

小剂量低剂量率 X 射线 诱发小鼠卵母细胞染色体畸变的研究

王献理 孙淑清 王 彬 王明东

(白求恩医科大学放射医学研究所, 长春)

摘要 采用超数排卵技术, 在相对较低剂量(0.25、0.50、0.75 和 1.00 Gy)X 线照射下, 观察了全身照射雌性小鼠对次级卵母细胞染色体的损伤。各受照组染色体畸变率均明显高于对照组, 并与剂量呈线性相关($Y_{\text{a}} = 0.0091 + 0.1230 D$)。染色体着丝粒分离率同样都高于对照组, 在 0—0.75 Gy 范围内, 其发生率与剂量呈线性相关($Y = -0.0002 + 0.0442 D$)。并进一步估算, 在 0.75 和 1.0 Gy 组预期其子代易位携带者的再现率为 0.22% 和 0.36%。

关键词 低剂量, 卵母细胞, 染色体畸变, 易位携带者, 超数排卵

辐射诱发体细胞突变出现躯体效应, 而诱发生殖细胞突变表现为遗传负荷增加。过去多用辐射流行病学调查来评价这种遗传效应。如日本原子弹爆炸受害者的子代遗传病调查等^[1,2]。但是, 由于人的生育周期长, 调查人数有限, 迄今尚不能明确辐射的遗传影响。动物生育周期虽然短, 也需要饲养大批亲代动物, 以满足足够分析的子代动物数的需要, 耗费大量人力物力。生殖细胞染色体畸变研究, 可以直接评价遗传危害, 过去多用取材方便、提供分析细胞数量多的雄性生殖细胞为材料, 而雌性生殖细胞的研究受到: 1) 排卵周期限制, 2) 自然排卵数量有限, 小鼠一次只能排出十数个卵, 远远满足不了实验数量的要求, 3) 需熟练的取卵技术, 即使用超数排卵处理, 也有可能在冲卵、卵的处理的某个环节中, 将卵丢失殆尽。因此, 这项研究工作进展缓慢, 目前国内关于辐射诱发卵细胞染色体畸变研究, 只有 2 篇报道。本文报告用超排卵技术, 对小剂量低剂量率 X 射线诱发小鼠卵母细胞减数分裂 II (M II) 染色体畸变的剂量效应关系及其遗传危害。

材料与 方法

(1) 实验动物选择 昆明种雌性小鼠, 8—10 周龄, 体重 30 ± 2 g, 每次实验取 15 只, 随机分为 5 组, 作 6 次实验。

(2) 超排卵处理 对实验动物用激素诱发超数排卵, 即用孕马血清(PMSG, 长春生物制品所)和人绒毛膜促性腺激素(HCG, 上海湖南生化制剂室), 相隔 48 h 腹腔各注射 10 Iu。

(3) X 线照射条件 用 200 kV、10 mA、飞利浦 X 线治疗机, 过滤板为 0.5 mm Cu 和 1 mm Al, 分别照射 0、0.25、0.50、0.75 和 1.0 Gy, 剂量率为 $0.05 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$, 于注射 HCG 前 1—2 h 照射。

(4) 卵的收集 杀鼠前 2 h 注秋水仙素 $4 \mu\text{g/g}$ 体重, 注 HCG 后 16—17 h 杀鼠取卵巢及输卵管, 在解剖镜下剪破输卵管壶腹部, 用特制的微吸管将卵细胞团块收集于含 RPMI 1640 培养液

的凹孔玻璃板内。

(5) 染色体标本的制备 用 1000 Iu/ml 的透明质酸酶消化, 去掉颗粒细胞, 当卵细胞分散开以后, 用含 40% 小牛血清的 1% 枸橼酸钠液挑洗 2 次, 37℃ 下低渗 20 min, 用固定液 I (甲醇: 冰醋酸: 水为 5:1:4) 挑洗卵细胞并固定, 此时卵细胞在固定液 I 中不停地旋转, 5—10 min 后, 用固定液 II (甲醇: 冰醋酸为 3:1), 挑出已静止的卵细胞, 滴于脱脂载玻片上, 并用另一支吸管再滴 1 滴固定液 II, 使卵充分铺展并固着于载玻片上之后, 再放于固定液 II 中 10 min, 取出晾干, 10% Giemsa 染色 20 min。该方法处理, 可分析细胞率达 30%^[3]。

油镜下分析分散良好的单倍体数在 18 条以上的 M II 分裂相。主要观察单体缺失(或单体断裂)和单体互换等畸变。

统计分析用 X^2 和回归分析方法处理数据。

结 果

小剂量低剂量率 x 线照射诱发卵母细胞 M II 的染色体畸变结果列于表 1。从该表中可见, 排卵前期卵细胞受到 0.25 Gy 照射后, 所诱发的 M II 染色单体型畸变即明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而且, 各组畸变量与剂量呈直线相关, 单体互换经回归分析拟合成 $\hat{Y} = -0.0028 + 0.0149 D$ ($P < 0.05$); 染色单体断裂拟合 $\hat{Y} = 0.0120 + 0.1080 D$ ($P < 0.01$); 总畸变为 $\hat{Y} = 0.0091 + 0.1230 D$ ($P < 0.01$)。畸变细胞为 $\hat{Y} = 0.8338 + 11.9205 D$ ($P < 0.01$)。各点单位剂量的贡献分别为 0.014、0.0016、0.0014 和 0.0012/配子·cGy, 平均为 0.0014/配子·cGy。

Tab 1. Number and average number per cell () of chromosome aberrations induced by X-rays in secondary oocytes of mice

Dose (Gy)	No of cells scored	Chromatid deletions	Chromatid exchanges	Total aberrations	Aberrant cells(%)
0	323	1(0.0031)	0	1(0.0031)	1(0.3096)
0.25	231	9(0.0390) ^b	0	9(0.0390) ^b	9(3.8961) ^b
0.50	233	19(0.0815) ^c	0	19(0.0815) ^c	17(7.2961) ^c
0.75	226	22(0.0973) ^c	2(0.0088) ^a	24(0.1061) ^c	24(10.6195) ^c
1.00	211	23(0.1090) ^c	3(0.0142)	26(0.1232) ^c	25(11.8483) ^c

a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$

Tab 2. Distribution of number of chromosomes in oocytes

Dose (Gy)	No. of cells	Number of chromosomes in oocytes			
		18	19	20	21
0	323	24(0.0743)	30(0.0929)	268(0.8297)	1(0.0031)
0.25	231	23(0.0996)	33(0.1429)	175(0.7576)	0
0.50	233	24(0.1030)	32(0.1373)	176(0.7554)	1(0.0043)
0.75	226	12(0.0531)	23(0.1017)	191(0.8451)	0
1.00	211	18(0.0853)	39(0.1853)	153(0.7251)	1(0.0047)

辐射可以诱发小鼠卵母细胞染色体不分离, 导致非整倍体细胞产生^[4]。但本文的非整倍体诱发率, 未见到有规律性的变化, 各受照组与对照组相比, 并无明显差异(见表 2)。有人^[5]对人体细胞染色体分离顺序研究发现, 不同细胞染色体着丝粒分离的顺序是一定的。而早熟着丝粒分离

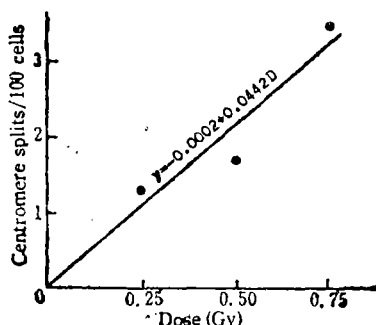


Fig 1. Dose-response curve for the centromere splits induced by 0—0.75 Gy x-rays in oocytes of mice

是21号染色体原发不分离的原因, 因此, 认为着丝粒分离顺序是不分离发生机理之一。接受 0.15 Gy 中子照射即能影响小鼠次级精母细胞着丝粒分离。本文各组着丝粒分离发生率分别为 0、0.0130、0.0172、0.0354 和 0.0190, 受照组均明显高于对照组 ($P < 0.05$), 虽与剂量相关不显著 ($0.10 > P > 0.05$), 但在 0—0.75 Gy 之间, 诱发着丝粒分离率与剂量呈明显正相关 $\bar{Y} = -0.0002 + 0.0442 D$ ($P < 0.05$), 见图 1。

讨 论

1. 卵母细胞的辐射敏感性

卵母细胞对辐射的敏感性与细胞的成熟程度有关^[6]。小鼠排卵前 21 d 受照的卵细胞染色体畸变量是 7 d 的 2 倍, Brewen 认为排卵前 14—18 d 的卵最敏感, 以后随着卵的成熟而降低, 直到排卵前 0.5—1.5 d 的卵母细胞敏感性最低。到排卵前 11 h 再次升高, 而且远远超过核网期的所有阶段, 不同阶段的敏感性可差 3—10 倍。Tease 和 Fisher^[7]也认为, 处于排卵中的卵母细胞是最敏感的阶段。有人用仓鼠做实验, 排卵前 85、59、35 和 19 h 照射卵母细胞, 染色体畸变率很低, 染色单体断裂占 0.003—0.0041/配子, 而在排卵前 11 h 最高(0.433/配子)^[8], 一般认为人工诱发排卵在注射 HCG 后 12 h。本实验为排卵前 14 h 受辐照, 虽然从核网期进入排卵前期, 仍没有达到最敏感时相, 甚至正处于最不敏感阶段。选择这一阶段的优点在于染色体畸变稳定, 而且持续的时间相对较长, 对估算遗传危害有一定的代表性。而最敏感的排卵期, 只能了解其辐射敏感性, 时间要求严格, 时相差波动大, 对其遗传影响的研究意义并不很重要。

2. 辐射诱发卵母细胞染色体畸变的遗传危害

染色体异常可以造成出生缺陷等遗传疾病的增加, 这种遗传效应多半由稳定性染色体畸变所贡献, 而非稳定性畸变常常在细胞分裂过程中死亡或以显性致死而告终。所以研究辐射诱发卵母细胞染色体遗传危害, 主要是研究可遗传易位的遗传几率。雄性动物可以直接观察精原细胞的易位, 而雌性个体在出生前已完成 MI 前期的大部分阶段, 即在出生前卵原细胞已经过 DNA 复制后发育到初级卵母细胞阶段, 出生后处于休止状态, 即核网期。直到性成熟后按其性周期以一定数量的卵细胞完成 MI 而发育到 M II, 因此, 对雌性成熟个体照射, 不能观察到卵原细胞染色体易位, 只能检测到对称性或非对称性单体互换和单体断裂等染色单体型畸变。

本实验所观察的 M II 染色体畸变主要是染色单体断裂和非对称性单体互换这两种类型, 并与受照剂量呈正相关。前者将有 1/2 的正常配子, 而另外的 1/2 配子将产生衍生染色体, 即表现为基因的重复或缺失, 其中大部分(94%)在发育过程中死亡^[8]。但是, 在判断为单体缺失的畸变中可能含有单体互换畸变, 因为小鼠染色体为端着丝粒, 常规分析时只靠其大小排列, 在正常大小范围内的对称性互换不易识别, 本文把这类畸变一律判断为单体缺失, 但是对称性单体互换的遗传特性是会以一定的比例表现出遗传后果的。如 MI 染色体中的对称性单体互换在理论上将有 1/16 的几率以平衡易位的形式在受精卵中得以表达, 这样的受精卵能够发育成表型正常(而核型不正常)的子代, 这种带有平衡易位的子代, 生育力低下, 并有易发肿瘤的倾向^[9]。

本文所观察的单体互换均为非对称性单体互换,即含有2个着丝粒体的染色体,属于非稳定性畸变,在细胞分裂过程会出现染色体桥,其后果可被拉断,形成染色体缺失,或同时被拉到同一子细胞内形成双着丝粒体,带双着丝粒体的细胞每分裂1次,大约丢失1/2左右^[10],以上各种畸变,最终将被淘汰,对遗传负荷影响不大。但是,一些学者^[11,12]认为对称性与非对称性单体互换的发生几率近似相等。那么,本文中高剂量组中(0.75 Gy以上),观察到的非对称性单体互换畸变量(0.0088和0.0142/配子)是经过第二次减数分裂后,已除去了有1/2分到第二极体的几率和一次细胞分裂中双着丝粒体丢失约占1/2的几率的剩余产额。所以推算卵母细胞染色体畸变量应为观察值的4倍。因此在子代中平衡易位的再现率应为 $(0.0088 \text{ 或 } 0.0142) \times 2 \times 2 \times 1/16 = 0.0022 \text{ 或 } 0.0036/\text{子代}$,即子代再现率为0.22%和0.36%。这与UNSCEAR^[13]报告的0.46%和Seace和Beechey^[14]观察3 Gy X线照射后,易位再现率为0.4%相接近。

参 考 文 献

- [1] 佐藤幸男等, 广岛医学, 41(3), 562(1988)。
- [2] 佐藤千代子等, 广岛医学, 41(3), 386(1988)。
- [3] 孙淑清, 王明东, 王彬, 王献理, 白求恩医科大学学报, 16(2), 108(1990)。
- [4] 王明东, 金玉珂, 遗传与疾病, 5(3), 174(1988)。
- [5] 王明东, 国外医学放射医学与核医学分册, 13(3), 105(1989)。
- [6] 王献理, 蔡露, 国外医学放射医学核医学分册, 13(6), 247(1989)。
- [7] C. Tease and G. Fisher, *Mutat. Res.*, 17, 211(1986)。
- [8] 户张巖夫, 放射线科学, 29(2), 25(1986)。
- [9] 周焕庚, 夏家辉, 张思仲, 人类染色体, 北京, 科学出版社, 1987, 314—320。
- [10] 金瑾珍, 刘秀林, 龚曼丽, 辐射防护, 5(4), 273(1985)。
- [11] J. G. Brewen, *Genetics.*, 87, 699(1977)。
- [12] C. Tease, *Mutat. Res.*, 199, 191(1983)。
- [13] UNSCEAR 翻译组, UNSCEAR 1982 年报告, 太原, 核工业部七所, 595(1983)。
- [14] A. G. Seace and C. V. Beechey, *Mutat. Res.*, 147, 357(1974)。

(稿件收到日期 1989 年 8 月 24 日)

PRELIMINARY STUDY ON CHROMOSOME DAMAGE INDUCED BY LOW DOSE X-RAYS IN SECONDARY OOCYTES OF MICE

Wang Xianli, Sun Shuqing, Wang Bin and Wang Mingdong

(Institute of Radiation Medicine, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun)

ABSTRACT The chromosome damage caused by relative low doses (0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 Gy) of X-rays was examined in secondary oocytes of mice. The frequency of chromosome aberrations was significantly higher in each X-irradiated group than that in control group with the tendency of increasing linearly with X-rays dose ($Y = 0.0091 + 0.1230 D$). The frequency of centromere splits was also markedly higher in each irradiated group than that in control. In the dose range of 0–0.75 Gy, the dose-effect relationship was fitted well to linear equation, eg. $Y = -0.0002 + 0.0442 D$. Using the frequency of chromatid aberrations in M II, the risk of balanced translocations in the offspring were predicted to be 0.22% and 0.36% in the 0.75 and 1.00 Gy groups respectively.

KEYWORDS Low dose, Mouse oocyte, Chromosome aberration, Carrier of the translocation