

哺乳动物卵细胞及受精卵染色体的研究

白求恩医科大学放射医学研究所 王献理 蔡露综述 金玉珂 郑斯英*审

提 要:哺乳动物卵细胞及受精卵染色体的研究,可直接观察配子染色体的畸变,而且这种带有畸变的配子与正常配子一样,都能完成受精过程,从而在子代产生可遗传性易位携带者,这对评价遗传危险度提供了直观材料。特别是异种体外受精技术的建立,可直接观察辐照所致人精子染色体的改变,开辟了人类生殖遗传研究的新途径。

人类染色体的研究最早由 Winivarler (1912)和Painter(1921)以人睾丸为材料,对精原细胞有丝分裂作染色体计数分析而报道。50年代由于研究方法的改进,使人类细胞遗传学发展成独立学科。但生殖细胞染色体的研究却远远落后于体细胞染色体的研究,其中雌性生殖细胞的研究受①排卵数量有限;②卵细胞浆丰富并有颗粒细胞妨碍压片的质量;③排出的卵完成了第一次减数分裂中期(M I)阶段,而第二次减数分裂(M II)必须在受精后才开始,所以研究更少。

Tarkowski^[1]给小鼠用秋水酰胺,超数排卵和醇酸固定等技术,虽得到高质量卵的中期相,但数量很少。直到1975年,Payne和Jones^[2]成功地建立了一次得到2000个卵母细胞分裂相的新技术。有人认为,用激素刺激超数排出的卵含有一些有缺陷的卵,增加了染色体畸变量。所以,Kamiguchi等^[3、4]主张:①不用激素刺激,取其自排卵,减少缺陷卵量;②在不破坏卵细胞的情况下,固定在玻片上,避免染色体丢失。Yamada等^[5、6]在此基础上建立了体外受精卵培养及其染色体制备技术,从而可以直接观察成熟配子染色体和受精卵染色体。

一、染色体标本制备方法^[1~12]

小鼠卵细胞的减数分裂染色体标本和小

鼠体内受精卵及体外受精卵染色体标本的制作有类似之处,故一同叙述。

1. 超数排卵处理:用孕马血清(PMS)和人绒毛膜促性腺激素(HCG),诱发超数排卵。

如采取自然排卵,可直接根据阴道涂片的细胞类型,选择排卵日进行如下处理。

2. 卵的准备:如观察卵母细胞M I染色体,需要在注射HCG的同时注射秋水仙素;如观察M II的染色体,则可不加秋水仙素或在处死前2小时注射秋水仙素(0.002 mg/g体重);如观察体内受精卵染色体,在注射HCG后4~5小时,雌、雄小鼠合笼,次日清晨以检出阴道栓者为交配成功,如观察体外受精卵染色体,则将获能精子注入含卵培养基中,使其受精。经过一定时间的体外培养,使其发育到两性原核核膜消失而两性单倍体组尚未混合,以便分别观察雌雄配子染色体。

3. 卵的收集及孵育:根据实验需要,于适当时间处死雌鼠,取出卵细胞(冲洗液为20%小牛血清的F₁₀或TCM199培养液,内含0.05μg/ml秋水仙胺)并置于玻璃凹孔内。根据需要把受精卵放在5%CO₂孵箱中,37℃培养2~3小时。在人-仓鼠实验时,用胰酶去除透明带。

4. 低渗处理:将卵移入含35~40%小

牛血清的1%枸橼酸钠液中20~65分钟,随时观察其变化,防止细胞膜膨胀破裂。

5. 固定:当细胞膜膨胀到合适程度,迅速把卵轻轻移入固定液Ⅰ(甲醇:冰醋酸:水=5:1:4)中固定5分钟,再把卵吸到载玻片上。立刻用固定液Ⅱ(甲醇:冰醋酸=3:1)复盖,迅速打散,使卵分散并固定在玻片上。将玻片放入固定液Ⅲ中5分钟,最后放到固定液Ⅳ(甲醇:冰醋酸:水=3:1)中1分钟后再用温湿风吹干。

6. 染色:10% Giemsa(0.1mol/L的PBS, pH6.8)染色20分钟,自来水漂洗,晾干备检。

二、辐射诱发卵母细胞染色体畸变的研究

Gilliavod和Leonard首先用X线照射小鼠,观察卵母细胞染色体易位^[13]。相继一些学者作了有关小鼠^[14~22]和仓鼠^[23~26]的系统研究。

1. 卵母细胞受照射所诱发可遗传性易位Searle和Seechey^[14]、Krishna等^[22]以3 Gy X线照射雌鼠,其子代中雌、雄小鼠的易位携带者分别为3/294和4/800,表明在受照雌鼠的后代中雌雄均可产生可遗传性易位。进一步的研究证明,受检的1 735个子代鼠中,有8只为易位携带者,易位发生率为0.46%或 0.15×10^{-4} /(配子·cGy),约为精原细胞受X线照射后数值的一半^[24]。

Brewen^[19]证明,卵母细胞中辐射诱发对称与非对称性单体互换为1:1,根据其发生率推算,子代中平衡易位携带者的发生率在X线照射3Gy时应为0.6%,与UNSC-EAR报告^[24]的0.46%相接近。

2. 诱发卵母细胞染色体畸变的辐射敏感性及其剂量效应关系

Gilliavod和Leonard^[13]给C₅₇小鼠照射后24小时,在356个卵母细胞中发现7个单体互换(注:原文作者是把卵母细胞单体互换形成的多价体按易位观察的)而对照组的

101个细胞中无畸变。以后Brewen等^[17~19]、Searle和Beechey^[14, 21]都证明辐射可诱发卵母细胞染色单体畸变。

Searle和Beechey^[14]用小鼠实验证明:染色体畸变量与从照射到卵排出的时间有关,如21天的畸变量为7天的2倍,因此认为卵母细胞的敏感性与其成熟程度有关,越成熟敏感性越低。Brewen^[19]也证明,诱发染色体畸变的敏感性随照射卵母细胞的不同阶段可差3~10倍,其中以排卵前14~18天的敏感性最高。Mikamo^[24, 26]和Koishi^[25]用仓鼠卵实验还证明,在排卵前85、59、35和19小时受照的卵母细胞,其染色体畸变率很低(染色单体断裂占0.3~4.1%),而在排卵前11小时(相当于第一次减数分裂的终变期)畸变率最高(染色单体断裂占43.3%),前中期I和中期阶段(排卵前9和7小时)的畸变量也较高(分别为31.4和25.3%),所以,认为卵母细胞的终变期和中期最敏感。这一结论与Tease^[27]研究的结果一致。

另外,有人认为,不同鼠龄对辐射诱发卵母细胞染色体畸变的敏感性可能不同。但Tease^[20]、Searle和Beechey^[21]都证明成年鼠和幼年鼠对辐射诱发核网期的卵母细胞染色体畸变的敏感性无差异。

关于剂量效应关系,Brewen^[17~19]用0、0.25、1.0、2.0和3.0Gy的X线照射小鼠后,在不同间隔时间观察小鼠卵母细胞MI染色体畸变率,结果表明,单体缺失和单体互换与剂量呈平方关系。

Kamiguchi^[23]在早终变期给中国仓鼠照射0~4Gy的X线,观察MI的染色体畸变,结果卵母细胞畸变率与剂量呈显著的直线相关,与小鼠的结果一致。

三、辐射诱发受精卵染色体畸变的研究

研究受精卵染色体畸变的意义在于:①揭示雄、雌性生殖细胞减数分裂后染色体的损伤情况;②对于常规检测显性致死表现不

明的致裂原可得到明确的显示；③异种体外受精卵染色体标本制备，使人类精子染色体的分析成为可能。

体内受精卵第一次卵裂中期(FCM)染色体分析证明：辐射诱发成熟精子染色体畸变的敏感性低于精细胞2~3倍^[28、29]。Katon用5 Gy X线一次照射雄鼠后，每两周与两个健壮雌鼠交配，共进行6周，用受精卵分析照后不同时期精子染色体畸变，结果证明减数分裂前，辐射诱发染色体畸变的敏感性比分裂后各阶段都高。

同种体外受精卵染色体畸变^[5、6、30~32]分析表明，①成熟精子在体外获能后离体受照或成熟卵细胞在受精前离体受照以及受精后4小时（即原核期受精卵）离体受照射，主要诱发染色体型畸变，其中以断片最多；②成熟精子或成熟卵受照射后的第一次卵裂中期染色体畸变的剂量效应关系，以二次曲线为宜，原核期受照射为直线关系；③原核期受精卵的辐射敏感性最高，其次是成熟卵，而成熟精子的敏感性最低。

Rudak(1976)发现，人精子能与去除透明带的黄金仓鼠卵受精。Martin等^[32]和UNSCEAR1986年报告书^[34]指出：用异种（人-仓鼠）体外受精卵染色体分析技术，对睾丸局部受0.4~5 Gy X线照射的13名肿瘤病人放疗前后精子染色体分析证明，射线可引起配子染色体畸变增加20%以上，并与睾丸组织接受的剂量显著相关，不论结构畸变还是数目异常都比正常人高，这些含有畸变的配子与正常配子一样，都能与卵子受精，从而提示睾丸组织受照后，其子代染色体异常的危险度增高。

总之，通过对配子染色体畸变的观察，对监测各种诱变剂所造成的遗传危害提供了直接观察畸变的手段，代替了过去用体细胞染色体畸变来间接估算子代的遗传风险的方法，使细胞遗传学研究进入新阶段。

参 考 文 献

1. Tarkowski AK: Cytogenetics 1966, 5:396
2. Payne HS and Jones KP: Mutat Res 1975, 33:247
3. Kamiguchi Y et al: Proc Jpn Acad 1976, 52:316.
4. Mikamo K and Kamiguchi Y: In "Ishihara T and Sasaki M(eds): Radiation-induced chromosome damage in man". Alan R Liss Inc, New York, P411, 1983
5. Yamada T et al: J Radiat Res 1983, 23: 450
6. Matsuda Y et al: Mutat Res 1985, 148: 113
7. 小泉明, 森本兼襄: 姊妹染色单体交换与环境科学 东京サイエンスフォーラム株式会社, 1985, 306~314
8. 苏瑞珍, 何健: 科学通报 1982, 24:1523
9. 山田武: 放射线科学 1986, 29(4):84
10. 齐藤晃: 产科と婦人科 1983, 49(12):49
11. 立野裕幸, 他: 遺伝 1986, 40(10):73
12. 岛田昌幸, 他: 遺伝 1986, 40(11):48
13. Gilliavod N and A Leonard: Can J Genet Cytol 1973, 15:363
14. Searle AG and Beechey CV: Mutat Res 1974, 24:171
15. Gilliavod N and Leonard A: Mutat Res 1974, 25:425
16. Cainc A and Lyon MF: Mutat Res 1977, 45:325
17. Brewen JG, et al: Mutat Res 1976, 35:111
18. Brewen JG, et al: Genetics 1977, 87:699
19. Brewen JG, et al: Genetics 1979, 91:149
20. Tease C: Mutat Res 1983, 119:191
21. Searle AG and Beechey CV: Mutat Res 1985, 147:357
22. Krishna M and Gencoso W: Genetics 1977 (abstract), 86:336
23. Kamiguchi Y and Mikamo K: Mutat Res 1982, 103:33
24. UNSCEAR: Sources and Biological Effects, 1982 report to the General Assembly with

- Annexes, New York, 1982
25. Koishi T: Nippon Sanka Fujinka Gakkai Iasshi 1983, 35:351
 26. Mikamo K: Cytogenet Cell Genet 1982, 33: 38
 27. Tease C: Mutat Res 1986, 173:211.
 28. Katon M, et al: Jpn J Genet 1982, 55: 464
 29. Katon M, et al: Jpn J Genet 1983, 58: 337
 30. Matsuda Y, et al: Mutat Res 1983, 121:125
 31. Matsuda Y, et al: Mutat Res 1985, 151:275
 32. Matsuda Y, et al: Mutat Res 1986, 160:87
 33. Martin RH, et al: Mutat Res 1986, 174 219
 34. UNSCAER: Genetic and Somatic Effects of Ionizing Radiation, 1986 report to the General Assembly with Annexes, New York, 1986.

冷光激发发光——热释光剂量学的一个新进展

Lakshmanan LR

近来Miller等人报道的关于 $\text{CaF}_2:\text{Mn}$ 的冷光激发发光 (COSL) 文章叙述了在热释光剂量学中一个有意义的新进展, 值得重视。我们之所以对此感兴趣, 是由于这种技术具有在快中子个人剂量测量中应用的潜力。中子个人剂量测量是辐射防护的一个重要分支, 应用在这一领域中的一般的TLD不大可能有进展, 这主要是由于塑料 (聚乙烯按重量计算含有14.3%氢) ——TLD的混合物不能安全地加热至高温, 而常规的TL加热温度要超过大多数塑料的熔点很多。COSL技术用一种巧妙的方法克服了这一困难。在这种方法中, 把在室温下辐照过的剂量计冷却至液氮温度 (77K) 进行紫外照射 (254nm或351nm) 并允许其温度上升到室温, 因为在77K和室温之间光发射与照射量成正比。光转换方法在过去已用于有关 LiF , $\text{CaF}_2:\text{Mn}$ 等TL机理研究。但就我所知, 建议把COSL技术用于辐射防护剂量测量则是第一次。

COSL是一种高灵敏 (光转换) 技术。用此法所报道的 $\text{CaF}_2:\text{Mn}$ 的最小可测 γ 照射量为 $10\text{nC}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($\sim 0.04\text{mR}$)。 $\text{CaF}_2:\text{Mn}$ 的热淬灭是众所周知的, 因此应该看到其它的普通TLD中其COSL的灵敏度比一般的TL是高还是低。不论哪种情况, 只要COSL的灵敏度足够探测象辐射防护剂量学中遇到的那种低照射量, 那么它将是足够好的。

Miller等已指出, 完全地利用这个技术还有待

于进一步研究读出参数和一种合适的热释光材料。如Miller等人所做的那样, 常规的读出器, 至少是其加热部分必须改变或修正, 以便于COSL测量。除了灵敏度以外, COSL响应的LET依赖性也是一个重要的参数, 它将决定这种技术的可用性。用一对嵌有TLD的聚乙烯和聚四氟乙烯在混合场中可以估计快中子和 γ 线的剂量。一个理想的快中子剂量计应显示出随LET增加其灵敏度也增加, 类似于 LiF TLD-700 的 250°C 高温峰的响应, 即来自于聚乙烯的反冲质子在TLD中应当比所伴随的 γ 射线诱导出更强的TL。最近研究了某些普通的TLD在室温以上对不同LET值的光转换热释光 (PTTL) 效率。由于荷电体从673K到473K陷阱的转移而产生的 LiF TLD-700 的PTTL响应是随LET增加而增加, 这种研究应扩大到低温范围。

虽然采用COSL技术, 剂量计的重读数将提供多次的剂量测量, 但Miller等人没有详细论述COSL读数后所采用的以便样品可重新使用的退火程序。与普通的TLD不同, 此TLD+聚乙烯样品不能在高温下退火。因此, 保证COSL读出后在77K或更高的温度 (室温或低于373K的任何温度) 上有一个强紫外线照射, 以完全湮没浅层以及深层陷阱的荷电体是很重要的。

[Radiat Protect Dosi 1989, 27(2):71~72(英文)]

戴光复节译 孙福印校