

在出生前以氚水照射致大鼠脑发育障碍的剂量效应关系研究

杨志远 郭月凤 王明明

(中国辐射防护研究院, 太原 030006)

摘要 以脑组织中游离氨基酸含量为指标, 观察出生前因氚水照射引起的大鼠脑发育障碍。实验用妊娠 11 d 的大鼠经腹腔单次注入 7.4×10^3 — 3.7×10^6 Bq/ml (体水) 放射性浓度的氚水。在仔鼠出生后 18 d 将其开颅取出大脑。取一半脑组织用高效液相色谱 (HPLC) 测定脑组织中游离氨基酸含量。结果表明: 受照仔鼠大脑组织中游离氨基酸含量随照射剂量增加而增多。在仔鼠总吸收剂量为 0.0038—1.9 Gy 范围内, 大脑组织中游离氨基酸含量增加的百分率与剂量对数值之间可拟合成直线回归方程 $\hat{Y} = A + B \lg D$ 。

关键词 氚水 (HTO), 氨基酸, 辐射, 剂量效应关系, 大鼠

日本受原子弹爆炸的远后效应调查的资料证明, 人的中枢神经系统是出生前照射诱发损伤最敏感的系统之一, 辐射诱发人类发育异常的主要形式是智力迟钝, 而且与受照剂量呈线性相关^[1]。直到 1984 年人们才确信, 电离辐射杀死脑细胞而导致儿童小头畸形、智力迟钝和严重智力障碍^[2]。脑细胞破坏和死亡必然伴随细胞蛋白质分解过程。因而以实验动物观察辐射引起的脑内氨基酸含量的改变, 可以作为认识辐射诱发人类智力发育障碍的生物学基础。在其出生前以低剂量氚水照射可导致大鼠脑细胞缺失, 这一效应与剂量对数值呈线性关系^[3], 本文针对脑内氨基酸含量改变研究其剂量的效应。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

采用 Wistar 种 100—110 d 龄雌性大鼠, 随机分成四个实验组和一个对照组, 每组 4 只, 每只雌鼠分别与一只同龄雄鼠合笼, 每日清晨检查阴道涂片, 发现精子时的日期定为妊娠第 1 d。实验组母鼠于妊娠第 11 d 经腹腔注入 1—3 ml 适当浓度的氚水, 使四个实验组母鼠体水氚放射性浓度在 7.4×10^3 — 3.7×10^6 Bq/ml 范围内 (见表 1)。氚水放射性活性用液闪法测定。用外标准道比法

Tab 1. Doses absorbed by 18-day-old young rats

Group	Peak concentration of ^3H in mother rats body water /Bq·ml ⁻¹	Average time fo exposure in uteru of fetus rats/d	Absorbed doses/Gy		
			Fetus	Off spring	Total amount
1	7.4×10^3	12.0	0.0022	0.0016	0.0038
2	3.7×10^4	12.2	0.011	0.008	0.019
3	3.7×10^5	12.0	0.11	0.08	0.19
4	3.7×10^6	12.4	1.1	0.8	1.9

收稿日期: 初稿 1992-07-26, 修改稿 1992-12-14

进行淬灭校正,液闪仪为美国贝克曼公司出品,LS-9000型,1990年经全国比对合格。对照组母鼠注入2 ml蒸馏水,母鼠体重按体重的62%计算^[4]。仔鼠出生后第18 d开颅取出大脑组织,用HPLC法测定氨基酸含量,反相梯度洗脱,丹酰氯柱前衍生,荧光检测,微机处理色谱图自动分析,HPLC仪为日本日立公司产品638-50型。方法详见文献[5]。

1.2 氘水 β 辐射剂量的估算

给大鼠单次注入氘水,体水氘浓度达平衡后,其浓度随时间呈指数减少。如不考虑组织结合氘的剂量贡献,氘水注入母鼠体内给其仔鼠造成的总吸收剂量(D_a)可由仔鼠在子宫内受母鼠体水氘照射的吸收剂量(D_e),和仔鼠出生后受其自身体水氘照射的吸收剂量(D_f)两部分组成,其计算方法和计算公式见文献[6]。

Tab 2. Contents of cerebral free amino acids in various groups of young rats, $\mu\text{g/g}$ cerebral tissue

	Dose/Gy				
	0	0.0038	0.019	0.19	1.9
Serine	28.07 $\pm$ 16.04	28.63 $\pm$ 8.02	38.51 $\pm$ 10.33	34.96 $\pm$ 17.10	50.38 $\pm$ 15.83
Hydroxyptoline	12.10 $\pm$ 5.06	12.11 $\pm$ 2.70	12.34 $\pm$ 4.56	20.25 $\pm$ 5.48 ⁽¹⁾	27.78 $\pm$ 7.61 ⁽¹⁾
Aspartic acid	12.01 $\pm$ 8.01	12.72 $\pm$ 6.49	24.41 $\pm$ 7.59 ⁽¹⁾	26.80 $\pm$ 12.58 ⁽¹⁾	27.21 $\pm$ 7.11 ⁽¹⁾
Glycine	87.94 $\pm$ 17.94	126.41 $\pm$ 25.20 ⁽¹⁾	142.24 $\pm$ 20.83 ⁽¹⁾	163.00 $\pm$ 19.59 ⁽¹⁾	199.34 $\pm$ 15.81 ⁽¹⁾
Leucine + isoleucine	147.25 $\pm$ 44.30	198.41 $\pm$ 42.62	229.54 $\pm$ 20.83	246.31 $\pm$ 30.54	294.12 $\pm$ 47.33 ⁽¹⁾
Histidine	45.01 $\pm$ 16.90	70.55 $\pm$ 11.43 ⁽¹⁾	78.28 $\pm$ 27.19 ⁽¹⁾	121.80 $\pm$ 36.45 ⁽¹⁾	335.71 $\pm$ 50.86 ⁽¹⁾
Lysine	43.67 $\pm$ 10.69	52.88 $\pm$ 11.00	63.84 $\pm$ 13.01 ⁽¹⁾	67.15 $\pm$ 13.85 ⁽¹⁾	97.38 $\pm$ 17.08 ⁽¹⁾
Tyrosine	3.33 $\pm$ 1.76	4.57 $\pm$ 0.86	4.70 $\pm$ 2.07	9.20 $\pm$ 4.71 ⁽¹⁾	41.67 $\pm$ 5.72 ⁽¹⁾
Proline	189.31 $\pm$ 74.43	209.60 $\pm$ 32.12	212.25 $\pm$ 55.01	214.61 $\pm$ 7.74	277.61 $\pm$ 49.73 ⁽¹⁾
Phenylalanine	72.10 $\pm$ 28.65	77.31 $\pm$ 10.93	75.12 $\pm$ 10.64	89.91 $\pm$ 16.54	117.33 $\pm$ 21.22
Amounts of the 11 amino acids	645.94 $\pm$ 188.43	793.19 $\pm$ 93.01	884.22 $\pm$ 48.49	993.99 $\pm$ 59.55 ⁽¹⁾	1468.50 $\pm$ 180.22 ⁽¹⁾

(1) Significant increase in comparison with control ($p < 0.05$)

2 结 果

2.1 各组仔鼠受氘水照射的吸收剂量

计算结果列于表1。在18 d龄仔鼠的总吸收剂量中,胎鼠期间的照射剂量高于仔鼠出生后的照射剂量。

2.2 大脑游离氨基酸含量测定结果

在每克脑组织中对11种游离氨基酸的含量进行了测定。它们是丝氨酸,羟脯氨酸,天门冬氨酸、甘氨酸、亮氨酸+异亮氨酸、组氨酸、赖氨酸、酪氨酸、脯氨酸和苯丙氨酸。各组共34只仔鼠(每个剂量组6只,对照组10只)大脑样品测定结果见表2。各受照仔鼠大脑内11种氨基酸的总含量及其中每种氨基酸的含量,比对照组都有不同程度增加,且比对照组呈显著性增加($P < 0.05$)的氨基酸种类随剂量增加而增多。

2.3 大脑组织中游离氨基酸含量改变的剂量效应关系

实验结果表明,在子宫受内照射的仔鼠大脑组织中,11种游离氨基酸的分别含量及总含量变化的基本规律是随吸收剂量增加而增多,且氨基酸含量增加的百分率多与剂量的对数值呈线性正相关。两者之间的关系可以拟合成对数直线回归方程。 $\hat{Y} = A + B \lg D$ (见表3)。由表3可见,不同种

Tab 3. Dose-response relationship of contents (fraction increased, %) of cerebral free amino acids

	Dose/Gy				Regression equation $Y = A + B \lg D$		$r^{(3)}$
	0.0038	0.019	0.19	1.9	A	B	
Serine	2.90	37.19	24.55	79.48	63.24	23.94	0.867
Hydroxyproline	0	1.98	67.35	129.59	108.09	50.93	0.972 ⁽¹⁾
Aspartic acid	5.91	103.24	123.15	126.56	135.31	39.79	0.825
Glycine	43.73	61.70	85.35	126.63	113.62	29.99	0.991 ⁽²⁾
Leucine + isoleucine	34.74	55.86	67.27	99.66	90.29	22.61	0.982 ⁽¹⁾
Histidine	56.74	73.91	170.61	645.86	478.32	210.77	0.896
Lysine	21.09	46.19	53.77	122.99	100.80	34.72	0.938 ⁽⁴⁾
Tyrosine	37.23	41.14	176.28	1151.35	803.89	394.76	0.866
Proline	10.72	12.11	13.36	46.64	34.87	12.36	0.841
Phenylalanine	7.23	4.19	24.70	62.69	48.97	21.17	0.928 ⁽⁴⁾
Amount of the 11 amino acid	22.80	36.89	53.88	127.34	102.60	36.98	0.937 ⁽⁴⁾

(1) $p < 0.05$ (2) $p < 0.01$ (3)regression coefficient (4) $0.05 < p < 0.1$

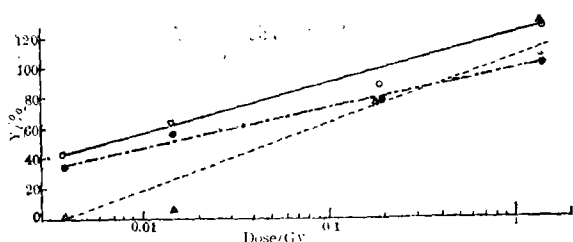


Fig 1. Relation between the percentage of increased contents of amino acids in brain and absorbed doses

(○) Glycine (●) leucine + isoleucine
(△) hydroxyproline

类氨基酸含量改变与吸收剂量之间的相关系数 r 值分布于 0.991—0.825 之间, 表明各种氨基酸含量改变与剂量的响应关系程度有所不同, 依相关系数显著性测验结果可分为 4 类, 即相关非常显著者 ($P < 0.01$) 为甘氨酸 (见图 1 ○); 相关显著者 ($P < 0.05$) 包括羟脯氨酸、亮氨酸 + 异亮氨酸 (见图 1、△ 和 ●); 相关接近显著者 ($0.05 < p < 0.1$) 包括赖氨酸、苯丙氨酸和 11 种氨基酸的总含量, 余者 $p > 0.1$ 。

3 讨 论

3.1 关于在出生前以氘水照射诱发大脑发育障碍的剂量效应关系

电离辐射对正在增殖、分化和转移的神经元前体细胞的损伤, 是神经元细胞缺失及相伴发生的神经细胞内生物化学改变, 这些变化是造成智力障碍的最主要原因。在先前工作的基础上^[3], 本实验把照射的最低剂量延伸到 0.01 Gy 以下。实验结果表明, 大鼠出生前后受氘水 β 射线照射, 吸收剂量在 0.0038—1.9 Gy 范围内, 使仔鼠大脑组织中游离氨基酸含量随吸收剂量增大而增加, 其中某些氨基酸 (如甘氨酸、羟脯氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等) 含量增加的百分率与吸收剂量的对数值呈显著正相关, 与先前脑细胞计数研究中所观察到的剂量效应关系规律^[3]相一致。

3.2 关于组织细胞破坏和死亡与组织中游离氨基酸含量改变的关系

脑细胞破坏和死亡与脑组织中游离氨基酸含量增加之间显然存在着内在联系。已知射线破坏胞浆内容酶体膜结构, 释放出大量的组织蛋白分解酶类, 使蛋白质分解加速, 而导致组织中游离氨基酸含量增高。Cerber 等^[7]用 HPLC 法测定了在出生前受 0.9 Gy X-线照射的大鼠仔鼠脑内生物胺和氨基酸含量, 发现大鼠于孕期第 12 d 和第 15 d 受照射, 仔鼠出生后 16 d 龄时, 脑组织中

游离天门冬氨酸、谷氨酸、 γ -氨基丁酸含量明显升高。本实验结果与之类似。辐射引起的细胞破坏和死亡所伴随发生的组织中游离氨基酸含量改变还有另一机制。辐射使细胞内氧化磷酸化抑制、细胞核中 DNA 和 RNA 破坏皆可导致蛋白质合成被抑制,而使组织中游离氨基酸含量增加。Fonagy 等^[8]报道,以 0.5 Gy 中子照射妊娠 18 d 的小鼠,仔鼠 3 周龄时经标记的氨基酸进入脑组织蛋白质中的量减少 40%。Konermann 等^[9]观察到以氘标记的谷氨酸、天门冬氨酸等氨基酸在脑组织蛋白质中掺入量的减少与脑细胞丢失相关。综上所述表明,射线在损伤和破坏脑细胞的同时伴随着蛋白质分解加速和合成受到抑制两种生物化学变化。这就不难理解所观察到的氘水 β 射线照射引起的脑细胞缺失及脑组织中游离氨基酸含量增加,这两种生物效应与吸收剂量之间响应关系的一致性。

熊金莲同志协助完成有关 HPLC 测定工作,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 ICRP, ICRP Publication 49, Developmental Effects of Irradiation on the Brain of the Embryo and Fetus, New York, ICRP Pergamon Press, 1986; 20
- 2 Miller R W. Health Phys., 1990, 59(1): 57
- 3 杨志远、郭月凤. 辐射防护, 1990, 10(4): 255
- 4 Chill D F et al., Radiat. Res., 1970, 44: 727
- 5 熊金莲、康宝珍. 辐射防护通讯, 1989, (1): 33
- 6 杨志远、郭月凤. 辐射防护, 1987, 7(6): 434
- 7 Cerber G B, Deroo J. Radiation Risks to the Developing Nervous System, Neuherberg, Commission of the European Communities, 1985, 323
- 8 Fonagy et al., Radiat. Res., 1985, 103(1): 34
- 9 Konermann G. Advances in Radiation Biology, 1987, 13, 127

STUDY ON DOSE-RESPONSE RELATIONSHIP BETWEEN PRENATAL EXPOSURE TO TRITIATED WATER AND THE DEVELOPMENTAL RETARDATION OF BRAIN IN RATS

Yang Zhiyuan Guo Yuefeng Wang Mingming

(China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006)

ABSTRACT The developmental retardation of brain in rats induced by prenatal exposure to HTO had observed by measuring the contents of cerebral amino acids. The HTO was injected intraperitoneally at the 11th day of gestation with concentration of 7.4×10^3 — 3.7×10^6 Bq/ml (body water). At 18-day-old the young rats were killed and their brains were separated from skulls. The brains were used to make biochemical specimens for measuring the contents of amino acids. The results showed that the contents of amino acids increases with the dose increased and the relationship between the percentage of the increased contents of amino acids in brain and logarithm of absorbed doses (D, Gy) give a good fit to liner regression equation $\hat{Y} = A + B \lg D$ in range of the absorbed doses from 0.0038—1.9 Gy.

KEYWORDS Tritiated water (HTO), Amino acids, Prenatal irradiation, Dose-response relationship, Rat