

X射线诱发雄性小鼠生殖细胞 染色体畸变及显性致死突变研究

王献理 王明东 王 彬 孙淑清

(白求恩医科大学放射医学研究所, 长春)

摘要 2.0 Gy X射线照射雄鼠不同发育阶段的生殖细胞与超数排卵处理的正常雌鼠交配, 制备受精卵染色体标本。结果表明: 雄性原核染色体畸变量以精细胞>成熟精子>精母细胞>精原细胞的顺序发生, 其中前二者与自身正常对照比较, 差异非常显著($P<0.01$), 与国外有关报道相一致。照后 170 d 的精原细胞易位, 明显高于正常对照, 而且与照后 140 d 观察的显性致死突变明显相关。[实验证实用受精卵技术检测减数分裂后染色体损伤是良好的实验手段, 而观察精原干细胞易位, 用精母细胞实验更理想。]

关键词 X射线, 生殖细胞, 雄性原核, 染色体畸变, 小鼠, 显性致死突变

辐射可导致生殖细胞染色体损伤, 并根据分离律, 可以估算损伤在子代的再现率^[1,2]。用受精卵(单细胞胚)染色体畸变研究方法, 既能揭示常规生殖细胞遗传学方法所不能看到的辐射对减数分裂后染色体的致突作用, 又能明确显示显性致死所不能达到的染色体水平上的微细改变。本文用受精卵染色体、精原细胞染色体易位及显性致死实验等系列的检测方法综合地观察了辐射导致的生殖细胞损伤, 并探讨其相互间的关系及规律。

材料与 方法

1. 动物的选择及处理

我校实验动物部提供的健康雄性昆明种小白鼠, 8 周龄(体重 24 g 以上)。照射条件为: 飞利浦 X 线深部治疗机, 电压 200 kV、电流 10 mA, 滤过板为 0.5 mmCu + 1.0 mmAl, 剂量率 0.44 Gy·min⁻¹。12 只鼠同时一次全身均匀照射 2.0 Gy, 与超数排卵处理的性成熟同系处女雌鼠交配。取受精卵制备单细胞胚染色体, 其方法参见文献[3、4]。

用本实验组照前与正常雌鼠交配的受精卵染色体畸变作自身对照。根据雄性原核 DNA 复制晚、螺旋化程度低、染色体形态细而长的特点, 本实验控制在两性原核分别完成 DNA 复制, 单倍体细胞染色体尚未混合时, 分析雄原核染色体畸变(见图 1)。

2. 显性致死实验的观察

上述实验的雄鼠, 在照后 140 d 开始与同系雌鼠以 1:4 交配 5 d, 受孕后 14—19 d 杀死雌鼠, 观察子宫内容, 统计活胎、吸收胎块和死胎数, 每 10 d 交配 1 次; 共 3 次; 用同样方法观察未经辐照的正常鼠的显性致死作对照。

3. 精原干细胞染色体易位的观察

将上述显性致死实验终了照后 170 d 的雄鼠杀死, 制备睾丸初级精母细胞染色体。制备方法及判定指标按文献[1]。

结 果

1. 照后不同时间受精卵染色体损伤

本实验用 2 Gy X 射线照射雄鼠生殖细胞的不同发育阶段、诱发受精卵染色体数目异常(见表 1)。在成熟精子中见有超单倍体的发生,亚单倍体以精母细胞阶段为高,但与正常自身对照相比,均无统计学意义($P > 0.05$);染色体结构畸变的发生率(见表 1)由高到低为:精细胞 > 成熟精子 > 精母细胞 > 精原细胞,经统计学处理,精细胞及成熟精子明显高于照前成熟精子的自身正常对照($P < 0.01$),精细胞与成熟精子之间差异不显著($X^2 = 1.0778$),精母细胞也高于自身对照($P < 0.05$),减数分裂前的生殖细胞畸变量逐渐降低。

Tab 1. Frequencies of chromosomal numerical and structural changes in paternal pronuclei of first-cleavage embryos recovered from 2Gy X irradiated male mice mated to normal females

Interval between irradiation and mating(days)	Number of one-cell embryos scored	Chromosome constitution of paternal pronucleus			Chromosome structural aberration	
		18-19	20	21	Total aberrations	Aberrant embryos
Control	76	7.89(6)	92.11(70)	0	0	0
2--7	121	7.44(9)	91.74(111)	0.83(1)	19.83**(24)	15.10**(19)
10--21	93	3.23(3)	96.77(90)	0	25.81**(24)	19.36**(18)
22--32	67	16.42(11)	83.58(56)	0	5.97*(4)	5.97*(4)
39--120	77	5.19(4)	94.81(73)	0	2.60(2)	2.60(2)

Note: (*), $p < 0.01$; (*), $p < 0.05$.

2. 精原干细胞受照后显性致死突变

2.0 Gy X 射线照射小鼠精原干细胞显性致死突变率(见表 2)比正常对照的雄鼠高,统计学处理 $X^2 = 3.49$, P 值接近于 0.05。

Tab 2. Induction of dominant lethality by 2 Gy Xrays in stem spermatogonia of male mice 140 days after irradiation

	No of pregnant females	No of living fetuses (No/female)	No of dead fetuses (No/female)	Frequency of dead fetuses(%)	Dominant lethality
Control	29	9.07(263)	0.55(16)	5.73	
Irradiation	99	9.93(983)	1.01(100)	9.23	0.03712

3. 精原干细胞受照后染色体相互易位

照后 170 d 的雄鼠,制备初级精母细胞染色体,观察精原干细胞易位的发生率(见表 3),其中环状四价体(CIV)、链状四价体(RIV)、环状六价体(CVI)和链状六价体(RVI)均有发生,与正常鼠易位率相比,差异非常显著($X^2 = 85.0491$, $P < 0.001$)。

4. 精原干细胞易位与显性致死的关系

上述实验小鼠的精原干细胞易位与其本身胎仔死亡率作回归分析(见表 4、图 2),二者呈直线相关,拟合成回归方程 $y = -0.0261 + 2.7492x$, ($r = 0.8444$, $P < 0.05$)。

Tab 3. Frequency of reciprocal translocations induced in stem spermatogonia of mice 170 days after 2Gy X irradiation

	No of male mice	No of cell scored	Multivalent				Total	Translocations Per cell
			CIV	RIV	CVI	RVI		
Non-irradiation	24	2000	0	1	0	0	1	0.0005
Irradiation	42	2400	42	55	1	2	103	0.0429**

Note: (**), $P<0.01$

Tab 4. The relationship between the reciprocal translocations and dominant lethality induced by 2Gy X irradiation in stem spermatogonia of mice

Mouse number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RT/100 cells	4.5	4.5	4.5	3.5	5.5	3.0	2.5	5.5	6.0	3.5	4.0	4.5
DF/implants	12.5	8.7	8.7	10.8	10.7	4.1	3.8	14.7	13.6	7.0	7.0	8.8

RT = reciprocal translocation; DF = dead, fetuses

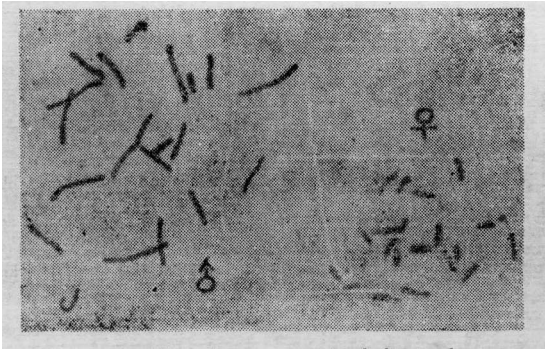


Fig 1. Metaphase spread of first-cleavage containing paternal pronucleus and maternal pronucleus

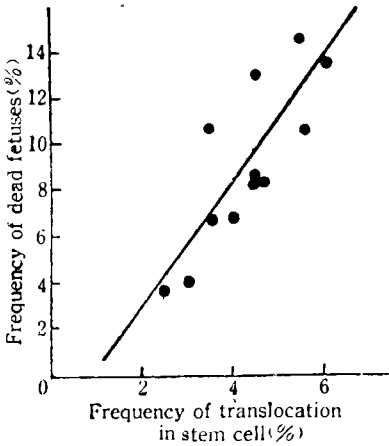


Fig 2. The relationship between dominant lethality and translocation induced by 2Gy irradiation in stem spermatogonia

讨 论

受精卵染色体检验技术的价值在于它可以检查形成个体(受精卵)最初阶段时的染色体改变,可反映来自不同阶段生殖细胞损伤的后果,尤其是对减数分裂后常规的精母细胞实验方法所不能分析的精细胞和精子的染色体损伤,根据精子发生的不同阶段^[1,5,6], 所获得的受精卵染色体分别显示附睾精子、睾丸精子、精细胞、精母细胞、精原细胞(包括分化型精原细胞和精原干细胞)阶段的损伤情况。上述各阶段是一个连续发生过程,不是截然分开的。故根据 Hus 等^[5]主张及本文测得的减数分裂后各阶段的结果差异不显著($P>0.05$)的结论,将睾丸精子划归到精细胞内统计分析。

1. 辐射诱发染色体数目异常

辐射可直接或间接通过染色体损伤导致染色体数目异常^[7], 常见的各种三体征和单体征是造成显性致死负荷增加的原因之一。但减数分裂后的精细胞和成熟精子受照,由于细胞不再分裂,

所以到单细胞胚, 辐射不能诱发数目异常。本文在成熟精子阶段见到的超单倍体, 显然是自发的; 减数分裂前受照引起的染色体数目异常理论上应以亚单倍体为主, 本文也观察到亚单倍体在精母细胞阶段偏高, 但无统计学差异, 可能与染色体制备过程中, 人为丢失而使观察结果不稳定有关。

2. 精子发生不同阶段受照后染色体损伤检测方法的比较

Kirk 和 Lyon^[8]证明辐射诱发染色体畸变在减数分裂后明显高于减数分裂前, 其中精细胞阶段最敏感。本文用 2.0 Gy X 射线照射小鼠, 精细胞染色体结构畸变率最高, 其次为成熟精子, 再次是精母细胞。与上述报道的结果完全相同, 并与吴骋等^[9], Katoh 等^[10]报道的照射雄鼠所诱发的显性致死突变实验相一致。上述结果说明减数分裂后受照, 诱发染色体畸变高, 而且这些畸变细胞和正常细胞一样, 能完成受精过程, 亦能植入子宫并发育成胚胎, 但由于早期卵裂可引起畸变染色体丢失, 故常造成早产、死胎等显性致死效应。减数分裂前各阶段染色体畸变率仅为 2.60%。其原因为精原干细胞的自我复制更新过程非稳定性畸变丢失而导致细胞死亡, 而常规受精卵染色体主要观察这类不稳定畸变, 易位这类稳定性畸变在小鼠受精卵染色体非显带标本中不易辨认, 使畸变量降低。Sega 等^[11]证实, 5.26Gy X 射线照射小鼠后, 前 15 d 附睾精子的 UDS 值一直很低, 第 18 d 才开始增加。说明小鼠晚中期初级精母细胞 DNA 损伤后缺乏修复功能。本实验在精细胞阶段这种缺乏 DNA 修复能力的损伤细胞, 发育到单细胞胚时, 表现出染色体畸变量的增加, 而早期精母细胞以后阶段的 DNA 损伤, 其修复能力增强, 畸变量便随之降低。

与此相反, 用初级精母细胞实验, 观察精原细胞染色体易位, 是以多价体状态存在, 是研究生殖细胞最常用的研究手段。本实验在照后 170 d 制备的终变期——中期 I (D-MI) 染色体标本, 易位率仍明显高于正常对照。

综上所述, 处于不同阶段的生殖细胞, 用不同检测方法各有其优点, 减数分裂后染色体水平的致突变效应观察, 只能用受精卵技术来实现; 而初级精母细胞实验, 由于方法简单, 易位的构型易于辨认, 是检测精原干细胞易位的理想手段。如果二者并用, 对精子发生全过程的损伤效应能作出全面的评价。

3. 精原干细胞受照诱发染色体易位和显性致死突变的关系

精原干细胞受照形成的染色体易位属于稳定性畸变, 没有遗传物质的丢失, 它可以自我复制形成易位细胞克隆。在 D-MI 阶段观察到的易位, 将有二分之一的机率形成不平衡配子, 最终以显性致死突变被淘汰^[1]。本文按此估算, 精原干细胞易位的显性致死贡献(实测值-自发率)应为 $(4.29 - 0.05)\% \times \frac{1}{2} = 2.12\%$; 本实验证明, 2.0 Gy X 射线诱发的显性致死突变(实测值-自发率)为 $(9.23 - 5.73)\% = 3.5\%$ 。如果考虑显性致死有数目异常贡献, 上述结果是比较接近的。分别统计每只鼠的精原干细胞染色体易位和显性致死突变, 并作回归分析证明, 二者高度相关, $y = -0.026 + 2.7492x$ ($P < 0.05$)。说明精原细胞染色体易位是造成减数分裂前显性致死的主要原因。

另外, 本实验观察的显性致死实验有增高的趋势, 统计学处理接近于有意义的改变 ($X^2 = 3.49$), 与 Kirk 和 Lyon^[10]报道的 X 射线 1.08—5.04 Gy 照射后, 显性致死率比对照组高但差异不显著相一致。这与显性致死实验的实验动物数难以扩大等因素有关。用 D-MI 检测辐射诱发的精原干细胞染色体相互易位发生率明显增加, 这说明检测辐射诱发的精原干细胞的损伤用长期精母细胞实验是理想的指标。本文及文献[8]、[9]的实验均表明: 显性致死实验对于检测减数分裂后

的生殖细胞辐射遗传损伤效应也是较理想的实验方法。

参 考 文 献

- 1 王献理, 蔡露. 中华放射医学与防护杂志, 1990, 10(4):239
- 2 王献理, 孙淑清, 王 彬, 王明东. 辐射研究与辐射工艺学报, 1991, 9(2):79
- 3 王献理, 蔡 露. 国外医学放射医学核医学分册, 1989, 13(6):247
- 4 王献理, 孙淑清, 王 彬. 白求恩医科大学学报, 1990, 15(6):616
- 5 Hus T C. Cytogenetic assays of environmental mutagens, Allanheld, Osmun & Co. Publishers, Inc. Totowa (USA), 1982:251
- 6 黄幸纾, 陈星若. 环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1985:250—251
- 7 王明东, 金玉珂. 遗传与疾病, 1988, 5(3):174
- 8 Kirk M Lyon M, F. Mutat. Res., 1984, 125:75
- 9 吴 骋, 王又明, 陈小衡. 中华放射医学与防护杂志, 1981, 1(4):1
- 10 Kato M, Tanaka N, Iwahara S. Jap. J. Genet., 1983, 58:337
- 11 Segal G A, Soto R E, Owens J G. Mutat. Res., 1978, 49:239

(稿件收到日期: 1991年2月5日)

STUDIES ON CHROMOSOMAL ABERRATIONS AND DOMINANT LETHAL MUTATIONS INDUCED BY X IRRADIATION IN GERM CELLS OF MALE MICE

Wang Xianli Wang Mingdong Wang Bin Sun Shuqing

(Institute of Radiation Medicine, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun)

ABSTRACT After male mice irradiated by 2Gy X rays mated to normal virgin females superovulated with PMSG and HCG, pronuclei chromosome spreading of first-cleavage embryos were prepared and chromosomal aberrations of paternal pronuclei were observed. The results showed that the frequency of chromosomal aberrations was highest irradiated at spermatid stage among different stages of spermatogenesis. The sequence of radiosensitivity in spermatogenesis was as follows: spermatid>mature sperm>spermatocyte>spermatogonium and stem spermatogonium. The frequencies of paternal chromosomal aberrations resulted from irradiation at spermatids and mature sperms were significantly higher than that in control.

The reciprocal translocations of stem spermatogonia induced by 2Gy X rays in those male mice were also examined in the preparations of diakinesis-metaphase I. The frequency of reciprocal translocations were 0.0429 per cell and significantly higher than that in control. The proportion of unbalanced gametes, resulting in lethal embryos after fertilization, was 0.02145 to be predicted. At the same time, the dominant lethality induced by X rays in stem spermatogonia was measured, being 0.0371. The frequency of dead fetuses in irradiation group was about twice as in control. The regression analysis was found that the reciprocal translocations was markedly related to the dominant lethality.

KEYWORDS X ray, Germ cell, Paternal pronucleus, Chromosomal aberration, Reciprocal translocation, Dominant lethality