

文章编号: 1007-4627(2011)03-0337-06

模拟微重力条件下 C 离子辐射对小鼠生殖器官的影响*

张录卫^{1,2,3}, 刘阳^{1,2,3,4}, 张红^{1,2,3,#}, 王振华^{1,2,3}, 武振华^{1,2,3}, 赵卫平^{1,2,3}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院重离子辐射生物医学重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

3 甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

4 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 探究模拟微重力条件下不同剂量 C 离子辐射对雄性动物生殖器官的急性影响, 以期了解空间环境辐射所致机体生殖系统的损伤。采用小鼠尾部悬吊模型地面模拟微重力状态 1 周后, 利用重离子加速器提供的 C 离子辐照处理, 检测了生殖器官脏器系数及精子密度、组织形态变化、DNA 损伤以及细胞凋亡各项指标。结果表明, 微重力和 C 离子辐射均能引起睾丸损伤, 且 1 Gy 单纯辐照组中损伤最为严重。此外发现, 模拟微重力能够在一定程度上降低辐射诱导的损伤, 其内在机制有待于进一步的研究。

关键词: 模拟微重力; C 离子; 急性损伤; 睾丸; 小鼠

中图分类号: Q256; Q279; Q274; Q37 **文献标识码:** A

1 引言

随着载人航天事业的发展, 在人类开发和利用太空的活动中, 航天员和太空旅行者无疑会受到来自太空辐射以及失重状态的威胁, 机体原有的内环境稳态将被严重破坏。已有研究表明, 微重力环境可以导致细胞结构和功能的改变, 进而导致机体发育异常, 以及循环、血液、神经、肌肉、骨骼、内分泌和免疫等多个系统的病变^[1]。对雄性生殖器官而言, 微重力可造成睾丸的形态结构变化, 降低睾酮的分泌水平和促进睾丸细胞的凋亡等^[2]。高能重离子虽然仅占太空离子辐射通量的 1%, 但其对生物效应的贡献极大^[3]。与常规射线(X 或 γ 射线)相比, 高传能线密度(LET)的重离子对遗传物质能够诱导更为复杂和高效的损伤^[4], 表现出更高的细胞致死和致肿瘤效应。我们的前期研究表明, C 离子辐照能够导致睾丸组织氧化损伤、细胞周期阻滞、激素水平改变、DNA 链断裂和细胞凋亡率增加等^[5-6]。因此, 在载人航天科技发展迅猛的时代, 关于研究空间环境对机体生殖系统的影响及防护已

迫在眉睫。

目前, 有关地面模拟微重力条件下辐射生物学的研究大都集中在常规射线的研究, 对重离子与模拟微重力复合作用下的机体应答报道较少。本实验采用公认的尾部悬吊模型进行地面模拟微重力状态^[7], C 离子束辐照在中国科学院近代物理研究所兰州重离子研究装置(HIRFL)上进行, 以昆明鼠重要雄性生殖器官——睾丸为主要研究对象, 探讨模拟空间环境对生殖系统的影响, 为保护宇航员和太空旅行者的健康安全提供科学依据。

2 材料方法

2.1 实验材料

健康昆明种雄性小鼠 56 只, 质量为 30—35 g, 由兰州生物制品研究所提供。动物适应饲养 1 周后, 按体重配对随机分组。随机分成 7 组, 每组 8 只。按陈杰等^[8]的方法, 悬吊期间小鼠始终保持约 -30° 的头低位模拟微重力效应。动物单笼饲养、自由进食、饮水和活动。动物室饲养环境温度

* 收稿日期: 2010-11-22; 修改日期: 2011-01-19

* 基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KJ CX2-YW-L08)

作者简介: 张录卫(1979—), 男(汉族), 甘肃文县人, 硕士, 从事辐射生物学研究工作; E-mail: zhanglw@impcas.ac.cn

通讯联系人: 张红, E-mail: zhng@impcas.ac.cn;

(20±2) °C, 同时 12 h 光照和黑暗交替循环。

2.2 照射条件

重离子照射在 HIRFL 肿瘤治疗终端上进行, 本次实验采用的束流为 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束, 能量为 235 MeV/u, LET 为 26.9 keV/ μm , 吸收剂量率为 1 Gy/min, 照射剂量分别为 0, 0.2, 0.4, 0.8, 同时 1.0 Gy。

2.3 实验处理

实验动物处理分为 7 个组, 即正常对照组 (CK), 1.0 Gy 单纯照射组 (IR, Irradiated group), 单纯微重力处理组 (SUS, tail-suspended group), 0.2 Gy 辐照微重力处理组 (0.2 Gy+SUS), 0.4 Gy 辐照微重力处理组 (0.4 Gy+ SUS), 0.8 Gy 辐照微重力处理组 (0.8Gy+ SUS), 1.0 Gy 辐照微重力处理组 (1.0 Gy+ SUS)。正常对照组中的受试动物不经过任何照射和微重力处理; 单纯照射组中的受试动物仅接受全身照射处理; 单纯微重力处理组仅对受试动物进行微重力处理; 受试动物首先悬尾模拟微重力状态一周后, 再进行不同剂量 C 离子辐照处理, 继续吊尾 24 h 后取材。

2.4 睾丸、附睾脏器系数及精子密度测定

称取小鼠重量, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 剖开腹腔后观察睾丸、附睾的外观形态变化, 分离双侧睾丸和附睾, 用解剖针除去周围脂肪组织并称量记录。睾丸和附睾脏器系数: 睾丸和附睾系数 = 双侧睾丸或附睾重量/体重。另外, 将左侧附睾置于 1 ml 的 PBS 缓冲液中 (37 °C 恒温水浴), 用眼科剪充分剪碎, 静置 20 min, 收集附睾精子滤液滴入血细胞计数板, 精子计数按血细胞计数法进行。

2.5 组织切片检测

取出左侧睾丸, 10% 甲醛固定, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 切片厚度 5 μm , 苏木精-伊红染色后用光镜观察病理组织学变化。

2.6 单细胞电泳

在 Hartmanne 等^[9]描述的方法基础上稍作改动, 制备单细胞悬浮液并调节每张载玻片的细胞数为 10^3 — 10^4 个; 在含高离子浓度去污剂裂解液中裂解 2 h; 碱性条件下解旋 20 min, 电泳 30 min (300 mA, 25 V); 0.4 mol/l 三羟甲基氨基甲烷 (Tris,

pH 值为 7.5) 中和, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭染色; 以上操作均在低温和弱光下进行。每张片子随机挑选 50 个细胞, 用 Caspl. 22 (Poland) 专业图像分析软件检测 DNA 尾距 (Tail Moment)。尾距是尾部 DNA 占总 DNA 的百分比与头、尾部中心间距的乘积。

2.7 TUNEL 染色测细胞凋亡

石蜡切片经常规脱蜡水化后, PBS 冲洗 2×3 min; 用 0.1 M pH6.0 的柠檬酸盐缓冲液经 750 W 微波修复 5 min, PBS 冲洗 3×3 min; 用含 3% BSA 和 20% 正常小牛血清的 pH7.5 的 Tris-HCL 在 37 °C 温箱中湿盒孵育 30 min, 滴加 50 μl 的 TUNEL 反应混合液, 在湿盒中 37 °C 孵育 60 min, PBS 冲洗 3×3 min; 再滴加二抗 37 °C 温箱中湿盒孵育 30 min, PBS 冲洗 3×3 min, DAB 显色, 阳性对照采用 DNA 酶 I (100 U/100 μl) 在湿盒中 37 °C 孵育 30 min 代替柠檬酸盐缓冲液修复, 其余步骤与正常染色同; 阴性对照采用 50 μl 不含 TDT 酶的核苷酸混合液替代 TUNEL 反应混合液。每批次实验均设立阴性、阳性对照。细胞凋亡指数 (AI), TUNEL 反应阳性为棕黄色或深褐色, 高倍镜倍镜 (40 \times 10) 下选定 5—10 个视野, 每个视野计数 100—200 个细胞, 总共计数 500—1000 个细胞, 计算其中的凋亡细胞数所占比例。

2.8 数据统计分析

所有数值表示为均数±标准差, 各组均数采用单因素方差分析, 采用 SPSS 11.5 统计软件和 Origin7.0 绘图软件。

3 结果

3.1 C 离子辐照复合模拟微重力对小鼠睾丸、附睾脏器系数及精子密度的影响

表 1 显示所有处理组较 CK 组小鼠睾丸及附睾脏器系数均有不同程度的减少, 除单纯辐照处理组外 ($p < 0.05$), 其余处理组脏器系数与对照组相比均无显著统计学差异。精子密度是评价雄性动物生育能力的重要指标之一, 在模拟微重力条件下, 随着 C 离子辐照剂量的增加 ($p < 0.05$ 或 0.01), 小鼠精子密度明显低于 CK 组以及 SUS 组, 且 IR 组的小鼠精子计数低于 CK 组 34.5%。

3.2 C 离子辐照复合模拟微重力引起的小鼠睾丸病理变化

光镜下病理阅片结果(图 1)表明, CK 组生精小管界膜完整平坦, 细胞层次宽, 各级生精细胞排列规则, 基底面至腔面可见精原细胞、初级精母细胞和精子细胞等各个发育阶段的细胞, 腔内可见成熟精子, 血管丰富, 间质细胞结构良好。SUS 组的

小鼠睾丸保持了较为完整的生精小管结构, 各级生精细胞排列略为紊乱, 生精小管直径明显缩小; 辐照复合微重力处理后, 生精上皮(管壁)明显变薄, 细胞层次减少, 各级生精细胞排列紊乱甚至脱落及缺失, 数量明显减少; 而 IR 组的小鼠生精小管发生了严重的退化变性、萎缩和空泡化, 甚至消失, 其中管腔内成熟精子明显减少, 甚至没有。

表 1 模拟微重力下 C 离子辐照对小鼠睾丸、附睾脏器系数及精子密度的影响*

组别 (Group)	睾丸脏器系数 /(mg/g)	质量损失率 (%)	附睾脏器系数 /(mg/g)	质量损失率 (%)	附睾精子数 /($\times 10^6$ /ml)
CK	6.26 \pm 0.63	0	2.51 \pm 0.23	0	18.13 \pm 2.12
SUS	5.87 \pm 1.10	6.23	2.34 \pm 0.25	6.77	16.87 \pm 1.16
0.2 Gy+SUS	5.49 \pm 0.92	12.30	2.32 \pm 0.21	7.57	16.30 \pm 1.57
0.4 Gy+SUS	4.48 \pm 0.96	28.43	2.11 \pm 0.19	15.93	13.97 \pm 1.36 ^a
0.8 Gy+SUS	4.57 \pm 0.83	26.99	2.18 \pm 0.20	13.15	14.20 \pm 1.60 ^a
1.0 Gy+SUS	4.42 \pm 0.42	29.39	2.07 \pm 0.17	17.53	13.10 \pm 1.47 ^b
IR(1.0 Gy)	4.27 \pm 0.79 ^a	31.79	1.88 \pm 0.17	25.10 ^a	11.87 \pm 0.90 ^b

* 与对照组(CK)相比, a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$ 。

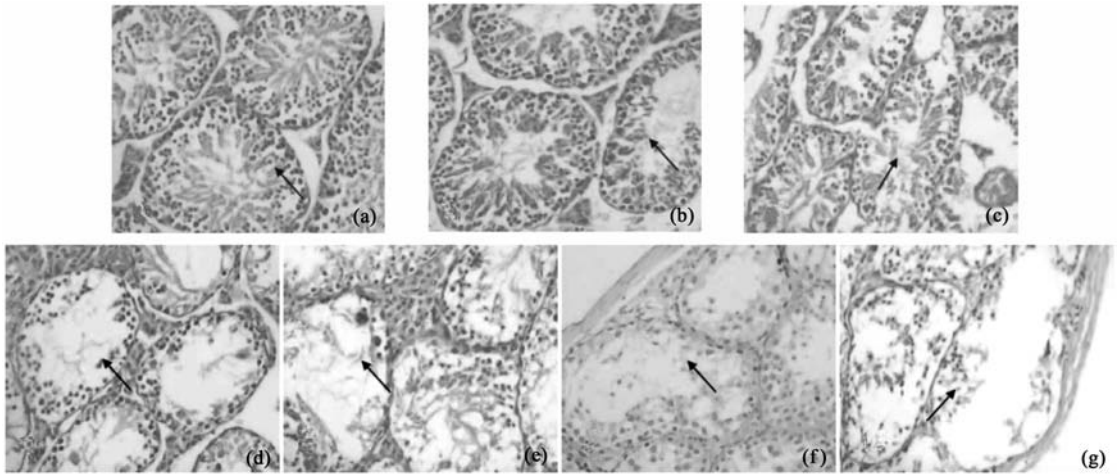


图 1 模拟微重力下 C 离子辐照对睾丸组织的病理影响

(a) CK(X200), (b) SUS(X200), (c) 0.2 Gy+SUS(X200), (d) 0.4 Gy+SUS(X200), (e) 0.8 Gy+SUS(X200), (f) 1 Gy+SUS(X200), (g) IR(1.0 Gy), 箭头表示生精小管。

3.3 C 离子辐照复合模拟微重力诱导小鼠睾丸的 DNA 损伤

图 2 给出了微重力条件下 C 离子辐射与 DNA 尾距的效应关系, 细胞 DNA 受损越严重, 其尾部的迁移距离越显著。除了 SUS 组与 0.2 Gy+SUS

组, 其余处理组中 DNA 的损伤程度均明显高于 CK 组, 且随着辐射剂量的增加, DNA 尾距呈现一定的剂量依赖效应。在本实验中, 1.0 Gy 单纯重离子辐照诱导的 DNA 损伤最为严重, 其尾距是正常对照组的 5.1 倍。

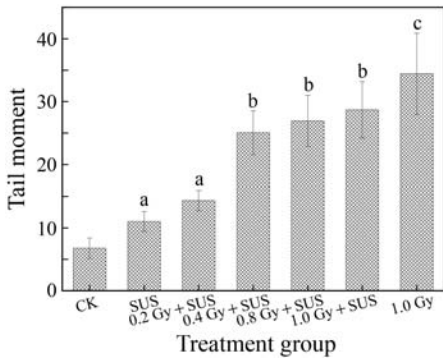


图 2 模拟微重力下 C 离子辐照对睾丸组织 DNA 损伤与对照组(CK)相比, a $p < 0.05$, b $p < 0.01$ 和 c $p < 0.001$ 。

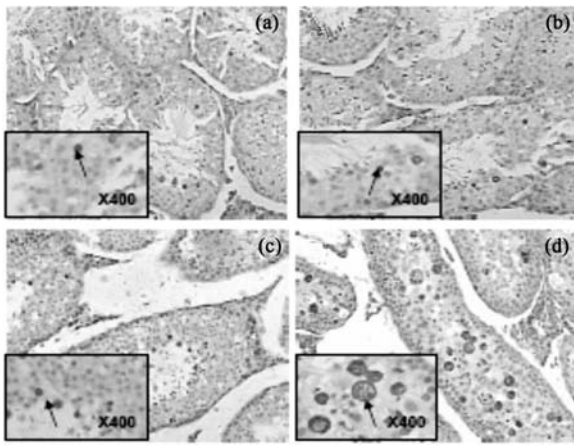
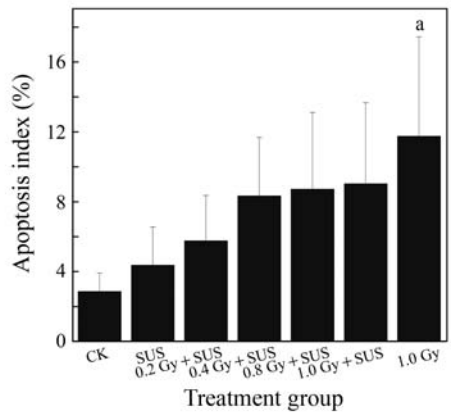


图 3 模拟微重力下 C 离子辐照对睾丸生殖细胞凋亡示意图以及效应关系

(a) CK(X100), (b) SUS(X100), (c) 1 Gy+SUS(X100), (d) IR 1 Gy(X100), 与对照组(CK)相比, a $p < 0.05$ 。

3.4 C 离子辐照复合微重力诱导小鼠睾丸的凋亡效应

如图 3 所示, TUNEL(POD)法阳性细胞定位于发生凋亡的细胞核或细胞浆内(少数), 着色呈棕色或褐色。与 CK 组 AI 值相比(2.85 ± 1.06), 所有处理组均引起了生殖细胞的显著凋亡, 其中 IR 组中的 AI 值约为对照组的 4.12 倍, 且不同类型的生精细胞包括精原细胞、初级、次级精母细胞以及精细胞都有不同程度的凋亡发生。在模拟微重力条件下, 睾丸细胞凋亡呈现辐照剂量依赖效应。



4 讨论

睾丸是雄性动物重要的生殖器官, 具有生精和内分泌双重功能。已有研究表明, 睾丸对微重力和重离子辐照的应答都相对敏感^[10-11], 睾丸的损伤将可能导致亲代不可逆的生精阻滞、生殖能力异常或者子代遗传缺陷或畸形。睾丸及附睾的脏器系数是生殖毒理学中的重要评价标准之一, 研究结果显示, 模拟微重力和 C 离子辐射均能不同程度地改变小鼠睾丸及附睾的脏器系数, 然而仅在 IR 组中脏器系数出现了显著降低, 说明 1.0 Gy 的 C 离子辐射导致了严重的睾丸萎缩, 这与我们以往的实验结果相一致^[5]。且模拟微重力下的 C 离子辐照(大于 0.4 Gy)能够引起精子密度的显著下降, 表明小鼠的精子发生受到了明显抑制。周艺等人发现, 模拟微重力环境会导致大鼠睾酮合成相关基因表达下调, 使其合成受阻, 含量下降^[12]。Tou 等人也报道在航天飞行中, 雄鼠和飞行员睾酮含量都出现了短

暂且剧烈的减少^[13]。同样, 重离子辐照也能通过直接损伤睾丸 Leydig 细胞或者间接调控下丘脑-垂体-睾丸性腺轴影响激素水平^[14]。然而, 激素水平的变化如睾酮下降等必将导致精子发生过程的受阻。

病理结果显示, SUS 组和 0.2 Gy+SUS 组的小鼠睾丸仍然保持了较为完整的生精小管结构, 各级生精细胞及精子排列有序。0.2 Gy 以上复合微重力处理组生精上皮变薄, 生精小管直径明显缩小, 且 1 Gy 单纯重离子处理的小鼠部分生精小管则发生了严重的退化或消失, 说明在本实验中微重力以及重离子辐射两个因素均可造成睾丸的组织形态改变, 且 1 Gy 单纯辐射导致的睾丸形态学变化大于微重力的。

在本研究中, 模拟微重力条件下, DNA 损伤水平呈现出一定的量效关系, 即随着辐射剂量的增加, DNA 链的断裂程度愈明显, 且 IR 组的 DNA

损伤远远大于 SUS 组的 ($p < 0.001$), 说明 C 离子辐照在睾丸细胞 DNA 损伤中的贡献要显著大于微重力的。已有研究表明, C 离子辐射能够直接作用于 DNA 分子, 所致损伤发生在糖和磷酸的位点, 且其造成的 DNA 双链断裂与粒子注入呈线性正相关^[15]。

细胞凋亡是睾丸的正常生精过程中存在的现象, 这是清除过量或受损生殖细胞的一种重要方式。然而过量的细胞凋亡将会打破凋亡与增殖间的固有平衡, 导致生殖功能异常。如图 3 结果显示, 与 CK 组相比, 微重力和 C 离子辐照因素均能诱导睾丸细胞凋亡率的增加, 且在 IR 组中 AI 达到峰值 ($p < 0.05$), 说明微重力和 C 离子辐照处理可促进小鼠睾丸细胞凋亡。在本实验中睾丸细胞凋亡与 DNA 损伤趋势的一致性, 表明 DNA 损伤的不可逆导致凋亡细胞数量的增多。同时我们还发现, 模拟微重力减少了 C 离子辐射造成的睾丸细胞凋亡。Canova 等人在研究微重力与 γ 射线的复合效应时, 也发现微重力能够降低射线造成的类淋巴母细胞 TK6 凋亡^[16]。

5 结语

本实验利用地面模拟装置从雄鼠生殖器官的发育和组织形态变化、DNA 损伤以及凋亡等多个角度, 探讨了微重力与辐射的复合生物学效应。结果表明, 模拟微重力和 C 离子辐射均能引起睾丸损伤, 且在 1 Gy 单纯辐照组中损伤最为严重。此外, 我们发现模拟微重力能够在一定程度上减轻辐射诱导的损伤, 此结果与马晓环等人在模拟微重力与 γ 射线复合作用于未分化 PC12 细胞的研究结果类似^[17], 其中的内在机制有待于进一步的研究。本实验结果为空间辐射危害评价和防护措施的研究提供了一定的基础数据。

参考文献 (References):

[1] Ji Yuhuan, Li Hulun, Wang Dandan, *et al.* Space Medicine & Medical Engineering, 2007, **20**(5): 327(in Chinese).

- (戴玉环, 李呼伦, 王丹丹, 等. 航天医学与医学工程, 2007, **20**(5): 327.)
- [2] Sharma G S, Sarkar S, Periyakaruppan A, *et al.* Mol Cell Biochem, 2008, **313**(1-2): 71.
- [3] Li Wenjian, Dang Bingrong, Wang Zhuanzi, *et al.* Nuclear Physics Review, 2010, **27**(2): 206(in Chinese).
(李文建, 党秉荣, 王转子, 等. 原子核物理评论, 2010, **27**(2): 206.)
- [4] Pathak P, Dey S K, Sarma A, *et al.* Mutation Research, 2007, **632**: 58.
- [5] Liu Yang, Long Jing, Zhang Luwei, *et al.* Advances in Space Research, 2010, in press.
- [6] Long Jing, Zhang Hong, Liu Yang, *et al.* 2008, Nuclear Techniques, **31**(6): 445.
(龙静, 张红, 刘阳, 等. 核技术, 2008, **31**(6): 445.)
- [7] Sandler H. NASA-TM-88314, 1988, 1-100.
- [8] Chen Jie, Ma Jin, Ding Zhaoping, *et al.* Chinese Journal of Space Science, 1993, **13**(2): 159(in Chinese).
(陈杰, 马进, 丁兆平, 等. 空间科学学报, 1993, **13**(2): 159.)
- [9] Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, *et al.* Mutagenesis, 2004, **19**: 51.
- [10] Sharma C S, Sarkar S, Periyakaruppan A, *et al.* Mol Cell Biochem, 2008, **313**: 71.
- [11] Zhang H, Zheng R L, Wang R Y, *et al.* Mutation Research, 1998, **398**: 27.
- [12] Zhou Yi, Zhu Baoan, Guo Aijuan, *et al.* Space Medicine & Medical Engineering, 2008, **21**(6): 461(in Chinese).
(周艺, 朱宝安, 郭爱娟, 等. 航天医学与医学工程, 2008, **21**(6): 461.)
- [13] Tou J, Ronca A, Grindelan K, *et al.* Biology of Reproduction, 2002, **67**: 1681.
- [14] Zhang H, Xie Y, Zhou Q M, *et al.* Advances in Space Research, 2006, **38**: 1148.
- [15] Zhao Weiping, Zhang Hong, Wang Yanling, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2008, **26**(6): 343(in Chinese).
(赵卫平, 张红, 王燕玲, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2008, **26**(6): 343.)
- [16] Canova S, Fiorasi F, Mognato M, *et al.* Radiat Res, 2005, **163**(2): 191.
- [17] Ma Xiaohuan, Wei Lijun, Zheng Hongxia, *et al.* Progress in Modern Biomedicine, 2008, **8**(12): 2204(in Chinese).
(马晓环, 魏力军, 郑红霞, 等. 现代生物医学进展, 2008, **8**(12): 2204.)

Influence of Modeled Microgravity on Mouse Reproductive Organs Induced by Carbon-ion Beams^{*}

ZHANG Lu-wei^{1, 2, 3}, LIU Yang^{1, 2, 3, 4}, ZHANG Hong^{1, 2, 3, #}, WANG Zheng-hua^{1, 2, 3},
WU Zheng-hua^{1, 2, 3}, ZHAO Wei-ping^{1, 2, 3}

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

3 *Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China;*

4 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: In this paper it was investigated that the effect of modeled microgravity on the acute injury induced by low doses of carbon ions in the male reproductive organs of mice, assessing the risk associated with the space environments. In our study, outbred Kunming mice were stimulated in microgravity by tail suspension, and then were irradiated with the low doses of carbon ions delivered by HIRFL, and measured the testis and epididymis coefficient, sperm number of epididymis, histological alterations, DNA strand breaks and cell apoptosis. The results demonstrated that carbon ions and stimulated microgravity could induce the damage in the present study. Moreover, most serious injury all occurred in the irradiation group. In addition, it was also found that the damage of the carbon ion irradiation combined microgravity group were lower than those of the irradiation group, while the related mechanism needs the further investigation.

Key words: modeled microgravity; Carbon ion irradiation; acute damage; testis; mouse

* **Received date:** 22 Nov. 2010; **Revised date:** 19 Jan. 2011

* **Foundation item:** Knowledge Innovation Projection of Chinese Academy of Science(KJ CX2-YW-L08)

Corresponding author: Zhang Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn