

第一步。要获得能够普遍适用的BBDR模型,最主要的障碍在于如何将发育毒效应与其作用机制加以联系。与一般毒理学终点(例如致癌)不同,对致畸化学物所引起的胚胎畸形和发育毒性是否具有共同的效应途径,目前尚没有一致的意见。但是,如果要发展出能描述不同生物学效应过程的通用模型,就必须获得更多的包括正常胚胎生理发育过程和发育毒物体内代谢等方面的信息,如代谢动力学和效应动力学、不同的暴露剂量和暴露途径导致的效应差异,以及实验动物的种属敏感性和受试化学物的性质等⁽⁶⁾。已经有人提出⁽⁷⁾,通过发现新的作用机制(如氟衍生物掺入胚胎组织核酸)或者某一效应机制的中间步骤(如测定核苷酸池)来进一步完善BBDR模型。当然,在最终达到这一目标之前,还有许多工作要做。

参考文献

1. Andersen ME, et al Mechanistic toxicology research and biological based modeling: partners for improving risk assessments *CIT A ctivities*, 1992; 12: 1.
2. Parker WB, et al Metabolism and mechanism of action of 5- fluorouracil *Pham Ther*, 1990; 48: 381.
3. Shurey DL, et al Biologically- based dose- response modeling in developmental toxicology: Biochemical and cellular sequelae of 5- fluorouracil exposure in the developing rat *Toxicol Appl Pham acol*, 1994; 126: 129.
4. Setzer RW. Development of biologically- based dose- response models: modeling the effect of 5- FU on cell cycle kinetics *Teratology*, 1993; 47: 435.
5. Pinendo HM, et al Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol*, 1988; 6: 1653.
6. Gaylor DW, et al Process of building biologically based dose- response models for developmental defect *Teratology*, 1992; 46: 573.
7. Leisenring WM, et al Evaluation of cellular kinetics in biologically based dose- response modeling for developmental toxicology. *Teratology*, 1993; 47: 426.

DNA 诱发损伤的修复与染色体畸变的研究——咖啡因对人精子染色体的影响

余云香¹ 黄天华² 黄建民² 刘鸿禧² 方小武²

¹广东省妇幼保健院生殖保健科 广州市 510010 ²汕头大学医学院生殖生物学研究室 汕头市 515063

摘要 应用人精子去透明带卵卵种体外受精技术,对第1次卵裂中期相的染色体畸变进行分析。实验分为对照、咖啡因后处理、丝裂霉素C(MMC)预处理、MMC预处理同时加咖啡因后处理4个组。咖啡因组、MMC组和MMC+咖啡因组染色体结构畸变精子率依次为27.0%、23.0%和45.0%;断裂均数依次为0.72、0.60和1.65,各组上述参数均高于空白对照组(8.0%,0.14),差异非常显著($P < 0.01$, $P < 0.01$)。与MMC组和咖啡因组相比较,MMC+咖啡因组诱发的染色体型和染色单体型畸变均明显增加,以染色体型畸变增加更为明显($P < 0.01$, $P < 0.01$)。结果显示,咖啡因可诱发人精子染色体畸变并能通过抑制金黄地鼠卵母细胞的复制前和复制后修复系统,有效地增强MMC对人精子染色体的诱变效应。

关键词 咖啡因; 丝裂霉素C; 人精子; 去透明带地鼠卵; DNA 修复系统

REPAIR OF DNA INDUCED LESIONS AND CHROMOSOMAL ABERRATIONS: THE EFFECTS OF CAFFEINE ON HUMAN SPERM CHROMOSOMES

Yu Yunxiang¹, Huang Tianhua², Huang jiamin², Liu Hongxi², Fang xiaowu²

¹Guangdong Province Maternal and Child Health Care Hospital, Guangzhou 510010, ²Medical School of ShanTou University, ShanTou 515063

Abstract Chromosome aberrations were analyzed at the first cleavage metaphase of zona-free hamster eggs fertilized in vitro with human sperm. The experiment was divided into four groups: control, caffeine post-treatment, mitomycin C (MMC) pretreatment and MMC pre-treatment + caffeine post-treatment. Frequencies of chromosome aberrations in Caffeine, MMC and MMC + Caffeine groups were 27%, 23% and 45%, and the means of breakages were 0.72, 0.60 and 1.65 sequentially. All of above parameters were statistically higher than those in control (8.0%, 0.14) ($P < 0.01$, $P < 0.01$). Compared with those in Caffeine and MMC groups, the increases in the frequencies of chromatid-type and chromosome-type aberrations were highly significant in MMC + Caffeine group ($P < 0.01$, $P < 0.01$). A far higher frequency of chromosome-type aberrations than that of chromatid-type ones was found. These results showed that caffeine could induce chromosomal aberrations in human spermatozoa and potentiate the effects of MMC induction by inhibiting the pre- and post-replication repair system in hamster oocytes.

Key words Caffeine; Mitomycin C; Human sperm chromosome; Zona-free hamster oocyte; DNA repair system

人精、卵中DNA损伤的诱发和修复长期以来受到学者们的特别重视,因为精、卵中发生任何事件都会给后代造成直接的遗传学后果。在体细胞中,有关DNA诱发损伤、修复与染色体畸变的关系的研究,已有大量报道⁽¹⁻⁴⁾,但在生殖细胞中的研究相对较少,尤其是在人类生殖细胞中有关这方面的研究资料更少。Matsuda等⁽⁵⁾的研究发现,小鼠受精卵对UV诱发的小鼠精子DNA损伤具有修复能力。Kamiguchi⁽⁶⁾和黄天华等^(7,8)通过分析物理、化学诱变剂处理后的人精子核型,观察到大量重接型畸变,从而推论物理、化学诱变所致的人精子DNA损伤能够在金黄地鼠卵母细胞中得到修复。但他们未采用修复抑制剂对受精卵中人精子DNA诱发损伤的修复抑制与染色体畸变的关系进行深入的研究。本研究就有关咖啡因对人精子染色体是否具有诱变作用及咖啡因作为一种修复抑制剂对MMC在人精子中诱变效应的影响进行

探讨。

材料和方法

1. 实验材料

1.1 人精液标本取自半年内无射线及致断药物接触史的健康男性。

1.2 鼠卵取自6—8wk龄雌性金黄地鼠。

2. 化学试剂

2.1 丝裂霉素C: 依赖S期的拟紫外线致断剂。

2.2 咖啡因: DNA损伤修复抑制剂。

3. 实验分组

正常组、咖啡因组、MMC组、MMC+咖啡因组。

4. 实验方法

地鼠卵超排、人精子与去透明带地鼠卵样本准备、受精、受精后异体卵的培养及精子染色体制片见参考文献⁽¹⁰⁾。与其不同之处是: MMC是在受精前用终浓度为 $15\mu\text{g/ml}$

的MMC 预处理精样 1h, 洗涤后与卵受精, 咖啡因在受精 1h 后用终浓度 1mM 咖啡因处理异合卵。

5 计数与数据处理

5.1 计数标准

按人类细胞遗传学命名的国际体制, 记录每个精子中发生的结构畸变。

5.1.1 畸变精子计数: 1 个精子核型中不管发生多少结构畸变均计为 1 个畸变精子。

5.1.2 断裂计数: 将每个精子中发生的各种畸变转换为断裂计数: 末端缺失(包括断片、断裂)计为 1 个断裂数; 双着丝粒体、相互易位等计为 2 个断裂数, 但伴随这种互换畸变的断片是这种互换畸变的一部分, 不另作独立断片计数; 染色单体互换根据其图像(四射体、四射体、复合射体)的构成计算断裂数。

5.2 实验参数

5.2.1 畸变精子率(%) = 具有结构畸变的精子数 ÷ 所分析的精子数 × 100%

5.2.2 断裂均数 = 发生的断裂总数 ÷ 所分析的精子数

5.2.3 畸变均数 = 发生的畸变总数 ÷ 所分析的精子数

5.2.4 增强系数(Potential Index, PI)

$$PI = \frac{E_{caf-} - E_{con}}{E_{con}} \text{ 或 } \frac{E_{mmc+} - caf-}{E_{caf-} - E_{con}}$$

E 表示畸变精子率或断裂均数, con 表示正常对照组, caf 表示咖啡因组, MMC 表示丝裂霉素 C 组。

5.3 数据处理

空白对照组、咖啡因组、MMC 组和 MMC+ 咖啡因组各分析 100 个人精子核型。将各组实验数据输入计算机进行统计学处理。

5.3.1 各组畸变精子率的比较分析

用 χ^2 检验进行分析。

5.3.2 各组畸变均数的比较分析

将每个精子核型中发生的断裂数、染色单体、染色体、断裂型和重接型畸变数经平方根转换后, 用 t 检验进行分析。

5.3.3 人精子染色体畸变类型分析

在资料分析中, 将记录的畸变按染色体型和染色单体型、断裂型和重接型分类。断裂型包括: 断裂、缺失、无着丝粒断片、粉碎化; 重接型包括四射体、四射体、复合射体、双着丝粒体、相互易位、环状染色体。

结果

1. 结构畸变精子率、断裂均数与增强系数分析 本实验中, 空白对照组、咖啡因组、MMC 组、MMC+ 咖啡因组精子染色体核型分析结果见表 1。

Table 1. Frequencies of metaphases with chromosomal aberrations (FMCA) and mean breakages of chromosomes (MBC) in human spermatozoa exposed to caffeine (CAF), mitomycin C (MMC) and MMC+ CAF and Potential Index of caffeine

groups	sperm analyzed	sperm with chromosome aberration	FMCA	Total No. of BC	MBC	potentiation Index	
						PII	PII
control	100	8	8.0	14	0.14		
CAF	100	27	27.0	72	0.72*	2.38	4.14
MMC	100	23	23.0	60	0.60*		
MMC+ CAF	100	45	45.0	165	1.65*	1.20	2.02

* $P < 0.01$.

2 人精子染色体畸变类型分析

2.1 人精子染色体畸变类型分析(表 2)

Table 2 Types of chromosomal aberrations in human spermatozoa exposed to CAF, MMC and MMC+ CAF

groups	sperm analyzed	CTD aberrations					CS aberrations				
		Total	ctb	tr	qr	com	Total	csb	dic	r	pvz
control	100	2	0	1	1	0	9	9	0	0	0
CAF	100	17	13	3	1	0	59	56	2	1	0
MMC	100	23	12	4	6	1	15	14	1	0	0
CAF+ MMC	100	54	40	7	4	3	84	67	12	5	0

* CTD, chromatid- type aberrations CS, chromosome- type aberrations

2.2 人精子染色体、染色单体、断裂和重接各型畸变均数分析(表 3)

Table 3 Means of chromosome-, chromatid-, breakage- and rejoining- aberrations

Groups	Total No. of sperm analyzed	Total No. of aberrations	Chromatid aberrations	Chromosome aberrations	Breakage aberrations	rejoining aberrations
Control	100	11	2 (0.02)	9 (0.09)	9 (0.09)	2 (0.02)
CAF	100	76	17 (0.17)	59 (0.59)	69 (0.69)	7 (0.07)
MMC	100	38	23 (0.23)	15 (0.15)	26 (0.26)	12 (0.12)
MMC+ CAF	100	138	54 (0.54)	84 (0.84)	107 (1.07)	31 (0.31)

讨论

1. 结构畸变精子率、断裂均数与咖啡因增强系数分析

如表 1 所示, 本研究中正常对照组畸变精子率为 8.0%, 属国内外文献报道的正常男性自发畸变精子率 1.4% - 13.6% 范围⁽¹⁰⁾; 断裂均数为 0.14, 与黄天华等报道的 0.12 相近⁽⁷⁾。咖啡因组畸变精子率为 27.0%, 断裂均数为 0.72, 与正常对照组间差异均非常显著 ($P < 0.01, P < 0.01$), 咖啡因增强畸变精子系数 $P_{II} = 2.38$, 增强断裂系数 $P_{I2} = 4.14$, 表明咖啡因本身能够诱发人精子染色体结构畸变。MMC 组畸变精子率为 23.0%, 断裂均数为 0.60, 与正常对照组相比, 两者间有非常显著差异 ($P < 0.01, P < 0.01$), 这与黄天华等⁽⁸⁾的实验结果一致。MMC + 咖啡因组畸变精子率为 45.0%, 断裂均数

为 1.65, 与空白对照组、咖啡因组和 MMC 相比较, 有非常显著差异 ($P < 0.01, P < 0.01$)。咖啡因增强 MMC 诱发精子系数 P_{II} 为 1.2, 增强断裂系数 $P_{I2} = 2.02$, 表明咖啡因具有增强 MMC 诱发人精子染色体畸变的效应。

2. 结构畸变类型分析

2.1 咖啡因组和 MMC 组诱发结构畸变类型分析(表 2, 3)

咖啡因组中, 诱发的畸变以染色体型畸变为主, 主要是无着丝粒断片, (图 1—6 见封二), 诱发的重接型畸变甚少。已有研究证实⁽⁸⁾, 人精子染色质在受精前和进入地鼠卵后的 3 小时内处于 G1 期, 继后的 8 小时为 S 期, 再经过 G2 期(约 5 小时), 受精卵进入第 1 次卵裂。导致本实验结果的可能机制是咖啡因是一种不依赖 S 期致断剂⁽³⁾。在 G1

期以诱发染色体型畸变为主; 咖啡因是已知的修复抑制剂, 可抑制人精子自发或咖啡因诱发DNA 损伤的修复, 同时对这些DNA 断裂的错误修复也可能具有抑制作用, 从而使咖啡因诱发的重接型畸变甚少。

本研究中, MMC 组诱发畸变以单体型为主, 包括单体断裂, 三射体, 四射体(见图 2)和复合射体; 染色体型畸变主要是无着丝粒断片。这个结果与黄天华等⁽⁸⁾应用相同剂量MMC 处理人精子时所得的结果一致。

2.2 咖啡因+ MMC 组诱发结构畸变类型

分析(见表 2.3)

与MMC 组和咖啡因组相比, 咖啡因+ MMC 组诱发的染色体型和染色单体型畸变均明显增高, 以染色体型增加更为显著, 包括无着丝粒断片(图 3、4), 双着丝粒体(图 4), 环(图 5); 染色单体型畸变, 以染色单体断裂为主(图 3), 其次为三射体(图 5), 四射体, 复合射体(图 5、6)。MMC+ 咖啡因组诱发的染色体型、单体型、断裂型和重接型畸变均数与MMC 组和咖啡因组相比, 均明显增高($P < 0.01$, $P < 0.01$), $P < 0.01$, $P < 0.01$)。

Figure 7. Effects of caffeine post-treatment on the frequencies of rejoined- and unrejoined- type aberrations induced in human sperm chromosomes

MMC 组的染色体结构畸变中, 放射体(三射体、四射体和复合射体)占 28.95%, 放射体是由错误重接引起的畸变, 发生在受精卵DNA 复制后期, 放射体的出现表明金黄色地鼠卵中存在复制后修复系统, 能对MMC 在人精子中诱发的DNA 损伤进行重接⁽⁶⁾。本实验中加入已知的修复抑制剂咖啡因处理, 如果DNA 损伤修复系统被完全抑制, 即

重接步骤也将受到抑制, 那么将不会出现放射体型畸变, 但在MMC+ 咖啡因组中仍观察到放射体型畸变, 表明在本实验条件下, 咖啡因不能完全抑制金黄色地鼠卵母细胞对MMC 诱发的人精子DNA 损伤的修复。这与Link 等研究结果一致⁽¹¹⁾。

MMC 的结构内含有氮丙啶与氨基酰基 2 个烷化基团, 系双功能烷化剂, 因此它可诱

发DNA 交联性损伤。有人报道,处于细胞周期G1期的体细胞对MMC 诱发损伤的修复分为2步:在DNA 交联部位进行半切割(half- excision);清除经半切割的或原有的单加合物(mono- adducts)⁽²⁾。本实验中,加入咖啡因处理后,MMC 诱发的染色体型畸变明显提高,其可能原因是MMC 诱发的交联性损伤在精子进入金黄地鼠卵后的G1期,经半切割修复发生单链断裂,咖啡因可以抑制多聚腺苷二磷酸核糖合成酶⁽¹¹⁾,该酶为DNA 链断裂修复所必需,即咖啡因抑制单链断裂的修复,造成单链断裂大量积累并增加损伤间相互作用机会,结果一些单链断裂转化为双链断裂,经S、G2期,形成染色体型畸变。加入咖啡因处理后,MMC 诱发的染色单体型畸变增加,导致这一结果的原因可能是:

咖啡因在G2期干扰DNA 损伤的修复;有人报道,MMC 的作用可引起细胞周期G2期延长⁽¹²⁾,咖啡因通过抑制MMC 的这种作用使G2期相对缩短,因而也就相应缩短了修复时间,从而在G2期有更多的DNA 损伤未被修复或错误修复,结果在有丝分裂期形成染色单体型畸变⁽¹⁾。

如图2所见,与正常对照组和MMC 组相比,加入咖啡因处理后,诱发畸变的增加以断裂型为主,这提示DNA 链断裂的正常和错误修复均受到了抑制,同时观察到重接型畸变也有增高,这可能是由于修复暂时受到了抑制,导致DNA 双链断裂的增加,继而发生交换所致。

咖啡因增强染色体诱变效应的机理尚未完全弄清。Ishii等⁽⁴⁾发现,咖啡因可抑制切除修复系统对MMC 诱发的人血淋巴细胞DNA 损伤的修复。也有文献报道,咖啡因至少作用于细胞周期的2个阶段,在S期咖啡因可解除物理、化学诱变剂所诱发的DNA 损伤对复制叉启动的抑制作用⁽¹³⁾;在G2期,咖啡因可以抑制DNA 损伤引起的G2期延长,相对缩短修复DNA 损伤的时间⁽¹⁾。本实验中,咖啡因增加了MMC 诱发的染色体型

和染色单体型畸变,这也表明咖啡因可以作用受精卵的G1期和G2期,抑制金黄地鼠卵母细胞的复制前和复制后修复系统对MMC 诱发人精子DNA 损伤的修复,从而增强MMC 对人精子的诱变效应。加入咖啡因后处理,MMC 诱发的畸变以染色体型为主,表明咖啡因在G1期对地鼠卵母细胞的修复系统的抑制作用更明显,在体细胞研究中,大多数报道,咖啡因在G2期作用显著。其原因尚有待进一步研究。

参考文献

1. Nataraj A T. Origin and significance of chromosomal alterations. In: Mutations in man Obe G, ed 1984: 156
2. Kishi K. Effects of repair inhibition in the G1 phase of clastogen- treated human lymphocytes on the frequencies of chromosome- type and chromatid- type aberrations and sister- chromatid exchanges *Mutat Res*, 1987; 176: 105
3. Hernandez P, Mingo R, Gonzalez- Fernandez A, et al Relationship of chromosomal damage induced by caffeine to growth temperature and ATP level in proliferating cells *Mutat Res*, 1986; 164: 327.
4. Ishii Y, Bender MA. Caffeine inhibition of prereplication repair of mitomycin C- induced DNA damage in human peripheral lymphocytes *Mutat Res*, 1978; 51: 419
5. Matsuda Y, Tobarí I Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultra- violet light (UV) and methyl and ethyl methanesulfonate (MMS and EMS). *Mutat Res*, 1988a; 198: 131
6. Kamiguchi Y, Tateno H, Mikamo K. Types of structural chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa X- irradiated in vitro. *Mutat Res*, 1990; 228: 133
7. 黄天华, 崔晓, 李丹, 等. 平阳霉素诱发人精子染色体结构畸变类型. 癌变·畸变·突变, 1994; 6(1): 11.
8. 黄天华, 刘鸿福, 蔡敏, 等. 丝裂霉素C 诱发人精子染色体结构畸变与诱发DNA 损伤在地鼠中的修复. 中国遗传学会第五次代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编, 中国的遗传学研究, 1994—1995, pp. 251.
9. 黄天华, 崔晓, 李丹, 等. 平阳霉素诱发人精子染色体畸变. 遗传, 1991; 13(6): 24
10. Temporado C, Benet J, Genesca A, et al Human sperm chromosomes *Hum Reprod*, 1988; 3(2): 133
11. Link CJ, Micheld JR, Evans K, et al Caffeine inhibits gene- specific repair of UV- induced DNA damage in

hamster cells and in human xeroderma pigmentosum group C cells *Carcinogenesis*, 1995; 16(5): 1149

12 Ceccherini I, Shrana I, Loprieno N. Kinetics of chromosomal aberrations and first mitosis division in human lymphocytes exposed to mitomycin C. *Mutat Res*, 1988;

208: 183

13 Painter RB. Effect of caffeine on DNA synthesis in irradiated and unirradiated mammalian cells *J Mol Biol*, 1980; 143: 289

妊娠终止药在生殖毒性试验中的设计方案

林 飞

中国药品生物制品检定所 北京 100050

妊娠终止药包括流产(坠胎)药、引产药和促产(催产)药,临床分早期流产药(如前列腺素F₂、塞普酮等),中期引产药(如利凡诺、天花粉、芫花脂等)和晚期催产药(催产素、安定、蓖麻油等)。其剂型以口服制剂和注射剂为多,其药理作用主要是能刺激子宫强烈收缩;宫腔血液供应减少,胎盘与子宫体分离;使胎膜组织坏死、变性;或直接致胎儿死亡等,达到引产或促产的目的⁽¹⁾。在临床由于使用药物不当或其他原因,未终止妊娠使胎儿出生者时有发生,在妊娠早期和中期正值胚胎发育形成阶段,妊娠终止药物进入体内,又可通过胎盘屏障,直接作用于胎盘或胎儿,给胎儿的生长发育造成重大打击,使生长发育障碍或畸形的发生率明显增加。为防止引产未遂,出生后的胎儿出现畸胎或其他发育障碍,进行临床前动物的生殖毒性试验是必不可少的。但在试验中首先面临的困难就是具有较明显药理学活性的妊娠终止药,一般在较大的剂量下给予受孕鼠后,因明显的药效学作用而出现生殖毒性反应——流产,而无法将试验继续进行下去,得不到试验结果。降至很低的剂量其结果如能得到阳性,则判定具有生殖毒性的存在是有意义的;但是如果

是阴性结果,则不能判定该药无生殖毒性,原因是较高剂量可能存在的生殖毒性,在低剂量下没有显示出来。我们在药品检测过程中遇到上述问题,在参考国际、国内有关标准和指导原则基础上^(2,3),考虑到该类药物的有关的细则以及特殊性,在进行各项动物体内试验和高剂量组剂量设定时,制定出一套设计方案:

方案一:按新药有关标准要求⁽⁴⁾进行常规致畸胎试验,即在受孕鼠第6—15天每天给药1次,连续给药10天,高剂量组的确定一般综合考虑以下几个因素:相同给药途径和动物的LD₅₀的1/2—1/3量;1g/kg/日的限度剂量或最大给药量;动物药效学高剂量组的倍量或有效剂量;给药后出现受孕鼠体重增长缓慢或下降,阴道流血或流产;受孕鼠出现低于10%的死亡率⁽⁵⁾。如果预试验发现动物高剂量已经低于临床人的拟用量,则正式试验在临床人用量1/2—1/8范围设两个剂量进行试验。所得阳性结果对分析和评价该药具有重要意义;阴性结果则意义不大,仍需选用其他方案进行试验。

方案二:根据动物妊娠期⁽⁶⁾的几个阶段(如小鼠着床期1—4天,早期6—8天,中期

余云香等:DNA 诱发损伤的修复与染色体畸变关系的研究——咖啡因对人类精子染色体的影响(正文见 13 页)

图 1—6 说明见正文