

离体培养的植入前期小鼠胚胎经X射线及 中子辐照后微核的形成

Molls M et al, Int J Radiat Biol 39(3): 307~314, 1981(英文)

体外培养的植入前期小鼠胚胎在2-细胞阶段的晚G₂期用X射线及中子进行辐照。两种射线在非常低剂量时都诱发微核，X线辐照后，第一个和第二个细胞周期中微核形成的动态取决于辐射剂量和分裂延迟的程度。甚至在照射后第三次和更晚一些的有丝分裂之后，似乎还有新的微核形成。本文讨论了各种剂量-效应曲线图形及两种辐射引起的微核形成机制。

一、引言

毫无疑问，由电离辐射引起的遗传突变是重要的，对于辐射防护来说这种低剂量效应相当有意义。Heddle和Schmid所述的微核检验方法应用渐增，特别是应用于化学诱变领域，微核检验是遗传损伤的一种有用的细胞学指征，且因它反映了人淋巴细胞中染色体畸变率，所以可作为染色体损伤的快速评价指标。然而，并不是所有类型的染色体畸变都导致微核的形成，通常认为微核是来自有丝分裂之后不结合到子细胞核内的无着丝点染色体断片。

也曾观察到植入前期小鼠胚胎在体内经X射线辐照后有微核的发生，但是没有进行详细的研究。本文报道了低剂量快中子及X射线辐照后微核的形成，用离体培养的植入前期小鼠胚胎研究了这种效应的剂量和时间的依赖关系，在这种体外快速增殖的体系中，整体的正常生理学条件与离体的培养物是一致的。在本实验中，将2-细胞阶段的胚胎，在细胞周期的晚G₂期进行照射。这与先前关于体外照射G₁期细胞微核或无着丝点染色体断片的命运的研究工作不同。

二、材料与方法

受孕后(p.c)32小时左右，将植入前期的2-细胞胚胎置于培养介质BMOC-2内进行体外培养，受孕后33小时将2-细胞胚胎用240KVX射线(剂量率100R/分)或用小型回旋加速器产生的中子(D-Be平均能量7MeV)照射，在照射时，该胚胎的细胞处于细胞周期的晚G₂期，这是通过细胞荧光测定法测定DNA含量而确定的。此外，当按照Tarkowski的方法对细胞核的样品进行检验，在照射当时未见有丝分裂相。照射后立即观察，在培养物中不存在4-细胞胚胎。

为了测定每个胚胎的微核数，将每个胚胎的细胞核经低渗处理后在载物片上制片，用冰醋酸/乙酸(1:3)固定并在空气中干燥后，用荧光染料乙基溴化物染细胞核和微核，用放大400倍的显微镜计数存在于细胞核附近的微核。乙基溴化物染色的优点是容易地辨认出微核，它是比主核直径1/3还小的染色质-阳性小颗粒。X线照射后，在受孕后48, 72, 76小时(p.c)，也就是照射后15, 39和63小时(p.r)进行测定。在这些时间中，正常对照胚胎分别地平均含有5.7、21.5、65个细胞。中子照射后的测定是在照射后39小时进行的。

三、结果

图1给出照射后39小时微核形成的两条不同的剂量-效应曲线。X线辐射后呈线性关系，低剂量中子辐照后的效应比X线辐照后的大得多，剂量-效应曲线呈非线性关系，在低剂量范围比在高剂量范围时陡些。从图1还可看出极低剂量的X线和中子辐照后都引起微核增加。对照组中有0.4%细胞平均显现一个微核。0.06GyX线剂量辐照后两倍于此值，应用0.03Gy中子引起6倍的增加，我们发现高剂量范围的两种射线都引起微核非常明显地增加，大约超过对照值的30倍。

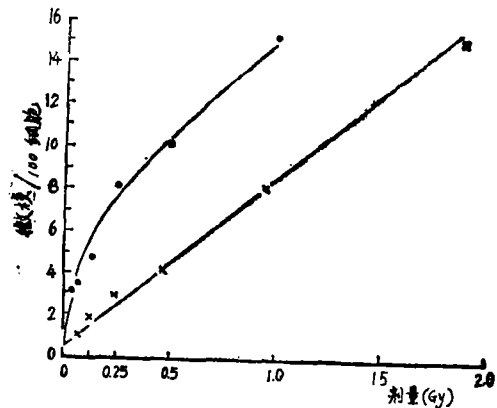


图1 照射后39小时(受孕后72小时)每100个细胞中的微核数与剂量的关系。

X线——x, 中子——●

在另一个实验中研究了X线辐射后微核的产生与时间的函数关系(图2)。照后15小时的剂量-效应曲线明显不同于照后39小时和63小时的曲线。照后15小时的微核发生率(以每Gy计算)在低剂量时比高剂量的大。这就与照后39小时和63小时的结果相反,这时剂量-效应呈线性关系,照后36小时对照组的微核增加了。

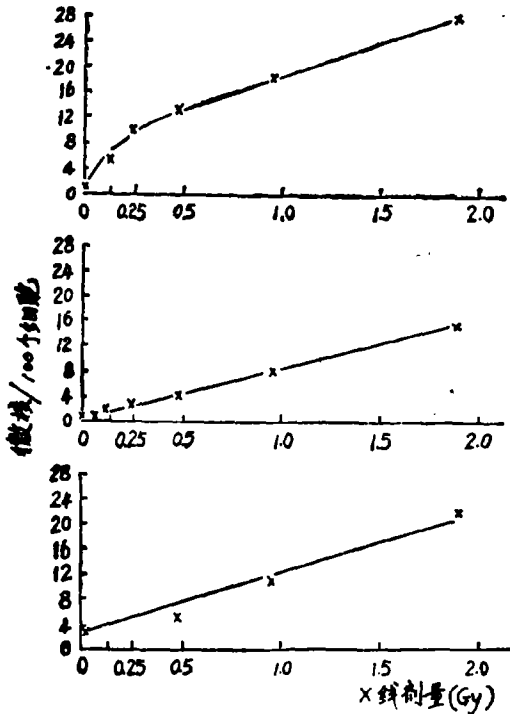


图2 照射后15、39、63小时(受孕后48、72、96小时)每100个细胞中微核数与X线剂量的关系

实验结果表明不同细胞数目的胚胎照射后15小时微核形成。

如上所述,对每个胚胎分别作微核的测定,因此可以对4-、5-、6-、7-、和8-细胞胚胎组分别计算平均微核数,1.88Gy照射后,在那些已进行一次有丝分裂的4-细胞胚胎中发现每个细胞有0.08个微核产生。与4-细胞胚胎一样胎龄(受孕后48小时)的8-细胞胚胎中每个细胞中的微核数明显地增加至0.88个。这种增加与剂量有依赖关系,并且即使在0.12Gy照射后,还可以观察到。

图3表示每个胚胎的平均微核数与时间的关系。其数值是从每个细胞的微核数(图2)以及表中给出的每个胚胎的平均细胞数计算出来的,随时间的增加,每个细胞的微核数也增加,正常对照组以及经辐照后的胚胎均如此。然而,在X线辐照后,特别在照

后39至63小时的这段时间中,效应更加明显。对照组中每个胚胎的微核数大约从0.1增加到15个,但经1.88Gy照射后则从2.5增加到7.5个。

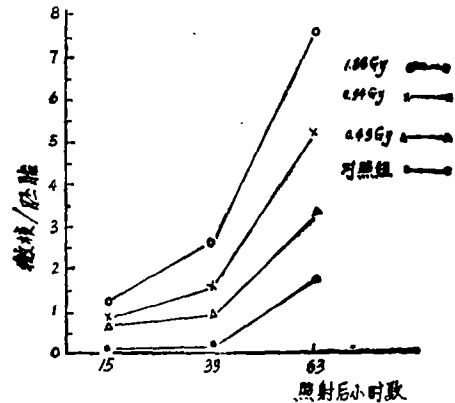


图3 X线辐射后15、39和63小时(受孕后48、72和96小时)每个胚胎的微核数

X线及中子照射后15、39和72小时(受孕后48、72及96小时)每个胚胎的平均细胞数

剂量(Gy)	X 线 照 射		中子照射	
	48h(p.c)	72h(p.c)	96h(p.c)	72h(p.c)
0.00	5.7	21.5	67	21.5
0.06	—	—	—	21.9
0.12	5.5	22.2	—	20.2
0.24	5.5	20.8	65	18.5
0.47	4.9	19.9	59	17.4
0.94	4.6	18.7	48	16.5
1.88	4.4	16.6	34	—

四、讨 论

已经证实微核的诱生与细胞分裂中期的染色体畸变密切相关。微核由染色体碎片或在细胞分裂后期没有参与正常分配的染色体所构成,一般认为有丝分裂对微核的显现是必须的。

染色体畸变的产生取决于被照射时细胞所处的细胞周期时期,2-细胞胚胎的细胞是在G₂期被辐照的。虽然至今还未确证DNA链断裂与染色单体断裂之间有直接关系,然而可以假定由辐射直接产生的或可能由DNA的双链断裂而引起的染色单体断裂,导致照射后的第一次有丝分裂之后形成微核。在4-细胞胚胎的细胞中可以观察到这些微核。X线辐照后的双链断裂是比较稀少的,因而在第一次有丝分裂之后只能找到极少数微核。但在中子辐照后,DNA双链断裂数相当高,所以在这个发育阶段出现较多微核(在1.0Gy

和0.5Gy照射后,每100个细胞分别有37个和14个微核),从这些数据并不能断定微核是否可能或在多大程度上起源于辐照所引起的不分裂所造成的整个染色体,对此必须进行的研究。

第一次有丝分裂后,当细胞通过具有完全的S期DNA复制的下一个细胞周期时,2-细胞阶段的G₂细胞中未修复X线辐照所引起的DNA单链的断裂也能发展为染色单体断裂,这些染色单体断裂在辐照后第二次有丝分裂后将产生微核。根据这些假设,似乎在照后15小时,所有4个细胞都已通过第二次有丝分裂,并达到每个胚胎8个细胞其微核数可能为最高,这种生物体系的优点是每个胚胎可以单独地追踪,并可以在这个密封体系中分析这两个“干细胞”的命运。

目前,我们不能排除微核形成动力学中还涉及其它机制的可能性,有人可能会假设存在于第一次有丝分裂一些碎片仅在以后的细胞分裂后才成为可见的微核,然而本资料阐明了即使在辐照后第三次甚至更后期的有丝分裂后,还明显地形成新的微核。这在照后63小时的胚胎内看得最清楚(图3)。在此发育阶段,每个胚胎由65个细胞(未受照)至大约40个细胞(1.88GyX线)所组成。在这个阶段,照后发生4~5次有丝分裂,而在受照后39~63小时之间发生1~2次有丝分裂。该效应的机制有待于进一步研究。当细胞增殖从指数增长变成平稳期时,此时细胞不再增加,基因组的一种普通的不稳定性就可能对此效应有所贡献。我们已经指出细胞是在G₂期受照,这与别的作者在G₁期进行照射的研究工作不同,可解释结果的差异。为了阐明我们的设想,有必要得到进一步的实验证据。

上述现象也可以解释在受孕后48小时进行X线照射后15小时的剂量-效应曲线的形状(图2)。这条曲线是两个主要效应的结果:(1)染色体损伤,它在细胞增殖后产生微核;(2)分裂延迟。这两种效应

都随辐射剂量的增加而增大,但第二种效应抑制了第一种效应的呈现。由于在低剂量X线照射后,通常没有或非常少地发生出分裂延迟,因此在这些条件下,微核的发生出现较快,而且相对辐射效应较高。在晚些时候(受照后39~63小时)分裂延迟只有数小时,由于这种X线剂量(0~1.88Gy)仅稍微改变增殖速度,所以受照后39小时的剂量效应曲线变成线性,并至少在照后63小时仍然保持线性(图2)。

辐照后较快分裂并在受照后15小时已达到8-细胞阶段的那些细胞中所观察到的结果加强了这一发现。如果将这些细胞的微核数对着X线剂量作图,所得到的剂量-效应曲线形状与那种用所有各种胚胎(4~8细胞胚胎,照射后15小时)所得曲线形状不相同。每一类别胚胎的曲线似乎都是线性,即使在受照后15小时亦如此。特别感兴趣的是在8-细胞胚胎中微核数非常高,这支持了所提出的微核形成机制。正在进行的实验,即为了进一步观察微核形成的生物学关系,分别培养了带有不同细胞数的胚胎,当前关于这些过程对于胚胎发育的影响如何并不清楚。

与X线辐照不同,中子辐照后得到的剂量-效应曲线不呈线性。所以RBE值从中子剂量为1.00Gy的1.8增加到0.1Gy的5.5和0.05Gy的7.4,每个胚胎的细胞数(它可以用来估算增殖率)在可比拟的X线和中子的低剂量范围照射下并没有很大差别(见表)。因而不同的增殖率对这个效应似乎并不负有责任。中子辐照后的时间进程以及其它参数都必须进一步的加以研究。

本文报道的研究工作说明了哺乳动物植入前期的胚胎具有高度辐射敏感性。微核的形成不仅在研究细胞遗传学损伤方面,而且在评价辐射效应的机制方面都是一个很有用的方法。

(周继文节译 官宜彬校 曹淑媛审)

微波照射对小鼠造血干细胞及动物抗放能力的影响

Ротковска Д и др: Радиобиология 21(4):558~562, 1981(俄文)

射频范围电磁波的生物学作用问题迄今还研究得很少,从和生物体相互作用的观点看来,至关重要的是波长小于1米的电磁波(即所谓微波)。在这个范围内观察到电磁能的吸收最大,并与生命物质产生强烈的相互作用,最终影响不仅取决于微波本身的物理参

数,也取决于受照射生物体的性质。据文献可知,微波本身乃是活性极大的物理因素。在百毫瓦/厘米²数量级照射强度下,厘米波段的电磁场能导致机体的损伤和死亡。

以前发表的大部分著作都是论述人受这种物理因