

## 平阳霉素诱发人精子染色体结构畸变类型\*

黄天华<sup>1</sup> 崔晓<sup>2</sup> 李丹<sup>2</sup> 蔡敏<sup>1</sup>

<sup>1</sup>汕头大学医学院生殖生物学研究室 汕头 515063 <sup>2</sup>四川省计划生育科学研究所 成都 610041

**摘要** 人精子经平阳霉素处理后与去透明带地鼠卵受精,继而制备染色体进行核型分析。结果显示断裂是诱发畸变的主要类型,其后依次为互换、缺失、环和粉碎化;染色体型畸变的比例和均数远高于染色单体型;断裂型畸变的比例和均数远高于重接型。畸变中17.3%为重接型,表明金黄地鼠卵母细胞中的DNA损伤修复系统能够修复化学诱变所致人精子DNA损伤。染色体型互换多于染色单体型互换提示:对这类损伤的修复,复制前修复系统可能比复制后修复系统作用更强。研究结果还证实染色体畸变精子和正常精子同样具有与卵受精的能力,提示人精子若反复或长期暴露于环境诱变因子,所产生的DNA损伤有可能在精子中积累并在受精时不受选择性淘汰而传递给下一代。

**关键词** 平阳霉素;人精子;诱发畸变;去透明带地鼠卵;DNA损伤修复系统

## TYPES OF STRUCTURAL CHROMOSOME ABERRATIONS INDUCED BY PINGYANGMYCIN IN HUMAN SPERMATOZOA *IN VITRO*

Huang Tianhua<sup>1</sup>, Cui Xiao<sup>2</sup>, Li Dan<sup>2</sup>, Cai Min<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Reproductive Biology, Shantou University Medical College, Shantou 515063 <sup>2</sup>Sichuan Family Planning Research Institute, Chengdu 610041

**Abstract** The karyotypes of human spermatozoa which are exposed to pingyangmycin before interspecific *in vitro* fertilization with zona-free hamster ova are analyzed. The break is the predominant type of pingyangmycin induced-aberrations, being followed by exchange, deletion, ring and pulverization in that order. A far higher incidence of chromosome-type aberrations than chromatid-type ones and of breakagetype aberrations than rejoining-type ones are observed. 17.3% of pingyangmycin-induced structural chromosome aberrations are rejoining-type. This indicates that the DNA repair system present in golden hamster oocytes is effective to some extent in golden hamster oocytes is effective to some extent in repairing chemical-induced sperm DNA lesions. The pre-replication repair system seems to operate more effectively than the post-replication ones because chromosome-type exchanges are induced more frequently than chromatid-type exchanges. It demonstrates that fertilizing capacity of spermatozoa with structural chromosome aberrations is as same as those with normal chromosome

\* 国家自然科学基金资助项目

complements. This suggests that if human spermatozoa are exposed to mutagens repeatedly or for long period, DNA lesions thereby induced are accumulated in them and may be transmitted to next generation without being selected out at fertilization.

**Key words** pingyangmycin; human spermatozoa; induced aberrations; zona-free hamster ova; DNA repair system

人精子染色体制备技术的建立为人们直接研究环境中理化因子对人类配子的诱变效应提供了有效手段。一些学者从健康男性获得精样，在离体条件下用  $x^{(1)}$ 、 $\gamma^{(2)}$ 、 $\beta^{(3)}$  线照射，发现受照射组染色体结构畸变精子率比对照组显著增高并有剂量效应。Kamiguchi<sup>(4)</sup> 等对  $x$  线诱发的人精子染色体结构畸变类型进行了分析并对电离辐射所致精子 DNA 损伤的修复机制进行了探讨。除了上述物理诱变研究外，黄天华等进行了化学诱变分析，发现平阳霉素<sup>(5)</sup>、环磷酰胺<sup>(6)</sup> 能诱发人精子染色体结构畸变，畸变精子率与断裂均数随着药物剂量增加而增高。不过平阳霉素诱发的人精子染色体结构畸变类型有何特点？它们与电离辐射诱发的和正常男性精子核型中自发的结构畸变有何异同？平阳霉素诱发的人精子 DNA 损伤能否修复以及何种修复系统起主导作用等迄今在国内外文献中未见报道。这些问题的阐明对于人类配子化学诱变研究无论在理论上还是在应用实践上都有重要意义，为此本文对平阳霉素诱发的人精子染色体畸变类型进行了分析。

## 材料和方法

### 1. 化学诱变剂：平阳霉素

### 2. 实验材料

2.1 人精液标本取自半年内无射线及诱变药物接触史的健康男性。

2.2 鼠卵取自 6~8 周龄雌性金黄地鼠

### 3. 实验分组

3.1 平阳霉素组：精子样本分别用最终浓度为 20、40、60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  平阳霉素处理。

3.2 自发畸变组：本组资料来自作者对 9 名正常男性 536 个精子核型分析。

### 4. 实验方法

地鼠卵超排、人精子与去透明带地鼠卵样本制备、受精、受精后异合卵培养及精子染色体制片见参考文献<sup>(5)</sup>。

### 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。

在资料分析中将记录的畸变按染色体型、染色单体型、断裂型和重接型分类。断裂型包括：染色体断裂、缺失、粉碎化和染色单体断裂；重接型包括染色体互换（双着丝粒体、相互易位）、染色单体互换（包括四射体、四射体）及环状染色体。

5.2 畸变均数 = 观察到的结构畸变数 ÷ 所分析的精子数

#### 5.3 百分比

以染色体和染色单体两型畸变的总数为基数计算两型畸变各在其中所占的百分比；以断裂和重接两型畸变的总数为基数计算两型畸变各在其中所占的百分比。

## 结 果

本研究对平阳霉素组 303 个和正常男性组 536 个精子核型进行了分析，实验结果见表 1、2。平阳霉素诱发的人精子染色体结构畸变以下简称诱发畸变，正常男性精子核型中的自发结构畸变以下简称自发畸变。

本研究中诱发的染色体(cs)畸变有断裂、缺失、互换、环和粉碎化 5 种类型。

以断裂型为主，其后依次为互换，缺失、环和粉碎化。诱发的染色单体 (ctd) 畸变仅发现互换型。除了缺失和染色单体互换外，其他各型畸变均数随着药物剂量增加而增高。自发畸变有断裂、缺失和互换 3

种类型。以断裂为主，染色体畸变未发现环和粉碎化，染色单体畸变仅发现断裂和互换。各型畸变均数明显低于诱发畸变 (表 1)。

**Tab 1 Types of chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa exposed to pingyangmycin**

Groups	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	No. of sperm analyzed	Total No. of aberrations	Breaks		Deletions		Exchanges		Ring	Pvz
				cs	ctd	cs	ctd	cs	ctd		
Pingyang-mycin	20	100	150 (1.500)	109 (1.090)	0 (0.0)	13 (0.130)	0 (0.0)	16 (0.160)	7 (0.070)	4 (0.040)	1 (0.010)
	40	100	227 (2.270)	164 (1.640)	0 (0.0)	22 (0.220)	0 (0.0)	31 (0.310)	3 (0.030)	5 (0.050)	2 (0.020)
	60	103	329 (3.194)	252 (2.447)	0 (0.0)	19 (0.184)	0 (0.0)	46 (0.447)	2 (0.019)	8 (0.078)	2 (0.019)
Controls	0	536	48 (0.090)	35 (0.065)	2 (0.004)	3 (0.006)	0 (0.0)	6 (0.011)	2 (0.004)	0 (0.0)	0 (0.0)

\* cs, chromosome-type aberrations; ctd, chromatid-type aberrations.

\*\* Figures in parentheses indicate that the incidence of pingyangmycin-induced aberrations per spermatozoon.

**Tab 2 The incidences and Percentages of chromosome, chromatid, breakage and rejoining aberrations**

Groups	Dose $\mu\text{g}/\text{ml}$	No. of sperm analyzed	Chromosome aberrations	Chromatid aberrations	Breakage aberrations	rejoining aberrations
Pingyang-mycin	20	100	1.43 (1.430)	7 (0.070)	123 (1.230)	27 (0.270)
	40	100	2.42 (2.240)	3 (0.030)	188 (1.880)	39 (0.390)
	60	103	3.175 (3.175)	2 (0.019)	273 (2.650)	56 (0.544)
(Sum)		303	694 [91.3%]	12 [1.7%]	584 [82.7%]	122 (17.3%)
Controls	0	536	44 (0.082) [91.7%]	4 (0.008) [8.3%]	40 (0.075) [83.3%]	8 (0.015) [16.7%]

Figures in brackets ( ) indicate the means of pingyangmycin-induced aberrations per spermatozoon, and in [ ] indicate the percentages of chromosome, chromatid breakage and rejoining aberrations respectively.

平阳霉素 20、40、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$  各剂量组染色体型畸变均数依次为 1.43、2.42、3.175；染色单体型依次为 0.07、0.03、0.019；断裂型依次为 1.23、1.88、2.65；重接型依次为 0.27、0.39、0.544。除了染色单体型外，其他各型畸变均数随着药物剂量增加而增高。自发畸变组染色体型畸

变均数为 0.082，染色单体型为 0.008；断裂型为 0.075，重接型为 0.015。各型畸变均数明显低于平阳霉素各剂量组(表 2)。

平阳霉素组染色体型畸变百分比为 91.3%，染色单体型为 1.7%；断裂型为 82.7%，重接型为 17.3%。自发畸变组染

染色体畸变百分比为 91.7%，染色单体型为 8.3%，断裂型为 83.3%，重接型为 16.7%(表 2)。

## 讨 论

### 1. 平阳霉素诱发人精子染色体结构畸变类型的特点

本研究中平阳霉素诱发人精子染色体结构畸变的主要类型是断裂，其后依次为互换、缺失、环和粉碎化。染色体型畸变的比例和畸变均数远远高于染色单体型畸变，断裂型畸变的比例和畸变均数远远高于重接型畸变。这一结果与 Kamiguchi 等<sup>(4)</sup>关于 x 线诱发人精子染色体结构畸变的研究结果一致，表明平阳霉素诱发的精子 DNA 损伤与电离辐射诱发的相似。平阳霉素为不依赖 S 期化学物，属于拟放射性致断剂，这可能是它们诱发精子染色体结构畸变的类型为什么与电离辐射相似的原因。

本研究中自发畸变以断裂为主，其次为互换和缺失。与平阳霉素诱发畸变比较，其差别在于①结构重排型畸变少，未观察到环和染色体严重受损的粉碎化现象；②各型畸变均数明显低于诱发畸变。

### 2. 精子 DNA 损伤修复机制分析

已有研究表明，哺乳动物精子本身不具备修复电离辐射<sup>(7)</sup>或化学诱变<sup>(8)</sup>所致 DNA 损伤的能力。不过当精子进入卵母细胞后，这种修复则有可能实现。Matsuda 等<sup>(9)</sup>对小鼠受精卵研究发现，X 线诱发的小鼠精子染色体结构畸变 40% 以上是互换型，并且全是染色体型互换，所占比例如此之高表明小鼠卵母细胞中的 DNA 损伤修复系统对 X 线诱发的精子 DNA 损伤具有很强的修复力。他们还发现应用切除修复抑制剂 3-氨基苯甲酰胺 (3-aminobenzamide) 可使诱发的染色体型结构畸变明显增加，表明小鼠卵母细胞

中切除修复系统在 X 线所致精子 DNA 损伤的修复中起主要作用。Kamiguchi 等<sup>(4)</sup>的研究发现 X 线诱发的人精子染色体结构畸变大约 10% 为互换型，但染色单体型互换多于染色体型互换，因此认为金黄地鼠卵母细胞中的 DNA 损伤修复系统能够修复电离辐射所致人精子 DNA 损伤，但与小鼠不同，在金黄地鼠卵母细胞中，复制后修复系统似乎比切除修复系统作用更强。

本研究中，平阳霉素组重接型畸变的比例高达 17.3%，这是由于平阳霉素处理造成人精子 DNA 链断裂，而后继发的修复错误使 DNA 损伤“固定”下来的结果。它表明金黄地鼠卵母细胞中的 DNA 损伤修复系统也能对化学物诱发的人精子 DNA 损伤进行修复。精子染色质在受精前和进入卵后极短暂时间处于 G1 期。平阳霉素是不依赖 S 期化学诱变剂，本研究用在受精前处理精子，除了观察到大量染色体型结构畸变外，还观察到了染色单体互换。后者的产生可能是由于金黄地鼠卵母细胞中的 DNA 损伤修复系统在复制后修复中发生错误的结果。与 Kamiguchi 等的结果恰好相反，平阳霉素诱发的染色体型互换多于染色单体型互换。这种差异的产生可能是导致人精子 DNA 损伤的 2 种诱因即电离辐射与化学诱变不一样，对于平阳霉素诱发的精子 DNA 损伤，金黄地鼠卵母细胞中的复制前修复系统似乎比复制后修复系统有更强的作用。

在自发畸变组，染色体型畸变的比例和均数高于染色单体型畸变；断裂型畸变的比例和均数高于重接型畸变。这和诱发畸变的结果相似，只不过与平阳霉素各浓度组相比，自发畸变中各型畸变均数远远低于诱发畸变(表 2)，但就自发畸变本身而言，重接型畸变所占比例为 16.7%，表明金黄地鼠卵母细胞中的 DNA 损伤修复系

统同样能够修复自发的人精子 DNA 损伤。

### 3. 畸变精子的受精能力

本研究结果表明,人精子接受化学物平阳霉素处理后,即使其染色体严重受损仍能保持与卵受精的能力。也就是说,对能够进行正常获能和顶体反应的精子,不管其染色体组正常还是发生了畸变,它们与卵受精机会相等,卵本身不具备对染色体异常精子进行选择性排斥的能力。Kamiguchi 等<sup>(4)</sup>用 X 线处理人精子后与去透明带地鼠卵受精的研究、Matsuda 等<sup>(10)</sup>对小鼠同种体外受精的研究、Kamiguchi 和 Tateno 等<sup>(11,12)</sup>对金黄地鼠和中国地鼠同种体内受精的研究均发现电离辐射诱发染色体畸变的精子保持了很高的受精能力。上述研究结果提示人精子若反复地或长期地暴露于某些诱变因子,由此而诱发的 DNA 损伤有可能在精子中积累并在受精时不受选择性淘汰而传递给下一代<sup>(4)</sup>,因此应用人精子染色体分析来检测各种环境诱变因子的遗传学效应,并在人类生活中尽可能避免诱变因子对人精子的损害,这对于提高人类素质具有重要的意义。

### 4. 尚待进一步探讨的问题

化学诱变剂分为两大类:不依赖 S 期的和依赖 S 期的。前者称为拟放射性致断剂,后者称为拟紫外线致断剂。本研究所用平阳霉素仅是拟放射性致断剂中的 1 种。而在化学物中占大多数的拟紫外线致断剂诱发的人精子染色体畸变类型有什么特点?金黄地鼠卵母细胞中的 DNA 损伤修复系统对这类化学物所致 DNA 损伤的修复作用如何?除了拟放射性和拟紫外线外,结构上千差万别的化学物对人精子染色体的诱变以及它们所致 DNA 损伤的修复作用又有何特殊性?这些都是未知的世界尚待人们进一步探讨。

### 参 考 文 献

1. Kamiguchi Y, Tateno H, Shimada M, et al.  $\gamma$ -ray induced chromosome aberrations in human spermatozoa. In: Mohri H, ed. *New Horizons in Sperm Cell Research*. New York: Japan Sci press, Tokyo/Gordon and Breach Sci publ, 1987: 117-123
2. Brandriff BF, Gordon LA, Ashworth LK et al. Chromosomal aberrations induced by vitro irradiation: Comparison between human sperm and lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 1988; 12(2):167
3. Kamiguchi Y, Tateno H, Mikamo K. Dose-response relationship for the induction of structural chromosome aberrations in human spermatozoa after *in vitro* exposure to tritium  $\beta$ -rays. *Mutat Res*, 1990;228:125
4. 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
5. 黄天华, 崔变晓, 漆 著, 等. 平阳霉素诱发人精子染色体畸变. *遗传*, 1991; 13(6): 24
6. 黄天华, 崔 晓, 李 丹, 等. 为精子染色体离体测试系统中 S9 混合物的应用. *癌变, 畸变, 突变*, 1993; 5(5):6
7. Ono T, Okada S. Radiation-induced DNA single-strand scission and its rejoining in spermatogonia and spermatozoa of mouse. *Mutat Res*, 1977; 43:25
8. Sega GA. Unscheduled DNA synthesis in the germ cells of male mice exposed *in vivo* to the chemical mutagen ethyl methanesulfonate. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1974; 71:4955
9. Matsuda Y, Tobari I. Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm and mature oocytes. *Mutat Res*, 1989; 210:35
10. Matsuda Y, Yamada T, Tobari I. Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized *in vitro* after irradiation. I. Chromosome aberrations induced in sperm after X-irradiation. *Mutat Res*, 1985; 148:113
11. Kamiguchi Y, Tateno H, Shimada M, et al. Radiation-induced chromosome damage in spermatozoa: comparison between human and other mammalian species. *Jpn J Human Genet*, 1988; 33:227
12. Tateno H, Kamiguchi Y, Shimada M, et al. Cytogenetic effects of X- and  $\gamma$ -rays on spermatozoa of the Chinese hamster. *J Radiat Res*, 1989; 30:95