

辐射诱发哺乳动物生殖细胞非整倍体畸变

白求恩医科大学 王明东综述 金玉珂 肖佩新*审

提 要:越来越多的证据表明,辐射可以诱发哺乳动物生殖细胞非整倍体,进而导致子代异常。目前研究生殖细胞非整倍体的方法有遗传学和细胞遗传学两类。前者有Rb和MBH等方法,后者以生殖细胞MⅠ及原核胚M期染色体检查为最佳。本文对辐射诱发非整倍体的可能机制作了讨论,认为对纺锤体及减数分裂速率的影响最为主要。

人类流行病学调查提示:母方孕前受诊断性X射线照射可增加生出非整倍体子代的风险。Lazar等人(1979)报道,X射线也可增加父源性非整倍体的产生。因此,辐射诱发哺乳动物生殖细胞非整倍体的实验研究便成为辐射遗传学研究的重要课题,现就近年来的研究作一综述。

一、研究非整倍体的方法

体内或体外的体细胞或生殖细胞遗传学方法都可以作为辐射诱发非整倍体的实验研究方法。对生殖细胞来说,有雄性生殖细胞的精原细胞、初级及次级精母细胞中期染色体检查,精子细胞YFF荧光小体检查;雌性生殖细胞有初级及次级卵母细胞中期染色体检查。雌性和雄性生殖细胞非整倍体也可通过检查原核胚、植入前胚及植入后胚胎或新生动物的染色体显示^[1~4]。近年广泛应用的DNA重组技术对光镜下核型正常但表型具有Down's综合征的个体的诊断很有用处,对部分非整倍体的肿瘤细胞检查价值也很高,但目前尚未见用此法检查诱发性非整倍体的报道。流式细胞计可以通过测定细胞内DNA含量估计染色体数目的改变,但由于辐射诱发非整倍体发生率很低,de Boer和Tates认为它不适于辐射诱发生殖细胞非整倍体的研究^[1]。PCC技术已证明微核内有

染色体片断,甚至存在完整染色体。因此,可以预料微核技术也可以作为间接推测非整倍体诱发的方法。如果有适当的使着丝粒染色的方法,也可以直接判定非整倍体的诱发。目前有人用此法在体外检测了数种化学物质的致非整倍体作用。

尽管有许多细胞遗传学方法可检查诱发性非整倍体,但这类方法较费力,技术上要求一定技巧。因此,许多人继续探索遗传学方法的应用。因为少数性的染色体数目改变的胚胎能够存活至出生,甚至成年。据此,Russell用性连锁标记基因研究X染色体的不分离。常染色体单体胚胎在妊娠早期即丢失,三体型胚胎绝大部分在植入后死亡^[5],因此,检查常染色体不分离的方法便取决于具有染色体不分离的配子的功能正常,且精卵染色体互补,产生正常受精卵。其方法主要有Cattanach等人的Rb和MBH(单臂同源)法。前者应用有一个或多个罗氏易位的小鼠与正常小鼠交配,后者应用有两个罗氏易位的小鼠(这两个易位染色体的一个臂是同源的)与正常小鼠交配,分别检查这种标记的易位染色体的不分离或丢失^[6]。Searle和Beechey(1982)还曾介绍过三臂同源(TBH)法,即三条罗氏易位染色体的每条易位染色体的两臂分别与另两条易位染色体各两臂的其中一臂具有同源性,认为这种小鼠仅产生

不分离的配子,是最有希望的方法,但似乎没有得到应用。

二、辐射诱发哺乳动物生殖细胞非整倍体

辐射诱发非整倍体的证据材料较少。人类的资料尽管少数有辐射诱发非整倍体趋势,但并不显著。原爆幸存者子代Down's综合征发生率并不高于未受照人群。有部分动物实验材料的辐射诱发非整倍体增加也不显著,尤其是受照者子代的材料。尽管如此,这些含糊的结论却引起人们对辐射诱发非整倍体的兴趣^[1]。

(一) 雌性哺乳动物的实验结果

yamamoto等人(1973)报道低水平辐射可以导致雌性小鼠卵母细胞染色体不分离率的增加,但Gosden和Walters(1974)对其实验结果的分析提出疑问,并重新统计分析表明缺乏显著性。随后,Uchida和Lee(1974)报道10~30cGy¹³⁷Cs γ线可以诱发幼龄小鼠卵母细胞超单倍体率增加。Uchida和Freeman(1977)又报道在相同剂量条件下照射老龄小鼠后,卵母细胞超单倍体的发生率同样增加。Hansmann等人(1982)用不同剂量X线照射雌性小鼠,发现20和80cGy剂量组超单倍体率增加显著,而5,10和40cGy剂量组增加不显著。他们在中国仓鼠的实验中未得到20cGy的X射线诱发超单倍体显著增加的证据。同样,Reichert等人(1975)也发现22.2、66.6和200cGy的X线并不增加幼龄小鼠卵母细胞超单倍体发生率。

近几年,Tease及其同事对辐射诱发小鼠卵母细胞非整倍体作了广泛研究。Tease(1982)的实验证明,低至10cGy的X线即能诱发幼龄或老龄小鼠排卵前卵母细胞染色体不分离率的增加,并随剂量的升高呈线性增加^[7]。这和Hansmann等(1979)所认为的非整倍体诱发率不存在剂量效应关系的观点相反。Tease(1985)的实验进一步证明,

较大剂量(100~600cGy)的X线诱发雌性小鼠不同成熟阶段(照后3.5、9.5、16.5和23.5天取材)的卵母细胞染色体不分离发生率的剂量效应关系为剂量平方曲线^[8]。Griffin和Tease(1987)则报道幼龄小鼠受较低剂量(0~100cGy)X线照后4周,卵母细胞超单倍体的发生率存在线性剂量效应关系。因此,可以肯定辐射能够诱发雌性小鼠生殖细胞染色体不分离。但可能存在种系间的差异。

流行病学调查发现,随着母体年龄的增长,生育出Down's综合征患儿的风险也增加。Uchida和Freemann(1977)、Martin等人(1976)及Chebotar(1978)在小鼠卵母细胞的实验中观察到超单倍体的增加与年龄相关,但没有被Golbus(1981)所证实。Golbus认为,前人在小鼠中所观察到的非整倍体胚胎随年龄增加而增加是由于老龄鼠对其选择淘汰作用降低所致。但研究者更关心的是辐射是否能够升高这种年龄效应。目前尚未见阳性报道。

上面的实验结果均来自受照者生殖细胞或其受精后原核胚的细胞遗传学材料。在雌鼠受照后交配所产生的植入后胚胎或新生鼠的细胞遗传学研究尚无阳性结果^[1]。大量实验证明,辐射诱发生殖细胞非整倍体率很低,绝大多数非整倍体胚胎在着床前便死亡^[1,5,6,11]。因此,欲得到植入后胚胎阳性结果实验所需样本量必然很大,Speed和Chandley通过小样本得出辐射诱发小鼠初级精母细胞非整倍体不敏感的结论证据似不足。

Cattanach等人用Rb遗传学方法测得不同剂量(0~400cGy)X线照射小鼠后,其卵母细胞1号染色体丢失率随剂量升高而近似线性增加,并在400cGy剂量组增加显著^[6]。但Russell(1976,1979)没有发现辐射导致性染色体不分离的证据。

(二) 雄性哺乳动物的实验结果

Tates等(1979)用C显带技术得到北

方田鼠受低至50cGy的X线照射诱发精细胞性染色体不分离的证据。Russo等人(1983)发现,75cGy中子或200cGyX线照射雄性小鼠生殖细胞减数分裂前期不同阶段,次级精母细胞超单倍体发生率明显增加;Pacchierotti等人(1987)进一步报道,0~75cGy中子及0~300cGyX线照射中粗线期精母细胞后,次级精母细胞超单倍体率随剂量升高呈线性增加^[11,12]。我们的实验资料同样证明晚粗线期精母细胞受0~200cGy或终变期受0~100cGy的X线照射后次级精母细胞超单倍体的诱发率随剂量升高呈线性增加。但有些实验结果与上述不同。如Nijhoff和de Boer(1980)用15cGy中子照射罗氏易位小鼠的M I至M II期间的精母细胞,发现超单倍体的发生率低于对照小鼠;同期受60cGyX线照射的超单倍体率则没有明显的变化。同样,Tates和Vogel(1981)用25~200cGy的X线照射初级或次级精母细胞,精细胞性染色体不分离率并未增加。

Cattanach等人用MBH法检测小鼠精细胞及精子受300cGyX线照射后的1号染色体丢失率,结果明显高于对照。而精母细胞受75及100cGyX线照后未见异常子代^[4,6]。

(三)生殖细胞不同发育阶段的辐射敏感性

对于雌性生殖细胞来讲,Tease等人的实验结果表明,受照后四周内排出的卵子较敏感,而以后排出的卵子似乎不敏感。随照后时间的延长,不分离率有降低的趋势,以排卵前卵母细胞最敏感^[7~9]。Russo等人及我们的实验结果表明,雄性生殖细胞减数分裂前期是较敏感的,尤以终变期最敏感^[11,12]。这一期和雌性的排卵前期相对应。同样,染色体结构畸变在该期也最易发生,结构畸变率远高于超单倍体率。但Chandley和Speed用100cGyX线照射雄性小鼠后五周或七周与雌鼠交配,检查10日胎,结果七周组的三体型胎发生率高于五周组;Cattan-

ach等人用MBH法测得减数分裂后的生殖细胞受照后其子代异常率为0.35%,而精母细胞受照后其子代未见异常^[4]。因此,所用检测手段不同,结论可有很大差异。值得指出的是,精原干细胞受照后或未成年雌鼠受照后,细胞遗传学或遗传学方法都没有证据表明辐射导致染色体不分离的增加。然而它们却是更具有遗传意义的阶段^[1,11]。

三、辐射诱发哺乳动物生殖细胞非整倍体的机制

非整倍体的诱发不象染色体结构畸变主要由辐射对染色体或DNA的损伤所致那样简单,还与参加细胞分裂或染色体分离的细胞器结构或功能损伤有关^[10]。下面就近几年提出的可能机制作一简述。

(一)染色体的损伤

辐射对染色体或DNA的直接或间接损伤导致部分非整倍体(Segmental Aneuploidy)是毫无疑问的,问题是辐射是否能够损伤它们后导致体型非整倍体(Chromosomal Aneuploidy)产生。Tease等人的实验资料表明,初级卵母细胞通过X线诱发的单体互换率与次级卵母细胞或原核胚雌性原核的超单倍体率相关^[13];Liang等人用长春花碱或X线处理雄性小鼠后同样观察到初级精母细胞多价体率与次级精母细胞超单倍体率相关^[14]。Tease等人认为,单体互换干扰减数分裂过程,导致染色体不分离。Russo等人认为,不是辐射诱发单体互换后导致染色体分离错误,而是通过单击机制引起着丝粒区损伤所致^[11,12],证据是辐射诱发雄性小鼠生殖细胞超单倍体率与剂量呈线性相关,且次级精母细胞超单倍体率与断片率相关。我们最近的实验资料同样表明,晚粗线期精母细胞受0~200cGy或终变期受0~100cGyX线照射后,次级精母细胞超单倍体与其断片率及初级精母细胞单体互换率或断片率相关^[15]。但终变期受照后单体互

换率低于超单倍体率,不足以解释超单倍体的发生。Uchida等人及我们的实验资料表明,超单倍体细胞可以没有畸变染色体;Hansmann等人同样没有观察到超单倍体细胞有染色单体长度不一致的染色体;Speed和Chandley也没有观察到亲代受照产生的三体型子代核型有易位的证据。因此,辐射诱发染色体损伤似乎不是染色体不分离的主要机制,两者间的相关可能是间接的。

另外,带有相互易位的生殖细胞经第一次减数分裂后将产生非整倍体细胞,但绝大多数实验材料中的多价体是单体互换而非易位。因此,如果单体互换是产生非整倍体的机制,需要回答的问题是是否单体互换也象易位一样分离。

(二) 联会复合物的损伤

哺乳动物生殖细胞减数分裂前期同源染色体通过联会复合物保持点对点的拉链样配对,然后交叉形成。同源染色体间交叉提前消失或解联会可产生单价体。若一对单价体随机分配到子细胞中去,便会有非整倍体次级精母细胞或卵母细胞发生。哺乳动物(及人)性染色体单价体发生率较高,性染色体非整倍体子代的发生率也较高。老龄纯合子T70H雌性小鼠的 1^{13} 标记染色体的单价体发生率与不带易位的小鼠比增加了8倍,该染色体不分离率增加9倍。易位杂合子T(14;15)6Ca/+小鼠的易位染色体单价体率较高,其子代该染色体三体发生率明显增加。因此,de Boer和Tates认为,通过解联会产生的单价体可能贡献于首次减数分裂不分离^[1]。但到目前为止,其它研究者及我们的实验材料未能证明辐射诱导单价体发生率明显增加或单价体率与非整倍体率相关^[14,15]。

(三) 着丝粒分离的异常

在所研究的动植物中,其不同号染色体着丝粒分开的先后顺序是一定的^[1,16]。在人的基因组中,D、G组及1、16和Y染色体姊妹着丝粒分开较晚,2和18号染色体分开

较早。D、G组及16号染色体姊妹着丝粒分开的先后顺序和自发流产儿中不同号染色体三体的发生率顺位相一致。因此,Vig提出着丝粒分开顺序是不分离的另一个机制^[16,17]。Fitzgerald等人对一连续生育三胎Down's综合征患儿的母亲研究后提出:早熟着丝粒分开(Premature Centromere Division, PCD)是21号染色体原发不分离的原因^[18]。目前除了Nijhoff和de Boer(1980)报道15cGy中子影响小鼠次级精母细胞着丝粒分开外,尚未见其它阳性报道。

(四) 中心体和纺锤体的损伤

电子显微镜下可见,细胞的纺锤体和中心体都由微管聚集而成。在细胞分裂期,纺锤体牵拉染色单体分别进入子细胞中。若纺锤体结构或功能受到影响,可能导致非整倍体产生。Sato等人(1980)用免疫荧光技术研究发现,500或1000cGyX射线照射细胞后,纺锤体出现形态异常和染色体迟滞现象。Oshimura等人用石棉纤维处理CHO细胞,石棉纤维入胞后分布到核周区,发现双核及非整倍体细胞增加,认为是石棉纤维对纺锤体机械干扰所致^[19]。Sugawara和Mikamo(1983)及Tease和Fisher(1986)分别在雌性中国地鼠和雌性小鼠的实验中发现,秋水仙素可以诱发初级卵母细胞非整倍体,认为与纺锤体微管形成不完全有关。前已述及,排卵前卵母细胞及终变期精母细胞对辐射诱发不分离最敏感,而该时期正是纺锤体形成阶段。既然辐射可以损伤纺锤体,也许这是该期诱发非整倍体率较高的原因。同样,此期辐射诱发精母或卵母细胞的染色单体断片率最高。这样的断片在M期没有着丝粒而可能在赤道板上排列不规则,干扰纺锤体,导致染色体不分离。

(五) 性激素分泌的改变

Growley等人(1979)提出交叉激素假说用以解释Down's综合征和母亲年龄的关系:假定减数分裂速率是激素依赖性的,则交

叉端化的速率直接受激素控制。Nielsen等发现,生育Down's综合征患儿的母亲口服激素类避孕药的比例很高、次数较多及时间较长。人类的排卵有季节性变化, Down's综合征发生率也有季节变化,而这样的卵子是在排卵急剧升高或降低的移行期排出的[20]。用孕马血清促性腺激素和人绒毛膜促性腺激素超排卵实验观察到,卵子染色体自发不分离率升高。kamiguki等人(1979)用戊巴比妥处理性成熟雌性大鼠延迟排卵,人为造成排卵前卵子过熟(Pre-ovulatory Overripeness Ovopathy),结果交配后产生的非整倍体胚胎发生率明显增加。因此,减数分裂速率与不分离密切相关。辐射可以导致生殖细胞分裂延迟,胚胎发育落后[21];可以提高大鼠脑垂体及性腺激素分泌水平;另一更有趣的现象是Hansmann(1983)等人发现低水平辐射可以诱发超排卵(Radiation-induced Superovulation),即用激素使小鼠超排卵时,受照动物的排卵量明显多于未受照者,前后之比约为2:1,因此,对辐射诱发哺乳动物生殖细胞非整倍体可以作这样的假设:动物受照—→体内激素水平升高—→减数分裂速率改变—→排卵量或生精量改变—→生殖细胞非整倍体率增加。

诱发不分离的因素还有核仁中期残留、染色体拉长、核膜损伤、巯基损伤及细胞内钙离子浓度改变等,在此不再一一论述。

参 考 文 献

1. de Boer P and Tates AD; Radiation-induced Chromosome Damage in Man, 1st ed. 1983, P299 Alan R. Liss, Inc.
2. Allen JW, et al; Mutat Res 1986, 167 (1): 123-137

3. Mailhes JB, et al; Mutat Res 1986, 167 (1): 139-148
4. UNSCEAR 1986年报告书: 辐射与防护通讯增刊 1988, 1: 101-104
5. Searle JB and Beechey CV; Cytogenet Cell Genet 1982, 33(2): 81-87
6. Cattanaach BM, et al; Mutat Res 1984, 126 (1): 189-204
7. Tease C; Mutat Res 1982, 95(3): 287-296
8. Tease C; Mutat Res 1985, 151(1): 109-119
9. Tease C; Mutat Res 1982, 105(1/2): 95-100
10. Bond DJ; Mutat Res 1987, 181(2): 257-266
11. Russo A, et al; Mutat Res 1983, 108(1-3): 359-372
12. Pacchierotti F, et al; Mutat Res 1987, 176(2): 233-242
13. Tease C and Fisher G; Mutat Res 1986, 173(3): 211-215
14. Liang JC, et al; Mutat Res 1986, 163(3): 285-297
15. 王明东、金玉珂; 遗传与疾病 1988, 5 (3): 174-175
16. Figueroa ML and Vig BK; Cytogenet Cell Genet 1983, 36(3): 627-632
17. Vig BK; Hum Genet 1984, 66(3): 239-242
18. Fitzgerald PH, et al; Hum Genet 1986, 72(1): 58-62
19. Oshimura M and Barrett JC; Environ Mutagen 1986, 8(1): 129-159
20. Jongbloet PH and Vrieze OJ; Hum genet 1985, 71(3): 241-248
21. West JD, et al; Mutat Res 1985, 149(2): 221-230