

文章编号:1004 - 616X(2002)01 - 0019 - 03

论著 ·

检测着床前胚胎非整倍性诱变的小鼠动物模型

帅祖兵, 黄天华, 曾荔苹, 黄建民, 孙希海

(汕头大学医学院生殖生物学研究室, 广东 汕头 515031)

【摘要】目的:建立检测化学物对着床前胚胎是否具有非整倍诱变性的动物模型,探讨非整倍性诱变剂秋水仙素(colchicine, COL)对着床前胚胎细胞的影响。方法:以昆明种小鼠作受试动物,分为空白对照、溶剂对照和秋水仙素(0.25 mg/kg、0.5 mg/kg、0.75 mg/kg)处理组共5个组,观察小鼠着床前胚胎丝裂指数和微核率的变化。结果:0.75 mg/kg组的丝裂指数比空白对照显著增高($P < 0.01$);微核率随秋水仙素剂量增加而升高,呈明显的剂量依赖关系,与空白对照组比较,差异有统计学显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:通过一系列预备试验,建立了一种有效地检测化学物非整倍诱变性的动物模型;秋水仙素只有在其剂量达到一定的阈值时才能中止着床前胚胎细胞分裂;秋水仙素可诱导着床前胚胎细胞出现非整倍性,并呈剂量依赖关系。

【关键词】非整倍性;着床前胚胎;秋水仙素

中图分类号:Q343

文献标识码:A

THE ANIMAL MODEL FOR INSPECTION OF ANEUPLOIDY IN PREIMPLANTATION EMBRYOS OF MICE

SHUAI Zu-bing, HUANG Tian-hua, ZENG Li-ping, HUANG Jian-min, SUN Xi-hai

(Department of Reproductive Biology, Shantou University Medical College, Shantou 515031)

Abstract : Purpose : To establish a new modal system to evaluate the genetic toxicity of aneugens and to investigate the effects of colchicine (COL) on preimplantation embryo cells. **Methods :** Kunming mice were divided into 5 groups including solvent control, and COL-treatments (0.00 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.50 mg/kg and 0.75 mg/kg). The mitotic index (MI) and micronucleus frequency (MNF) of cells from preimplantation embryos of mice were observed. **Results :**

The MI of the 0.75 mg/kg group was highly significant as compared to that of the control ($P < 0.01$). MNF of 0.25 mg/kg, 0.50 mg/kg and 0.75 mg/kg groups were 2.99%, 7.35%, 10.13% respectively and presented a dose responsive relationship with COL. All of MNF of COL treated groups were highly significant as compared to that of control ($P < 0.01$). **Conclusion :** A new reliable animal model for evaluating the genetic toxicity of aneuploidogen was established by a series of pre-test procedures. COL could arrest nuclear division of preimplantation embryo cells only when the dose reaches a certain level. COL may induce the aneuploidy of preimplantation embryos with dose response.

Key words : aneuploidy, preimplantation embryo, colchicine.

非整倍性(aneuploidy)是人类染色体异常中最常见流产中的发生率约占50%,在全部妊娠中的发生率见的类型,在新生儿中的发生率约为0.3%,在自发超过5%¹。它是引起人类智力障碍、先天畸形和妊

收稿日期:2001-06-04;修订日期:2001-07-20

基金项目:国家自然科学基金(39970374)

作者简介:帅祖兵(1970-),男,湖北省人,医学硕士,研究方向为人类配子与早期胚胎的遗传学。现通讯地址:武昌市珞珞路745号:湖北省妇幼保健院,邮编430070

娠失败的主要原因之一,因此关于非整倍性发生机制及其诱变因素的研究一直是学者们重视的课题。

对于人类健康,胚胎着床前即卵裂初期是一个重要的时段。在这个时段,如果发生染色体不分离或染色体丢失就可能形成非整倍体或含有非整倍性细胞系的嵌合体,从而对人类妊娠或子代产生严重的后果。遗憾的是,关于这个时段的诱变研究,迄今为止,几乎是一片空白,其原因在于缺乏一种有效的检测化学物非整倍毒性的动物模型。随着科学的发展,大量化学物进入人类生活,化学物的诱变性变得日益为人们关注。本课题的目的是,通过研究非整倍性诱变剂秋水仙素对着床前胚胎细胞的作用,建立一种新的动物模型,为评价化学物对着床前胚胎是否具有非整倍诱变作用提供一种有效的检测手段,同时也探讨秋水仙素对早期胚胎细胞的影响。

1 材料与与方法

1.1 超排卵与雌雄鼠交配

选6~8周龄雌性昆明种小鼠,于实验第1d 4:00 pm腹腔注射孕马血清促性腺激素(PMSG)5 IU/只鼠,第3d 4:00 pm注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)5 IU/只鼠,7:00 pm与10周龄雄鼠合笼,第4d 8:00 am检查阴栓,阳性者交配成功,记为妊娠第1d。

1.2 实验分组与胚胎细胞染色

将阴栓检查为阳性的小鼠随机分为A(空白对照)、B(溶剂对照)、C1(COL 0.25 mg/kg)、C2(COL 0.50 mg/kg)、C3(COL 0.75 mg/kg)5个组。于妊娠第4d 0:00 am腹腔内分别注射溶剂(B组)和COL(C1、C2、C3组),A组不作处理。8:00 am杀鼠取材。

1.3 胚胎的收集

处死小鼠后开腹暴露两侧卵巢、输卵管及子宫,剥离输卵管,在解剖镜下用4号针头(针尖磨平)从输卵管壶腹开口处插入,冲洗出小鼠胚胎。

1.4 胚胎染色体的制备²

将胚胎转移到0.075 mol/L的KCl溶液中,于37℃低渗处理10~20 min后移入固定液中,3~5 min后再转移到载玻片上,用固定液处理。

1.5 判断标准与计数

1.5.1 微核 着色与主核一致,大小约为主核的1/5~1/20,边缘光滑。每组观察5 000个以上细胞,记数其中的微核数,计算出微核率(MNF)。

1.5.2 丝裂指数(MI) 即中期细胞数占细胞总数的千分率。

1.6 统计学处理

实验数据用SAS软件包进行处理。

2 结果

2.1 着床前胚胎化学诱变检测系统

通过一系列预备试验,包括对受试化学物的选择、测试指标的选择,染毒时间和剂量的探索,建立了一种检测化学物对着床前胚胎是否具有非整倍诱变效应的动物模型(图1)。

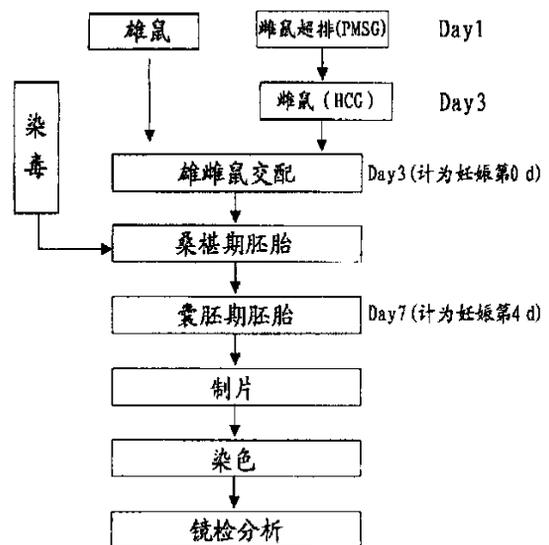


图1. 着床前胚胎化学诱变检测系统模式图

2.2 秋水仙素对小鼠着床前胚胎细胞的影响

2.2.1 丝裂指数分析 对照与试验各组丝裂指数分析结果见表1。

表1. 不同浓度的COL对丝裂指数的影响

Table 1. Effect of different doses of COL on mitotic index

Groups	No. of mice	No. of embryos	No. of cell analyzed	No. of metaphases	MI %
A	10	192	5 550	208	37.4
B	10	186	5 308	166	31.3
C1	10	183	5 263	222	42.2 *
C2	10	198	5 374	216	40.2 *
C3	10	194	5 349	466	87.1 **

* P>0.05, ** P<0.01, compared with A and B

2.2.2 微核率分析

对照与试验各组微核率分析结果见表2。

表 2. 不同剂量 COL 对微核率的影响

Table 2. MNF induced by different doses of colchicine

Groups	No. of mice	No. of embryos	No. of cell analyzed	No. of interphases	No. of MN	MNF %
A	10	192	5 550	5 300	9	1.70
B	10	186	5 308	5 101	6	1.18
C1	10	183	5 263	5 023	15	2.99*
C2	10	198	5 374	5 031	37	7.35**
C3	10	194	5 349	5 234	53	10.13**

* $P > 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with A and B

3 讨论

3.1 检测早期胚胎化学诱变动物模型的建立

3.1.1 受试化学物 在建立“着床前胚胎化学诱变动物模型”的预备试验中,首先涉及的问题是受试药物的选择。由于不能诱发非整倍性的化学物或诱变作用不明的化学物作为受试物不可能验证所要建立的动物模型是否正确,因此本课题选择一种有代表性的、已知的非整倍性诱变剂—秋水仙素作待测物,来探讨将要建立的动物模型能否以及如何能对非整倍性诱变剂进行检测,同时研究该化学物对着床前胚胎细胞的作用特点。

3.1.2 测试指标 本研究选择微核率作为测试指标。因为在检测化学物诱变性时,微核分析的灵敏性与其他细胞遗传学分析基本相同,而微核试验的技术步骤与样本分析却比其他细胞遗传学试验简单、省时得多。这也是大多数学者在进行非整倍性诱变研究时采用微核率作测试指标的原因。

3.1.3 暴露时间 在检测化学物能否诱发非整倍性的过程中,对早期胚胎细胞进行处理的时段较多:雄雌鼠交配当天、囊胚期、囊胚期。在哪一个时段用待测物处理细胞才能达到理想的染毒效果是预试验要解决的又一个关键问题。本研究进行预试验,分别于妊娠第 4 d 的 0 00、7 00、8 00、9 00 取材分析。结果发现,第 4 d 0 00,大多数胚胎已发育至 14.57 ± 4.28 细胞,处于桑椹期;8 h 后,大多数细胞又进行了一次分裂,每胚胎平均细胞数为 28.32 ± 4.89,进入囊胚期。本研究选择第 4 d 0 00 用不同剂量的秋水仙素染毒胚胎,8 00 取材制片,经过反复探索,取得了理想的检测结果。

3.1.4 暴露剂量 在建立新的动物模型过程中,化学物剂量的选择是预试验中要解决的又一个问题。剂量过大,可能导致胚胎发育中止,使实验不能继续进行下去,剂量过小,若得出阴性结果,难以判断是药物剂量本身不足以诱发非整倍性还是实验系统本身

不能检测化学物的诱变效应。本实验用秋水仙素染毒的剂量从 4 mg/kg 开始,依次减半进行试验,发现剂量为 4 mg/kg 和 2 mg/kg 时,几乎所有的胚胎细胞都处于有丝分裂中期,各细胞的染色体相互混杂重叠,难以进行分析;因无间期细胞,也不能进行微核分析。当剂量为 1 mg/kg 时,大部分细胞处于有丝分裂中期;当剂量为 0.75 mg/kg,胚胎中多数细胞通过中期继续发育,制片已能进行微核分析。因此选择 0.75 mg/kg、0.5 mg/kg 和 0.25 mg/kg 作为本实验秋水仙素的检测剂量,最后获得了预期结果。

3.1.5 新动物模型的可信性 秋水仙素是一种已知的非整倍性诱变剂。应用本课题建立的动物模型对 3 种不同剂量秋水仙素的诱变作用进行检测,均得出了阳性结果并有剂量依赖关系,而对空白和溶剂对照的检测结果皆为阴性(表 2),表明该动物模型能有效地用于非整倍性化学诱变剂的检测。

3.2 秋水仙素的作用特点

3.2.1 秋水仙素对着床前胚胎细胞增殖的影响 秋水仙素是一种植物碱,提取自秋水仙(colchicum autumnale)和其他百合花科(liliaceous)植物。通过它的环庚三烯酚酮环(tropolone),秋水仙素能特异地与微管蛋白二聚体和微管结合蛋白结合,妨碍微管组装,破坏纺锤体的结构和功能,使细胞停止在有丝分裂中期,引起丝裂指数升高。汪旭³等发现,用秋水仙素处理小鼠骨髓细胞,能够提高丝裂指数,加强中期染色体的浓缩状态,并抑制有丝分裂进程。从表 1 可以看到,本实验空白对照、溶剂对照、0.25 mg/kg、0.5 mg/kg 秋水仙素处理组的丝裂指数依次为 37.4%、31.3%、42.2%和 40.2%。各组丝裂指数间的差异不显著($P > 0.05$)。但 0.75 mg/kg 组的丝裂指数为 87.1%,与其他 4 个组比较差异显著($P < 0.05$)。提示秋水仙素只有在其剂量达到一定的阈值时,才能使早期胚胎细胞停止在有丝分裂中期。

3.2.2 秋水仙素对着床前胚胎细胞的诱变作用 从表 2 得知,本实验空白对照组和溶剂对照组的微核率分别为 1.70%和 1.18%,与程龙球等⁴用小鼠外周血淋巴细胞作材料进行的微核检测结果 1.20%相近。本实验中 0.25 mg/kg、0.5 mg/kg 及 0.75 mg/kg 秋水仙素处理组的微核率依次为 2.99%、7.35%和 10.13%,各暴露组与空白对照组的微核率间差异非常显著($P < 0.01$);而且随着秋水仙素剂量增加,微核率明显升高。这一结果表明,秋水仙素能诱导非整倍性发生,其诱变效应与剂量有明显的依赖关系。

云南籍几个正常人群间 GSTM1 基因多态性的比较研究

梁子卿¹, 宋忠魁¹, 夏晓玲², 黄云超², 谭颖¹, 汪旭^{1*}

(1. 云南师范大学生命科学学院遗传教研室, 云南 昆明 650092; 2. 昆明医学院第二附属医院胸外科, 云南 昆明 650031)

【摘要】目的: 针对云南曲靖地区宣威县、富源县及非曲靖地区 3 组正常人群进行 GSTM1 基因型多态性的比较研究。方法: 采用聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 技术对相关人群进行基因型鉴定。结果: GSTM1 纯合缺失基因型 (0/0) 的频率在宣威人群为 63.6% (n=33), 富源人群为 64.5% (n=31), 非曲靖人群为 68.5% (n=35)。结论: GSTM1 基因型多态性在 3 个正常人群中的分布情况均一。该研究为了解特定地区肺癌与外源物代谢解毒基因之间的可能联系提供了一些基础数据。

【关键词】谷胱甘肽硫转移酶 M1 基因; 遗传多态性; 正常人群; 云南人群

中图分类号: Q319

文献标识码: A

STUDY OF GENETIC POLYMORPHISM OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE M1 AMONG THREE SUBPOPULATIONS IN YUNNAN PROVINCE

LIANG Zi-qing¹, SONG Zhong-kui¹, XIA Xiao-ling², HUANG Yun-chao², CHAN Ying, WANG Xu¹

(1. Genetic Section, School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China; 2. Chest Surgical Department, The 2nd Attached Hospital of Kunming Medicine College, Kunming 650031, China)

秋水仙素诱发微核的原理是, 它们能造成细胞纺锤体功能紊乱和结构损伤, 使染色体在有丝分裂后期不能进入子代核内而滞留在胞质中形成微核。由于此类微核起源自带有丝粒的染色体, 因而可用荧光原位杂交 (FISH)、C 显带或抗着丝点抗体间接免疫荧光染色法 (CREST) 作出鉴定。但是很多学者发现, 秋水仙素或其他非整倍性诱变剂诱发的微核, 经多种方法鉴定, 源自带有丝粒的染色体者只有 80% 左右^{5,6,7}。也就是说, 有 20% 以上的微核起源在现有技术条件下无法得到满意解释。尽管如此, 因所得实验数据对评价待测化学物是否具有非整倍诱变性方面并不造成影响, 所以微核分析仍是学者们在研究化学物非整倍性诱变效应时采用的主要指标。

参考文献:

- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, et al. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology J. *Environ Mol Mutagen*, 1996, 28: 167 ~ 175.
- Kaniguchi Y, Mikamo K. An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova J. *Am J Hum Genet*, 1986, 38: 724 ~ 740.
- 汪旭, Miller B, Klisch U, 等. 三种有丝分裂抑制剂诱发小鼠骨髓细胞非整倍体的研究 J. *遗传学报*, 1991, 18(4): 312 ~ 319.
- 程龙珠, 梁志成, 汝明权. 三种葱醌衍生物对小鼠外周血淋巴细胞微核影响 J. *癌变 畸变 突变*, 2000, 12(1): 45 ~ 47.
- 汪旭, 刘素清, 金正基. 抗着丝粒抗体在鉴别微核起源上的应用 J. *癌变 畸变 突变*, 1994, 6(2): 60 ~ 63.
- 胡斌, 曹佳, 程舸, 等. 荧光原位杂交和 CREST 染色对甲基丙烯酸环氧丙酯的非整倍体诱发效应的研究 J. *癌变 畸变 突变*, 1998, 10(2): 65 ~ 68.
- Verschaeve L, Vanderkerken K, Kirsch-Volders M, et al. C-banding as a simple tool to discriminate between micronuclei induced by clastogens and aneugens J. *Stain Technol*, 1988, 63(6): 351 ~ 354.

收稿日期: 2001-05-08; 修订日期: 2001-07-24

基金项目: 云南省自然科学基金 (2000C0046M)

作者简介: 梁子卿 (1964 -), 男, 昆明市人, 副教授, 主要从事遗传毒理学研究。

* 通讯作者