

双色荧光原位杂交检测丙烯腈接触男工精子性染色体数目畸变

徐德祥¹ 郑履康² 邓丽霞²

¹安徽医科大学卫生毒理学教研室 合肥 230032 ²中山医科大学卫生毒理学教研室 广州 510089

摘要 本研究用荧光原位杂交技术(FISH)对9名丙烯腈接触男工和9名健康者精子性染色体数目畸变率进行了检测,结果显示,精子性染色体杂交点荧光信号强,背景清楚,在镜下容易观察;接触组和对照组杂交效率均大于99%。9名对照者X和Y精子分别为49.1%和49.6%,X、Y精子比例接近于1:1。对照人群精子性染色体数目畸变率与其它试验室检出结果基本一致。接触组和对照组分别共计数了91015和74679个精子细胞核,两组精子性染色体数目畸变率分别为0.70%和0.35%,有显著性差异;其中接触组XX、YY、XY分别为0.10%、0.23%、0.37%,明显高于对照组的0.05%、0.10%和0.20%,表明使用荧光原位杂交技术(FISH)能检出接触丙烯腈引起的精子性染色体数目畸变。

关键词 丙烯腈;精子;性染色体;非整倍体;荧光原位杂交

STUDY ON NUMERICAL CHROMOSOME ABERRATION IN HUMAN SPERM CELLS ON ACRYLONITRILE-EXPOSED WORKERS USING TWO-COLOR FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

常分离的风险⁽⁵⁾。

C-有丝分裂分析是检测化合物是否对染色体分离具有某种影响从而导致染色体异常分离,形成非整倍体的初筛技术⁽¹¹⁾。本研究以C-有丝分裂分析初步探讨乙酰胆碱及其受体拮抗剂于染色体的正常分离是否具有直接的调节作用,结果初步证明,阿托品具有秋水仙素样的C-有丝分裂效应,提示乙酰胆碱毒蕈碱型受体既可能通过其功能途径,对微丝功能产生影响而调节细胞质裂,也可能通过同一途径,对某种有丝分裂器的功能施加影响而调节染色体分离。

参考文献

- 1 Shackney SE, Singh GH, Yakulis R, et al. Aneuploidy in breast cancer: a fluorescence in situ hybridization study. *Cytometry*, 1995, 22,(4):282
- 2 程书钧. 肺癌的研究进展. *癌变 畸变 突变*, 1997;9(6):332
- 3 Jamieson ME, Coutts JM. The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod*, 1994;9:

- 709
 - 4 PA Jacobs. The chromosome complement of human gametes. Milligan SR(ed): "Oxford Review of Reproductive Biology, 14" New York: Oxford University Press. 1992:47
 - 5 Onfelt A, Soderpalnr-Berndes C, Wiberg K. Antagonists to cholinergic receptors increase the frequency of binuclear V79 Chinese hamster cells. A mechanism for induction of aneuploidy. *Mutat Res*, 1992; 281:267
 - 6 张德成. 动物细胞受体学基础. 北京:中国农业出版社,1996:74-84
 - 7 周永自,王世祥. 新编药物手册. 第二版. 北京:金盾出版社, 1992:140-142
 - 8 张德成. 动物细胞受体学基础. 北京:中国农业出版社,1996:78-81
 - 9 周永自,王世祥. 新编药物手册. 第二版. 北京:金盾出版社, 1992:17-18
 - 10 汪旭, Miller B, Kliesch U, et al. 三种有丝分裂抑制剂诱发小鼠骨髓细胞非整倍体的比较研究. *遗传学报*, 1991;18(4):312
 - 11 Miller BM, Adler ID. Suspect spindle poisons: Analysis of C-mitotic effects in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis*, 1989;4:208
- (1998-11-20投稿;1999-03-17修回)

Abstract In this study, Fluorescence in situ hybridization(FISH) was used to investigate rates of sex chromosome aneuploidy in spermatozoa among 9 acrylonitrile-exposed workers and 9 healthy sperm donors. 74679 sperm nuclei were counted among 9 healthy sperm donors, and 91015 sperm nuclei among 9 acrylonitrile-exposed workers. The average frequency of total chromosome numerical abnormalities was 0.70% in exposure group, and 0.35% in the control. XY-bearing sperm was the most common sex chromosome disomy, with an average rate of 0.37% in exposure group, and 0.20% in the control. XX-and YY-bearing sperm accounted for an additional 0.10% and 0.23% in exposure group, and 0.05% and 0.10% in the control. Significantly increased frequencies of total sex chromosome disomy, and XX-, YY-and XY-bearing sperm were observed among acrylonitrile-exposed workers, as compared with healthy sperm donors. This study demonstrated that sperm FISH was a useful biomarker to detect and compare numerical chromosome aberration in human sperm cells for heritable risk assessment of acrylonitrile.

Key Words Aneuploidy; Sex Chromosome; Sperm; Fluorescence In Situ Hybridization(FISH); Acrylonitrile

丙烯腈(Acrylonitrile)是工业有机合成的重要单体,广泛应用于腈纶纤维、丁腈橡胶、ABS工业塑料及某些合成树脂的制造。大量动物实验和人群流行病学调查表明,丙烯腈对试验动物和人均有致癌作用^(1,2)。常规的遗传毒性实验结果表明,丙烯腈对体细胞仅表现较弱的致突变作用⁽¹²⁾。丙烯腈有明显的生殖和胚胎毒作用,引起生殖器官和生殖细胞的损害及自然流产、死胎死产和新生儿先天性畸形危险度明显增加^(3-6,21)。然而,由于长期以来缺少快速和有效的检测人类生殖细胞染色体畸变的实验方法,对有关丙烯腈是否引起人类生殖细胞染色体结构和数目畸变却了解不多。

近年来,分子生物学技术取得重大突破,荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)技术就是其中之一,并已应用于不育症患者和染色体相互易位携带者精子染色体非整倍体的检测^(14,15),也用于评价肿瘤化疗和吸烟、饮酒以及饮用咖啡等对精子染色体非整倍体的影响^(16,19)。本次研究用双色FISH方法对某腈纶厂9名丙烯腈接触男工精子性染色体数目畸变进行了检测,为探讨应用这一最新技术研究外来化学物接触男工生殖和遗传毒作用提供依据。

材料与amp;方法

1 研究对象 实验组9例,某腈纶厂生产丙烯腈男工,丙烯腈接触时间均为2.8年,各采样点各时点(每

月定时定点检测一次)丙烯腈空气浓度均低于国家车间空气卫生标准(2mg/m³)。年龄范围25-35岁。对照组9例,无丙烯腈接触史,年龄范围24-35岁。所有研究对象在近一年内无放射线和可疑药物接触史。

2 试剂 生物素标记 卫星x染色体特异DNA探针(DXZ1)、地高辛标记 卫星Y染色体特异DNA探针(DYZ3),Oncor公司产品。二硫苏糖醇(DTT),Promega公司产品。二碘水杨酸锂(LIS)、鼠抗地高辛抗体(Mouse anti-Digoxigenin)、荧光素兔抗鼠抗体(Rabbit antimouse-FITC)、荧光素羊抗兔抗体(Goat anti-Rabbit-FITC)、联咪二苯吡啶(DAPI),Sigma公司产品。Cy3-链亲和素(Cy3-streptavidin),Amersham公司产品。生物素化羊抗链亲和素抗体(Biotinylated goat anti-streptavidin),Vector公司产品。

3 仪器 Nikon AFX-IIA型荧光显微镜,由日本Nikon公司生产。DAPI/FITC/TEXAS RED三段滤色块由美国Chroma定制。

4 精液标本的采集 采用手淫法。采集前禁欲3-5d,采集后盛于无菌容器内,室温下液化后分装,-20℃保存。

5 精子间期核双色荧光原位杂交试验 根据我室建立的双色荧光原位杂交方法,具体操作步骤如下:冷冻精液室温液化后用0.01mol Tris-0.09%NaCl洗涤三次,调节精子密度至6×10⁶/ml,涂片,室温下老化至少48h后分别用10mmol DTT浸泡30mins,

10mmol LIS 和 1mmol DTT 浸泡 30mins 至 3h,待精子头部涨大约 1.5 倍时,用 2 ×SSC 冲洗晾干,依次用 70%,80%,100% 的无水乙醇脱水各 2mins。取 X、Y 探针各 0.5μl 加于 10μl 杂交混合液(含 55% 的甲酰胺、10% 的硫酸葡聚糖和 0.5μg/ml 的鲑鱼精子的 DNA)于 71 °C 水浴中变性 5 mins,取出迅速置冰浴中;另将精子标本玻片 37 °C 的 2 ×SSC 中浸泡 30 mins,置 70% 甲酰胺中 71 °C 变性 2.5min,取出迅速依次浸入 70%、80%、100% 的冰乙醇各 2min,晾干,每片加含探针的杂交液 4μl,封片,置 37 °C 培养箱内 16 - 24h;依次在下列溶液中冲洗:50% 甲酰胺 45 °C 浸洗 2 次,每次 7.5mins,2 ×SSC 37 °C 浸洗 2 次,每次 4mins,磷酸缓冲液(PBD)中浸洗 10mins,加 0.5% 阻断液 5μl,37 °C 10mins,PBD 洗 2 次,每次 3mins,依次分别加下列检测液:1、Cy3 - 链亲和素(10μg/ml)与鼠抗地高辛抗体(1:200)混合液,2、生物素化羊抗链亲和素抗(10μg/ml)与荧光素兔抗鼠抗体(1:200)混合液各 5μl,每次加入检测液后立即置 37 °C 30mins,PBD 洗 3 次,每次 3mins,加 DAPI(0.5μg/ml) 5μl 复染,37 °C 水浴 10mins,PBD 洗 3 次,每次 3mins,加抗褪色液 8μl 后封片。

6 镜检和计数 在配置 DAPI/FITC/TEXAS RED 三色滤色块的荧光显微镜油镜下选择边缘完整清晰,无重叠,荧光信号强的精子核计数。每个样本计数约 10 000 个精子。分别记录 X-、Y-、XX-、YY-、XY- 精子以及无杂交信号和三个以上杂交信号精子数目。

7 统计分析 所有数据用 SPSS FOR WINDOWS 软件包处理,接触组和对照组精子染色体畸变率的比较采用 U 检验。

结 果

1 杂交效率:对 9 名健康者和 9 名丙烯腈接触男工精子性染色体进行的检测结果显示,精子性染色体杂交点荧光信号强,背景清楚,在镜下容易观察(见图 1);接触组和对照组杂交效率均为 99.1% (见表 1)。

1.2 X、Y 精子比例:丙烯腈接触组共计数 91015 个精子,其中 X 和 Y 精子分别为 48.7% 和 49.6%;对照组共计数 74679 个精子,其中 X 和 Y 精子分别为 49.1% 和 49.6%;接触组和对照组 X 与 Y 精子比例均接近于 1:1,无明显差异(见表 1)

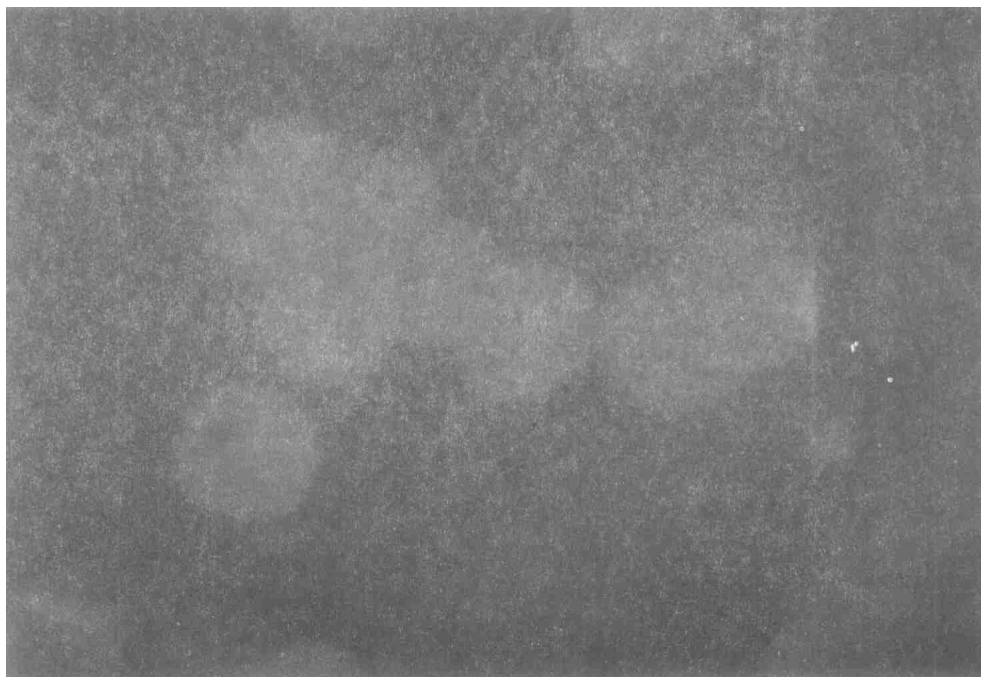


图 1 荧光原位杂交检测的精子性染色体。红点(所指者)为 X 染色体,绿点为 Y 染色体,两点线点(所指者)为 YY 染色体。

Table 1 comparison of hybridization efficiency and sex ratio between acrylonitrile-exposed workers and controls

Group	No. of Cells	No. of Signals	Hybridization Efficiency %	X (%)	Y (%)	X Y
exposure	91015	90222	99.1	44337(48.7)	45152(49.6)	0.98
control	74679	74034	99.1	36687(49.1)	37000(49.6)	0.99

2 性染色体数目畸变率 表 2 和表 3 分别为健康者和接触丙烯腈男工受检精子细胞中 XX、YY 和 XY 精子数及各受试者精子性染色体数目畸变率。结果显示,接触丙烯腈男工精子性染色体数目畸变率为 0.70%,明显高于对照组 0.35%。接触组 XX、YY 和 XY 精子百分率分别为 0.10%、0.23%和 0.37%,明显高于对照组的 0.05%、0.10%和 0.20%。

Table 2 Frequencies of sex chromosome numerical aberration for each individual in healthy sperm donors

Subject	Cell	Nullisomy (%)	rates of disomy			
			XX (%)	YY (%)	XY (%)	Total (%)
3	10121	56(0.55)	3(0.03)	13(0.13)	34(0.34)	50(0.49)
6	10374	56(0.55)	5(0.05)	9(0.09)	18(0.18)	32(0.31)
7	8754	45(0.51)	4(0.05)	10(0.11)	20(0.23)	34(0.39)
8	9791	169(1.73)	6(0.06)	8(0.08)	19(0.19)	33(0.34)
9	9983	39(0.39)	3(0.03)	9(0.09)	23(0.23)	35(0.35)
10	5906	43(1.57)	5(0.05)	11(0.19)	9(0.15)	25(0.40)
11	8790	43(0.49)	2(0.02)	3(0.13)	7(0.08)	12(0.14)
12	4028	44(1.09)	2(0.05)	4(0.10)	7(0.17)	13(0.32)
13	6932	99(1.43)	6(0.09)	10(0.14)	10(0.14)	26(0.38)
Total	74679	595(0.70)	36(0.05)	77(0.10)	147(0.20)	260(0.35)

Table 3 Frequencies of sex chromosome numerical aberration for each individual in acrylonitrile-exposed workers

Subject	Cell	Nullisomy (%)	Rates of disomy			
			XX (%)	YY (%)	XY (%)	Total (%)
1	8908	76(1.98)	7(0.08)	18(0.20)	45(0.51)	70(0.79)
2	10467	61(0.58)	13(0.12)	30(0.29)	28(0.27)	71(0.68)
3	10366	58(0.56)	7(0.07)	17(0.16)	28(0.27)	52(0.50)
4	10406	133(1.28)	15(0.14)	29(0.28)	26(0.25)	70(0.67)
5	9929	64(0.64)	9(0.09)	25(0.25)	40(0.40)	74(0.74)
6	9795	182(1.86)	9(0.09)	21(0.21)	27(0.28)	57(0.58)
7	10453	64(0.61)	8(0.08)	19(0.18)	32(0.31)	59(0.57)
8	10337	89(0.86)	9(0.09)	30(0.29)	60(0.58)	99(0.96)
10	10354	66(0.64)	9(0.09)	24(0.23)	48(0.46)	81(0.78)
Total	91015	793(0.87)	86(0.10)	213(0.23)	334(0.37)	633(0.70)

讨论

本次研究使用双色 FISH 技术对 9 名丙烯腈接触男工精子性染色体数目畸变率进行了检测,结果表明:丙烯腈接触男工精子性染色体数目畸变率为 0.70%,明显高于对照组的 0.35%;XX、YY 和 XY 二体率分别为 0.10%、0.23%和 0.37%,明显高于对照组的 0.05%、0.10%和 0.20%,表明丙烯腈可能是生殖细胞性染色体非整倍体突变剂,这与 Osgood 等对黑腹果蝇的研究结果一致⁽²²⁾。

生殖细胞非整倍体突变是不育、自然流产、死胎死产、胎儿先天性畸形、智力发育障碍和人类遗传病的主要原因。据报道,有 0.3%的新生儿为染色体三体畸形,其中 50%为性染色体三体畸形。而死胎和自然流产胚胎中非整倍体发生率分别为 4.3%和 35%,是正常新生儿的 10 倍和 100 倍⁽⁷⁾。无论活胎、死胎或自然流产胚胎的三体或缺体均由于父亲或母亲生殖细胞非整倍体畸变所致,常染色体三体或缺体主要来源于母亲卵子的非整倍体畸变,而性染色体三体或缺体则主要来源于父亲精子的非整倍体畸变,人类 44%的 47XXY、100%47XYY 和 80%的 45X 是由于父亲精子性染色体非整倍体畸变所致^(8,9)。

过去研究人精子染色体畸变的常规方法为人精子/金黄地鼠卵融合试验⁽¹⁰⁾,但这一方法技术要求高、费时且工作量大,难以普遍采用。FISH 技术的最大优点是可以用于测定间期细胞染色体数目畸变,对于一些体外不能分裂的细胞如成熟人精子细胞尤为合适。一些试验室通过对健康者的研究表明,用 FISH 技术检测的精子性染色体数目畸变率与用人精子/金黄地鼠卵融合实验结果基本一致,并且实验结果有很好的重要性⁽²³⁻²⁵⁾;此外,FISH 可快速检测大量精子,能准确地检测每个人的精子非整倍体发生率,并可通过增加检测精子数量检验接触组和对照组之间精子非整倍体畸变率很轻微的差异。FISH 技术还可用于检测精液异常、少精和畸形精子患者的染色体非整倍体畸变^(26,27),由于环境或职业接触外来化学物常引起少精或精子畸形,因此这一技术尤其适合用于职业接触男工的生殖和遗传毒作用研究。

用本室建立的双色 FISH 方法,对 9 名健康者和 9 名丙烯腈接触男工精子性染色体进行的检测结果显示,精子性染色体杂交点荧光信号强,背景清楚,在镜下容易观察;接触组和对照组杂交效率均大于 99%;9 名对照者 X 和 Y 精子分别为 49.1%和 49.6%,X、Y 精子比例接近于 1:1,检出的精子性染

染色体数目畸变率与其它试验室比较,在正常变动范围内^(11,13,18,19,20,23),表明这一技术用于检测精子染色体数目畸变实验结果是稳定和可靠的。

本文存在的明显缺陷是:首先,仅对丙烯腈接触男工 X、Y 二条性染色体进行了检测,而没有检测常染色体。其次,仅对丙烯腈接触男工精子染色体数目畸变进行了检测,而没有检测结构畸变。此外,用二色 FISH 检测精子性染色体数目畸变不能区分二体和二倍体以及研究对象太少,这些均有待以后的研究中逐步改进和不断积累。

参考文献

- 1 Maltoni CA. Carcinogenicity on bioassays rats of acrylonitrile administered by inhalation and ingestion. *Med Law*, 1977;68:401
- 2 O Berg M. Epidemiology study of workers exposed to acrylonitrile. *J Occup Med*, 1980;22:245
- 3 吴维铠,苏江,黄美媛,等 6 接触丙烯腈男工的生殖结局流行病学调查. 中华劳动卫生职业病杂志,1994;12:261
- 4 李芝兰. 丙烯腈对女工生殖机能影响的调查. 中国工业医学杂志,1996;9:43
- 5 Lambotte-Vandepaer M and Duverger-van Bogaert M. Genotoxic properties of acrylonitrile. *Mutat Res*, 1984;134:49
- 6 Recio I, Skopek TR. Mutagenicity of acrylonitrile and its metabolite 2-cyanoethylene oxide in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*, 1988;206:297
- 7 Hassold T, Jacobs PA. Trisomy in man. *Annu Rev Genet*, 1984;18:69
- 8 Hassold T, Pettay D, Robinson A, et al. Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45, X conceptuses. *Hum Genet*, 1992;89:647
- 9 Abruzzo MA, Hassold T. The etiology of nondisjunction in humans. *Environ Mol Mutagen*, 1995;25(Suppl. 2):38
- 10 Rudak E, Jacobs PA, Yanagamachi R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, 1978;274:911
- 11 Martin RH, Spriggs E, Rademaker AW. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidy and diploidy frequencies in 225846 sperm from 10 normal man. *Biol Reprod*, 1996;54:394
- 12 WHO. IPCS international programme on chemical safety: Environmental Health Criteria 28: Acrylonitrile. Geneva, 1983.
- 13 Griffin DK, Hassold TJ. Nondisjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Hum Mol Genet*, 1995;4:2227
- 14 Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, et al. Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by two and three color fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1995;71:240
- 15 Lahdetie et al. Incidence of aneuploid spermatozoa among infertile men studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet*, 1997;71:115
- 16 Monteil M, Rousseaux S, Chevret E, et al. Increased aneuploid frequency in spermatozoa from a Hodgkin's disease patient after chemotherapy and radiotherapy. *Cytogenet Cell Genet*, 1997;76:134
- 17 Robbins WA, Meistrich ML, Morre D et al. Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nature Genet* 1997;16:74
- 18 Han TL, Ford JH, Webb GC, et al. Simultaneous detection of X- and Y-bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev*, 1993;34:308
- 19 Robbins WA, Vine MFM, Truong KY, et al. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mut*, 1997;30:175
- 20 Apriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: the use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction. *Am J Hum Genet*, 1996;58:356
- 21 Chagn CM, Stephen Hsia MT, Stoner GD, et al. Acrylonitrile-induced sister-chromatid exchanges DNA single-strand breaks in adult human bronchial epithelial cells. *Mutat Res*, 1990;241:355
- 22 Osgood C, Bloomfield M, Zimmering S. Aneuploidy in drosophila, IV. Inhalation studies on the induction of aneuploidy by nitriles. *Mutat Res*, 1991;259:165
- 23 Wyrobek AJ, Robbins WA, Mehraein Y, et al. Detection of sex chromosomal aneuploidies XX, YY, and XY in human sperm using two chromosome fluorescence in situ hybridization. *Amer J Med Genet*, 1994;53:1
- 24 Martin RH, Ko, E, Chan K. Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cytogenet Cell Genet*, 1993;64:23
- 25 Robbins WA, Baulch JE, Morre HD, et al. Three probe fluorescence in situ hybridization to assess chromosome X, Y, and 8 aneuploidy frequencies in sperm from 14 men from two healthy populations. *Reprod Fertil Dev*, 1995 77:799
- 26 Miharun N, Best RG, Young SR. Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet*, 1994;93:502
- 27 Moosai N, Pattison HA, Carter MD, et al. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Urol Androl*, 1995;64:811

(1998 - 09 - 29 收稿;1999 - 03 - 11 修回)