

氚水 (HTO) 生物效应研究

赵乃坤 高凤鸣 李新兰 杜维霞 刘秀敏 王文惠

卫生部工业卫生实验所 北京 100088

摘要 氚水诱发 F₁ 代小鼠肿瘤实验研究, 分三个剂量组, 即 $22.2 \times 10^7 \text{Bq} \times 4$, $11.1 \times 10^7 \text{Bq} \times 4$, $3.7 \times 10^7 \text{Bq} \times 4$ 和一个对照组。结果显示, 最高剂量组动物, 雌性小鼠肿瘤发生率为 57.1%, 雄性小鼠肿瘤发生率为 39.3%, 肿瘤发生潜伏期分别为 195.3 ± 77.4 天和 180.3 ± 57.1 天。肿瘤主要类型是淋巴细胞白血病和胸腺瘤。原代金黄地鼠胚胎细胞, 在体外培养条件下, 经放射性比活度 1 mci/ml 和 2.5 mci/ml HTO 作用后, 24~26 天潜伏期细胞发生了转化, 在无刺激因子条件下, 半琼脂培养能形成细胞集落。L₈₅₅ 白血病细胞系, 在不同放射性比活度 $0.66 \times 10^7 \sim 23.125 \times 10^7 \text{Bq/ml}$ HTO 作用后, 其微核细胞率和微核率与放射性比活度呈线性关系, 回归方程分别是 $\bar{Y} = 0.8183 + 0.1416X$, $r = 0.98$ 和 $\bar{Y} = 0.0508 + 0.1548X$, $r = 0.96$ 。小鼠一次腹腔注入放射性比活度为 518 MBq 的氚水后 20 小时, 小肠上皮坏死细胞达到峰值 (5.48 个/隐窝), 然后开始减少, 当注入 37~555 MBq 不同放射性比活度的氚水后 6 小时, 小肠隐窝上皮坏死细胞与放射性比活度呈线性关系。 $\bar{Y} = 0.0263 + 0.1612X$, $r = 0.99$ 。

关键词 氚水; 小鼠肿瘤; 细胞转化; 细胞微核; 小肠腺窝上皮细胞坏死

BIOLOGICAL EFFECTS OF TRITIATED WATER (HTO)

Zhao Naikun, Gao Fengming, Li Xinlan, Du Weixia, Liu Xiumin and Wang Wenhui

Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of Public Health, Beijing 100088

Abstract Biological effects of tritiated water (HTO) were studied in this paper by four different tests, and the following results were obtained: ① The induction of tumor formation by HTO on mice showed that it was a very effective carcinogen, especially for lymphocyte leukemia and lymphoma; ② Cultured golden hamster embryo (GHE) cells were transformed by HTO, as indicated by Con A agglutination test and colony formation test; ③ The micronucleus cell rate and micronucleus rate of the mouse granulocytic leukemia cell line L₈₃₃ increased with increasing radioactivity of HTO and both fitted well to linear relationship; ④ The number of necrotic epithelial cells in mouse intestinal crypts reached to its peak 20 hrs after injection of 518 MBq HTO, then declined. And when the injected amount of radioactivity of HTO changed, the number of necrotic cells detected 6 hrs after injection changed correspondently, also in a linear manner.

Key words tritiated water; tumor; cell transformation; micronuclei; epithelial cell necroses.

随着核能在国民经济中广泛应用, 由核反应堆排放出氚的量也逐年增加。这些氚是以氚水 (HTO) 的形式释放到周围环境, 造成“氚化环境”。氚的化合物如³H-TdR 等在医学生物学领域中也广泛用于示踪实验, 向环境中排放出一定量的有机氚。无论 HTO 或有机氚其物理半衰期较长, 直接或间接进入体

内, 一部分氚结合到细胞核 DNA 等有机物质中, 长期在体内存在, 是内照射剂量的主要来源。氚所释放的 β 射线, 可使细胞 DNA 损伤, 细胞发生突变, 后期可能引起躯体肿瘤和寿命缩短, 对人群的健康具有潜在的影响。如何解决长期小剂量辐射对人体所造成的危害, 这是辐射防护中所关心的重要问题。

近年来,对氚在生物体内的代谢;照射剂量估算;相对生物效应(KBE)等作了大量研究,但是氚水的致突、致畸,特别是致癌研究报导较少。因为氚是低毒类核素,氚水进入体内绝大部分被排泄,仅有1~3%与机体有机物结合。氚没有特异靶器官,因此需要作大量长期的实验研究。

本文包括四部分实验资料:HTO诱发小鼠肿瘤;HTO及其化合物致体外细胞转化;HTO致L833细胞系细胞微核率和HTO致小鼠小肠上皮细胞坏死的研究。

材料和方法

1. HTO诱发小鼠肿瘤研究

1.1 动物: F₁ (C₅₇BL/6J[♀] × BALB/c[♂]) 小鼠 267 只,雌雄各半,8~10 周龄,平均体重雄性 22.4 ± 1.7 克,雌性 21.0 ± 1.7 克,中国医学科学院动物中心供应。

1.2 HTO: 放射性比活度 3.7 × 10¹¹ Bq/ml,二机部原子能研究所产品。

1.3 实验方法和分组:根据文献报导⁽¹⁾预测肿瘤最高发生率和是否存在实际阈剂量进行分组。HTO给动物注入前用液闪作进一步标定,每只小鼠腹腔一次注入 0.4ml,间隔 7 天,共注射 4 次。实验分组如表 1。对照组小鼠注射等量生理盐水。

1.4 观察指标:肿瘤发生率、肿瘤发生潜伏期、肿瘤组织病理学分类和动物寿命。

1.5 观察时间:1.5 年。

1.6 全身吸收剂量估算⁽²⁾:根据 HTO 在小鼠体内代谢规律,符合两项指数函数关系,即:

$$R(t) = R_{01}e^{-\frac{0.693}{Tb_1}t} + R_{02}e^{-\frac{0.693}{Tb_2}t}$$

$$D = 51.2 \times \frac{\epsilon}{m} \times Q = 51.2 \times \epsilon \times \frac{q_0}{m} \int_{t_1}^{t_2} R(t) dt, (rad)$$

表 1 实验分组

组别	放射性比活度 (×10 ⁷ Bq/只)	性别	实验开始例数 (只)
1	22.2×4	雌	30
		雄	30
2	11.1×4	雌	30
		雄	30
3	3.7×4	雌	30
		雄	30
4	对照组	雌	62
		雄	25

由于 HTO 在雌雄动物体内第一半排期 T_{b1} 相同,但第二排出期的相应生物半排期有所差别,按每克动物体重注入 3.7 × 10⁴Bq (1 微居里 1 克体重) 计算,积分到 HTO 注入后 65 天,吸收剂量 D,雌性小鼠 0.89 rad,雄性小鼠 0.82 rad。由放射性比活度 (Bq) 换算成吸收剂量 (Gy) 即:如果积分到 1.5 年,动物全身累积剂量可能比上述剂量再增加 1% (见表 2)

表 2 各实验组动物累积平均吸收剂量

放射性比活度 (×10 ⁷ Bq)	吸收剂量 (Gy)	
	雌性	雄性
22.2×4	10.18	8.75
11.1×4	5.09	4.38
3.7×4	1.70	1.46

2. 氚水 HTO 及其化合物体外诱发原代金黄地鼠胚胎细胞转化

将液氮中储存的原代金黄地鼠胚胎细胞按常规接种在 30ml 的玻璃培养瓶内,细胞量为 0.86 × 10⁵/瓶。分 8 组,每组 3 瓶。于培养后第 6 天细胞生长贴壁在 2/3 以上,分别加入核素见表 3。

表 3 实验分组

组别	瓶数	HTO	³ H-TdR	³ H-Uridine	E (戊酸雌二醇)
		mci/ml	(uci/ml)	µci/ml	µg/ml
1	3	1.0			
2	3	2.5			
3	3	2.5			0.5
4	3	1.0			1.0
5	3		0.01		
6	3			0.5	
7	3			0.5	1.0
8	3				

根据细胞形态,半琼脂培养和刀豆 A 凝

集实验等来判断细胞是否转化。

3. 氡水诱发体外细胞微核的研究

L₈₃₃细胞系按常规培养,在细胞呈指数生长期加入氡水,最终比活度在 0.18~6.6mci/ml,根据文献报导⁽³⁾,由 HTO 放射性比活度换算成细胞吸收剂量在 0.32~10.93 GY 之间。采用 CB 法常规制备细胞微核标本。只计数双核细胞中的微核。各剂量点分别计数双核细胞 600~1000 个。计算微核细胞率、微核率与剂量之间关系。

4. 氡水 β 线致小鼠小肠隐窝上皮细胞坏死

雌性 F₁ (C₅₇BL/6J[♀] × BALB/c[♂]) 小鼠,10 周龄,平均体重 25 克。每只小鼠腹腔一次注入 HTO 放射性比活度为 518 MBq (14mci),注入后 0.5~24 小时不同时间点处死动物取小肠,观察注入 HTO 后不同时间小肠隐窝上皮坏死细胞和核分裂指数的变化;每只小鼠腹腔分别一次注入 37~555 MBq 不同放射性比活度的 HTO。注入后 6 小时处死动物取材,观察放射性比活度与小肠隐窝上皮细胞坏死和核分裂指数变化的关系。吸收剂量照参考文献⁽⁴⁾估算方法,即:25 克体重小鼠一次注入 1MBq HTO,组织吸收剂量率为 0.131mg/小时。

结果和讨论

近年来,由于核能大力发展,环境中的氡逐年增加,这些氡以 HTO 形式广泛分布在生物链中,对人类存在潜在的危害。实验证明小剂量,低剂量率 HTO 能引起哺乳细胞死亡、突变、染色体畸变和恶性转化^{5,6}。Yokoro • k et al⁽¹⁾报告,小鼠腹腔分别注射 HTO 1.9 × 10⁸ × 4 和 1.4 × 10⁸ × 4 Bq 后,其白血病发病率分别为 45%和 27.4%。本文 HTO 诱发 F₁ 小鼠肿瘤实验研究与上述结果基本相似。如表 4 所示。在最后一次注入 HTO 后 112 天时,在最大剂量组雌性小鼠中首先发现第一例肿瘤。接着此组雌性动物陆续发生肿瘤。实

验结束后最大剂量组雌性动物肿瘤累积发生率为 57.1%,雄性动物肿瘤累积发生率为 39.3%。雌性动物肿瘤发生率明显高于雄性动物,这可能是雌性动物全身吸收剂量大于雄性动物所致。雄性动物肿瘤发生潜伏期分别是 195.3±77.4 天和 180.3±57.1 天,无显著差别。

表 4 各组动物肿瘤累积发生率 (%)

HTO 比活度 × 10 ⁷ Bq/只	吸收剂量 (Gy)	性 别	例 数	肿瘤发生率 (%)	肿瘤潜伏期 (天)
22.2 × 4	10.18	雌	28	16 (57.1)*	195.3 ± 77.4
		雄	28	11 (39.3)	180.3 ± 57.1
11.4 × 4	5.09	雌	30	1 (3.3)	324
		雄	30	1 (3.3)	532
3.7 × 4	1.70	雌	30	1 (3.3)	350
		雄	30	1 (3.3)	536
对照组		雌	62		
		雄	25		

* 括号内为肿瘤发生率

根据血液学和病理学检查,按肿瘤种类来分,主要是胸腺瘤,淋巴细胞白血病和胸腺瘤全身化形成白血病。见表 5。

表 5 各组动物各类肿瘤发生率

HTO 比活性 × 10 ⁷ Bq/只	性 别	例 数	淋白发生 率 (%)	胸腺瘤发生 率 (%)	淋白+胸腺瘤发生 率 (%)
22.2 × 4	雌	28	5 (17.9)	9 (32.1)	2 (7.1)
	雄	28	4 (14.3)	1 (3.6)	6 (21.4)
11.1 × 4	雌	30	1 (3.3)		
	雄	30	1 (3.3)		
3.7 × 4	雌	30	1 (3.3)		
	雄	30	1 (3.3)		
对照组	雌	62			
	雄	25			

最大剂量组雌性动物是以淋巴细胞白血病和胸腺瘤为主。而雄性动物则以淋巴细胞白血病和胸腺瘤全身化形成淋巴细胞白血病为主。这些差异尚不清楚。淋巴细胞白血病主要是来源于胸腺瘤。其它两个剂量组动物各发生 1 例淋巴细胞白血病。这两组动物肿瘤发生率这样低可能与注入 HTO 放射性比活度较小有关。这有待进一步重复实验。对照组动物未发现肿瘤。

原代金黄地鼠胚胎细胞,体外培养,经 HTO 作用一周后换液,再继续培养 26 天。在加 HTO 1.0mci/ml 和 2.5mci/ml 组,培养细

胞出现复层,交叉灶,相继 HTO-E, ^3H -TdR 组也分别出现上述细胞形态学变化。

这些细胞在刀豆 A 作用下,出现凝集现象,凝集发生时间是在加刀豆素 A 溶液后 2~3 分钟,最长 4 分钟,同时没有任何刺激因子存在的情况下,无论在单层或双层半琼脂培养均能形成细胞丛或集落。这就证明了此时细胞已发生了转化,而 ^3H -U-E, ^3H -U 及对照组培养细胞没有发生转化。

氘水诱发体外细胞系(L₈₃₃)微核的研究,其实验结果显示,当 L₈₃₃细胞系在 0.66×10^7 Bq/ml 放射性比活度 HTO 作用 20 小时,其微核细胞率与对照组相近。当 HTO 放射性比活度增加时,其微核细胞率和微核率随 HTO 的放射性比活度增加而增加,图 1 显示,微核细胞率和微核率与 HTO 放射性比活度呈线性关系。其回归方程分别是 $\hat{Y} = 0.8183 + 0.1416X$, $r = 0.98$; $\hat{Y} = 0.0508 + 0.1548X$, $r = 0.96$,二者均高度相关。但是当 HTO 放射性比活度为 23.125×10^7 Bq/ml 时,则微核细胞率和微核率明显增加,偏出回归直线。

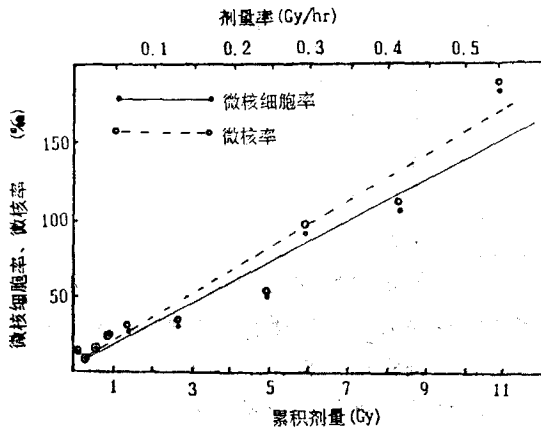


图 1 微核细胞率和微核率与剂量关系

氘水致小鼠小肠隐窝上皮细胞坏死,其实验结果显示,小鼠腹腔一次注入放射性比活度为 518 MBq 的 HTO 时,注射后 0.5~16 小时,吸收剂量为 0.03~1.0 Gy。小肠隐窝上皮细胞坏死随时间而增加,但是在注射后 3 小时内,坏死细胞表现出形态学特征,至少需要 2 小时。注入后 6 小时坏死细胞明显增

加,20 小时达到峰值,然后坏死细胞开始减少,如图 2 所示。

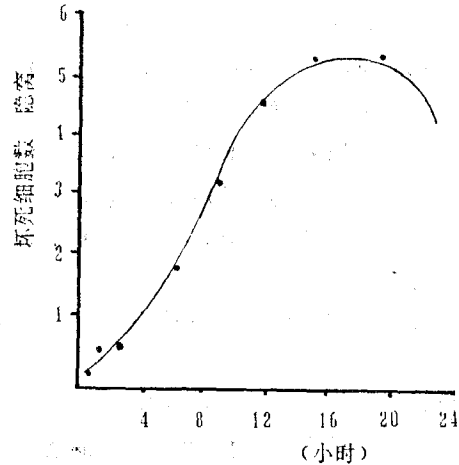


图 2 一次注入 HTO (518MBq) 后不同时间小肠隐窝上皮坏死细胞数

当小鼠腹腔一次注入不同放射性比活度 HTO 时,注入后 6 小时,小肠隐窝上皮坏死细胞随放射性比活度增加而增加,如图 3 所示。当 HTO 放射性比活度在 37~555 MBq 时,吸收剂量为 0.029~0.44 Gy 时,小肠隐窝坏死细胞与 HTO 的放射性比活度呈线性关系,回归方程 $\hat{Y} = 0.0263 + 0.1612X$, (X 为 mci/25 克体重) $r = 0.99$,高度相关。本文由于注入 HTO 放射性比活度偏低,注射后取材偏早,小肠隐窝坏死细胞始终没有达到峰值(直线没有出现平坦部分)。

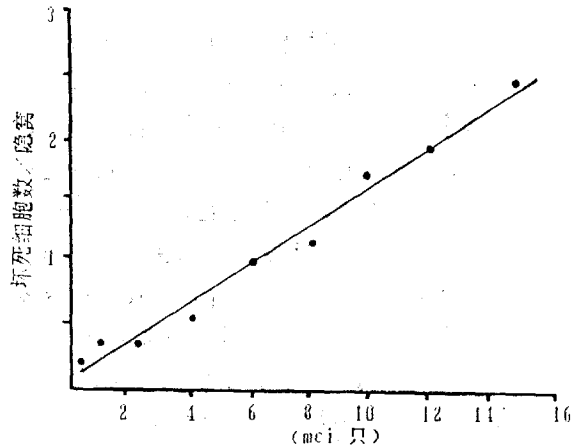


图 3 注射不同比活性 HTO 后 6 小时小肠隐窝上皮坏死细胞数 (下转封三)

细胞质颗粒上存在遗传信息的必要性，最终确定为线粒体，它产生呼吸链上的各种酶。

移植的想法对于酵母和果蝇实验来说都是基础，虽然看上去不太明显。在酵母中，移植不是通过不同类型组织的外科融合来实现的，而是设计将不受核控制的各种细胞质的酵母进行有性杂交。不用显微注射照样达到交配和出芽，将有特定成分的核带入有不同生理和生化属性的细胞质环境。但显微操作仪也在一些酵母实验中应用，它被用来分离用吡啶染料诱导出的小菌落表型酵母细胞个体中继生的芽。对这些芽的分析实验表明染料是通过增加小菌落表型突变的频率来起作用的，而不是通过改变选择。

体细胞遗传学：Ephrussi 的探索建立在能呼吸与不能呼吸细胞质之间“移植”酵母细胞核的技术，但他仍然不能知道他所关心的发育问题的实质。正如他经常指出的，在胚胎学概念“在分化过程中发育潜能的限制”与遗传学概念“后生动物所有细胞的基

因型实际上是相同的”之间有明显的矛盾。他希望了解不同细胞系中细胞决定的区别如何产生、调节、和保持，以及明显的分化如何调节和保持。1971年他这样写道：

……如果 Hershey (1970) 所说的“不成文”法则是正确的（即“所有三维结构都由核苷酸顺序编码的推论”），在发育过程中不同后生型[决定的细胞谱系的有限潜能性]的建立一定由核 DNA 编码……（但）总的信息的功能限制是来自不同细胞谱系的不同后生型，是由于染色体本身的改变……或仅是细胞中任何变化的反映（如细胞膜），这是一个值得特别关注而未解决的问题……实际上，这是我无法回答的一个基本问题。

所以，在五十年代，随着酵母工作的进展，Ephrussi 找到一种新的系统用来研究体细胞分化。他终于在 1959-1960 年在 Renato Dulbecco 的实验室学习组织培养的新方法。这是一个明智的选择，因为后来他就用组织培养的手段研究体细胞的特性。（待续）

（上接第 18 页）

由于 HTO 的剂量率和吸收剂量较低，小肠隐窝分裂细胞指数变化不大。

参考文献

1. Yokoro K, et al. Acute and chronic effects of tritiated water in mice with special reference to its carcinogenicity, an interim report. *Radiat Protection Dosimetry* 1986; 16 (1~2): 165~168.
2. 周顺元, 等. 氚水在小鼠体内的代谢. *中华放射医学与防护杂志* 1985; 5 (1): 22-26.
3. Ueno AM, et al. Induction of cell killing, micronuclei and

mutation to 6-thioguanine resistance after exposure to low dose-rate γ rays and tritiated water in cultured mammalian cell (L₅₁₇₈Y). *Radiation Res* 1982; 91: 447~456.

4. Ijiri K. Cell death (apoptosis) in mouse intestine after continuous irradiation with γ rays and with β rays from tritiated water. *Radiation Res* 1989; 118: 180~191.
5. Prosser Js, et al. The induction of chromosome aberration in human lymphocytes by exposure to tritiated water in vitro. *Radiat Protection Dosimetry* 1983; 4 (1): 21~26.
6. Little JB. Induction of neoplastic transformation by low-dose-rate exposure to tritiated water. *Radiation Res* 1986; 107: 225~233.

（上接第 41 页）

7. Schmid W, et al. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31 (1): 9.
8. Ranki A, et al. Nonspecific esterase activity in human lymphocytes histochemical characterization and distribution

among major lymphocyte subclasses. *Clin Immunol Immunopathol* 1978; 10: 47.

9. 陈崇株, 等. 用酸性 α -乙酸萘酯酶法测定小鼠淋巴细胞中 T、B 淋巴细胞的组成. *上海免疫学杂志* 1983; 3 (3): 138.