

文章编号: 1007-7847(2000)S0-0056-06

FISH 在人类未受精卵染色体异常分析中的应用*

张群芳, 卢光

(湖南医科大学 人类生殖工程研究室, 中国湖南 长沙 410078)

摘要: 分子细胞遗传学的主要技术代表——荧光原位杂交(FISH) 是用荧光标记的依靠探针杂交原理在细胞核中或染色体上显示某一特定核酸序列的位置, 并可进行相对定量分析. 它广泛应用于遗传病的诊断、产前诊断、肿瘤遗传学、进化遗传学研究和基因定位等领域, 随着辅助生殖技术的进展, 将在植入前胚胎遗传学诊断(PGD)、生殖细胞(卵母细胞和精子)染色体异常的研究方面发挥更大的用途. 它是联系分子遗传学和细胞遗传学之间的桥梁.

关键词: 分子细胞遗传学; 荧光原位杂交; 人类; 未受精卵; 染色体

中图分类号: Q343

文献标识码: A

Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) Study in Human Unfertilized Oocytes with Chromosome Abnormalities

ZHANG Qun-fang, LU Guang-xiu

(The Lab of Human Reproductive, Hunan Medical University, Changsha 410078, Hunan, China)

Abstract: Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a kind of technological representative in molecular cytogenetics. Based on the principle of nucleic acid hybridization, FISH can reveal where a certain sequence locate in nucleus or chromosomes by using probes labeled with fluorescence and can provide a relative quantitative result. It is widely used in diagnosis of genetic disease, prenatal diagnosis, tumor genetics, evolutionary genetics and gene location etc. With the proceeding of artificial reproductive technology(ART), fish will play a more important role in preimplantation genetic diagnosis(PGD), study of chromosomal abnormality in zygote(eg. Oocyte and sperm). It is a bridge between molecular genetics and cytogenetics.

Key words: molecular cytogenetics; FISH; human; unfertilized oocyte; chromosome

FISH 技术在 1977 年由 Rudklin 建立后, 80 年代中期迅速发展起来, 它具有快速、安全、直观、简便、高灵敏度、高特异性等优点. 它虽然不是一项很新的技术, 但随着其技术本身的发展日新月异, 应用也日益深入和开发. 90 年代用于生殖助孕技术的植入前遗传学诊断(PGD)为 FISH 技术又赋予新的内涵. 1996 年, 国外又将 FISH 技术用于配子(未受精卵母细

* 收稿日期: 2000-05-14

基金项目: 湖南省科委基金资助项目

作者简介: 张群芳(1970), 女, 福建屏南人, 医学硕士, 博士研究生.

胞)染色体方面的研究,揭示人类体外受精(IVF)未受精卵母细胞染色体非整倍体是体外受精失败的主要原因。国内尚无这方面的报道,现将国外1996年以来有关这方面的研究进展做一综述。

1 人类未受精卵 FISH 技术要点

要切实完成人类未受精卵染色体异常的细胞遗传学检测,要经过下述步骤:①选择探针类型,②标本制备,③探针制备,④标记探针与变性靶 DNA 特异杂交,⑤荧光标记,⑥信号显示。

1.1 可适用于间期核的 FISH 杂交探针

重复序列探针包括着丝粒探针和端粒探针 Repeated sequence centromere probe, telomere probe。

1) 着丝粒探针包括在人类的着丝粒及近着丝粒区域所发现的重复 DNA 序列。优点是可用于中期相染色体或间期核 FISH 杂交,检测染色体数目异常有效,也可以进行间期核甚至染色质纤维的高分辨 FISH 作图(fiber-FISH)分析。缺点是不能检测染色体结构异常。

2) 端粒探针:端粒是指染色体末端所特有的帽子片段。人类的端粒包括数百次(TTAGGG)的核苷酸重复。端粒对于维持染色体的稳定性非常重要。最近人们从 cosmid、PAC 和 YAC 文库中分离和鉴定了全套代表每条染色体端粒的特异性 FISH 探针。端粒的变化涉及肿瘤的发生和细胞的衰老,而细胞遗传学难于研究,新的全套端粒探针为我们提供了过去所不能解决的检测患者的微小易位和缺失的能力。

3) 卫星 DNA 探针:常用于检测间期核中特异染色体数目的改变。

1.2 未受精卵 FISH 的实验步骤

1) 制片:将未受精卵用传统的方法去透明带,低渗后用 3% 甲醇-冰醋酸的固定液或 0.01% Tween 20/0.01 NHCl 固定于干净玻片上,玻片在 75 °C, 70% 甲酰胺溶液中温育,使 DNA 解链,然后固定在冷乙醇中以防止在加入探针前 DNA 链退火。

2) 探针选择:选择端粒探针或着丝粒探针,探针片段用生物素、地高辛等试剂标记。

3) 杂交:标记的探针在含甲酰胺、盐、硫酸葡聚糖的杂交液中混合,对于重复序列探针,则加入封闭 DNA(常为 ssDNA)以控制探针非特异性结合于染色质或玻片上,湿盒中 37 °C 杂交过夜。

4) 荧光信号检测、拍照:洗脱错配或未杂交的探针后,把玻片与免疫荧光试剂共同温育,在探针杂交的位置形成荧光。

5) 信号显示:荧光原位杂交过的片子在荧光显微镜下通过选择合适的滤光片可以观察及照相。

2 FISH 技术研究近况

人卵母细胞(oocyte)的数量远不及精细胞,但其非整倍体率远远高于精细胞。有学者分析了至少 4 000 个人卵细胞,其中 26.5% 为异常卵母细胞,13.3% 为亚单倍体,8.1% 为超单倍体,1.6% 为结构异常,3.5% 为二倍体。非整倍体频率大约为 10%,但不同学者之间的结果差异很大,从 3% ~ 32% 不等,并且不同染色体的二倍率各不相同。但 Jacobs 认为卵母细胞来源为不孕患者在 IVF 时通过促性腺激素刺激细胞获得,并在受精失败后用作研究材料。它们

并不代表正常妇女的非整倍体频率。

1996 年, Benkhalifa^[1] 等学者研究未卵裂卵与 IVF 体外受精失败的关系, 并比较与女性年龄组、卵泡刺激方案的关系。标本来源于 1990~1994 年实行 IVF 的 208 名患者(年龄 21~42 岁)的 920 个卵和 94 个受精后 4 h 未卵裂的卵。实验对象随机分为两组: 第一组: GRH+ hMG 方案, 第二组: CC+ hMG 用修正的气干法固定标本, FISH 程序按试剂盒说明进行。

920 个无原核卵中, 710 个固定成功(77.5%, 710/920), 按有无第一极体分为两组, 无第一极体卵 135 枚, 排出第一极体的卵 575 枚(81%, 575/710)停留于有丝分裂中期。其中, 124 枚(21.5%)染色体正常, 103 枚(18%)非整倍体, 21 枚(3.5%)有结构异常。在 575 个卵中的 153 个精原细胞染色体呈单体排列。

第二组卵(排出第一极体的)统计未成熟的螺旋化的精子染色体(prematurely condensed sperm chromosomes, PCC)、非整倍体率、女性年龄、超排方案之间关系。结果发现 PCC 出现率与不同年龄及两种超排方案无统计学上意义。卡方检验, $P > 0.05$ 。

12 个卵用 18 着丝粒探针 FISH 检测, 11 个正常, 1 个显示 18 单体被认为处于有丝分裂中期, 15 枚卵用 21 特异性探针, 10 个正常, 1 个为单体, 4 个未检测到信号。17 个卵用 X 探针检测, 2 个未显示杂交, 14 个显示卵和第一极体正常分离, 一个为 X 单体(异常分离)。

此外, 发育阻滞胚胎(受精或卵原细胞异常) 94 枚受精后 18 h 显示双原核, 但受精后 48 h 未卵裂, 原核也消失。其中 64 枚用 R 显带 Gimesa 染色, 30 枚 FISH 检测。Gimesa 染色发现 4 种情况: (1) 27 枚有浓缩的卵母细胞染色体(两条染色单体), 然而精原细胞为染色单体形式; (2) 16 枚核崩解; (3) 9 枚有 DNA 碎片; (4) 12 枚阻滞于第一次减数分裂, 其中 10 个显示正常染色体数目, 2 个为非整倍体。

在 10 个合子中, 染色体 1, 8 和 12 探针 FISH 检测, PI 染色, 用 12 号着丝粒探针, 2 个发现卵 DNA 为两条染色单体, 精子 DNA 为一条染色单体(每条单体一个信号)。5 个仅剩余 DNA 片段。其中 3 个在减数分裂 II 期阻滞(信号数目正常)。8 号染色体探针 1 个卵显示两条染色单体, 精子 DNA 为一条染色单体, 2 个核裂解, 7 个减数分离后剩 8 号单体。染色体 1 杂交显示一个卵 DNA 两条染色单体和精子 DNA 一条染色单体, 一个核裂解, 3 个剩 DNA 碎片, 5 个单体, 一个多体。

研究中发现, 26.6% 卵判断未受精(出现第一极体, 受精后 18 h 无原核, 48 h 无卵裂)实际上已受精。从而得出结论大约 1/4 的 IVF 失败的卵, 在 94 个卵中细胞质不成熟, 阻滞于合子或减数分裂阶段。综合以上信息, 64 例 Giemsa 染色, 30 个 FISH 检测。我们观察到 31 个(33%)卵染色体(两条染色单体), 然而精原细胞为染色单体, 36 例(38.3%)核崩解或仅剩 DNA 碎片, 27 例(28.7%)阻滞于第一次减数分裂。提示: 细胞质和核的“成熟度”与染色体异常有很大关系。

1996 年, Dailey 等^[2] 研究人类卵母细胞减数分裂 II 染色体不分离与女性年龄的关系。临床上女性年龄越大, 其后代三体出现的危险性越高, 但在卵细胞水平的发病机理通过进行检测。实行 IVF 治疗的 107 个患者的 383 个卵用 X-, 18-, 13/21- 染色体探针同时检测。其中 188 个卵的第一极体同时用几种探针检测, 同时设立一内对照以避免非整倍体或操作误差。出现两种情况, 一种情况染色体全部进入一个部分, 第二部分染色单体出现平衡分离(2+2)或不平衡(3+1)进入第一极体或 M II 期卵母细胞: 40 岁以上患者较 35 岁以下患者有明显增高。卵按新鲜或 < 6 h, ($n=38$), 24~48 h ($n=139$), ≥ 72 h ($N=87$) 分组, 在这 275 个卵中, 染色

体异常在新鲜标本为 5.2%, 在 > 72 h 的标本为 33.3%。患者年龄为 26~ 34 岁 (n= 67), 35~ 39 岁 (n= 68), ≥40 岁 (n= 33)。在 24~ 36 岁组中, 15% 为新得卵, 55% 为 24~ 48 h 卵, 30% 为 ≥72 h 卵; 35~ 39 岁组中, 分别为 18%, 47%, 35%; 40~ 45 岁组为 21%, 64%, 15%, 没有显著差异, 用 X, 18, 和/或 13/21, 25~ 34 岁组 1.5% 异常, 而 ≥40 岁组为 24.2% 异常。24 个卵为多倍体, 年龄增大, 培养时间延长并不增多染色体的异常率(11% 年龄组, 老年组 12%)(新鲜卵 11%, ≥72 h 为 7%)。

机理: 第一, 二价染色体的不分离导致两个单价染色体进入同一部分; 第二, 未成熟染色体的不分离造成一个平衡的(2+ 2)或不平衡的(3+ 1)染色质分离并分别进入第一极体和 M II 卵。染色质的平衡分离可能是非整倍体出现的主要原因。随着培养时间的延长显著增加 ($P < 0.005$)。不平衡分离和传统的不分离与卵龄无关。在没有 FISH 错误并有可分析的极体和卵的对称性研究中发现 35 岁以下和 40 岁以下患者染色体不分离情况显著增加 ($P < 0.001$), 染色质成熟前即分开现象也造成不分离, 但与母体年龄无关。

1996 年, Wall MB^[3] 等用 FISH 研究人类体外受精(IVF)和 ICSI 术后受精失败的人类卵母细胞遗传学异常, 研究 162 个 IVF 术后和 51 个 ICSI 卵, 其中 82.1% (133/162) IVF 后卵和 78.4% (40/51) ICSI 术后卵处于有丝分裂中期, 又选择其中 50.4% 的 IVF 卵和 47.5% 的 ICSI 术后卵做进一步分析, G 组染色体通常是正常的。IVF 卵和 ICSI 卵非整倍体出现率为 37.3% 和 31.6%, 差别无显著意义。然而染色体单倍, 染色单体片段等单精子和卵染色单体在年龄大于 36 岁的 IVF 患者的卵中发现, 而在 ICSI 患者则全部年龄段均出现。第一极体的染色单体情况显示总体在 ICSI 和 IVF 卵中无显著性差异。在 ICSI 受精失败卵中精子显微扎入卵母细胞成功 72.5% (37/51), 其中 19.6% (10/51) 保留有精子染色体, 7.8% (4/51) 有一膨胀的精子头部, 剩余 45% 有一浓缩的精子头部。都出现精子和 M II 期卵子染色体的占 ICSI 中 19.6% (10/51), IVF 卵中 8.6% (14/162)。特异的探针用于检测染色体数目异常。着丝粒探针 86% ~ 95% 着丝粒探针杂交有效, 21 号染色体和 18 号染色体为 100%。

这些不育夫妇, 生殖助孕技术(Assisted Reproductive Techniques, ART)包括宫腔内配子移植和体外受精—胚胎移植等(*In vitro* fertilization and Embryo transfer, IVF-ET)可能使其受孕。但是染色体异常胚胎将在移植前后丢失, 远期流产丢失。分析染色体异常, 不仅适用于平衡易位携带者妊娠胎儿染色体异常的危险性分析, 而且染色体正常的夫妇, 因年龄相关性在减数分裂时染色体不分离情况也使他们可能移植异常胚胎。故染色体分析有助于患者夫妇生育染色体正常胎儿, 但 IVF 成功率较低的主要原因是染色体非整倍性。

因为染色体不分离的卵母细胞受精后易产生三体新生儿, 尤以 13, 18, 21, X, Y 三体儿为多见。近年来, 不孕症的发病率日趋增加, 约累及 10% ~ 15% 的育龄妇女。这些妇女大多因为各种各样的原因, 反复治疗, 贻误了 IVF 最佳时间(如自然周期 IVF 就要求年龄为 30 岁, 很多人拖至 30 岁以上甚至 40 岁才接受 IVF 治疗。年龄较大, 存在配子质量问题(卵细胞和精子), 染色体不分离的机率增高, 造成非整倍体卵子的增多, 体外受精率较低。卵母细胞染色体的非整倍性使得即使受精, 胚胎难逃致死畸形, 常在早孕前 3 个月自然淘汰而自然流产。

1996 年, Dorit M 等^[4]发现: 在 IVF 受精后 12~ 20 h 卵将出现前核。偶尔在此之前, 原核就已消失。我们称之为“未被证实的卵”(undocumented oocyte)。因为原核用于区别正常和非正常胚胎, 所以“未被证实的胚胎”, 其核型是有疑问的, 经常被丢弃不用。FISH 分析 10 个病

人, 23 个未被证实胚胎, 允许这些胚胎继续发育为卵裂球. 活检胚泡并用 5 个探针(X, Y, 13, 18, 21), 13 个(57%) 核型被确定为正常, 剩下 10 个有不同的染色体异常, 6 个正常胚胎移植. 如果一个病人只有少量胚胎, FISH 可用于查明“未被证实的胚胎”是否正常, 若正常则可移植, 从而增加可移植胚胎的总数.

1997 年, Elena Martini 等发现^[5], 人类已出生婴儿中, 非整倍体通常只在染色体 13、18、21 和性染色体. (一些研究提示 50% 的人类妊娠有染色体异常, 在配子阶段染色体畸变在致死性突变中扮演重要角色). 研究人类配子的不同阶段包括卵发育、精细胞发育、受精、早期胚胎发育等染色体异常可提示不同阶段流产的原因.

1997 年 Elena^[5] 调查 ICSI 术后未受精卵的非整倍体, 卵子用 HCl/Tween20 固定, 用二轮 FISH. 第一轮, 三色 FISH 用直接标记的着丝粒探针 1, 7, 15(过夜杂交) 观察. 第二轮 FISH(1, X, Y, 2 h 杂交)、染色体 1 作为内对照. 27 个病人的 79 个卵, 固定成功 67 枚(84. 8%), 65 枚可分析结果. 其中 17 个(26. 2%) 显示正常二倍体核, 23 个(35. 4%) 显示多倍体, 25 个(38. 4%) 显示单倍体, 证明 FISH 技术对于研究人类卵母细胞染色体数目异常是一快速有效的方法. 在过去研究人类配子染色体异常常用核型分析这一标准. 核型分析发现人类卵细胞 25% ~ 30% 染色体异常. 但核型分析有两个缺点: 一、卵的匮乏; 二、染色质在有丝分裂中期高度浓缩. 用 3 × 1 的甲醇-冰醋酸固定有一明显缺点: 单细胞丢失, 形态学异常, 降低有效性、可靠性和重复性. 这是非整倍体的最大缺点. 有改进的 HCl/Tween20 方法具有高重复性、细胞核形态好、FISH 效率高、信号清晰等优点.

ICSI 诞生于 1992 年, 是治疗男性因素不育的一次革命. 然而体外受精总的成功率只有 60% ~ 70%, 相当数量的卵细胞未受精被浪费了. 有研究表明, 82% 的 ICSI 术后未受精仍处于有丝分裂 II(中期), 71% 有一膨胀的精子头部, 显示受精失败是由于卵细胞不全激活而非显微受精所致. 有研究证实, 未激活卵子的显微授精可用钙离子激活并摄取钙, 最后发展为原核. 这种处理的安全性, 用于临床分析的可行性尚未被证实和正确评估.

1997 年, 比利时科学家 Stuessen^[8] 分析在 ICSI 和体外受精后 1 个原核和 3 个原核受精卵. 用 X, Y, 18 号探针检测. FISH 分析 3 原核胚胎、106 个 ICSI 术后和 71 个 IVF 术后的卵, 在 ICSI 以后三原核中, 发现 XXX 和 XXY, 未发现 XYX. 这提示三原核起源. 另一方面, IVF 后 XYX 提示双精受精. IVF 后, 只有 12. 7% 的 3PN 卵发育成为胚胎, 与 ICSI(55. 7%) 相比有显著意义($P < 0. 001$). 另一方面, ICSI 术后 16. 0% 胚胎发育为 3PN 卵是嵌合体, 与 IVF(42. 3%) 相比有显著意义($P < 0. 001$). FISH 通常从 1PN 卵开始分析, 115 个 IVF 后胚胎中 35. 6% 的 Y 特异性杂交信号被检测到. 这显示 70% ~ 75% 造成多精受精. 只有 25% ~ 30% 有更多比率形成 1PN, 比 ICSI 比率低.

1998 年 Benzacken B 等^[7] 研究 IVF 患者 100 个未卵裂卵中 21 号和 X 染色体数目和结构的异常, 并分析其与 IVF 指征, 超排方案, 女性患者年龄之间的关系, 结果显示 21 号染色体二倍体为 8 枚(8%), 缺体 3 枚(3%), X 染色体二倍体 1 枚(1%). 显著高于正常人群. 不同的 IVF 指征和超排方案不影响结果, 而女性患者年龄与 21 号染色体非整倍体出现率有关.

综上所述, 多色 FISH(m-FISH) 分析为人类未受精卵染色体异常的研究以及 IVF-ET 的研究提供了广阔前景.

参考文献:

[1] BENKHALIFA M, MENEZO Y, JANNY L, *et al.* Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF

- programs[J] . J Assist Reprod Genet, 1996, 13(2): 140-148.
- [2] DAILEY T, DALE B, COHEN J, *et al* . Association between nondisjunction and maternal age in meiosis II human oocytes[J] . Am J Hum Genet, 1996, 59: 176-184.
- [3] WALL M B, MARKS K, SMITH T A, *et al* . Cytogenetic and fluorescent *in-situ* hybridization chromosomal studies on *in-vitro* fertilized and intracytoplasmic sperm injected failed-fertilized human oocytes[J] . Human Reprod, 1996, 11(10) : 2230-2238.
- [4] DORIT M, SHAHAR K, NATHAN L, *et al* . Undocumented embryos: do not trash them, FISH them[J] . Human Reproduction , 1996, 11(11) : 2502-2506.
- [5] ELENA Martini, SEAN P, FLAHERTY, *et al* . Analysis of unfertilized oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection using two rounds of fluorescence *in-situ* hybridization and probes to five chromosomes[J] . Human Reprod, 1997, 12(9) : 2014-2018.
- [6] CATHESINE S, ANDRE C, VAN S. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional *in-vitro* fertilization[J] . Human Reprod, 1997, 12(2) : 324-327.
- [7] BENZACKEN B, MARTIN-PONT B, BERGERE M, *et al* . Chromosome 21 detection in human oocyte fluorescence *in situ* hybridization: possible effect of maternal age[J] . J Assist Reprod Genetics, 1998, 15(3) : 105-110.

(上接第 41 页)

- [13] NALDINI L, BLOMER U, GALLAY P, *et al* . *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J] . Science, 1996, 272: 263-267.
- [14] WU G Y, WU C H. Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo* [J] . J Biol Chem, 1988, 263(29) : 14624-14624.
- [15] CHUAH M K L, VANDENDRIESSCHE T, MORGAN R A. Development and analysis of retroviral vector expressing human factor VIII as a potential gene therapy for hemophilia A[J] . Hum Gene Ther, 1995, 6: 1363-1377.
- [16] DWARKI V J, BELLONI P, NIJJAR T, *et al* . Gene therapy for hemophilia A: production of therapeutic levels of human factor VIII *in vivo* in mice[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(4) : 1023-1027.