

体外受精技术在辐射细胞遗传学中的应用

白求恩医科大学环医系 蔡露综述 金玉珂 杨宝晨 郑斯英* 审

提 要 , Rudak (1978) 建立的直接分析人精子染色体的技术, 也为辐射细胞遗传学开辟了新局面。本文简要介绍了体外受精技术, 重点总结了小鼠精子和人类精子辐射诱变的研究结果。最后讨论了辐射细胞遗传学今后的发展方向。

众所周知, 雄性生殖细胞经过两次减数分裂后, 染色体以单倍体数浓缩于精子头部, 呈均匀一致的染色质结构, 此时要确定精子染色质是否损伤和畸变是非常困难的。为此, 要了解各种有害因素的影响是否有可能通过配子传递给子代, 只能从羊水、绒毛膜或胎儿中所获得的细胞染色体畸变进行推测, 所以, 多年来学者们一直在探讨如何对配子染色体进行直接分析。体外受精技术的建立, 使之成为可能。但人类卵子来源受到限制, 所以人们又成功地建立了人精子穿透仓鼠卵试验^[1](Sperm Penetration Assay简称 SPA) 或称人-仓鼠试验系统(Human-Hamster system) 或无透明带仓鼠卵试验系统(Iona-free Hamster)。

一、配子染色体直接分析技术简介

在体外受精技术的基础上, Rudak^[2], Martin^[3~6]建立了分析人类精子染色体技术, 同时 Yamada^[8, 9]和 Matsuda^[10~13]建立了直接分析小鼠雌雄配子染色体技术。人精子与仓鼠卵的异种体外受精技术原理是除去仓鼠卵的透明带后, 不再具有种属特异性, 可接受异种精子。当两性配子结合后, 经一段时间, 精子头部的染色质浓缩逐渐形成雄性原核; 卵细胞因受精而激活, 经第二次减数分裂后染色质形成雌性原核, 二者再形成染色体完成第一次卵裂, 使两配子染色体停止在中期。在人-仓鼠卵中可以借助不

同形态和染色体数来识别人类精子或仓鼠卵的染色体。在小鼠与小鼠的体外受精卵中则可借助雌、雄原核染色质浓缩的速度, 导致两性配子染色体长度差异而加以识别^[8]。上述两类受精卵的差异在于同种受精和异种受精。两类受精技术有相似处, 故本文只介绍人-仓鼠卵受精及人类精子染色体的制备。

(一)人精子的处理: 收集精液后→液化(37℃)→获能(5%CO₂温箱37℃)。

(二)成熟卵的处理: 雌性金满地鼠用孕马血清(40Iu)和人绒毛膜促性腺激素(40Iu)诱发超排卵→收集卵后用透明质酸酶、胰酶消化透明带, 备用。

(三)体外受精及染色体制备: 精卵混合→受精卵培养→秋水仙素处理→1%柠檬酸钠低渗, 甲醇:冰醋酸(3:1)固定→染色。

二、小鼠配子染色体分析及辐射诱变研究

Matsuda Y(1983)^[10]用X射线照射成熟精子和卵(即体外照射受精前的卵和精子)以及受精后4小时的原核期受精卵(Zygotes或Eggs at early pronuclear stage), 观察受照后三组受精卵第一次卵裂染色体中期相(First-cleavage metaphase)。X射线剂量为0.4Gy时, 受精卵的染色体畸变率最高(20.6%); 成熟精子畸变率最低(2.9%); 成熟卵居中(11.0%)。1985年^[11, 12]又用X射线对同样三组作了不同剂量照射后的剂量-效应关系研究, 结果: ①成

*苏州医学院放医系

熟精子受照组中每个受精卵细胞中断裂数与X射线的剂量之间为二次多项式相关:

$$Y = 0.02 + 5.11 \times 10^{-4}D + 1.88 \times 10^{-6}D^2;$$

②原核期受精卵受照后,每个受精卵细胞中染色体畸变数与剂量呈直线相关: $Y = 0.28 \times 10^{-1} + 0.96 \times 10^{-2}D$; ③成熟卵受照后,每个受精卵细胞中染色体畸变与剂量为二次多项式关系: $Y = 0.15 \times 10^{-1} + 1.88 \times 10^{-3}D + 1.95 \times 10^{-5}D^2$ 。三组比较,以原核期受精卵的敏感性最高,成熟卵次之,成熟精子最低。

Katoh等(1983)^[14]用X射线照射雄性小鼠,1~2天后与雌性鼠交配,从雌性鼠中取出受精卵分析染色体畸变率,5.0Gy组畸变率(0.35%)明显低于上面的体外受精卵中4.0Gy照射成熟精子组(0.47%)。本实验中受照射的是未获能精子;而上实验是受精前一刻受照,即已获能精子,二者畸变率的差异在于获能精子代谢活力强,敏感性高。这是应用体外受精技术所揭示的新问题。另外,上面提到的辐射对三组不同对象染色体畸变敏感性的顺序与Yamada研究辐射诱发

胚泡形成障碍的结果完全一致,证明X射线诱发胚胎死亡和诱发胚胎中染色体畸变密切相关,也证明在第一次卵裂中见到的各类染色体畸变均能导致植入前期的胚胎丢失^[11]。

Matsuda(1986)还对⁶⁰Co-γ射线和氘水对受精卵染色体影响作了研究,结果表明:原核期体外受精卵受γ射线(0~0.295Gy)照射后,每个受精卵中染色体畸变率与剂量呈直线相关: $Y = 1.82 \times 10^{-2} + 0.78 \times 10^{-2}D$ 受氘水照射(0~0.34Gy)的剂量效应为二次多项式: $Y = 1.19 \times 10^{-2} + 1.14 \times 10^{-2}D + 0.75 \times 10^{-4}D^2$ 。经与⁶⁰Co-γ线和X线比较,氘水β粒子RBE分别是2.0和1.6。

三、人类精子染色体分析及辐射诱变

(一)人类精子染色体的自然畸变率

目前世界上对这方面的研究主要集中在几个实验室,Rudak第一次分析了一例23岁健康男子的60个精子染色体组,继而Martin^[5,6]、Brandriff^[15,16]和上口勇次郎^[7]也作了一些研究(见表1)。

表1 各实验室关于正常人精子染色体畸变分析结果

作 者	受检的 个体数	分析的 精子数	性 比				染 色 体 异 常 (%)			
			Y	X	Y/X	P值	结构 异常	超单 倍体	亚单 倍体	总染色 体异常
Rudak[2]	1	60	26	34	0.78	<0.05	1 (1.7)	1 (1.7)	2 (3.3)	4 (6.7)
Martin[5,6]	51	1240	558	682	0.82	<0.05	46 (3.7)	41 (3.0)	35 (2.6)	117 (8.7)
Brandriff[15,16]	15	2468*	1251	1256	0.99	>0.05	191 (7.7)	18 (0.7)	23 (0.9)	231 (9.4)
上口勇次郎[7]	10	2668	1210	1391	0.87	<0.05	363 (13.6)	16 (0.6)	22 (0.8)	401 (15.0)
总 计	77	6436	3045	3363	0.91	<0.05	601 (9.3)	76 (1.2)	82 (1.3)	753 (11.7)

* 作染色体组异常分析的细胞数,有些细胞又作带X,带Y染色体分析未进行其它分析。未计入总数内,故作性比分析的细胞数为2507。

从带X和带Y精子染色体组的比例看,Rudak和Martin及上口勇次郎的结果以带X的精子染色体组为多,但Brandriff的结果不同,几乎是1:1,与理论值一致,但综合他们的整个结果分析,仍以带X的精子占

多数,是否减数分裂不产生相等数量的X或Y精子还有待于探讨。另外,Rudak和Martin的材料中精子染色体组中多一条染色体的分别占异常精子染色体组中的33.3%(1/3)和35.0%(41/117),这与自然流产物中50%

染色体异常是三体型非常相似；但在Brandriff的材料中其发生率较低，仅为7.8% (18/231)。Martin^[6]和Brandriff^[16]还证明这些三体涉及G组染色体的明显高于其它组常染色体，这与人类发生的三体中以21三体最常见一致。自然流产物中常染色体单体型是罕见的，但异常的精子染色体组中约有10.9 (82/753) 是丢失了一条常染色体，从整个数据看，它与三体在异常染色体组中所占的比例是相等的 (76/753 10.1%) (见表1)。他们还证明，见到的非整倍体染色体中具有各组染色体变化甚至是自然流产物中罕见的1号染色体三体^[6, 16]。自然流产物中常有单体X，并且认为75%起源于父方的不分离^[17]，但人类精子染色体分析中极少出现X染色体丢失，在Brandriff分析的2468个精子染色体组中仅见一个^[16]。

精子染色体结构畸变的波动较大，从1.7至13.6%，其中数量最多的是染色体断裂，其次是无着丝粒断片，染色单体交换，单体断裂，染色体缺失，双着丝粒体，易位和重复。染色体断裂发生率高，是否与培养基中含有易诱发染色体断裂物有关，有人作了同样条件的培养^[16, 18]，分析仓鼠卵细胞（即雌性原核）的染色体断裂，证实培养基不是人类精子染色体断裂频率高为其特征。Brandriff^[16]作了有父子关系的染色体断裂点的比较性分析，结果有共同断裂点的发生率不高，发生率高的都是无共同断裂点的，说明断裂发生率高并不是人类精子染色体的特性。在上口勇次郎的实验数据中，结构畸变率是目前报道中最高的，而数目异常是最低的，其原因原作者认为主要是实验方法不同所致，他们用改进的方法制备的标本中，细胞膜不破，减少了染色体丢失，故减少了人为造成的数目异常，同时断片也不丢失，提高了检出率。

(二) 辐射诱发人类精子染色体畸变的研究^[19]

Martin RH(1986)对13例睾丸肿瘤患者放疗前后的精子染色体组进行分析，睾丸吸收剂量为0.4~5.0Gy，分别在照射前和照射后12、14和36个月观察其精子染色体畸变情况。结果：放疗后12、24和36个月的异常率分别为13% (1/8)、13% (7/55)和21% (18/80)，照射后总平均异常率为18% (26/147)。与正常人群中精子染色体异常率比，照射后总平均异常率和照射后36个月的异常率明显增高。分析照射后36个月的个体之间精子染色体异常率变动为：6~67%，与睾丸组织吸收剂量明显相关 ($r=0.884$; $P<0.02$)。说明放疗可诱发人类精子染色体数目、结构异常率增加，并说明诱发的各类生殖细胞染色体异常均可传递给成熟精子及子代个体。

上口勇次郎^[7]用5名健康男子精液作体外X射线照射，其染色体结构异常的精子发生率：0、0.25、0.50、1.0和2.0Gy组分别为14.2%、18.9%、28%、42.7%、68.2%，说明异常精子发生率随照射剂量呈直线增加，其方程： $Y=13.89+0.28D$ ，照射诱发的畸变，大部分是断裂和断片，少数是易位。

(三) 放射性诱发精子染色体畸变敏感性的种系差异

人类精子染色体辐射诱变的结果与其他哺乳动物精子的研究结果相比较表明：人精子的辐射敏感性最高。过去的研究，有的是用显性致死为指标，已证明：显性致死率与1细胞胚时出现的染色体结构畸变率几乎相等，所以可与精子染色体畸变结果比较，其结果：人精子的辐射敏感性分别是豚鼠、兔子、中国仓鼠、小鼠和金黄地鼠的约6倍、5.5倍、3倍、3倍和1.5倍。这对于评价男性受照后对下一代的影响具有重要意义。

四、配子染色体分析在辐射细胞遗传学中应用的前景

多年来，在辐射诱发人类生殖细胞染色体畸变的研究中，主要是根据哺乳动物的研

究材料推算人类生殖细胞的损伤程度^[20]。目前还未能同一实验中作辐射诱发人类配子染色体畸变与小鼠配子染色体畸变的比较性研究。但从自发畸变率看,人类配子染色体畸变率为9.3%,三体率为1.2%(见表2);小鼠受精卵中染色体畸变率为1.3%,三体率为0.3%(见表1);1.0Gy和2.0GyX射线照射后,小鼠染色体畸变率为8.3%和14.8%,而人的配子染色体畸变率分别为33.2%和62.9%。后者明显高于前者。因此,有必要对辐射诱发人类和小鼠配子染色体畸变率进行系统比较,验证以往用体细胞研究所得的种系差异代替生殖细胞之间规律的合理性。

另外一个途径是研究辐射诱发生殖细胞与体细胞染色体畸变之间的关系,以便从体细胞染色体畸变研究了解生殖细胞的损伤程度^[20]。大量研究表明,辐射诱发小鼠体细胞染色体畸变(双着丝粒体或易位)是小鼠精原细胞染色体畸变(易位)的4倍,人类的材料也基本与其一致^[20],并且间接证明受照个体中精原细胞易位率以1/4的比例传给子代。所以人们利用这样一个模式:人体细胞染色体畸变率外推→人生殖细胞染色体畸变率外推→子代个体染色体畸变率(也就是配子染色体畸变率)进行探讨。现在能直接分析配子染色体畸变,上模式应改为:人体细胞染色体畸变率外推→配子染色体畸变率,直接找出二者之间的规律性。直接分析受照个体的体细胞染色体畸变后,就能掌握子代中染色体畸变的发生率,对优生、优育尤为重要。

目前尚无辐射诱发体细胞和生殖细胞染色体畸变规律性的研究。Brandriff^[16]作了正常男性外周血淋巴细胞染色体畸变率与配子染色体畸变率的比较,结果表明,精子中染色体畸变率明显高于淋巴细胞中的染色体畸变($P < 0.01$)。这与以往的研究结果(以体细胞敏感性高)正相反,所以需要进行深入

系统研究。

总之,配子染色体分析是一个新领域,无论在遗传学还是在辐射细胞遗传学中都有许多问题有待于解决。

参 考 文 献

1. Yanagimach R, et al, Biol Reprod 1976, 15: 471
2. Rudak E, et al, Natural 1978, 274: 911.
3. Martin RH, et al, Fertil Steril 1983, 39: 379.
4. Martin RH, et al, Cytogenetic cell Genet 1983, 35: 252.
5. Martin RH, et al, Am J Human Genet 1982, 34: 459.
6. Martin RH, et al, Human Genet 1983, 63: 305.
7. 上口勇次郎, 他, 遗传 1986, 40: 36.
8. Yamada T, et al, J Radiation Res 1982, 23: 450.
9. Yamada T, et al, Radiation Res 1982, 92: 359.
10. Matsuda Y, et al, Mutation Res 1983, 121: 125.
11. Matsuda Y, et al, Mutation Res 1985, 149: 113.
12. Matsuda Y, et al, Mutation Res 1985, 151: 275.
13. Matsuda Y, et al, Mutation Res 1986, 160: 87.
14. Katoh M, et al, Jpan J Genet 1983, 58: 337
15. Brandriff B, et al, Human Genet 1984, 66: 193.
16. Brandriff B, et al, Human Genet 1985, 70: 18.
17. Hoffmann GK, et al, Environmental Mutagenesis 1986, 8: 643.
18. Martin RH, et al, Cytogenetic Cell Genet 1983, 35: 41.
19. Martin RH, et al, Mutation Res 1986, 173: 219.
20. 蔡露等, 国外医学放射医学分册 1986, 10: 133.