

CN930035

CNIC-00607

SMC-0073

中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

低剂量¹⁴⁷Pm 内照射对精子 DNA 链
修复的刺激效应

STIMULATIVE EFFECT OF LOW DOSE ¹⁴⁷Pm ON DNA
REPAIR OF GERM CELLS IN SPERMIOGENIC STAGES

(In Chinese)



原子能出版社

中国核情报中心

China Nuclear Information Centre



朱寿彭：苏州医学院放射毒理学教授，博士研究生导师。放射损伤研究室主任。1952年毕业于浙江医学院，1958年毕业于苏联医学科学院放射医学专业研究生，获医学博士学位。

Zhu Shoupeng: Professor of Radiotoxicology and advisor of doctoral candidate, Suzhou Medical College. Director of the Laboratory of Radiation Injury. Graduated from Zhejiang Medical College in 1952 and graduated from the Soviet Academy of Medical Science as a postgraduate of radiation medicine speciality in 1958 and had gotten degree of Medical Doctor.

CNIC-00607

SMC-0073

低剂量 ^{147}Pm 内照射对精子 DNA 链修复的刺激效应

朱寿彭 王六一

(苏州医学院)

摘 要

用碱性淋洗技术探讨了机体受低剂量 ^{147}Pm 内照射时对精子 DNA 链修复的刺激效应。机体预先在睾丸内注入 $^3\text{H-TdR}$,用以标记精子 DNA,从标记到采集精子的时间固定为 36 d,正好为 BALB/c 小白鼠雄性生殖细胞的一个发育周期,从摄入 ^{147}Pm 到采集精子的时间则固定在 12 d,待精子被溶破后,加入 30 mL 淋洗液,此时调节蠕动泵流量为 120 $\mu\text{L}/\text{min}$,共收集标本 4 h。然后用 Beckman 液体闪烁装置测量膜上和膜下各收集标本中的放射性活度,就可以判断膜上及各收集标本中 DNA 的量。研究结果发现,当机体摄入低剂量 ^{147}Pm 的内照射水平在 185 Bq/g 后,此时的膜上 DNA 存留率即呈现上升,显著高于相应对照组,表现出低剂量裂片 ^{147}Pm 内照射对精子 DNA 链修复的刺激效应。

STIMULATIVE EFFECT OF LOW DOSE ^{147}Pm ON DNA REPAIR OF GERM CELLS IN SPERMIOGENIC STAGES

(In Chinese)

Zhu Shoupeng Wang Liuyi
(SUZHOU MEDICAL COLLEGE)

ABSTRACT

Stimulative effect of low dose from ^{147}Pm radiation on DNA repair of germ cells in spermiogenic stages was studied by alkaline elution technique. For labelling spermatid DNA, male BALB/C mice were given intratesticular injection of ^3H -TdR in advance. After 36 days of labelling, spermatozoa were sampled that is just the period of germ cells to mature. The period from intraperitoneal injection of ^{147}Pm to sampling spermatozoa was 12 days. After sperm cells have been lysed, 30 ml. eluant was added in, then the flowrate was adjusted by the pumping speed. Finally, the DNA in filters and bottles were determined by radioactivity of labelled nuclides with a Beckman liquid scintillation device. Results showed that after small dose of irradiation with 185 Bq/g of ^{147}Pm , an increase of sperm DNA on the filter was observed that was considerably higher than the control group. This indicates that low level radiation from ^{147}Pm has tendency to stimulate the capacity of DNA repair in spermiogenic stages.

前言

低剂量辐射效应与大剂量辐射效应完全不同,低剂量辐射对机体不仅没有明显的损伤效应,而且还可产生一定的刺激作用。关于低剂量外照射的辐射生物效应,文献中已有一些报道^[1,2],但对低剂量核素内照射的生物效应研究,迫切有待阐明。考虑到DNA是机体细胞生命活动与遗传的物质基础,DNA分子内特有的核苷酸排列顺序中蕴藏着大量的遗传信息,在细胞分裂时通过DNA自身的复制,将信息传给下一代子细胞。DNA是对辐射敏感的靶分子^[3],在放射遗传效应研究中起着关键的作用。鉴于¹⁴⁷Pm不仅在裂片中的份额较高,而且又是纯 β 辐射体核素,目前在夜光涂料工业中大多作为激发能源,而且在核辅助动力装置系统中亦经常使用。由于有关低剂量¹⁴⁷Pm内照射的刺激效应,国内外文献中尚无报道,为此,本文探讨了在低剂量¹⁴⁷Pm内照射条件下对精子DNA链修复的刺激效应。

1 实验方法

1.1 精子的标记

实验是选用11周龄左右的30只BALB/c纯品系成年雄性小白鼠,体重为 24 ± 1 g,随机分成5个实验组和1个相应对照组,每组5只动物,全部预先在睾丸内(双侧)各注入167kBq的³H-TdR,用以标记精子DNA^[4]。从标记到采集精子的时间固定为36d,正好为BALB/c小白鼠雄性生殖细胞的一个发育周期,此时的DNA标记率最高^[5]。5个实验组分别接受腹腔注入放射纯和化学纯的¹⁴⁷Pm(NO₃)₃,其放射性活度分别为0.185,0.74,3.7,11.1,和37kBq/g。探讨低剂量¹⁴⁷Pm内照射对精子DNA链修复的刺激效应是用碱性淋洗技术进行的,从注射¹⁴⁷Pm到采集精子的时间则固定在12d,因为经预试验通过上述时间的实验观察,经¹⁴⁷Pm处理的小白鼠这时的精子DNA链断裂的洗脱量最大。

1.2 精子的采集

5个实验组和相应对照组的小白鼠均在睾丸注入³H-TdR后的第36d放血处死,迅速取出双侧的输精管,每只动物的输精管分别被放入盛有5mLpH为7.2的PBS液的小烧杯中,并注意用黑纸包裹置于黑暗处以防止可见光对精子DNA的损伤^[6-8]。当放置15min后,输精管中的大部分精子均可游入PBS中,此时可用眼科镊轻轻除去输精管,然后用毛细滴管小心吹打含精子的PBS液,使精子在其中分布均匀,然后从每个样品中移取约 5×10^6 个细胞上膜淋洗。显微镜观察表明,这样采集到的精子活力良好。该操作过程对精子的人为损伤极微。

1.3 碱性淋洗

本实验中使用的碱性淋洗装置见图1,过滤装置如图2所示。

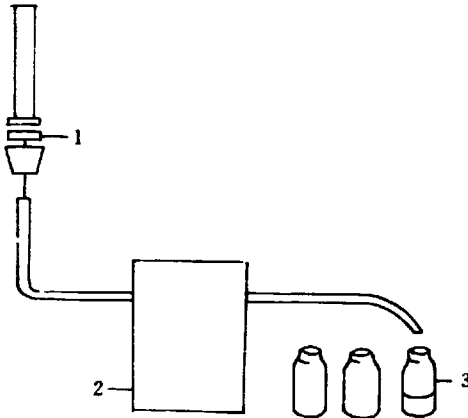


图1 碱性淋洗装置图

1 滤器；2 蠕动泵；3 收集瓶

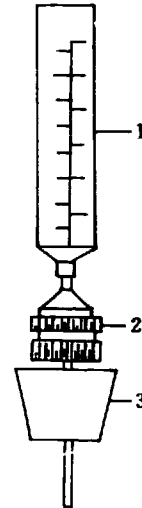


图2 滤过装置图

1 注射器外壳；2 滤膜和滤器；3 橡皮塞

实验时,先取直径为 25 mm、孔径为 $2\ \mu\text{m}$ 的聚氯乙烯滤膜,用 PBS 液浸湿后装入全塑料针头滤器中,内有支持滤膜的筛网板,在滤器入口处直接连接 50 mL 的注射器外芯,出口用硅胶管连接,滤膜下空间通过蠕动泵用重蒸馏水充盈,使不留气泡,并仔细观察有否漏液情况。待整个装置运行正常,将 5×10^6 个精子 PBS 液转至滤器中,开启蠕动泵,将流量调控在 2 mL/min,即将蠕动泵上的定量旋钮调至与样品体积相当的数码,这样当液体流完时,蠕动泵即自动停止,从而可以保证滤膜以下空间始终被液体充盈。待含精子的 PBS 液完全流过滤膜后,随即加入 5 mL 的溶胞液。该溶胞液含有:0.025 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA),2% 十二烷基硫酸钠(SDS),1.0 mg/mL 新溶解的半胱氨酸和 0.5 mg/mL 新溶解的蛋白酶 K(Proteinase k),其 pH 为 9.6。然后开启蠕动泵,使调控流量仍为 2 mL/min。2 min 后关闭蠕动泵,此时滤器里留有 1 mL 溶胞液,让其在室温下作用 40 min,此时经显微镜观察可发现精子被溶破,让最后 1 mL 溶胞液通过滤膜,而后加入 30 mL 的淋洗液,该淋洗液含有 2% 四丙基氢氧化铵(TPAH),0.02 mol/L EDTA 和 0.1% SDS,其 pH 为 12.2。然后调节蠕动泵流量为 120 $\mu\text{L}/\text{min}$,在通过蠕动泵的硅胶管出口处用器皿收集淋洗液,共收集 4 h,所有上述操作均应注意在避光条件下进行。

2 实验结果

由于考虑到断裂的 DNA 片段较未损伤的 DNA 链短小,因此通过上述操作过程可将其淋洗下来,而未受损伤的 DNA 则留在膜上。当 DNA 链断裂越多,片段越小,于是就更容易被淋洗下来,洗脱的量也越多。所以,当通过 $^3\text{H-TdR}$ 专一性的标记 DNA 作示踪,观察其在

膜上和膜下各收集瓶中的标本,置于 5 mL 含 0.3%PPO 和 0.03%的 POPOP 甲苯闪烁液中,用 Beckman 液体闪烁装置 LS6800(程序 1)进行液体闪烁放射性测定,就可以判断膜上及收集瓶中 DNA 的量,然后按下式分别求得膜存留率:

$$\text{膜存留率} = \frac{\text{膜上 cpm}}{\text{膜上 cpm} + \text{膜下 cpm}} \times 100\%$$

表 1 中所列为机体腹腔注入不同放射性活度¹⁴⁷Pm 后 12 d 期间内的精子 DNA 膜存留率变化值。从表 1 可以得知,当机体摄入低剂量¹⁴⁷Pm 185 Bq/g 时,可以观察到此时的膜存留率即显著上升至(66.2±7.8)%;而其相应对照组的膜存留率只有(37.4±25.6)%,即明显高于对照组的值,呈现出低剂量内照射的刺激效应。而当摄入¹⁴⁷Pm 的剂量增至 740 Bq/g 时,其相应的膜存留率的值已接近到对照水平,即刺激作用已趋消失。随着¹⁴⁷Pm 放射性活度的进一步增至 3.7 kBq/g 时,已呈现出膜存留率的明显降低至(25.5±9.3)%,即已出现抑制效应。而且可观察到当¹⁴⁷Pm 摄入机体的放射性活度继续增大,则其膜存留率的降低程度亦更加显著:如当机体摄入¹⁴⁷Pm 的放射性活度增至 37 kBq/g 时,此时的 DNA 膜存留率只有(13.3±0.6)%了。

表 1 机体腹腔注入不同放射性活度的¹⁴⁷Pm 后 12 d 期间内的精子 DNA 膜存留率%的变化值

注入 ¹⁴⁷ Pm 放射性活度, kBq/g	DNA 的膜存留率(%), $\bar{X} \pm SD$
对照组	37.4±25.6
0.185	66.2±7.8
0.740	36.6±3.7
3.7	25.5±9.3
11.1	24.6±5.5
37	13.3±0.6

3 讨论和结论

DNA 是生物体中遗传信息的携带者,是机体细胞中与遗传有关的重要生命物质,在放射遗传效应研究中起着关键的作用^[9]。而电离辐射,尤其是放射性核素内照射的主要生物学效应的表现,就是引起细胞内遗传物质 DNA 分子的链断裂损伤^[10~12],其主要作用形式为辐射粒子的直接作用或辐射和化学物质诱导产生的自由基等的间接作用,其损伤形式表现为碱基脱落、糖分子结构破坏、磷酸二酯键断裂等,这些损伤均可导致 DNA 链断裂^[13]。

值得指出的是,有必要深入探究关于低剂量¹⁴⁷Pm 内照射对精子 DNA 链修复的刺激效应^[14]。Wolff^[15]曾观察到当人的淋巴细胞受到低剂量 X 线 10 mGy 照射后,进行 1.5 Gy X 线再次照射时,可使染色体损伤减半,并认为这是由于低剂量辐射诱导了 DNA 修复机制所致。现已发现,当细胞处于 G₁、S 或 G₂ 期^[16]受到低剂量辐射时,即可诱导修复机制;而在 G₀ 期受辐照则不能诱导修复机制。并且观察到一旦诱导成功,修复功能可持续 3 个细胞周期。因此可以设想,当机体摄入低剂量¹⁴⁷Pm 时,基于¹⁴⁷Pm 在体内呈持续性的滞留特性^[17],有可能引起持续性的诱导作用,从而使 DNA 链修复功能达到显著增升的效果。

参 考 文 献

- [1] Planel H. et al. *Health Phys.*, 1987, 52 (5): 571
- [2] Liu S. Z. et al. *Health Phys.*, 1987, 52 (5): 579
- [3] 朱寿彭等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1987, 5 (1): 7
- [4] Sega G. A. et al. *Mutation Res.*, 1986, 159: 55
- [5] Sega G. A. and Generoso E. E. *Mutation Res.*, 1988, 197: 93
- [6] Kohn K. W. et al. *Biochemistry*, 1976, 15: 4629
- [7] Skare J. A. and Schrodel K. R. *Mutation Res.*, 1984, 130: 283
- [8] Woods W. G. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 698: 40
- [9] 朱寿彭. 国际学术动态, 1991, (6): 74
- [10] Coquerelle T. M. et al. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1987, 51: 209
- [11] Coogan T. P. and Rosenblum I. Y. *Mutation Res.*, 1988, 194: 183
- [12] Bradley M. O. and Dysart G. R. *Cell Biol. Toxicol.*, 1986, 1: 181
- [13] 苏兆众, 罗祖玉. 辐射研究与辐射工艺学报, 1987, 5 (3): 42
- [14] Sagan L. A. *Health Physics*, 1987, 52 (5): 521
- [15] Wolff, S. Pre-exposure of human lymphocytes to 1cGy of x rays halves the amount of chromosome damage induced by subsequent high dose exposures. Proceedings of the 8th ICRR, Edinburgh, England. Taylor and Francis press, 1987: 212
- [16] Palmer F. et al. Induction and repair of DNA DSB and induction of G₂ delay in radiation sensitive mutants of chinese hamster V-79 cells. Abstracts of 9th ICRR, Toronto, Canada, Academic Press. 1991: 311
- [17] 朱寿彭等. 中华放射医学与防护杂志, 1991, 11 (2): 88

低剂量²¹⁰Pm 内照射对精子 DNA 链

修复的抑制效应

原子能出版社出版

(北京 2108 信箱)

中国核情报中心排版

北京市海表区三环快速印刷厂印刷

☆

开本 787×1092 1/16 · 印张 1/2 · 字数 6 千字

1992 年 4 月北京第一版 · 1992 年 4 月北京第一次印刷

ISBN 7-5022-0688-4

TL·422

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT



This report is subject to copyright. All rights are reserved. Submission of a report for publication implies the transfer of the exclusive publication right from the author(s) to the publisher. No part of this publication, except abstract, may be reproduced, stored in data banks or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of the publisher, China Nuclear Information Centre, and/or Atomic Energy Press. Violations fall under the prosecution act of the Copyright Law of China. The China Nuclear Information Centre and Atomic Energy Press do not accept any responsibility for loss or damage arising from the use of information contained in any of its reports or in any communication about its test or investigations.

ISBN 7-5022-0688-4
TL • 422

P.O.Box 2103
Beijing, China

China Nuclear Information Centre