

从表 2 结果可见,在 15mg/l 以下剂量组,个别小鼠胚胎形态分化出现异常,表现为胚胎翻转不完全或后神经孔未闭,但与对照组相比差异无显著性($P > 0.05$),也无剂量—反应关系,可能系整个胚胎发育迟缓的表现。15mg/l 组小鼠胚胎除生长发育严重迟缓外,还出现了身体躯干扭曲、胚胎未翻转、神经管未闭合等畸形,表明钒在该剂量下可导致小鼠胚胎形态分化异常。

讨 论

关于钒有无致畸等发育毒性曾长期未得出一致的结论,为此 WHO 专家组(1987)建议对此问题作进一步研究。作者曾根据整体动物研究结果,提出钒对大、小鼠的致畸等发育毒性可能存在种属差异,即钒对大鼠的发育毒性较小鼠敏感的假设,并认为这是以往对钒有无致畸性认识不一致的主要原因⁽⁶⁾。根据现有整体动物试验结果显示,虽然钒对大、小鼠均可诱致胚胎或胎鼠致死,影响生长发育等发育毒性,但在致畸性上存在明显差异,大鼠均观察到不同程度的致畸作用,而小鼠尚未见有致畸阳性的报道。从诱致发育毒性的严重程度和钒的染毒剂量来看,大鼠也明显比小鼠敏感⁽⁶⁾。

本试验结果显示,VO₅ 浓度达 15mg/l 时才对小鼠胚胎的生长发育和形态分化出现明显影响,而此时各观察指标均已出现明显改变,说明胚胎已出现明显毒性。因此,该剂量下的形态分化异常可能由于胚胎毒性导致严重发育迟缓所致,而非特异性作用所致。而在大鼠体外全胚胎培养试验中,VO₅ 在 2.5mg/l 剂量时即可对胚胎生长、形态分化诱发明显异常(另文发表)。这从体外试验也证实了大、小鼠对钒的发育毒性存在敏感性差异。

参考文献

1. 张天宝,苟晓燕,杨大昌. 五氧化二钒对 NIH 小鼠发育毒性的研究. 华西医科大学学报, 1990; 1(4): 12
2. Wide M. Effect of short-term exposure to five industrial metals on the embryonic and fetal development of the mouse. *Environ Res*, 1984; 33: 47.
3. Corlton BD, Beneke MD, Fisher GL. A sssessment of the teratogenicity ammonium vanadate using Syrian golden hamsters. *Environ Res*, 1982; 29: 256
4. paternain JL. Developmental toxicity of vanadium in mice after oral administration. *J Appl Toxicol*, 1990; 10: 181.
5. 张天宝,孙棉龄,杨在昌. 小鼠着床后全胚胎培养方法的建立及其应用. 癌变·畸变·突变, 1995; 7(1): 23
6. 张天宝,杨在昌,曾长纓,等. 五氧化二钒对大鼠发育毒性的研究. 华西医科大学学报, 1993; 24(1): 92

⁶⁰Co γ射线离体照射诱发人精子和淋巴细胞染色体畸变的比较

刘金荣¹ 傅宝华² 黄自明³ 吕玉民² 任春仙¹ 陈玉浩² 韩林² 赵风玲²

山西省计划生育科学研究所 太原 030006 ²河南省职业病防治研究所 郑州 450052 ³河南省肿瘤研究所

摘要 本文对⁶⁰Co γ射线离体照射诱发的人精子和淋巴细胞染色体畸变进行了分析。在对照 1.01、1.81 和

2.99Gy 剂量组, 两类细胞的畸变细胞率和结构畸变率基本相同。结构畸变类型明显不同, 精子染色体以断裂型畸变为主, 是淋巴细胞断裂型畸变的 4 倍; 淋巴细胞以互换型畸变为主, 是精子互换型畸变的 7 倍。讨论了两类细胞染色体畸变类型差异的可能原因及用电离辐射诱发淋巴细胞染色体畸变的结果外推其对生殖细胞作用的可行性。

关键词 ^{60}Co γ 射线离体照射; 人精子; 外周血淋巴细胞; 染色体畸变

COMPARISONS OF CHROMOSOME ABERRATIONS INDUCED BY IN VITRO ^{60}Co γ - RAY IRRADIATIONS IN HUMAN SPERM AND LYMPHOCYTES

Liu Jinrong¹, Fu Baohua², Huang Ziming³, Lu Yumin², Chen Yuhao², Ren Chunxian¹, Han Lin², Zhao Fengling²

Shanxi Family Planning Research Institute, Taiyuan 030006, ²Henan Institute of Occupational Disease, Zhengzhou 450052, ³Henan Institute of Cancer Research, Zhengzhou 450003

Abstract Frequencies and types of chromosome aberrations in human sperm and lymphocyte from one healthy man were compared after in vitro ^{60}Co γ ray irradiation with 0, 1.01, 1.81 and 2.99Gy. The results indicated that the frequencies of chromosomal aberration and structural aberration were similar in two cell types, respectively. However, the types of structural chromosome aberrations were distinctly different. The incidence of breakage-type aberrations in sperm was about 4 times higher than that in lymphocyte; The incidence of exchange-type in lymphocyte was about 7 times higher than that in sperm. The possible cause that types of structural aberrations were distinctly different in the two cell types was discussed. The feasibility of using lymphocytes as surrogates for germ cells in genetic risk estimation was discussed.

Key words ^{60}Co γ - ray in vitro irradiation; human sperm; peripheral blood lymphocyte; chromosome aberration

人精子与去透明带地鼠卵受精制备人精子染色体技术的建立, 使直接评价电离辐射诱发的遗传风险并与体细胞的结果作比较成为可能。一些学者对放疗和/或化疗后的肿瘤患者^(1,2)、事故受照患者⁽³⁾受照若干年后的精子和淋巴细胞染色体畸变作了比较分析, 均观察到精子染色体畸变显著高于淋巴细胞, 而且两类细胞染色体畸变类型也各不相同。在离体照射条件下, 两类细胞的染色体畸变细胞率类似, 但结构畸变类型明显不同⁽⁴⁾。我们进一步用 ^{60}Co γ 射线离体照射人精子和淋巴细胞, 对两类细胞染色体畸变类型、畸变细胞率和结构畸变率及与照射剂量的关系进行了比较分析, 并对两类细胞染色体畸变类型

差异的可能原因以及用淋巴细胞染色体畸变结果评价生殖细胞遗传风险的可行性进行了讨论。

材料和方法

1. 实验材料

精液标本和肝素抗凝静脉血取自一名 31 岁的健康男性, 采样前 6 个月内无放射线和诱变药物接触史; 鼠卵取自 6~8wk 龄雌性金黄地鼠。

2. 照射条件

将精液标本放于无菌小烧杯中, 37℃ 温箱中液化 20~30min, 然后等分成两份, 分装于无菌塑料管中, 一份用于 ^{60}Co γ 射线照射,

另一份作对照。将欲照射的精液和外周血标本置于 37 的塑料水杯中用钴源照射,剂量分别为 1.01、1.81 和 2.99Gy,剂量率为 1.79Gy/m in。

3 精子和淋巴细胞染色体制备

人精子与去透明带金黄地鼠卵离体受精及精子染色体制备程序如前文⁽⁵⁾。

外周血淋巴细胞培养及染色体制备按本室常规方法⁽³⁾。

4 染色体畸变分析与计数指标如前文⁽³⁾。

结果

精子和淋巴细胞染色体结构畸变类型、结构畸变细胞率和结构畸变分别列于表 1、表 2 中。精子染色体结构畸变共有 7 种类型。其中以染色体断裂和无着丝粒断片为主,其次是染色单体互换、染色体型互换(双+环)

和染色单体断裂,易位和缺失所占比例较少;淋巴细胞染色体结构畸变有 5 种类型,其中以双+环为主,其次是无着丝粒断片,染色单体断裂、易位和缺失占有较小比例。在 0.00、1.01、1.81 和 2.99Gy 剂量点,精子染色体的结构畸变细胞率(y_1)和结构畸变率(y_2)及淋巴细胞染色体的结构畸变细胞率(y_3)和结构畸变率(y_4)均分别与照射剂量(D)成非常显著正相关,相关公式分别为: $y_1 = 6.62 + 16.11D$, $r = 0.999$; $y_2 = 5.75 + 27.33D$, $r = 0.998$; $y_3 = 0.31 + 18.86D$, $r = 0.999$; $y_4 = -3.65 + 29.54D$, $r = 0.992$ 。从上述相关公式看, y_1 与 y_3 的斜率分别为 16.11 和 18.86,两者相比 $P > 0.05$; y_2 与 y_4 的斜率分别为 27.33 和 29.54,两者相比 $P > 0.05$ 。说明两类细胞染色体的结构畸变细胞率和结构畸变率基本相同,没有显著性差异。

表 1 精子染色体结构畸变类型、结构畸变精子率和结构畸变率

剂量 (Gy)	分子精 子数	畸变细胞 率(%)	结构畸 变率(%)	染色体各型畸变数						
				csb	ace	ctb	dic+ r	cte	del	t
0.00	360	6.39(23)a	7.22(26)b	14	7	2	1	2	0	0
1.01	143	23.08(33)	30.07(43)	23	12	2	1	4	1	0
1.81	200	36.00(72)	57.00(114)	61	35	4	5	8	0	1
2.99	88	54.55(48)	87.50(77)	18	46	3	5	4	0	1

a 为畸变精子数, b 为结构畸变数

表 2 淋巴细胞染色体结构畸变类型、结构畸变细胞率和结构畸变率

剂量 (Gy)	分子精 子数	畸变细胞 率(%)	结构畸 变率(%)	染色体各型畸变数				
				dic+ r	ace	ctb	t	del
0.00	200	0.5(1)a	0.5(1)b	0	0	1	0	0
1.01	200	18.5(37)	19.5(39)	20	18	1	0	0
1.81	200	35.5(71)	50.5(101)	72	24	2	2	1
2.99	200	56.5(113)	86.5(113)	127	40	1	3	2

a 为畸变细胞数, b 为结构畸变数

当以每个精子和淋巴细胞中染色体畸变数为指标分析时,精子和淋巴细胞染色体断裂型畸变数(y_5 , y_6)、互换型畸变数(y_7 , y_8)亦分别与受照剂量(D)成非常显著正相关,相

关公式分别为: $y_5 = 0.051 + 0.241D$, $r = 0.998$; $y_6 = 0.009 \pm 0.069D$, $r = 0.999$; $y_7 = 0.007 + 0.032D$, $r = 0.996$; $y_8 = -0.052 + 0.227D$, $r = 0.982$ 。从上述相关公式看,精子染

染色体断裂型畸变明显高于淋巴细胞染色体, 约为 4/1, 而淋巴细胞互换型畸变的比例远远高于精子染色体, 约为 7/1。精子和淋巴细胞均是以染色体型畸变为主, 亦分别与照射剂量(D)成非常显著正相关($y = 0.042 + 0.251D$, $r = 0.997$ 和 $y = -0.040 + 0.289D$, $r = 0.992$), 精子染色单体型畸变与照射剂量有线性关系($y = 0.015 + 0.023D$, $r = 0.989$), 而淋巴细胞单体型畸变未见剂量依赖关系(表 2)。

讨 论

本文用⁶⁰Co γ射线和 Brandriff 等⁽⁴⁾用¹³⁷Cs γ射线离体照射人精子与淋巴细胞诱发染色体畸变的研究结果均表明: 电离辐射离体照射诱发人精子和淋巴细胞染色体结构畸变细胞率是类似的, 结构畸变类型明显不同, 精子染色体断裂型畸变明显高于淋巴细胞, 淋巴细胞染色体互换型畸变明显高于精子。Brandriff 等认为这可能与以下两种因素有关: 一, 由于精子本身不具备修复 DNA 损伤的能力, 精子 DNA 损伤的修复只能在地鼠卵中进行, 而地鼠卵和淋巴细胞的细胞周期明显不同, 精卵融合后 4h 即从 G1 期进入 S 期, 由 PHA 刺激的淋巴细胞从 G1 期进入 S 期则大约需 24h, 所以形成双着丝粒体的 G1 期在地鼠卵中比在淋巴细胞中短得多; 二, 精子染色体是单倍体, 其染色体臂的数目是双倍体淋巴细胞的一半, 因此, 照射后在精子中形成双着丝粒体的机会就比在淋巴细胞中要少。与本文实际观察到的精子双着丝粒体畸变较少, 淋巴细胞双着丝粒体较多的结果是一致的。此外, 两类细胞结构畸变类型的差异, 可能还与地鼠卵和淋巴细胞中 DNA 损伤修复机制的不同有关⁽⁶⁾。

用各种环境诱变因素诱发的染色体畸变来评价人类的遗传风险, 过去大多是用体细胞或动物生殖细胞的结果外推到人类生殖细胞, 但所得结果是不可靠的⁽⁷⁾。随着人精子染色体制备技术的建立与完善, 可以对诱变因

子诱发的遗传风险做直接的预测和评价, 这已得到越来越多的实验证实。Martin 等⁽¹⁾、Genesca 等⁽²⁾对放疗和/或化疗的肿瘤患者和我们对象受照者⁽³⁾精子和淋巴细胞远期遗传效应的分析中, 均发现精子染色体畸变显著高于同期淋巴细胞, 用精子染色体畸变分析评价电离辐射诱发的远期细胞遗传效应比淋巴细胞染色体要直接可靠得多。但在离体照射条件下, Brandriff 等⁽⁴⁾和本文均观察到两类细胞的结构畸变细胞率基本相同, 畸变类型明显不同。说明离体照射条件下精子和淋巴细胞染色体对电离辐射的敏感性基本相同, 同时又不能相互代替。

众所周知, 在活体受照条件下, 淋巴细胞染色体对电离辐射的敏感性与离体照射基本相同, 研究电离辐射离体照射诱发淋巴细胞染色体畸变的重要目的是建立剂量效应曲线, 以便对事故受照或其它原因受照患者的受照剂量做出估算。但是, 随着照后时间的推移, 淋巴细胞染色体畸变绝大多数均已丢失, 不能准确反映电离辐射诱发的远期遗传效应。而生殖细胞染色体要复杂得多, 尽管对人精子染色体在体内、体外对电离辐射的敏感性是否一致还需进一步研究, 但可以肯定的是医疗或事故照射若干年后生殖干细胞来源的精子染色体畸变仍保持在一个较高水平^(1,2,5)。可见, 直接对受照者精子染色体畸变进行分析, 评价电离辐射诱发的远期遗传效应, 可能比淋巴细胞直接可靠。对此, 还需做进一步研究。

参考文献

1. Martin H, Radenakor A, Hidebrand K, et al A comparison of chromosomal aberrations induced by in vivo radiotherapy in human sperm and lymphocytes *Mutat Res*, 1989; 226: 21.
2. Genesca A, Barrios L, Miro R, et al Lymphocyte and sperm chromosome studies in cancer-treated man. *Hum Genet*, 1990; 84: 353.
3. 吕玉民, 傅宝华, 刘金荣, 等。⁶⁰Co 全身照射后人精子与外周血淋巴细胞染色体畸变比较 中华医学遗传学杂志,

- 1994; 11 (6): 329
- 4 Brandriff BF, Gordon LA, A sworth L K, et al Chromosomal aberrations induced by in vitro irradiation: Comparisons between human sperm and lymphocyte *Environ Mol Mutagen*, 1988; 12: 167.
- 5 傅宝华, 刘金荣, 吕玉民等. ^{60}Co 全身照射诱发人精子染色体畸变的研究 *中华放射医学与防护杂志*, 1995; 15 (1): 10
- 6 Kaniguchi Y, Tateno H, Miamo K. Types of structural chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa X - irradiated in vitro. *Mutat Res*, 1990; 228: 133
- 7 Buul PPW van. Absence of correlation between the chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and stem cell spermatogonia in mammals *Mutat Res*, 1982; 95: 69.

人精子 2 细胞胚微核技术在化学诱变研究中的应用

陈壁锋 黄天华¹ 李来玉 林珏龙¹ 郑巧玲 黄建民¹

广东省职业病防治院 广州 510260 ¹汕头大学医学院 汕头 515063

摘要 人精子经化学诱变剂处理后与去透明带金黄地鼠卵受精, 在离体条件下孵育 18 小时后发育为 2 细胞胚, 采用压片技术观察每个 2 细胞胚的微核形成情况。平阳霉素 10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 诱发微核 2 细胞胚率分别为 39.0%、50.0%、58.11%, 微核均数依次为 0.99、1.58、2.02, 微核指数依次为 2.54、3.17、3.48。与阴性对照组相应的微核 2 细胞胚率 17.19%、微核均数 0.40、微核指数 2.32 比较差异有显著性意义; 并且三个指标均存在明显的剂量反应关系。实验结果表明, 人精子 2 细胞胚微核试验是一种评价环境化学物质对人类精子染色体畸变效应的简便快捷的监测技术。

关键词 人精子; 2 细胞胚; 微核试验; 平阳霉素

THE APPLICATION OF MICRONUCLEUS TEST IN 2-CELL EMBRYOS TO STUDYING CHEMICAL MUTAGENICITY ON HUMAN SPERM

Chen Bifeng, Huang Tianhua¹, Li Laiyu, Lin Juelong¹, Zheng Qiaoling, Huang Jianming¹

Guangdong Provincial Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Guangzhou 510260, ¹Shantou University Medical College, Shantou 515063

Abstract Human spermatozoa were exposed to chemical mutagen and then fertilized with the zona-free golden hamster oocytes. After about 18 hours in vitro incubation, the 2-cell embryos were collected for observing the formation of micronuclei by a squashing technique. The incidences of micronucleated 2-cell embryos, induced by Pingyangmycin of 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, were 39.0%, 50.0% and 58.11% respectively; the number of micronuclei per 2-