

MEA 及 AET 对电离辐射所引起的染色体畸变及精原细胞损伤的防护作用

汪安琦 杜若甫

(中国科学院遗传研究所)

小白鼠在受 150 伦 γ 射线照射前 8—10 分钟, 受含 5.0 毫克 AET, 3.0 毫克 MEA 或 2.5 毫克 AET 及 1.5 毫克 MEA 的生理盐水溶液的腹腔注射。结果表明, AET 及 MEA 使各种精原细胞的退化细胞减少, 存活的精原细胞增多, 并使初级精母细胞中的染色体畸变率降低。

一、前言

目前世界各国对寻找电离辐射的化学防护药物都非常重视, 正在进行大规模的试验研究。正如巴克 (Z. M. Bacq) 所指出的, 一个能实用的化学防护药物, 也必须同时对电离辐射的遗传学危害有防护作用^[1]。

不少人曾研究了对射线的致死作用有防护效果的药物对哺乳动物性腺的防护作用, 但在 1959 年以前所得的结果中, 大部分是失败的^[1,2,3]。巴克, 迈森 (J. R. Maisin) 等以及努日金 (Н. И. Нуждин) 等都认为, 这是由于有全身防护作用的药物在体内分布不均, 而在性腺内浓度过低所致^[1,3,4]。

我们认为, 除上述可能的原因外, 也有可能是: (1) 过去研究中多以睾丸重量及一般组织学观察作为指标, 这些指标都不够细致。(2) 过去所用的射线剂量太大, 以致敏感性很大的性腺所受的损伤很严重, 防护药物的效果不能表现出来。例如, 在过去一些失败的试验中, 一般用 200 伦琴照射雌鼠, 300, 500 伦琴照射雄鼠。而腊 (R. Rugh) 等于 1957 年用 50 伦琴 X 射线照射性成熟之雌性小家鼠时, 却观察到 MEA 对卵巢的防护作用——使生殖力提高、绝育期推迟^[5]。管原努等在以 200 伦琴照射雄性小家鼠时, 也曾观察到 AET 在后代显性致死率上所表现的部分防护效果^[6]。

为了验证上述两点设想, 我们于 1960 年进行了本工作¹⁾。

二、材料与方 法

在本研究中用 150 伦琴的 Co^{60} γ 射线照射昆明种性成熟之雄性小白鼠; 所观察的指标为敏感性很高的各类精原细胞的退化现象及初级精母细胞后期与末期中染色体畸变。

小白鼠体重为 22—27 克, 平均体重为 25.6 克。全部试验动物分为五组:

第一组: 对照组, 20 只, 不注射药物, 受照射。

第二组: AET 组, 20 只, 先注射 AET, 然后受照射。

第三组: MEA 组, 20 只, 先注射 MEA, 然后受照射。

第四组: AET + MEA 组, 20 只, 先注射 AET 及 MEA 之混合液, 然后受照射。

第五组: 绝对对照组, 5 只, 正常性成熟之雄性小白鼠, 不注射药物, 也不受照射。

1) 参加本项研究的还有王秀英、刘翠英、林应山等。

MEA 与 AET 均分别溶于生理盐水中, pH 值为 7.0。在照射前 8—10 分钟, 给药物处理各组的每只动物腹腔注射 0.2 毫升的生理盐水溶液, 内含 5 毫克 AET (第二组), 或 3 毫克 MEA (第三组), 或 2.5 毫克 AET 及 1.5 毫克 MEA (第四组)。

放射源为 400 克镭当量之钴源。受照射时动物装在特制塑料盒中, 盒面与射源中心距 18 厘米。剂量率为 104 伦琴/分。每次照射一组动物。

在照射后隔 12 小时、1 天、5 天及 35 天, 自受照射各组分别随机取 5 只小白鼠, 杀死, 取出其一对睪丸。将其中的一个固定于 Orth 液中, 另一个固定于 Carnoy 液中。绝对对照组的动物在照射组受照射后的第 11 天一次杀死, 其睪丸也用上述两种固定液固定。

除第四组外, 对其他各组照射后 12 小时、1 天及 5 天固定于 Orth 液的睪丸进行了组织学观察。切片厚 7 微米, 用 PAS 法染色, 并用埃尔利希 (Ehrlich) 酸性苏木精液复染。在显微镜下选择切片中接近于圆形的精小管横切面, 先按欧克伯格 (E. F. Oakberg) 的将精子发生过程分为十二个时期的方法确定其时期^[7], 然后数横切面中正常的与退化的 A 型、B 型及中间型精原细胞。在每一小白鼠的睪丸中, 观察 36 个精小管横切面 (每一时期的精小管横切面各 3 个)。

将照射后 1 天、5 天及 35 天用 Carnoy 液固定的各组睪丸组织, 用醋酸洋红染色法制成压片。观察其初级精母细胞分裂的后期与末期中染色体畸变。在每一小白鼠睪丸组织中观察 200 个后期与末期。在计算染色体畸变率时, “一个桥”、“断片”及“桥+断片”作一次畸变计, 而“两个桥”则作两次畸变计。

三、实验结果

1. 对精原细胞的防护作用

在绝对对照组中, 每一精小管横切面中平均有 3.190 个 A 型精原细胞和 9.570 个 B 型及中间型精原细胞。每一横切面上的 A 型细胞平均数在受照射后迅速减少, 在照射后 12 小时减至 2.212 个, 而 5 天后则降至 0.448 个, 仅为绝对对照的 1/7。B 型与中间型细胞更为敏感, 在照射后每一横切面上其平均数减少得更快。在受照射后 12 小时, B 型与中间型细胞即减少一

表 1 各组小白鼠的每一精小管横切面中 A 型精原细胞平均数

照射后间隔时间	处 理	每一精小管横切面中 A 型细胞数 $\bar{x} \pm S. E.$	与对照组比较差异显著性之测定		
			t	自由度	P
12 小时	对照	2.212 \pm 0.238	—	—	—
	AET	2.055 \pm 0.131	0.577	7	>0.2
	MEA	2.918 \pm 0.251	2.034	8	>0.05
1 天	对照	1.932 \pm 0.407	—	—	—
	AET	2.633 \pm 0.534	1.042	7	>0.2
	MEA	2.666 \pm 0.281	1.485	8	>0.1
5 天	对照	0.448 \pm 0.231	—	—	—
	AET	1.278 \pm 0.110	3.255	6	*<0.05
	MEA	1.703 \pm 0.125	4.790	6	**<0.01
绝对对照		3.190 \pm 0.274	—	—	—

注: 不包括退化的精原细胞。

* 有显著差异;

** 有非常显著之差异。

半多,由绝对对照组的 9.570 个减少到 4.132 个; 而 5 天后则降至 0.583 个, 只有绝对对照的 1/16 (表 1, 2)。与此同时, 观察到大量退化的精原细胞 (表 3)。这些结果与欧克伯格所得结果相似^[9]。

AET 与 MEA 对 A 型精原细胞的防护效果在照射后 12 小时及 1 天时并不明显, 对照组与药物处理各组在这时的 A 型细胞数并无显著差异。然而在照射后隔 5 天, 则药物处理各组中的 A 型细胞平均数显著地较对照组为高, AET 组 $P < 0.05$, MEA 组 $P < 0.01$ 。这表明 AET 及 MEA 对 A 型精原细胞的退化有明显的防护作用, 而且尤以 MEA 的效果更为显著 (表 1)。

由于 B 型及中间型精原细胞比 A 型精原细胞更为敏感, 受照射后退化得更快, 因此药物对 B 型及中间型细胞的防护效果也显示得更早。在照射后 12 小时, MEA 对 B 型及中间型细胞的防护作用已明显地显示出来。MEA 组在照射后 1 天及 5 天时, B 型及中间型细胞的平均数

表 2 各组小白鼠的每一精小管横切面中 B 型及中间型精原细胞平均数

照射后间隔时间	处 理	每一精小管横切面中 B 型及中间型细胞数 $\bar{x} \pm S. E.$	与对照组比较, 差异显著性之测定		
			t	自由 度	P
12 小时	对照	4.132±0.505	—	—	—
	AET	3.518±0.320	1.025	7	>0.2
	MEA	6.246±0.734	2.369	8	* <0.05
1 天	对照	1.484±0.310	—	—	—
	AET	3.690±0.640	3.103	7	* <0.05
	MEA	5.356±1.108	3.367	8	** <0.01
5 天	对照	0.583±0.292	—	—	—
	AET	1.768±0.245	3.112	7	* <0.05
	MEA	3.520±0.328	6.691	6	** <0.01
绝对对照		9.570±1.395	—	—	—

注: 不包括退化的精原细胞。

* 有显著差异;

** 有非常显著之差异。

表 3 各组的各类精原细胞中退化细胞所占之百分率

照射后间隔时间	处 理	A 型 精 原 细 胞		B 型及中间型精原细胞	
		所观察的细胞总数	退化细胞所占 百分率±S. E.	所观察的细胞总数	退化细胞所占 百分率±S. E.
12 小时	对照	422	12.085±1.587	211	13.744±2.370
	AET	313	4.153±1.128	135	5.926±2.032
	MEA	492	5.488±1.026	271	2.583±0.964
1 天	对照	357	13.445±1.805	83	3.614±2.048
	AET	350	2.286±0.799	142	5.634±1.935
	MEA	487	1.643±0.576	262	3.817±1.184
5 天	对照	46	4.348±3.007	21	4.762±1.470
	AET	220	0.909±0.603	83	1.205±1.198
	MEA	206	1.456±0.835	123	5.691±2.098
绝对对照		696	0.431±0.205	414	0

也都显著地较对照组为高 ($P < 0.01$)。在照射后 1 天及 5 天, AET 也表现出明显的防护效果 ($P < 0.05$) (表 2)。

各类精原细胞总数中退化细胞所占的百分率,也证明两种药物有明显的防护效果,使退化细胞减少。由于 B 型及中间型细胞更为敏感,对照组中在照射后 12 小时即可以看到大量的退化细胞 (13.744%),这时经药物处理各组中退化的 B 型及中间型细胞显著地较对照组为少;而在照射后 1 天及 5 天,因为早先看到的退化细胞已经死亡消失,此时看到的退化细胞百分率在各组中均不高,因此药物对退化细胞百分率的影响也不明显。退化的 A 型细胞则在照射后 12 小时及 1 天都有大量出现,因此在照射后 12 小时及 1 天都可看到药物使退化细胞百分率大大降低(表 3)。

总结上述结果可以看出,在射线作用下, AET 及 MEA 对 A 型或 B 型及中间型精原细胞都有防护作用,使退化细胞减少,存活的细胞增多,而且 MEA 的防护效果较 AET 更为显著。

2. 在染色体畸变率上所观察的防护效果

经 150 伦琴 γ 射线照射后,小白鼠初级精母细胞后期与末期中染色体畸变大大增加。照射后 1 天,染色体畸变率比绝对对照组高 10 倍左右,达 9.672%。在照射后 5 天,畸变率已显著降低,但仍比绝对对照高 6—7 倍。在照射后 35 天,则畸变率已接近于绝对对照的水平(表 4, 5)。

表 4 在各组中所观察的初级精母细胞后期与末期数及染色体畸变

照射后 间隔时间	处 理	所观察的后期与末期数	有染色体畸变之后期与末期数				
			一个桥	断 片	桥+断片	两个桥	合 计
1 天	对照	1043	75	20		3	98
	AET	1006	52	6			58
	MEA	800	29	9	1	3	42
	AET+MEA	1000	38	5	1	1	45
5 天	对照	800	41	8	2	2	53
	AET	1000	46	12			58
	MEA	1002	35	5	2		42
	AET+MEA	1004	26	3		1	30
35 天	对照	1000	8	1		1	10
	AET	1000	2	3			5
	MEA	1000	6	1			7
	AET+MEA	1000	9	3	1	1	14
绝对对照		2000	13	5			18

在照射后 1 天,受药物处理的各组的染色体畸变率为 4.6—5.8%,都比未经药物处理而受照射的对照组显著为低;而其中尤以 AET 及 MEA 混合注射的效果最为明显, $P < 0.01$ 。在照射后过 5 天,经药物处理的各组的畸变率也都比对照组为低。其中 AET + MEA 组与对照组的差异仍非常显著, $P < 0.01$; MEA 组与对照组也有显著差异, $P = 0.05$; 但 AET 组与对照组的差异在统计学上并不显著。在照射后 35 天,因各组中染色体畸变率都已降至绝对对照组的水平,所以各组之间已无显著差异(表 4, 5)。

从上述结果看来,在照射后 1 天或 5 天,在初级精母细胞中的染色体畸变率方面, AET 及

MEA 也表现了防护作用。在照射前注射上述药物,可使初级精母细胞中的染色体畸变率显著地降低。作者等在前一研究中已证明了 MEA 对猕猴及小白鼠睾丸中由 X 射线引起的染色体畸变有防护作用^[10]。本试验则进一步证明 AET 及 MEA 两种药物在 γ 射线作用下对染色体的防护作用,而且两种药物混合施用的防护效果更好。

表 5 各组中有畸变的初级精母细胞后期与末期所占百分率及畸变率

照射后间隔时间	处 理	有畸变的后期与末期所占百分率 $\bar{x} \pm S. E.$	畸 变 率 $\bar{x} \pm S. E.$	各组畸变率与对照相比时差异显著性之测定
1 天	对照	9.392±0.655	9.672±0.913	—
	AET	5.760±0.950	5.760±0.950	*P < 0.05
	MEA	5.250±0.777	5.625±0.800	*P < 0.05
	AET+MEA	4.500±0.570	4.600±0.534	**P < 0.01
5 天	对照	6.625±0.375	6.575±0.375	—
	AET	5.800±0.930	5.800±0.930	P > 0.05
	MEA	4.192±1.094	4.192±1.094	*P = 0.05
	AET+MEA	2.990±0.910	3.090±0.994	**P < 0.01
35 天	对照	1.000±0.316	1.100±0.400	—
	AET	0.500±0.274	0.500±0.274	—
	MEA	0.700±0.583	0.700±0.583	—
	AET+MEA	1.400±0.484	1.500±0.548	—
绝对对照		0.900±0.179	0.900±0.179	—

* 有显著差异;
** 有非常显著之差异。

四、讨 论

1. 本研究证实了我们的设想,即虽然有人证实 MEA 在睾丸中的浓度很低,但这并不完全决定 MEA 对睾丸就不能有防护作用。更重要的是研究方法,特别是剂量与观察指标。除了我们的结果外,1959 年以来陆续发表的不少资料,也都与我们的观点相一致。

如所用的剂量较大,但以生殖力和暂时绝育期的长短等为指标,则仍可观察到 MEA 与 AET 的防护效果。例如迈森等观察到,在以 900 伦琴全身照射小家鼠时,受 AET 注射的小家鼠的暂时绝育期比用骨髓防护的为短^[11]。汪(S. C. Wang)等也证明,MEA 能预防雄性小家鼠受 700 伦琴 X 射线全身照射后最初 2—3 个月内暂时不育^[12]。

反之,如所用剂量较大,而且用睾丸重量及一般的组织学观察作为指标,则即使药物在睾丸中浓度相当高,也不一定观察到药物对睾丸组织的防护效果。例如阿希伍德史密斯(M. J. Ashwood-Smith)所用的二甲基亚砷(CH₃SCH₃),对小家鼠有全身防护作用,而且在

↓
○

注射后不到半小时内,在睾丸内即可发现药物含量相当高。他在注射药物后 45 分钟时,以 100、300、500、800 伦琴 X 射线照射小家鼠,并在 28 天后观察其睾丸重量及一般的组织学损伤情况,结果并未发现药物对性腺的防护作用^[13]。过去迈森等失败的原因,很可能也在于此^[3,13]。又如厄肖夫(B. H. Ershoff)在以 900 伦琴致死剂量全身照射大家鼠,而以睾丸重量及一般组织学观察为指标,也没有观察到 AET 对睾丸的防护作用^[13]。

在以染色体畸变率、精原细胞数及卵泡数等更敏感的指标来研究药物对射线的防护作用时,则以用比较低的剂量(即剂量与效应的相关曲线中斜率最大的那一段的剂量)来照射为宜。

如射线剂量过高,则性腺组织受损严重,以这些指标就不易观察到药物的防护效果。当我们正在对本试验的材料进行观察时,已看到曼德尔(A. M. Mandl)已提出了这样的见解,并用自己的试验加以证实。当以230, 345及460伦琴照射大鼠时,MEA可使存活的精原细胞及前精母细胞增多^[14]。

努日金等起初用500伦琴照射雄性小鼠,以200伦琴照射雌性小鼠,分别以雄性性细胞数及卵泡数作指标,结果表明MEA等三种防护药物对雌雄性腺均无防护效果。后来改用50伦琴的较低剂量照射雌鼠,却证明MEA可使受照射雌鼠的存活卵泡增多。而若同时以自体移植的方法改变卵巢的正常条件,则使MEA的防护效力更提高五倍^[4]。

总之,性腺中药物浓度较别的器官中低,这并不完全决定该药物对性腺一定没有防护作用,研究方法在这里可能起重要作用。在研究中利用较细致和敏感的组学指标或细胞遗传学指标时,所用的照射剂量不宜太大。但如能使性腺中的药物浓度提高,则当然有可能使药物对性腺的防护效果更为明显。

2. 根据已看到的文献材料,到目前为止,以哺乳动物的后代变异为指标,证实化学防护药物对射线的遗传学效应有防护作用的,有管原努等及吕宁格(K. G. Lüning)等。管原努等用AET处理雄性小鼠,在注射后30分钟以200伦琴X射线进行照射,在与正常雌鼠交配后,观察到AET有部分防护效果,使显性致死率降低^[6]。吕宁格等用MEA处理雄性小鼠,在受照射后7天内交配,发现MEA可使受300伦琴照射的雄鼠,在交配后所得胚胎的植入后死亡率减少,而使受600伦琴照射的雄鼠交配后所得胚胎的植入前死亡率减少。根据内尔桑(A. Nelson)等研究的结果,MEA在注入雄鼠后过20分钟,在副睾中的浓度相当高,而在睾丸中的浓度却很低。吕宁格等认为照射后立即交配时所用的是在副睾中的精子,因此估计在照射后立即交配的后代中,MEA也应表现出它的防护作用,试验结果也与预想相符合^[16]。

但是我们的试验结果表明,MEA也可使照射后1天及5天内所观察到的初级精母细胞后期与末期中染色体畸变率减少。而根据欧克伯格的研究,自初级精母细胞后期与末期至精子排出精小管约需15天左右^[17],而自精小管排出至精子排出体外尚需几天。因此,如以MEA预先处理受150伦琴照射的雄性小鼠,则在照射后20—27天左右交配所得的仔鼠中,染色体突变也可能会减少。但也有可能,由于受药物处理组与对照组中有染色体畸变的精母细胞因受损伤严重而死亡,以致在这批精母细胞发育而成的精子使卵受精而得到的仔鼠中,在染色体突变方面不能显示MEA的防护作用。这有待进一步的研究来阐明。

3. 目前已证明对哺乳动物性腺有防护作用的只是MEA与AET,这些含硫的化合物作用的主要机制在于使自由基钝化(Inactivation)。因此它们对染色体的防护作用,主要是由于影响了电离辐射对染色体的间接作用过程。可是也有一些防护药物能直接影响靶分子的辐射敏感性^[18],而在电离辐射的遗传学效应中,直接作用也起重要作用。因此,除MEA及AET外,其他化学防护药物,如那些直接影响靶分子敏感性的防护药物,也可能对辐射的遗传学效应有防护作用。而且有可能,作用机制不同的防护药物混合使用时,对辐射的遗传学效应的防护作用也更大。值得进一步进行这方面的研究。

参 考 文 献

- [1] Bacq Z. M., Possibilities and limitations of the chemical protection of man and other mammals against ionizing radiation, International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Vol. 11, 1956, pp. 332—334.
- [2] Kaplan W. D., Lyon M. F., Failure of mercaptoethylamine to protect against the mutagenic effects of radiation II. Experiments with mice, *Science*, Vol. 118 (1953), pp. 777—778.
- [3] Maisin J., Maisin H., Dunjic A., Maldague P., Cellular and histological radiolesions, their consequences

- and repair, *International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy*, Vol. 11, 1956, pp. 315—329.
- [4] Нуждин Н. И., Шапиро Н. И., Чудиновская Г. А., Панова Н. В., Влияние защитных веществ на гонады млекопитающих, *Журнал Общей Биологии*, Том 21 (1960), № 6, стр. 430—438.
- [5] Rugh R., Walf J., Evidence of some chemical protection of the mouse ovary against X-irradiation sterilization, *Radiation Research*, Vol. 7 (1957), pp. 184—189.
- [6] 菅原努, 土川清, 田中富藏, 堀川正克, 山本五郎, 杉浦嘉彦, 所謂放射線障害防护剂の効果の遗传学的研究, 日本医学放射线学会杂志, 1958, 第18卷, 第5号, 第188页。
- [7] Leblond C. P., Clermont Y., Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "Periodic acid-fuchsin sulfurous acid" technique, *American Journal of Anatomy*, Vol. 90 (1952), No. 2, pp. 167—217.
- [8] Oakberg E. F., A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal, *American Journal of Anatomy*, Vol. 99 (1956), No. 3, pp. 391—413.
- [9] Oakberg E. F., Initial depletion and subsequent recovery of spermatogonia of the mouse after 20 r of gamma rays, *Radiation Research*, Vol. 11 (1959), No. 5, pp. 700—719.
- [10] М. А. 阿尔辛尼也娃, 马秀权, 汪安琦, MEA 对电离辐射所引起的染色体畸变的防护效应, 1960, 未发表。
- [11] Maisin J. R., Doherty D. G., Chemical protection of mammalian tissues, *Federation Proceedings*, Vol. 19 (1960), No. 2, pp. 564—572.
- [12] Wang S. C., Kuskin S., Rugh R., Protective action of cysteinamine (β -mercaptoethylamine) against X-irradiation-induced sterility in CF_1 male mice, *The Proceedings of the Society of the Experimental Biology and Medicine*, Vol. 101 (1959), No. 2, pp. 218—221.
- [13] Ashwood-Smith M. J., Inability of dimethyl sulphoxide to protect mouse testis against the effect of X-radiation, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 3 (1961), No. 1, pp. 101—103.
- [14] Mandl A. M., The effect of cysteamine on the survival of spermatogonia after X-irradiation, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 1 (1959), No. 2, pp. 131—142.
- [15] Ershoff B. H., Brat V., Failure of AET to protect against testes injury in the X-irradiated rat, *American Journal of Physiology*, Vol. 198 (1960), No. 3, pp. 655—656.
- [16] Lüning K. G., Frölen H., Nelson A., The Protective effect of cysteamine against genetic damage by X-rays in spermatozoa from mice, *Radiation Research*, Vol. 14 (1961), No. 6, pp. 813—818.
- [17] Oakberg E. F., Duration of spermatogenesis in the mouse, *Nature*, Vol. 180 (1957), No. 4595, pp. 1137—1138.
- [18] Eldjarn L., Pihl A., Mechanisms of protective and sensitizing action, In "Mechanisms in Radiobiology, Vol. II, Multicellular Organisms", 1960, Chap. 4, pp. 231—296.

(编辑部收稿日期 1962 年 1 月 6 日)

