

文章编号:1004 - 616X(2000)03 - 0175 - 04

人卵母细胞染色体研究进展

曾荔苹综述,黄天华审校

(汕头大学医学院,广东 汕头 515031)

中图分类号:Q343

文献标识码:A

人类配子的遗传学研究具有重要意义,因为在人类配子中发生的任何遗传学异常都会给子代带来严重后果。自1978年Rudak建立人精子染色体制备技术以来,男性单倍体遗传学研究发展较快¹。而人卵母细胞染色体研究却一直进展缓慢。主要原因是:材料获得困难,因为从正常妇女获取卵母细胞进行实验研究几乎不可能;受实验技术限制,很难获得质量好的卵母细胞中期相,更难以对其染色体显带进行分析。随着生殖生物学与临床医学技术的飞跃发展,开展人类辅助生殖技术的IVF(in vitro fertilization)中心愈来愈多,为科学家们获得人卵母细胞进行实验研究提供了可能;卵母细胞染色体制片技术的改进与荧光原位杂交(FISH)技术的建立为进行人卵母细胞染色体分析提供了更好的手段。本文对

相关研究进展综述如下。

1 卵母细胞染色体畸变频率

人类减数分裂,特别是在卵子发生过程中,最易发生错误²,因此关于人卵母细胞染色体畸变频率是很多学者研究中均涉及的内容。但是不同研究室报道的结果差异甚大:亚单倍体频率为2.9%~47.2%^{3,4};超单倍体频率为2.4%~16.0%^{5,6};为排除制片过程中染色体丢失造成的偏差,非整倍体频率用超单倍体频率乘2得出,为3.0%~32.0%^{6,7}。染色体结构畸变多为断裂与无着丝粒断片,频率为4.2%~19.0%^{8,9}。结果差异的原因可能是:不同研究室所用样本大小不同;不同研究室所用实验技术各异或水平不同;由于技术水平所限,几乎所有

表1 医用材料浸提液对微核细胞率的影响

组别	浓度	PCE (个)	MN (个)	MNF (%)	PCE
					PCE+NCE(%)
壳聚糖	浸提原液	1 000	18	1.8 ±0.29	69.55
	1/5 原液	1 000	18	1.8 ±0.29	68.24
	1/10 原液	1 000	17	1.7 ±0.21	70.07
磷灰石蛋白	浸提原液	1 000	12	1.2 ±0.25	70.76
	1/5 原液	1 000	17	1.7 ±0.29	70.79
	1/10 原液	1 000	16	1.6 ±0.22	70.41
空白对照	0	1 000	19	1.9 ±0.28	66.58
溶剂对照	50 ^a	1 000	21	2.1 ±0.31	65.46
阳性对照	50 ^b	1 000	246 ^c	24.6 ±2.55	61.24

a. ml/kg b. mg/kg c. 与溶剂组比较 $P < 0.01$

微核试验是检测染色体损伤的一种快速、简便、有效的方法。为了确保应用材料的安全,本文除了对

各剂量浓度进行诱变性研究外,并设空白对照组、溶剂对照组及阳性对照组以作对比研究,使结果更加可靠。在本试验范围内,壳聚糖和磷灰石蛋白各剂量组诱导的微核细胞率均在正常范围,而阳性的微核细胞率为24.6%。本研究结果表明上述两种医用材料在本试验条件下无诱发小鼠骨髓PCE微核增加作用。

参考文献:

- 1 卫生部卫药发1997 81 号. 生物材料和医疗器械生物学评价技术要求Z. 卫生部. 1997.
- 2 中华人民共和国卫生部药政局. 临床研究指导原则汇编(致突变、致畸、致癌试验)Z. 卫生部. 1993. 215.
- 3 黄幸纾,陈星若. 环境化学物致突变致畸致癌试验方法M. 第一版. 杭州:浙江科技出版社,1985. 218.

收稿日期:1999-12-18 修订日期:2000-03-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970374)

作者简介:曾荔苹(1965-),女,广东省梅县人,主治医师,研究方向为人类配子与早期胚胎的遗传学。

研究室只有部分卵样能用于分析,未能分析的部分会使信息丢失给结果带来偏差;不同研究中所采用的卵样在体外培养时间长短不同,卵的质量随体外培养时间延长而下降,必然会影响研究结果。值得注意的是,几乎所有文献报道的卵样均取自到 IVF 中心求治的妇女。由于她们并非从正常人群中随机抽样,本身又明显存在不育问题,且卵样由激素超排所得,与正常排卵有所差别,因此严格说来,她们提供的卵样不是研究正常卵细胞遗传学的合适样本。不过,在现有科学技术条件下,上述文献仍然是了解卵细胞遗传学的宝贵资料²。

2 非整倍性发生机理

人类妊娠中至少有 5% 为非整倍体患儿,其中约 90% 系母方减数分裂错误所致,错误发生频率随着母方年龄增高而增加。据估计,年龄超过 40 岁的妇女,其卵细胞在减数分裂过程中发生错误的至少占 20%¹⁰,因此关于非整倍性发生机理及其与母方年龄的关系多年来是学者重视的课题。

2.1 着丝粒周围重组事件

人类卵子发生经历增殖、生长、成熟三个时期。在胚胎发育过程中,卵原细胞增殖并生长成初级卵母细胞。直到性成熟发生排卵前,初级卵母细胞停留在第一次减数分裂(M_I)前期中的双线期。性成熟后,每月有一个卵泡发育成熟,排卵,又恢复减数分裂过程,初级卵母细胞二价体中的两条同源染色体即两条单价体彼此分开,分别进入次级卵母细胞和第一极体,此后卵子发生停留在第二次减数分裂(M_{II})中期,直到受精后,次级卵母细胞单价体在着丝粒处分离,两条染色单体分别进入卵细胞和第二极体,完成减数分裂。

M_I 中二价体的两条单价体不分离或单价体的两条染色单体提前分离(成熟前分离,premature separation)以及 M_{II} 的单价体的两条染色单体不分离,结果都会导致非整倍体产生。

Lamb 等¹¹ 认为,非整倍体的形成与减数分裂过程中发生在着丝粒周围的重组事件有关,并为其假说提出了两种模型。(1)在卵子发生的漫长过程中,随妇女增龄卵母细胞中染色体的构型逐渐发生蜕变。若发生在着丝粒周围的重组事件减少到在 M_I 不能有效地维持二价体的稳定时,导致二价体在成熟前出

现分离,其单价体中的两条染色单体也彼此分开,进入 M_I 时,出现“染色单体型异常”,即染色体数目分别为 23 + 1/2, 22 + 1/2 或 22 + 1/2 + 1/2。此处 1/2 表示 1/2 个单价体即 1 条染色单体。(2)若发生在着丝粒周围的重组事件过多,导致二价体在成熟后也不分离。则在 M_I 中出现“染色体型”异常,染色体数目分别为 24 或 22 等。有上述核型的次级卵母细胞在受精后的减数分裂中必然形成超单倍体与亚单倍体。它们与正常单倍体精子受精将形成非整倍体胚胎。Angell¹² 报道了对 200 个人卵母细胞 M_I 核型的分析结果,发现比例高达 33% 的卵母细胞出现“染色单体型异常”。在此篇报道以前,其他作者的一些小样本研究中,也发现了与 Angell 相同的结果。因此较多的学者支持 Lamp 的第 1 种假说模型。但 Angell 及其他学者的研究在人 M_I 卵母细胞中未观察到“染色体型”异常,因此否认 Lamp 的第 2 种假说模型。黄天华等¹³ 在 50 个人 M_I 卵母细胞核型分析中,不仅观察到“染色单体型”异常,而且首次观察到 4 个核型具有“染色体型”异常,为 Lamp 的第 2 种假说模型提供了直接的实验证据。

2.2 随体联合

由于新生儿中大多数染色体异常涉及近端着丝粒染色体,因此有人假设,近端着丝粒染色体随体联合(SA)可能与染色体不分离或结构重排的形成有关¹⁴。

黄天华等¹³ 对 25 例 IVF 术后病人自愿捐赠的 50 个卵母细胞进行了 SA 分析,病人平均年龄 34.96 (28~42) 岁。SA 总频率为 0.36, D-D、D-G、G-G 联合频率分别为 0.01、0.18、0.08。远高于在人精子染色体中观察到的结果,后者 SA 总频率为 0.11; D-D、D-G、G-G 联合频率分别为 0.039、0.058、0.015¹⁵。

他们还将供卵者分为 ≤34 岁和 >34 岁两个组,对两组的 SA 频率与染色体异常的卵母细胞率进行了比较分析。在 ≤34 岁组,SA 总频率为 0.32, D-D、D-G 和 G-G 联合频率分别为 0.05、0.18 和 0.09。在 >34 岁组 SA 总频率为 0.39, D-D、D-G 和 G-G 联合频率分别为 0.14、0.18、0.07。两年龄组间 SA 各种频率的差异均无统计学意义 (P > 0.05)。但在 >34 岁组中,涉及 D、G 组染色体异常的卵母细胞率高达 50%,其中 11 个卵母细胞为 D、G

组“染色单体型”异常,3个卵母细胞为D、G组“染色单体型”异常。在 ≤ 34 岁组中,仅1个卵母细胞为G组“染色单体型”异常(4.5%),未观察到“染色体型”异常。两年龄组间异常卵母细胞率的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。该研究结果不支持“SA与染色体不分离或结构重排形成有关”的假说,因为若此假说成立,则 > 34 岁组的SA频率应显著高于 ≤ 34 岁组。

3 卵母细胞染色体异常与受精率、妊娠率

在IVF项目中,受精率是与治疗结果密切相关的指标。Simerly等¹⁶研究了体外受精失败与卵母细胞染色体异常间的关系。107个卵母细胞来自45位妇女,在体外进行授精处理后仍未受精。染色体分析发现,非整倍体率为37.3%,其中亚单倍体率为11.8%,超单倍体率为21.6%,主要涉及D、G组染色体。虽然非整倍体率在相关报道的正常范围内,但超单倍体率却远远高于他人的研究结果。他们将卵母细胞不受精的原因归于卵染色体异常,并认为这是目前关于人类受精机理的知识中尚未涉及到的一种新的病理现象。

学者们在IVF的临床实践中还发现,不同年龄妇女间妊娠率明显不同,因此关于差异原因的探讨也成为学者们感兴趣的课题。Simerly等⁹对287个卵母细胞进行了分析。卵样来自151个妇女,按供卵者年龄分为 ≤ 34 岁、35-39岁、 ≥ 40 岁三个组。结果发现,三个组的卵母细胞受精率依次为50.9%、49.3%、37.9%,其差异没有统计学意义;但 ≥ 40 岁组的妊娠率(14.3%)却显著低于 ≤ 34 岁组(43.2%)。该研究还发现,三个组间的非整倍体频率没有显著差异,但卵母细胞退化率却随增龄升高,依次为23.7%、52.0%、95.8%。卵母细胞退化的特征是在M中期核型内,本应观察到的染色体却在其着丝粒处分离,形成未相联的染色单体。因此Simerly等认为,生育力随增龄下降,其原因可能更多地与卵母细胞退化、质量下降有关,而不是卵的非整倍性引起。在IVF项目中,高龄妇女不用自己的卵而接受年轻供体的卵时,其妊娠率会有明显的提高。

4 卵母细胞染色体异常与着床前诊断

着床前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)是对有遗传风险的夫妇,将其精、卵进行

体外受精,当胚胎发育到6~8细胞期时,取1~2个细胞进行遗传学分析,剔除具有遗传缺陷的胚胎,将正常胚胎植入母体子宫,以期生育正常的后代。此外,对于女性患者,也可取其极体进行遗传学分析,从而推断相应的卵母细胞是否正常,选择正常卵母细胞与其丈夫的精子受精,再将胚胎植入母体子宫。

Dyban等¹⁷应用和18号染色体卫星DNA直接标记探针,与156个人卵母细胞(M)及其第一极体(IPB)进行FISH,探讨FISH技术在PGD中诊断非整倍体的可行性。结果在151个正常的M及其相应的IPB中,每个M与IPB各观察到1个和1个18号染色体的杂交信号。另外在5个M及相应的IPB中发现,当M中少1个信号时,则在相应的IPB中多1个信号;当M中多1个信号时,则在相应的IPB中少1个信号,这是由于发生了不分离事件的结果。Dyban等的结论是,在PGD中,应用FISH技术对IPB进行分析,来推断卵母细胞是否具有非整倍性,从而避免三体患儿的产生,是一种可行的手段。

Munne等¹⁸从2例核型为45,der(13;14)(q10;q10),1例核型为46,t(4;14)(p15;q24)患者的31个卵母细胞中活检得到23个第1极体,用染色体涂色探针进行FISH分析,将推断为正常的卵母细胞与其丈夫精子受精,再将胚胎植入患者子宫,使3例患者均获得正常妊娠。

5 卵母细胞染色体诱变研究

由于取材容易,活体与离体的人精子染色体诱变研究均有大量报道¹⁹。与精子不同,人卵母细胞获得非常困难,因此迄今为止,关于人卵母细胞染色体诱变研究的文献非常有限。Simerly等²⁰研究了在离体条件下,温度对人卵母细胞的影响。他们发现,当温度冷却至室温仅10分钟,培养基中的人卵母细胞就发生变化,或纺锤体变小,或纺锤体内微管解体甚至完全消失,中期相染色体也呈无序分布。将在室温下放置10分钟或30分钟的人卵母细胞再次放回37℃培养箱中1或4小时,不到一半的卵样恢复至与未受降温处理的对照卵母细胞相似。由于纺锤体在细胞分裂中的作用至关重要,他们认为,在输卵管内配子转移和体外受精术的操作步骤中,温度的影响可能与在人早期胚胎中观察到的非整倍性发生有关。

George 等²¹ 报道了防冻剂二甲基亚枫 (DMSO) 对人卵母细胞的影响。他们将卵样分为年轻 (新鲜采样) 与老化 (体外培养时间较长)、暴露前与暴露后 4 个组,对组间微管蛋白的变化进行了比较。结果发现,随着卵母细胞离体培养时间延长,纺锤体异常频率与卵胞质中微管增生明显增加。暴露前后两组比较,染色体均排列于中期相赤道板,没有差别。但是,在没有 DMSO 的情况下,若将卵母细胞暴露于 4 将会引起纺锤体解体。他们的结论是,由于卵母细胞老化导致微管形成发生变化,使得它们不再适合用于体外受精或精子胞质内注射以治疗临床不育;加入防冻剂有助于稳定人卵母细胞的纺锤体结构;与人卵母细胞纺锤体密切相关的 gamma - 微管蛋白对卵母细胞老化和环境条件的变化非常敏感。

上述研究虽然涉及环境因素对人卵母细胞纺锤体的作用并间接影响到染色体,但并非环境因素直接诱发染色体畸变。而且本文述及的所有研究均用 M 中期的次级卵母细胞为材料,它只能反映在 M 而不能反映在 M 中发生事件的结果。次级卵母细胞受精后,完成第二次减数分裂,形成卵细胞与第二极体。只有卵细胞核型才能全面反映减数分裂中发生事件的最终结果。遗憾的是,至今并无直接制备卵细胞染色体的方法。因此有人建议,能否像制备人精子染色体那样,用异种体外受精的方法,譬如用金黄地鼠精子与去透明带人卵母细胞受精,待异合卵发育至第一次卵裂时,制备人卵细胞染色体进行分析。若能成功,将为女性单倍体遗传学的发展,包括人卵染色体的诱变研究开辟广阔的前景。

参考文献:

- 1 黄天华. 男性单倍体遗传学研究进展 J. 国外医学遗传学分册, 1992, 15(3): 113 - 117.
- 2 Warburton D. Human female meiosis: new insights into an error-prone process J. *Am J Hum Genet*, 1997, 61: 1 - 4.
- 3 Veiga A, Calderon G, Santalo J, et al. Chromosome study in oocytes and zygotes from an IVF program J. *Hum Reprod*, 1987, 2: 425 - 430.
- 4 Delhanty JDA and Penketh RJA. Cytogenetic analysis of unfertilized oocytes retrieved after treatment with the LHRH analogue, busserelin J. *Hum Reprod*, 1990, 5: 699 - 702.
- 5 Djalali M, Rosenbusch B, Wolf M, et al. Cytogenetics of unfertilized human oocytes J. *J Reprod Fertil*, 1988, 84: 647 - 652.
- 6 Macas I, Floersheim Y, Hotz E, et al. Abnormal chromosomal arrangements in human oocytes J. *Hum Reprod*, 1990, 5: 703 - 707.
- 7 Van Blerkom J, Henry G. Cytogenetic analysis of living human oocytes J. *Hum Reprod*, 1988, 3: 777 - 790.
- 8 Simerly C, Balczon R, Brinkley BR, et al. Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm infection: a double blind study J. *Hum Reprod*, 1997, 111: 2784 - 2791.
- 9 Simerly C, Balczon R, Brinkley BR, et al. Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes J? *Fertil Steril*, 1997, 111: 265 - 271.
- 10 Hassold TJ. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology J. *Environ Mol Mutagen*, 1996, 28: 167 - 175.
- 11 Lamp N, Freeman S, Austin A, et al. Susceptible chiasmata configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II J. *Nat Genet*, 1997, 14: 400 - 405.
- 12 Angell R. First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes J. *Am J Hum Genet*, 1997, 61: 23 - 32.
- 13 黄天华, 许康朴. 人卵母细胞中随体联合与染色体异常分析 J. 云南大学学报, 1999, 21: 301 - 302.
- 14 Houghton JA. Relationships between satellite association and the occurrence of non-disjunction in man J. *Mutat Res*, 1979, 61: 103 - 114.
- 15 黄天华, 蔡敏, 黄建民. 9 例正常男性 536 个精子染色体核型分析 J. 癌变. 畸变. 突变, 1995, 7(1): 15 - 19.
- 16 Simerly C, Balczon R, Brinkley BR, et al. Contribution of chromosomal abnormalities to in vitro fertilization failures J. *Rev Med Chil*, 1998, 111: 511 - 519.
- 17 Dyban A, Freidline M, Severova E, et al. Detection of aneuploidy in human oocytes and corresponding first polar bodies by fluorescent in situ hybridization J. *J Assist Reprod Genet*, 1996, 13: 73 - 78.
- 18 Munne S, Scott R, Sable D, et al. First pregnancies after pre-conception diagnosis of translocations of maternal origin J. *Fertil Steril*, 1998, 69(4): 675 - 681.
- 19 黄天华. 人精子诱变研究进展. 癌变. 畸变. 突变 J. 1994, 6(5): 1 - 3
- 20 Simerly C, Balczon R, Brinkley BR, et al. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocytes J. *Fertil Steril*, 1990, 111: 102 - 108.
- 21 George MA, Pickering SJ, Braude PR, et al. The distribution of alpha- and gamma-tubulin in fresh and aged human and mouse oocytes exposed to cryoprotectant J. *Mol Hum Reprod*, 1996, 61: 445 - 456.