

## $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ 线辐照的油菜花粉致突变活性研究\*

贺维顺 刘爱华 熊习昆 林世英

(中国科学院昆明动物研究所, 昆明)

**摘要** 本文以小鼠骨髓细胞微核率, 姐妹染色单体交换率及睾丸细胞减数分裂染色体畸变率为指标检测经  $2.5\text{ kGy }^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照的油菜花粉的致突变性。结果表明: 多染性红细胞及有核细胞的微核率, 减数分裂染色体畸变率, 辐照的及未辐照的花粉和对照组相比均无明显差异。未辐照的花粉诱发的姐妹染色单体交换(SCE)率同对照组相比无明显差异, 而灌胃相同剂量  $3000\text{ mg/kg/天} \times 7$  和  $6000\text{ mg/kg/天} \times 7$  辐照的花粉同对照组相比, 有显著性差异。

**关键词** 油菜花粉, 辐射, 微核, 姐妹染色单体交换, 生殖细胞染色体畸变。

花粉是具有丰富营养成份及生物活性的物质, 经小鼠游泳和爬杆试验证实花粉能增强耐力、具有抗疲劳作用<sup>[1]</sup>。花粉能恢复造血功能, 对贫血、肿瘤病人的化疗, 放疗及其他原因所致造血功能低下颇为有益<sup>[2]</sup>。花粉对人体发育, 增强体质, 延年益寿以及防治老年病都有明显的疗效<sup>[3-4]</sup>。

由于花粉有丰富的营养物质, 因此, 在花粉中的细菌极易生长繁殖, 同时, 花粉是显花植物的雄性配子体, 含有多生物活性物质。人们食用经  $\gamma$  射线辐照灭菌的花粉后是否会诱发生殖细胞突变? 因此, 辐照花粉的安全性便引起人们的关注。我们以小鼠骨髓细胞的微核率、姐妹染色单体交换率以及生殖细胞的染色体畸变率为检测指标, 对  $2.5\text{ kGy }^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照的及未辐照的油菜花粉进行了安全性检查。

### 材 料 和 方 法

(1) 实验动物: 成年的昆明品系小鼠, 由本所动物饲养场提供。外观健康, 雌雄各半。体重为  $22-25\text{ g}$ 。

(2) 待测油菜花粉样品, 产地云南。供试样品分为: ①, 经  $2.5\text{ kGy }^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照的花粉(辐照后在  $25^\circ\text{C}$  以下室温条件下保存半年)。②, 未辐照的花粉(与辐照组在相同的条件下保存)。

(3) 实验程序: ①微核标本制备及观察: 辐照的及未辐照的花粉分组按正常人每日口服  $3\text{ g}$  用量的  $10$  倍( $600\text{ mg/kg}$ ),  $50$  倍( $3000\text{ mg/kg}$ )及  $100$  倍( $6000\text{ mg/kg}$ )  $3$  个剂量组。每日上午灌胃一次, 连续  $7$  次, 在最后一次给花粉后  $6\text{ h}$ , 脱颈椎处死小鼠; 剪取胸骨, 剔净肌肉, 用血管钳将骨髓挤在滴有血清的载玻片上, 混匀后涂片。干燥后用甲醇固定  $15\text{ min}$ 。以  $\text{pH } 6.4$  的磷酸盐缓冲液配制的 Giemsa 染色液染色  $12\text{ min}$ 。每鼠至少观察  $1000$  个有核细胞及多染性红细胞, 出现的微核数, 以千分细胞率表示之。

\* 云南省科委及昆明南坝食品厂委托项目

②小鼠骨髓细胞姐妹染色单体交换(SCE)标本制备及观察: 分组和染毒方式及染毒剂量与微核试验组相同。姐妹染色单体交换实验采用活性炭吸附 5-溴脱氧尿苷(BrdU), 体内标记, 紫外线照射—Giemsa 染色的姐妹染色单体分化染色技术。BrdU 的用量为 1 mg/g 体重。腹腔注射 BrdU 混悬液后 24 h, 按 4 mg/kg 腹腔注射秋水仙素溶液; 2 h 后脱颈椎处死小鼠。取两根股骨放入含生理盐溶液的容器中。用血管钳挤出骨髓, 制备细胞悬浮液, 离心沉淀, 低渗、固定, 空气干燥法制片。按以前描述的方法<sup>[5,8]</sup>分化染色。干燥后镜检, 记数, 统计学处理。

③小鼠睾丸生殖细胞染色体标本制备及观察<sup>[7,9,11,13]</sup>: 实验分为 5 组: 对照组; 2.5 kGy  $^{60}\text{Co}$  射线辐照的剂量为 50 及 100 倍的油菜花粉组; 未经处理的 50 和 100 倍的油菜花粉组。每日灌胃一次, 连续 7 天。处死动物前 10—12 h 腹腔注射 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  秋水仙素溶液 0.1 ml。脱颈椎处死动物, 取出双侧睾丸。在生理盐水溶液中洗去血污, 0.7% 柠檬酸钠溶液中去被膜, 分散精小管, 在室温下低渗处理 30 min。弃去低渗液, 加入新配制的甲醇: 冰醋酸(3:1 v/v)固定剂。固定 15 min 后; 更换新的固定剂, 移入具塞的小瓶中, 保存于冰箱。制片时取出适量的精小管, 放入离心管中, 加入 2 ml 60% 冰醋酸, 用吸管轻轻吸打, 约 1 min 左右, 加入 6 ml 甲醇, 吸打均匀。800—1000 转/min 离心 10 min, 空气干燥法制片。用磷酸盐缓冲液(pH 6.98)配制的 5% Giemsa 染色, 干燥后镜检。

在低倍显微镜下选择分散良好的初级精母细胞转到油镜下观察记录。应记录的染色体畸变类型有: 间隙、断片、常染色体单价体、x-y 单价体、链状四价体及环状四价体等。

## 结 果

(1) 辐照与未辐照的油菜花粉诱发小鼠骨髓细胞微核试验结果见表 1。

Tab 1. The effect of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray irradiated rape pollen on the frequency of micronuclei of nucleated cells and polychromatic erythrocytes of bone marrow in mice

| Groups                    | Dose<br>(mg/kg/day)<br>$\times 7$ | Number of<br>animal | Nucleated cells in bone marrow |                                                | Polychromatic erythrocytes<br>in bone marrow |                                                |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                           |                                   |                     | Number of<br>cells scored      | Frequency of cells<br>with micronucleus<br>(%) | Number of<br>cells scored                    | Frequency of cells<br>with micronucleus<br>(%) |
| Control                   | 0                                 | 6                   | 6000                           | 0.85                                           | 6000                                         | 2.00                                           |
| Rape pollen               | 600                               | 7                   | 7000                           | 0.14                                           | 7000                                         | 1.71                                           |
|                           | 3000                              | 6                   | 6000                           | 0.50                                           | 6000                                         | 2.00                                           |
|                           | 6000                              | 9                   | 9000                           | 0.33                                           | 9000                                         | 1.67                                           |
| Irradiated<br>rape pollen | 600                               | 5                   | 5000                           | 0.80                                           | 5000                                         | 4.00                                           |
|                           | 3000                              | 8                   | 8000                           | 0.88                                           | 8000                                         | 2.13                                           |
|                           | 6000                              | 9                   | 18000                          | 0.67                                           | 18000                                        | 1.56                                           |

从表 1 可以看出, 对照组骨髓多染性红细胞及有核细胞微核率与口服辐照花粉和未辐照的花粉各组之间相比, 经统计学处理, 均无显著差异。

(2) 辐照与未辐照的花粉对小鼠骨髓细胞姐妹染色单体交换率影响结果见表 2。

从表 2 可以看出: 未辐照的花粉, 无论是每日食用量的 10 倍(600 mg/kg), 50 倍(3000 mg/kg)还是 100 倍(6000 mg/kg)的剂量组与对照组相比, 其姐妹染色单体交换率均无显著性差异。而经 215 kGy 辐照的花粉, 10 倍剂量组尚无明显变化。50 倍剂量组, 姐妹染色单体交换率有所

Tab 2. Effect of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray irradiated rape pollen on the frequency of SCE of bone marrow in mice

| Groups                    | Dose<br>(mg/kg/day) $\times 7$ | Number of<br>animal | Number of<br>cells scored | Mean number of SCE per cell |                      |
|---------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------|
|                           |                                |                     |                           | Range                       | $\bar{X} \pm S. E.$  |
| Control                   | 0                              | 5                   | 150                       | 0—5                         | $2.01 \pm 0.12$      |
| Rape pollen               | 600                            | 5                   | 150                       | 0—6                         | $2.01 \pm 0.11$      |
|                           | 3000                           | 5                   | 150                       | 0—6                         | $2.01 \pm 0.11$      |
|                           | 6000                           | 5                   | 150                       | 0—5                         | $2.15 \pm 0.16$      |
| Irradiated<br>rape pollen | 600                            | 5                   | 150                       | 0—7                         | $2.03 \pm 0.12$      |
|                           | 3000                           | 5                   | 161                       | 0—6                         | $2.36 \pm 0.12^*$    |
|                           | 6000                           | 5                   | 150                       | 0—6                         | $2.95 \pm 0.14^{**}$ |

\*  $t = 2.17$     \* \*  $t = 4.40$

增高。100 倍剂量组增高明显。50 倍未辐照的与辐照的花粉，100 倍未辐照与辐照的花粉组相比，经统计学处理，前者  $t$  值 = 2.17，后者  $t$  值 = 4.40，均有显著性差异。

(3) 辐照的和未辐照的油菜花粉对小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变的影响，结果见表 3。

Tab 3. The effect of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray irradiated rape pollen on the meiotic chromosome in mice

| Groups                    | Dose<br>(mg/kg/day) $\times 7$ | Number<br>of cells<br>scored | Number<br>of animal<br>scored | Type of chromosomal aberrations |                |                        |                                    | X—Y Univalent                        |                                    |
|---------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------|------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
|                           |                                |                              |                               | Frag-<br>ment                   | Univ-<br>alent | Autosomal<br>univalent | Frequency of<br>aberrations<br>(%) | Number of<br>cells with<br>univalent | Frequency of<br>aberrations<br>(%) |
| Control                   | 0                              | 250                          | 5                             | 2                               | 1              | 7                      | 4.0                                | 23                                   | 9.2                                |
| Rape pollen               | 3000                           | 300                          | 6                             | 2                               | 0              | 15                     | 5.6                                | 23                                   | 7.7                                |
|                           | 6000                           | 250                          | 5                             | 2                               | 0              | 8                      | 4.0                                | 21                                   | 8.4                                |
| Irradiated<br>rape pollen | 3000                           | 250                          | 5                             | 0                               | 1              | 4                      | 2.0                                | 25                                   | 10.0                               |
|                           | 6000                           | 250                          | 5                             | 2                               | 4              | 8                      | 5.6                                | 23                                   | 9.2                                |

表 3 表明：辐照的和未辐照的花粉对小鼠生殖细胞染色体畸变的影响，对照组与各实验组之间经统计学处理，均无明显变化。

## 讨 论

(1) 花粉含有极为丰富的生物活性物质，如植物树脂，乙醚脂，烯类化合物，黄酮等，还有蛋白质、氨基酸、碳水化合物，维生素等<sup>[9]</sup>，这就为细菌生长繁殖提供了适宜的环境。2.5 kGy  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照灭菌对于花粉保鲜有明显的效果。但它用于食品，药品及化妆品对人体健康是否会带来不良效应，尤其是潜在的致突变效应。1980 年，虽然联合国 FAO/IAEA/WHO 组织组成 JEOPF 组织通过决议：当辐照的剂量低于 10 kGy 时，任何食品都不会引起毒理学危害，可以不必再作毒性试验。1986 年我国卫生部颁发的规定<sup>[10]</sup>必须按规定做动物急性毒性和致突变试验。本实验使用的是经 2.5 kGy  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照的油菜花粉，按规定进行了致突变实验研究。结果表明：未辐照的花粉无论是 10 倍、50 倍或 100 倍，在上述三项测试指标中与对照组相比，均无显著性差异。所以，未辐照的花粉用于食品、药品及化妆品是安全的。辐照的花粉对小鼠骨髓

有核细胞及多染性红细胞微核率;对初级精母细胞染色体畸变率亦无明显的致突变效应。姐妹染色单体交换检测技术比微核试验和染色体畸变灵敏得多。用姐妹染色单体交换技术测 2.5 kGy 辐照的花粉,结果表明:50 倍辐照与相同剂量未辐照的油菜花粉相比,姐妹染色单体交换率有所增高。100 倍辐照与 100 倍未辐照的油菜花粉组相比,姐妹染色单体交换率增高更为明显,经统计学处理有显著差异。但辐照的花粉,食用量为每人每天 10 倍时,对姐妹染色单体交换未发现致突变作用。每人每天食用量超过 50 倍或 100 倍,在日常用量中是不存在的。按《食品安全性毒理学评价程序(试行)》,根据受试物可能摄入的量考虑,不必担心  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照的油菜花粉的致突变效应。

(2) 有些生物活性物质及某些物理和化学因素能引起生殖细胞遗传物质发生变化。因此,检查这些因素对生殖细胞的潜在遗传学效应是非常必要的。检查生殖细胞染色体异常最常用的方法之一,是对初级精母细胞作细胞遗传学分析<sup>[7-9,11-13]</sup>。花粉既含多种生物活性物质,又经 2.5 kGy  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照,因此,食用或使用这种花粉是否会引起生殖细胞遗传物质发生损伤,自然为人们所关注。

小鼠减数分裂染色体畸变分析法为国际 ICPEMC 组织 1983 所推荐,它能在哺乳动物中直接测定可遗传的染色体损伤。在本实验中,辐照的与未辐照的油菜花粉,在初级精母细胞中引起的染色体畸变:有断片,常染色体单价体及 x-y 染色体单价体(亦称为早熟分离 Procoious disjunction)。x-y 单价体出现的频率约 10%,对照组和实验组没有明显差异,与文献报道的相一致<sup>[11,12]</sup>,因此 2.5 kGy  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线辐照的油菜花粉对小鼠生殖细胞不会造成潜在的遗传学危害。

### 参 考 文 献

- [1] 陈 珏, 龚维柱, 钱伯初, 许衡钧, 蔡华芳, 汤 蕾, 中国药理通讯, 1 (3,4), 186(1984).
- [2] 许衡钧, 陈 珏, 中国药理通讯, 1(3,4), 188(1984).
- [3] 尹渭元, 食品工业科学, 1, 6(1987).
- [4] 黄伟坤, 食品科学, 4, 34(1985).
- [5] 贺维顺, 刘爱华, 保海仙, 陈永光, 动物学研究, 3(2), 129(1982).
- [6] 贺维顺, 刘爱华, 保海仙, 王英彦, 曹维勤, 环境科学学报, 3, 294 (1983).
- [7] I. D. Adler, Mutat. Res., 35(2), 247(1978).
- [8] W. M. Generose, J. B. Bishop, D. G. Gosslee, G. W. Newell, J. Sheu and E. Van Halle, Mutat. Res., 76, 191(1980).
- [9] 施立明, 遗传学报, 12(5), 362(1985).
- [10] 辐射食品卫生管理暂行规定 (86), 卫防字第 52 号卫生部文件, (1986).
- [11] Y. Matsuda, H. Ohara. and Tobar, Mutat. Res., 179, 251(1987).
- [12] 黄幸舒, 陈星若主编, 环境化学致突变、致畸、致癌试验方法, 浙江科学技术出版社, 1985.
- [13] Y. Shiraishi, Mutat. Res., 57(3), 313(1978).

(稿件收到日期: 1988 年 10 月 23 日)

## STUDIES ON MUTAGENIC ACTIVITY OF $^{60}\text{Co}\gamma$ -RAY IRRADIATED RAPE POLLEN

He Weishun, Liu Aihua, Lin Shiyong and Xiong Xikun.

(Laboratory of Animal Genetics and Evolution, Kunming  
Institute of Zoology, Academia Sinica)

**ABSTRACT** The rape pollen contains many biologically active and nutritive substances that are easily spoilt by bacteria because there are abundant nutritive substances. In the present study on disinfection, the rape pollen was irradiated with 2.5 kGy  $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray. We used micronuclei, sister chromatid exchanges (SCE) of bone marrow cells and chromosomal aberrations of meiotic cells in mice as an indicator of chromosomal damage to study the mutagenicity of irradiated rape pollen. The results are as follows:

(1). Micronuclei: The frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes is 2.00‰; nucleated cells is 0.85‰ in control group. In the numbers of polychromatic erythrocytes and nucleated cells with micronuclei, there is no obviously difference in irradiated and unirradiated groups.

(2) SCE: SCE incidence of control group is  $2.01 \pm 0.12/\text{cell}$ . No significant difference in the frequency of SCE exists between non irradiated rape pollen and the control groups. But the frequency of SCE in irradiated rape pollen group (3000 mg/kg/day  $\times$  7) is  $2.36 \pm 0.12/\text{cell}$ ; high dose group (6000 mg/kg/day  $\times$  7) is  $2.96 \pm 0.14/\text{cell}$ . In comparison with control group, there is significant difference.

(3). The meiotic chromosomal aberration: The chromatid breaks, fragments, and univalents in primary spermatocytes have been observed. The frequencies of chromosomal aberration showed no obviously difference among irradiated and non irradiated rape pollen groups. The univalent frequencies of X-Y chromosomes in the experimental groups didn't found the difference with the control group which is 9.2% and over similar to that of the reference.

**KEY WORDS** Rape pollen, Radiation, Mouse, Chromosomal damage