文章编号:1000-5404(2006)09-0869-03

论著

长期接触贫铀对大鼠遗传毒性的初步研究

冷言冰,李 蓉,艾国平,徐 辉,粟永萍,程天民,冉新泽 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究贫铀植入/摄入3个月后对大鼠的毒性作用。**方法** 观察大鼠精子畸形率,骨髓微核率的改变,睾丸的超微结构和病理形态学改变以及采用显性致死突变试验观察贫铀对大鼠的生殖毒性。**结果** 植入/摄入贫铀后大鼠精子畸形率和微核率均有增加,睾丸超微结构均有不同程度的改变,而病理形态学观察则未见显著影响。植入组大鼠受孕率明显低于对照组。**结论** 贫铀长时间暴露可对大鼠产生生殖毒性损害以及超微结构的损伤。

关键词:贫铀;精子;微核;毒性
中图法分类号:R-332;R339.21;R818.73 **文献标识码**:A

Toxic effects of depleted uranium on rat after long term exposure

LENG Yan-bing, LI Rong, AI Guo-ping, XU Hui, SU Yong-ping, CHENG Tian-min, RAN Xin-ze (State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the toxic effects of three-month exposure to depleted uranium (DU) on rats. **Methods** Forty weaned young Wistar rats (male/female = 1∶1) were fed with water containing 50 μg/L DU and forage containing 70 μg/kg DU as intake group. Twenty adult male Wistar rats were implanted DU plate as implantation group. The control groups were established in correspondence to the two groups. The deformity rate of rat sperm, the micronuclear rate of marrow cells, the ultrastructural changes of testis were observed by electron microscopy and microscopy 3 months after intaking or implanting DU. The dominant lethal mutation test was performed to observe the reproductive toxicity of DU in coupled rats of intake group and the female rats which mated with the male rats of implantation group. **Results** After DU exposure, the rate of rat sperm deformity and the micronucleus of marrow cells in rats both increased in the rats of intake group and implantation group. The ultrastructures of the testis were impacted in different levels, while the pathological changes were not found. The pregnant rate of rats mating with male rats of implantation group reduced obviously as compared with the control group. **Conclusion** Long term exposure to DU might cause reproductive toxic effect and ultrastructural damage on rats.

Key words: depleted uranium; sperm; micronuclei; toxicity

贫铀(depleted uranium,DU)是铀经浓缩提取了^{235}U以后所产生的副产品。从1991年的海湾战争开始,1999年的科索沃冲突到2003年的伊拉克战争,贫铀武器被大量使用,造成人员伤亡和自然环境的大面积污染。DU物理半衰期很长,长期存在于环境当中,污染土壤、地下水和动植物,最终可经食物链进入人体。DU释放α射线,具有放射毒性,作为重金属又具有化学毒性,虽然DU的放射活度低于天然铀,但是由于其高传能线密度,特定组织器官蓄积以及半衰期长的特点,人员吸入或食入后,会对人体产生严重损害作用。损害作用与接触的剂量,时间以及接触者的年龄、性别、体质、饮食等有关[1]。对DU污染情况进行的调查研究表明,贫铀弹产生释放的铀化合物可长期存在并能污染地面下土壤,表层土壤样本铀活度要明显高于环境水平[2-4]。有关DU的毒性、毒理国内外已做了大量研究,但所使用剂量往往大大超过日常生活所能接触浓度的上限。因此,本研究拟通过大鼠长期低剂量接触DU,观察大鼠精子畸形率、骨髓细胞微核率

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划指令性课题(01L061)
Supported by the Mandatory Scientific Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (01L061)
作者简介:冷言冰(1973-),男,山东省烟台市人,博士研究生,助教,主要从事贫铀毒理学方面的研究,电话:(023)68771721
通讯作者:粟永萍,电话:(023)68752009,E-mail:suyp2003@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-08-30;修回日期:2005-11-01

的改变，睾丸的超微结构和组织病理形态学改变。并采用显性致死突变实验及初筛实验观察贫铀对大鼠的生殖发育和遗传毒性。对DU引起的长期危害进行初步研究，评价DU的生殖发育毒性和遗传毒性效应。

1 材料与方法

1.1 DU染毒模型的建立及实验分组

根据实验目的将大鼠分为摄入组和植入组。摄入组为初断乳Wistar大鼠，体质量35～55 g，雌雄各20只，以含有50 μg/L和70 μg/kg的DU饮水及饲料喂食大鼠。植入组为初成年雄性Wistar大鼠，体质量为150～200 g，共20只，用于DU片植入，DU片组成及植入方法见文献[5]。另设摄入对照组及植入对照组各20只，摄入对照组以正常饲料与饮水喂食大鼠。植入对照组大鼠除手术植入时植入物为与DU片相同体积大小的塑料片外，其他与植入组相同。本研究所采用大鼠均由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 大鼠精子畸形实验

在植入/摄入DU后第3个月，颈椎脱臼处死大鼠，取双侧附睾，制成精子悬液，甲醇固定，伊红染色。在高倍镜下观察精子形态，每只大鼠至少观察100条完整精子，每组大鼠至少检查1 000条。计算精子畸变率。

1.3 大鼠骨髓细胞微核(micronucleus, MN)实验

在植入/摄入DU后第3个月，颈椎脱臼处死大鼠，取出双侧股骨。常规制片、固定、染色、自然晾干、镜下观察。

在100倍油镜下观察计数微核数，每组大鼠共观察5 000个嗜多染红细胞(polychromatic erythrocytes, PCE)中的MN及MNPCE数。计算微核细胞MNPCE率(‰)和MN率(‰)。

1.4 改进显性致死突变实验

雄性大鼠染毒3个月后，与雌性大鼠按照1∶1交配1周。每组受孕雌鼠一半在第19天称重，颈椎脱臼法处死，检查并记录两侧子宫内着床数，早期和晚期死胎数、活胎数以及吸收胎，后4项之和为总着床数。对大体检查发现有异常的器官作组织病理学检查。计算每组大鼠平均着床率和平均早期死亡胚胎数。

另一半受孕大鼠自然分娩，观察胎鼠有无显性畸形，继续饲养。计算平均活仔数、存活到出生第3天的平均存活率及出生时活仔的平均体重和出生后3 d的平均体质量。

1.5 病理组织学与超微结构观察

在植入/摄入DU 3个月后，处死大鼠，取睾丸组织固定后行病理形态学和超微结构观察。

1.6 统计学处理

数据分析采用Microsoft Excel和SPSS 11.0软件进行精子畸形实验采用秩和检验，微核实验采用χ^2检验，显性致死突变实验采用方差分析。

2 结果

2.1 DU植入/摄入后大鼠精子畸形率的改变

植入组精子畸形率(6.83±1.29)与对照组(2.29±1.03)比较显著升高($P<0.01$)，而摄入组(4.51±0.34)与对照组(2.36±1.01)相比差异不显著($P>0.05$)，大鼠精子畸形以头体部为主，头部以无钩、无定形和香蕉头畸形居多。

2.2 DU对大鼠骨髓嗜多染红细胞微核的影响

摄入组、植入组与对照组比较微核率明显升高($P<0.01$)，见表1。植入组大鼠骨髓嗜多染红细胞中的微核见图1。

表1 大鼠骨髓微核率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	嗜多染红细胞	含微核的红细胞	微核率(‰)
摄入对照组	5 000	0.56±0.22	0.9±0.21
植入对照组	5 000	1.24±0.56	1.43±0.82
摄入组	5 000	8.10±2.03[a]	8.5±1.39[a]
植入组	5 000	7.45±1.68[b]	9.09±1.81[b]

a：$P<0.01$，与摄入对照组比较；b：$P<0.01$，与植入对照组比较

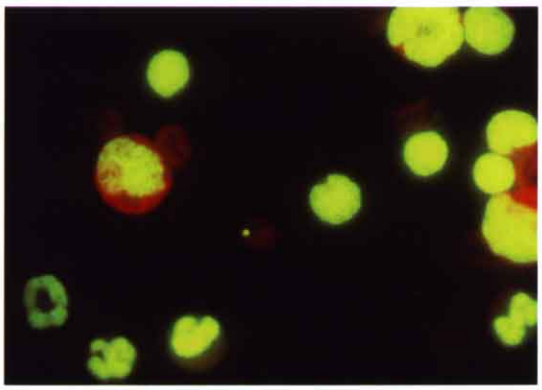


图1 大鼠植入贫铀3个月后骨髓嗜多染红细胞中的微核 (吖啶橙×1 000)

2.3 显性致死突变实验结果

显性致死突变实验中，贫铀植入与摄入组的仔鼠3 d存活率，出生体质量、3 d内体质量、着床率及早死胎率与对照组统计学比较均无显著差异，见表2。

表2 大鼠显性致死突变实验结果

组别	活仔数	死胎数(%)	着床数	受孕(%)	仔鼠体质量(g, $\bar{x}\pm s$)	
					出生时	出生后4 d
摄入对照组	53	3(5.36)	14	85.7	5.25±0.04	7.78±1.09
植入对照组	65	5(7.14)	13	69.6	5.26±0.35	7.62±0.87
摄入组	86	6(5.43)	13	75.0	5.41±0.30	8.19±0.92
植入组	61	10(9.86)	14	45.5[a]	5.24±0.37	7.56±0.60

a：$P<0.05$，与植入对照组比较

2.4 病理组织学及超微结构观察

各组大鼠睾丸在病理组织切片中未发现明显异常，但超微结构观察均有异常改变。摄入组大鼠精子细胞微管排列整齐，头部无明显异常。生精细胞核异染色质成团块状，边集；胞质内线粒体肿胀，嵴有模糊断裂。支持细胞核肿胀，内有空泡形成，细胞质内吞噬体和溶酶体增多，线粒体肿胀，有空泡变，见图2。

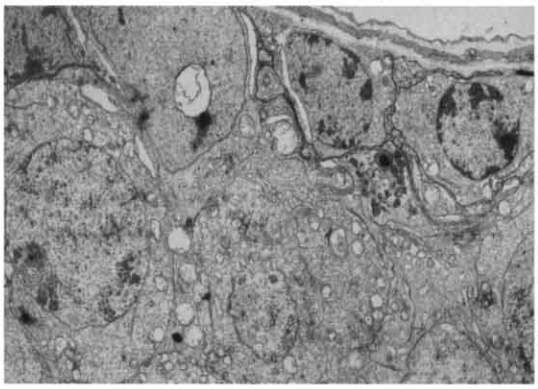


图 2　大鼠摄入 DU 3 个月后精原细胞超微结构　（TEM　×2 100）

植入组大鼠超微结构可见生精细胞核体积增大，核淡染，常染色质增多，细胞质内线粒体肿胀，支持细胞内溶酶体多见。精子头部固缩，粗细不均匀；鞭毛外形不规则，微管芯偏位，线粒体肿胀，有的微管溶解。

3　讨论

贫铀武器的广泛应用，可造成大面积潜在的环境污染。贫铀半衰期长，在环境中持续存在，可通过各种途径进入人体，长期接触导致体内的蓄积。长期饮用含铀地下水，即使脱离接触后，尿铀含量仍可保持长时间的高水平[6]。贫铀污染涉及的居民人数多，影响面广。研究贫铀的低剂量长期接触造成的机体损伤可为评估贫铀接触造成的潜在危害提供实验依据，为贫铀接触人群的防护和治疗提供理论指导。

DU 急性毒性实验表明大剂量接触贫铀后，可引起雄性动物睾丸损伤，细曲精管、生精上皮及各型生殖细胞均受不同程度的影响，初级精母细胞染色体畸变率也有所升高；精子数量降低，雌性受孕期间体质量显著下降，受孕率下降，胚胎显性致死率升高，子代生长延迟，存活率降低，显性骨骼畸形等毒性作用[7,8]。

但以上研究均采用高剂量的贫铀给予，而对于环境水平的低剂量贫铀接触可能造成的危害研究很少。遭受贫铀污染地区的土壤贫铀含量范围波动很大，在微克至毫克之间[4]。本研究采用文献[5]中所用剂量，分别以(0.2 ±0.02)g DU 片植入和 50 μg/L 饮水，70 μg/kg DU 饲料摄入的方式进行染毒，正是模拟 DU 弹片伤及污染环境后不同人群所能接触的贫铀水平，探索贫铀低剂量长期接触可能造成的远后效应。

雄性动物接触外来化合物后，检查精子畸形率的高低可作为评价这些化合物生殖毒性和诱变性的指标之一。微核实验能检测断化学或/和其他物质因素诱导产生的染色体完整性改变和染色体分离改变两种遗传学终点。而显性致死突变实验用于检验哺乳动物生殖细胞染色体畸变情况，用以判断受试物是否具有致突变作用。以上实验可初步评价和推断 DU 长期接触是否会对大鼠产生生殖毒性作用。本研究表明 DU 植入与摄入后均可诱导亲代大鼠的精子畸形及微核率的增加。但对亲代与子代大鼠的生长发育无明显影响。仔鼠 3 d 存活率，出生体质量、3 d 内体质量、着床率、平均早死胎数和早死胎率组间比较均无显著差异，仅植入组受孕率低于对照组，说明长时间接触 DU 后，对亲代大鼠的损伤较大，而对子代影响可能因接触时间短，及胎盘屏障作用等原因而损伤较轻。大鼠睾丸超微结构受到不同程度的损伤，说明长期低剂量接触后将对大鼠产生生殖毒性作用，并且随接触时间延长，可能损伤更严重。本研究分别采用植入和摄入的方式进行染毒，对大鼠所能直接接触到的贫铀量将在以后的研究中以重要脏器贫铀含量测定的方式进行比较及评估，但对两组的实验结果进行统计分析，表明组间比较差异不显著，这可能与染毒剂量有关。因本研究所采用的染毒剂量均低于以往研究的 DU 染毒剂量，故在染毒 3 个月时间内所观察到的损伤效应并不能完全揭示 DU 不同的染毒方式对机体的毒性作用，其长期损伤效应还需延长观察期以便进一步深入研究。

参考文献：

[1] MILACIC S, PETROVIC D, JOVICIC D, *et al*. Examination of the health status of populations from depleted-uranium- contaminated regions [J]. Environ Res, 2004, 95(1): 2 - 10.

[2] NUCCETELLI C, GRANDOLFO M, RISICA S. Depleted uranium: possible health effects and experimental issues [J]. Microchem J, 2005, 79(1 - 2): 331 - 335.

[3] TOROK S, OSAN J, VINCZE L, *et al*. Characterization and speciation of depleted uranium in individual soil particles using microanalytical methods [J]. Spectrochimica Acta Part B, 2004, 59(5): 689 - 699.

[4] DI-LELLA L A, NANNONI F, PROTANO G, *et al*. Uranium contents and $^{235}U/^{238}U$ atom ratios in soil and earthworms in western Kosovo after the 1999 war [J]. Sci Total Environ, 2005, 337(1 - 3): 109 - 118.

[5] 李　蓉，艾国平，徐　辉，等. 不同取片方式对植入贫铀片大鼠组织铀浓度的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(7)：569 - 572.

[6] ORLOFF K G, MISTRY K, CHARP P, *et al*. Human exposure to uranium in groundwater [J]. Environ Res, 2004, 94(3): 319 - 326.

[7] 白　杨，刘晋祎，曹　佳，等. 贫铀对小鼠睾丸生精细胞和精子遗传损伤的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(19)：1722 - 1724.

[8] MCCLAIN D E, BENSON K A, DALTON T K, *et al*. Biological effects of embedded depleted uranium (DU): summary of armed forces radiobiology research institute research[J]. Sci Total Environ, 2001, 274(1 - 3): 115 - 118.

（编辑　周　芳）