fixes the X-ray induced PLD, and thereafter prevents its repair. The molecular mechanism of CM inhibiting effects on PLDR is discussed.

KEYWORDS CM, Potentially lethal damage recovery (PLDR), Repair inhibition factor (RIF), V_{79} cells