

文章编号:1004 - 616X(2002)02 - 0080 - 04

论著 ·

双色荧光原位杂交检测正常人精子 9、18 号染色体非整倍体率

李 欣¹, 郑履康², 邓丽霞², 张 桥²

(1. 广东省疾病预防控制中心毒理所, 广东 广州 510300; 2. 中山医科大学公共卫生学院遗传毒理研究室, 广东 广州 510080)

【摘要】目的:测定健康人精子 9、18 号染色体非整倍体率。**方法:**用 9、18 号染色体着丝粒探针与精子核进行双色荧光原位杂交, 计数非整倍体率。**结果:**检查 16 位健康捐精者 156 955 个精子, 每人约计数 10 000 个精子。平均杂交率 > 99%, 平均 9 双体率 0.050% \pm 0.030%, 18 双体率 0.033% \pm 0.025%, 二倍体精子率 0.040% \pm 0.036%, 9 缺体率 0.067% \pm 0.037%, 18 缺体率 0.048% \pm 0.034%, 无荧光点精子率 0.427% \pm 0.357%, 总数目畸变率 0.218% \pm 0.071%。**结论:**测定了 16 例健康人精子 9、18 号染色体非整倍体率, 与传统的人精子染色体分析法测定的结果相近。

【关键词】荧光原位杂交; 非整倍体; 精子

中图分类号: Q343 文献标识码: A

DETECTION OF ANEUPLOIDIES FOR CHROMOSOME 9, 18 IN SPERM OF NORMAL MALES USING TWO-COLOR FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

LI Xin¹, ZHENG Lu-kang², DENGLi-xia², ZHANG Qiao²

(1. Lab. Of Genetic Toxicology, Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China; 2. Lab. Of Genetic Toxicology, School of Public Health, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

【Abstract】 Purpose: To detect the frequencies of aneuploidy for chromosome 9 and 18 in sperm of healthy males. **Methods:** Two-color fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed on sperm nuclei using centromeric probes for chromosome 9 and 18, and the frequencies of aneuploidy were scored. **Results:** 156 955 sperm nuclei were detected in 16 healthy adults. About 10 000 sperm nuclei were scored from each of 16 donors and the average efficiency of hybridization was above 99%. The mean frequencies of disomy obtained were 0.050% \pm 0.030% for chromosome 9, 0.033% \pm 0.025% for chromosome 18. The nullisomy frequencies of chromosome 9 and 18 were found to be 0.067% \pm 0.037%, 0.048% \pm 0.034% respectively. Diploidy was observed as 0.040% \pm 0.036%. The frequency of total numerical aberration was 0.218% \pm 0.071%. **Conclusion:** The aneuploidy for chromosome 9 and 18 in sperm of 16 healthy males was detected in this research, the result was similar to that of traditional sperm karyotype analysis.

【Key words】fluorescence *in situ* hybridization; aneuploidy; spermatozoa

非整倍体是引起人类出生缺陷、智力低下、肿瘤形成、不孕不育和自发流产的重要原因。染色体三体

收稿日期: 2001-07-24; 修订日期: 2001-08-27
 基金项目: 广东省自然科学基金(001334)
 作者简介: 李欣(1973-), 女, 河北人, 医师, 硕士, 研究方向: 遗传毒理。
 通信作者: 郑履康(E-mail: Zhenglk@gzsums.edu.cn)

胚胎绝大多数在妊娠中以自然流产告终,其中只有13、18、21及性染色体非整倍体的胚胎可发育到成熟至娩出。非整倍体多发生于生殖细胞减数分裂过程,绝大多数的三体来自母方生殖细胞的不分离,约10%来自父方¹;某些三体病(47, XYY)额外染色体100%来自父方。目前对人精子染色体非整倍体率的研究已成为一个热点。

由于精子染色质高度凝集,直接分析人精子染色体非整倍体十分困难。荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)不仅能检测中期相染色体,还能检测间期细胞核,与传统的精子染色体分析方法相比,具有简便、快速、灵敏的特点。近年国内外多位学者用FISH法测定了正常人精子染色体非整倍体率^{2~6}。我们也曾报道了正常人X、Y染色体双体率^{7,8},本次实验应用双色荧光原位杂交法检测了9、18号常染色体的非整倍体率,现报道如下。

1 材料与方方法

1.1 对象 选择不接触化学毒物,近3个月无放射线和致突变药物接触史的健康捐精者16例,平均年龄(28.63 ± 4.99)岁(22~37岁)。精液标本用手淫法采集,液化后分装于小塑料离心管中, - 70 保存(未加化学防腐剂)。

1.2 双色荧光原位杂交 地高辛标记的经典卫星9号染色体探针(D9Z1)和生物素标记的卫星18号染色体探针(D18Z1),均购自Oncor公司,具体过程见我室已建立的方法⁷。

1.3 观察与计数 用Nikon荧光显微镜油镜(×100),通过三色滤色块(DAPI/FITC/Texas Red Chroma)观察精子核并计数,每例约计数10 000个间期精子核。记录以下几种精子数(在1个精子头内): 含红、绿2个荧光点(正常单倍体精子); 含两红

两绿4个荧光点(二倍体精子); 含一绿两红3个荧光点(18双体); 含一红两绿3个荧光点(9双体); 含1个红荧光点(9缺体); 含1个绿荧光点(18缺体); 无荧光点(null)的精子。在1个精子核内如有3个杂交信号(两红一绿或两绿一红),两个同色光点大小、形状和亮度相同,距离至少等于一个光点直径,判为非整倍体超单倍体精子。

1.4 统计学处理 所有数据用SPSS 8.0 FOR WINDOWS软件包处理,精子畸变为Poisson分布。

2 结果

2.1 捐精者精液 16名受试者精液量平均为(3.31 ± 1.42) ml,平均精子计数为(94.19 ± 60.74) × 10⁹/L,精子活率(56.87 ± 11.81)%,活动度在正常范围。

2.2 精子染色体非整倍体检测结果 在荧光显微镜下可见精子头部经DAPI复染后呈蓝色,边缘清楚,正常单倍体精子有红、绿两个荧光点。标本背景清晰,荧光信号强。

2.2.1 计数精子数与杂交效率 共计数16名正常人的156 955个精子核,平均杂交率为(99.57 ± 0.36)% (98.70%~99.93%)。

2.2.2 精子9、18号染色体数目畸变 每一受试者标本计数约10 000个精子,记录有异常的精子并计算其畸变率。18号染色体双体率平均为(0.033 ± 0.025)%,9号染色体双体率(0.050 ± 0.030)%,二倍体精子率(0.040 ± 0.036)%,9缺体率(0.067 ± 0.037)%,18缺体率(0.048 ± 0.034)%,未杂交精子率(null) (0.43 ± 0.35)%,总数目畸变率 = (18双体 + 9双体 + 二倍体 + 9缺体 + 18缺体)精子数/所有计数的精子,总数目畸变率(0.218 ± 0.071)%。结果见表1。

表1. 双色FISH法检测正常人精子间期核9、18号染色体数目畸变结果

Table 1. Results of numerical aberrations of chromosome 9 and 18 in sperm of normal men by two-color FISH

Sample	Number	Null (%)	Diploidy (%)	Disomy 18 (%)	Disomy 9 (%)	Nullisomy 9 (%)	Nullisomy 18 (%)
1	11 242	17(0.15)	4(0.035)	2(0.018)	2(0.018)	8(0.071)	3(0.027)
2	8 732	25(0.29)	3(0.034)	6(0.069)	2(0.023)	8(0.092)	6(0.069)
3	10 424	38(0.36)	1(0.010)	2(0.019)	4(0.038)	4(0.038)	4(0.038)
4	11 274	27(0.24)	1(0.009)	9(0.080)	8(0.071)	10(0.089)	1(0.009)
5	9 824	22(0.22)	3(0.031)	2(0.020)	0(0)	6(0.061)	2(0.020)
6	10 066	131(1.30)	3(0.030)	5(0.050)	8(0.080)	10(0.099)	12(0.119)
7	9 406	78(0.83)	1(0.011)	3(0.032)	3(0.032)	12(0.128)	12(0.128)
8	9 767	15(0.15)	7(0.072)	4(0.041)	1(0.010)	5(0.051)	2(0.021)

Sample	Number	Null (%)	Diploidy (%)	Disomy 18 (%)	Disomy 9 (%)	Nullisomy 9 (%)	Nullisomy 18 (%)
9	9 887	103 (1.04)	6 (0.061)	3 (0.030)	7 (0.071)	6 (0.061)	7 (0.071)
10	9 610	42 (0.44)	1 (0.010)	1 (0.010)	3 (0.031)	13 (0.135)	4 (0.042)
11	9 020	25 (0.28)	1 (0.011)	1 (0.011)	5 (0.055)	6 (0.067)	5 (0.055)
12	8 334	59 (0.71)	5 (0.060)	2 (0.024)	6 (0.072)	1 (0.012)	2 (0.024)
13	9 719	34 (0.35)	4 (0.041)	3 (0.031)	3 (0.031)	8 (0.082)	4 (0.041)
14	9 892	29 (0.29)	15 (0.152)	8 (0.081)	10 (0.101)	1 (0.010)	4 (0.040)
15	9 290	10 (0.11)	3 (0.032)	1 (0.011)	8 (0.086)	6 (0.065)	3 (0.032)
16	10 468	7 (0.07)	4 (0.038)	0 (0)	8 (0.076)	2 (0.019)	4 (0.038)
sum	156 955	662	62	52	78	106	75
mean	9 810	41 (0.43)	4 (0.040)	3 (0.033)	5 (0.050)	7 (0.067)	5 (0.048)
s	797	0.36	0.036	0.025	0.030	0.037	0.034

2.2.3 统计分析 结果表明,9 双体率与 9 缺体率, 18 双体率与 18 缺体率,18 缺体率与 9 缺体率,18 双体率与 9 双体率间均未发现染色体畸变率间存在差异。

3 讨论

双色 FISH 可同时检测两条染色体,还可区分双体精子与二倍体精子、缺体精子与未杂交精子,不仅提高了检测效率且增加了检测非整倍体率的准确性

和可信性,是检测精子常染色体数目畸变的较好方法。

本研究应用的 FISH 方法,荧光信号强,背景清晰,非特异性杂交少,杂交效率 > 99 %。共测定 16 名正常健康人 156 955 个精子核,9 号染色体双体精子率为(0.050 ± 0.030) %,18 号染色体双体率为(0.033 ± 0.025) %。国外报道,18 号染色体双体率在 0.03 % 至 0.36 % 间,9 号双体率在 0.11 % 至 0.29 % 间,不同作者报道相差 3 ~ 10 倍(见表 2)。

表 2. 不同研究者 FISH 法测得正常人精子二倍体率(%)及 9、18 号染色体双体率(%) 的比较
Table 2. Comparisons of disomy and diploidy for chromosome 9,18 using FISH by different authors

Authors	Number of men	Number of cells	Criteria	Deconcentration treatment	Diploidy	Disomy 9	Disomy 18
Williams (1993) ^a	9	26 022	1 dia	DTT/LIS	0.34		0.08
Griffin (1995) ^b	24	16 254	1 dia	DTT/LIS	0.19		0.04
Spriggs (1995) ^a	5	10 000	1 dia	DTT/LIS	0.18		0.11
Abruzzo (1996) ^b	14	13 000	1 dia	DTT/LIS			0.03
Spriggs ^{3 1} (1996) ^a	5	10 000	1 dia	DTT/LIS	0.19	0.14	0.11
More ^{4 1} (1997) ^a	97	500	d. s.	DTE/DMSO	0.05		0.2
Human sperm/ hamster egg fusion present	16	10 000	1 dia	DTT/LIS	0.04	0.056	0.044
						0.050	0.033

^a two-color FISH, ^b three-color FISH, criteria (scoring criteria, d. s.: Distinct signals, 1 dia: one diameter distance between homologous signals, respectively), DTT: dithiothreitol, LIS: lithium diiodosalicylate, DTE: dithioerythritol. The data above was referred to Guttenbach's paper², except special introduction.

表 3. FISH 法与人精子/仓鼠卵体外异种受精法测得 9、18 号染色体双体精子率比较:

Table 3. Comparisons of frequencies of sperm disomy for chromosomes 9,18 obtained by FISH and by the hamster/egg technique for human sperm cytogenetics

	Sperm FISH assays ^c		Hamster egg technique ^d		P value
	No. of disomic sperm	Freq./10 ⁴ sperm	No. of disomic sperm	Freq./10 ⁴ sperm	
disomy 9	78	5.0	10	5.6	> 0.42
disomy 18	52	3.3	8	4.4	> 0.34

^c Based on 156 955 sperm nuclei, ^d based on 17 998 sperm nuclei²

不同作者所得双体率之间的明显差别,主要是实验条件的差异,例如精子染色体去凝集的方法不同,判断双体的标准不同等。Guttenbach 等²将不同实验室实验条件相同的结果加以比较,不同作者的差别明显缩小。如与我们实验条件相同(去凝集用 DTT/LIS,同一精子内两相同荧光点相距一个光点直径判为双体)的试验结果进行比较,我们的 18 号染色体双体率(0.033%)与 Abruzzo 等(0.03%)及 Griffin 等(0.04%)所测的结果相近。9 号染色体唯有 Spriggs 的试验条件与我们相近,我们测得的 9 号双体率(0.05%)较 Spriggs 的 0.14%为低。虽然如此,我们测得的 9、18 号染色体双体精子率,与传统的人精子染色体分析法所得双体率更为接近(表 3)

以上说明我们用 FISH 法测得的 9、18 号染色体双体率与传统人精子染色体分析法测得的数值是相近的($P > 0.05$)。

本研究中 9、18 号染色体的双体率与缺体率间的比均接近 1:1,经分析差异无显著性,这是符合减数分裂过程中双体精子率与缺体精子率数目相同的规律的。我们观察的结果与 Baumgartner 等⁹的结果类似,他们在实验中也观察到 16、21 号染色体双体率与缺体率相等的情况。

我们所得的二倍体精子率(0.04%)(表 2)低于 Griffin 等和 Spriggs 的 0.19%、0.18%值,处于较低的水平,可能与实验条件不完全一致有关。这方面仍有待做更多的研究。

参考文献:

- 1 Abruzzo MA, Hassold TJ. Etiology of Nondisjunction in Humans J. *Environ Mol Mutagen*, 1995, 25(supple 26):38~47.
- 2 Guttenbach M, Engel W, Schmid M. Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations J. A review. *Hum Genet*, 1997, 100:1~21.
- 3 Spriggs EL Rademaker AW, Hartin AH. Aneuploidy in human sperm: the use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction J. *Am J Hum Genet*, 1996, 58:356~362.
- 4 Morel F, Mercier S, Roux C, et al. Estimation of aneuploidy levels for 8, 15, 18, X and Y chromosomes in 97 human sperm samples using fluorescence *in situ* hybridization J. *Fertil Steril*, 1997, 67(6):1134~1139.
- 5 Shi Q, Martin RH. Spontaneous frequencies of aneuploid and diploid sperm in 10 normal Chinese men: assessed by multicolor fluorescence *in situ* hybridization J. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 90:79~83.
- 6 黄建民, 黄天华, 方小武, 等. 用荧光原位杂交技术检测人精子核的非整倍体性 J. *中华医学遗传学杂志*, 1997, 14(4):248~249.
- 7 刘胜勤, 郑履康, 邓丽霞, 等. 用双色荧光原位杂交法检测苯系物接触工人精子染色体数目畸变 J. *中华预防医学杂志*, 2000, 34(1):17~19.
- 8 郑履康, 刘胜勤, 邓丽霞, 等. 用双色荧光原位杂交检测人精子染色体非整倍体率 J. *中华医学遗传学杂志*, 1999, 16(2):116~118.
- 9 Baumgartner A, Van Hummelen P, Lowe XR, et al. Numerical and structural chromosomal abnormalities detected in human sperm with a combination of multicolor FISH assays J. *Environ Mol Mutagen*, 1999, 33:49~58.

中国环境诱变剂学会风险评价专业委员会 第五届全国学术专题讨论会会议纪要

中国环境诱变剂学会风险评价专业委员会于 2001 年 11 月 1 日在上海市复旦大学召开了中国环境诱变剂学会风险评价专业委员会第五届全国学术专题讨论会,会议主要内容如下: 中国化妆品卫生监督管理法规和化妆品安全性评价。主讲人:中国预防医学科学院环境卫生监测所徐凤丹教授。我国药物遗传毒性试验的现状与 ICH 的差距。主讲人:中国药品生物制品检定所林飞教授。风险性评价专业委员会主任委员阎雷生教授主持了会议。与会人员包括风险性评价专业委员会委员、药物安全性评价学组成员、从事毒理学或安全评价方面的工作以及对上述专题内容感兴趣的专业技术人员共 48 人。会上围绕专题内容参会人员进行了热烈地讨论。大家普遍对药品、化妆品、食品和农药等有关规程的修订内容极其关心,希望修订内容尽早公布,以便于基层单位按照新的修订内容实施。大家对国际有关规程的认识和理解以及我国毒理学的现状各抒己见,希望有权威的机构能将试验方法的细则以多种方式公布于众,避免基层单位重复试验或走弯路。由于会议时间有限,很多问题没有更深入的讨论,很多同行希望再组织一次有关试验方法、试验原理和新规程的专题讨论。本专业委员会将在明年举办一届学术交流会,重点研讨上述内容。

中国环境诱变剂学会风险评价专业委员会
2001 年 11 月 10 日