

He-Ne 激光对小鼠联会复合体影响的研究

李鸿业¹ 牛新华² 徐艳岩² 刘文波¹ 曲惠青

(滨州医学院¹ 电镜室;² 生物学教研室 滨州 256603) (滨州医学院附属医院检验科 滨州 256603)

提要 以两种不同剂量的 He-Ne 激光照射两组雄性小鼠左侧睾丸。电镜观察以微铺展技术制备的精母细胞联会复合体。结果表明,两个试验组小鼠被照射的左侧睾丸精母细胞联会复合体畸变率未见明显升高。联会复合体的畸变类型,包括断裂、单侧侧生组份(LE)断裂、不联会、联会紊乱及圆环等,照射后与对照组也无明显差异。试验所用 He-Ne 激光剂量比临床治疗常用剂量大得多。表明 He-Ne 激光照射睾丸治疗疾病不致引起联会复合体畸变。

关键词 He-Ne 激光, 联会复合体, 畸变

1 引 言

联会复合体(synaptonemal complex, SC)是减数分裂前期同源染色体配对时所形成的一种核内非永久性细胞器。SC 微铺展技术在细胞遗传学及遗传毒理学中的应用已十分活跃,在辐射细胞遗传学中的应用也逐渐展开。SC 损伤是鉴别染色体损伤的更为灵敏的指标,通过电镜分析,可明显提高畸变的鉴别能力^[1,2]。但迄今未见在激光致 SC 畸变方面的研究报道。作者在 He-Ne 激光对哺乳动物雄性生殖细胞的影响方面,已从组织学、组织化学及细胞学水平三方面进行了实验研究^[3,4]。本实验以 SC 微铺展技术结合电镜观察,进行 He-Ne 激光对小鼠精母细胞 SC 影响的研究,进一步探讨 He-Ne 激光临床应用是否有致畸作用。

2 材料和方法

雄性昆明种小鼠 18 只,体重为 25~30 g,随机分为 3 组,每组 6 只,用上海医用激光仪器厂生产的 HN2SQ-2 型 He-Ne 激光治疗器,波长 632.8 nm。将小鼠两侧睾丸推入阴囊固定,以激光原束直接照射左侧阴囊中部,光斑直径为 3 mm,照射距离为 1 m,每日照射 1 次,每次 10 min,连续照射 10 次。右侧睾丸不照射,作自身对照。

对照组:每天只把睾丸推入阴囊固定 10 min,不照射。

实验 I 组:输出功率为 20 mW,功率密度为 285.71 mW/cm²,能量密度为 171.43 J/cm²/次,总能量密度为 1714.3 J/cm²。

实验 I I 组:输出功率为 25 mW,功率密度为 357.14 mW/cm²,能量密度为 214.28 J/cm²/次,总能量密度为 2142.8 J/cm²。

精母细胞 SC 标本制备: 本实验对 Moses 方法^[5]加以改进。照射结束后第 3 天, 颈椎断离处死小鼠, 取两侧睾丸, 2.2% 柠檬酸钠洗去脂肪等污物, 将睾丸组织于 0.9% 的生理盐水中剪碎, 制成细胞悬液。在一牙科蜡的平面上滴加一直径约为 1 cm 的 0.4% KCl 液珠, 取少量细胞悬液与液珠的表面接触。用涂有 0.3% Formvar 膜的玻片与载有细胞的液珠表面接触, 细胞即附着于玻片上。空气干燥后, 将玻片置于新配制的 4% 多聚甲醛中固定 10 min, 晾干后参照 Howell 和 Black 方法^[6]进行硝酸银染色。光镜下找到要观察的细胞, 将 50 目铜网准确置于被检细胞的部位, 用针尖沿铜网边缘将膜划破并滴加 0.1 mol/L 氢氟酸, 在清水中漂膜, 待膜漂起后, 捞起铜网, 用日立 H-800 型电镜观察(75 kV) 拍照。



图 1 断裂(▲)(3640×)

Fig. 1 Breakage (▲) (3640×)



图 2 LE 断裂(▲)(5460×)

Fig. 2 LE breakage (▲) (5460×)



图 3 联会紊乱, 箭所指为银染桥(4550×)

Fig. 3 Synapsis irregularity, arrows indicate silver-staining bridges (4550×)

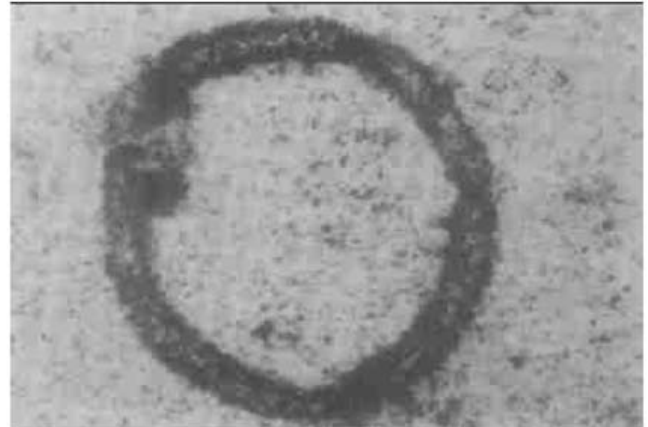


图 4 常染色体 SC 环(18200×)

Fig. 4 Autosome SC ring (18200×)

每一动物每侧睾丸分别(对照组两侧混合)分析 50 个第一次减数分裂前期细胞的 SC, 对 SC 配对和结构异常进行分类计数, 分析指标包括: (1) SC 畸变百分率, 为 SC 配对和结构异常的细胞在所观察细胞中所占百分数, 1 个细胞内包含多个 SC 损伤和结构异常时, 也仅做 1 次计数; (2) SC 畸变总数系所有受损细胞内 SC 畸变事件的总和; (3) SC 畸变类型, 分为双侧侧生组份在同一部位同时断裂(Breakage), 单侧侧生组份(Lateral element, LE)断裂, 同源染色体不联会(Asynapsis), 联会紊乱(Synapsis irregularity), 圆环(Ring)等(见图 1~ 图 4)。以 *t* 检验法进行统计学分析。SC 畸变情况见表 1。

表 1 He-Ne 激光照射后小鼠联会复合体畸变
Table 1 SCs aberrations of mice after He-Ne laser irradiating

Group	Sum total of observed cells	Frequency of SCs aberrations cells $\bar{X} \pm S / \%$	Sum total of SCs aberrations				
			Breakage	LE breakage	Asynapsis	Synapsis irregularity	Ring
Control	300	10.3 ± 2.13	28	0	1	2	1
I	Right	8.3 ± 2.13	20	1	0	2	2
	Left	* 10.7 ± 3.19	24	1	1	4	3
I I	Right	9.0 ± 1.91	18	1	2	4	2
	Left	* 11.7 ± 2.69	27	2	1	3	3

* $P > 0.05$

3 结 果

正常小鼠粗线期精母细胞具有 19 个常染色体 SC 及深染的 X, Y 轴(见图 5, 图 6)。He-Ne 激光照射后的左侧睾丸的粗线期精母细胞 I 组 SC 畸变率为 10.7%, I I 组为 11.7%。对照组为 10.3%, 未照射的自身对照的右侧睾丸, I 组为 8.3%, I I 组为 9.0%。把照射过的左侧睾丸 SC 畸变细胞率与对照组及自身右侧睾丸相比, 经 t 检验, $P > 0.05$ 。说明两个实验组 He-Ne 激光照射后 SC 畸变细胞率与对照组的差异无显著性。SC 畸变类型照射组与对照组也无明显差异, 以 SC 的整体断裂居首, 联会紊乱及 SC 圆环居中, LE 断裂及不联会较少。此外, 在联会紊乱或 LE 断裂的细胞中有银染桥(Silver-staining bridges)出现, 把银染桥归入 LE 断裂或联会紊乱类(见图 3)。



图 5 小鼠精母细胞 SC 核型。可见 19 条常染色体 SC 及深染 X 轴(↑)和 Y 轴(↑↑)。注意 XY 配对片段(▲)开始分离(910×)

Fig. 5 SC karyotype in a spermatocyte of mouse, showing nineteen autosomal SCs, deeply staining X axis (↑) and Y axis (↑↑). Note the XY pairing segment (▲) starts separating (910×)

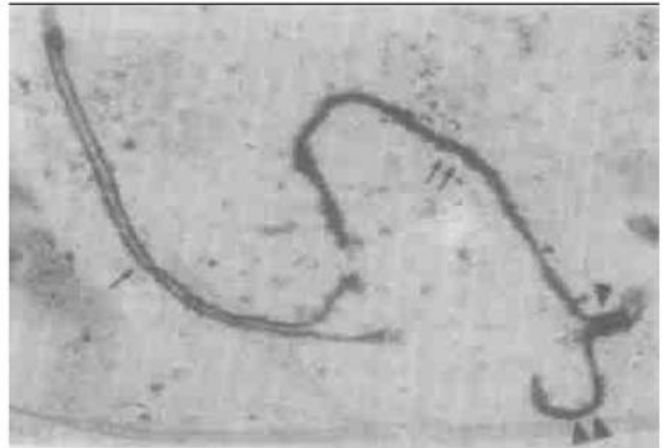


图 6 正常的 SC。箭所指为常染色体 SC, 联会尚未完成。箭头所指为 XY 配对区, 双箭指未配对的 X 轴, 双箭头指未配对的 Y 轴(5460×)

Fig. 6 Normal SCs, arrow indicates autosome SC, synapsis did not finish. Arrowhead indicates XY paired region, double arrow indicates unpaired X axis, double arrowhead indicates unpaired Y axis (5460×)

4 讨 论

由于内部或外界的原因,会导致联会异常或 SC 结构畸变。SC 畸变类型中,本文把银染桥视具体情况归入 LE 断裂或联会紊乱类,因为作者认为银染桥并非如 Backer 等认为的半染色单体交换^[7]。每一 SC 都有两条侧生组份,每一侧生组份又由两条姐妹染色单体组成。两条侧生组份同时断裂称作断裂,若一条侧生组份断裂为 LE 断裂,若侧生组份中的一条染色单体断裂,断裂的染色单体断端因无端粒保护而具有粘性,很容易与其他 SC,尤其是 SC 的断端粘连,形成所谓的银染桥,因此本文把银染桥归入 LE 断裂或联会紊乱类。另外,有人把 X, Y 长臂末端连接形成的环归入 SC 损伤类^[8]。实际上,这和人的 X, Y 配对行为^[9]一样属于 X, Y 的次级联合(second association)(见图 7)。是中粗线期精母细胞中 X, Y 轴配对的一种类型。而常染色体 SC 圆环,可能由于 SC 端粒损伤后失去保护作用而使自身端-端相连发生的一种畸变(见图 4)。

虽然临床上 He-Ne 激光局部照射所用剂量大小不一,但按多数文献报道,所用 He-Ne 激光的功率密度多为 15~ 25 mW/cm²,每次照射 10~ 15 min,10 次为一疗程^[10,11]。若按上述最大功率密度为 25 mW/cm²,每次 15 min,共照 10 次计,则能量密度为 22.5 J/cm²,疗程总能量密度为 225 J/cm²。本实验所用激光总能量密度 I 组为 1714.3 J/cm²,II 组为 2142.8 J/cm²。两组都比上述剂量大得多。实验结果表明,经照射后的左侧睾丸 SC 畸变细胞率与对照组及自身未照射的右侧睾丸相比,差异无显著性。SC 畸变类型也无显著差别。提示 He-Ne 激光照射睾丸治疗疾病不致引起 SC 畸变。

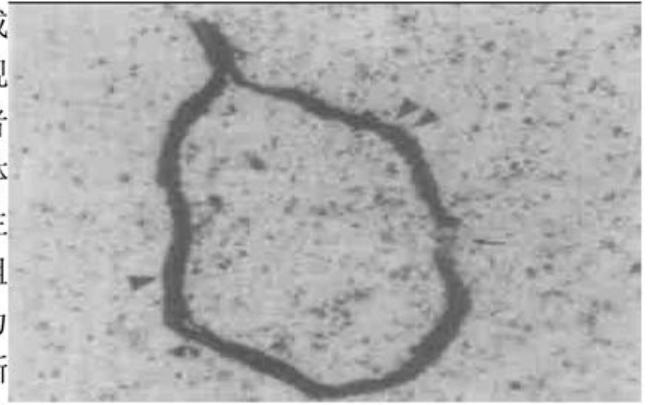


图 7 X (▲) 和 Y (▲▲) 长臂末端的次级联合(↑)(7280×)

Fig. 7 Arrow indicates second association at the end of the Xq (▲) and Yq (▲▲) (7280×)

参 考 文 献

- 1 J. W. Allen, G. K. Deweese, J. B. Gibson *et al.*. Synaptonemal complex damage as a measure of chemical mutagen effects on mammalian germ cells. *Mutat. Res.*, 1987, **190**(1): 19~ 24
- 2 Jiang Jie, Wang Bin, Wang Yamei. Studies on the synaptonemal complex aberrations induced by ionizing radiation. *Chin. J. Radiol. Med. Prot.* (中华放射医学与防护杂志), 1996, **16**(2): 109~ 111 (in Chinese)
- 3 Li Hongye, Liu Guixiang, Li Zhenfeng. Histological and histochemical observation on mouse's testis with He-Ne laser irradiating. *Chinese J. Lasers* (中国激光), 1991, **18**(4): 281 (in Chinese)
- 4 Li Hongye, Wu Lijun, Liu Wenbo *et al.*. OM and TEM observation on mouse's testis after He-Ne laser irradiation. *Laser J.* (激光杂志), 1997, **18**(4): 56~ 59 (in Chinese)
- 5 M. J. Moses. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster. *Chromosoma*, 1977, **60**: 99~ 125
- 6 W. M. Howell, D. A. Black. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 1980, **36**: 1014~ 1015
- 7 L. C. Backer, M. R. Sontag, J. W. Allen. Stage-specific damage to synaptonemal complex and metaphase chromosomes induced by X-rays in male mouse germ cells. *Radiat. Res.*, 1991, **125**(2): 187~ 196
- 8 Zhou Rumin, Wang Xu, Cao Neng *et al.*. A study of synaptonemal complex damage induced in male mice by two anti-mitotic chemicals. *Hereditas* (遗传), 1997, **19**(1): 9~ 12 (in Chinese)
- 9 A. J. Solari. Synaptic behaviour and recombination nodules in the human XY pair. *Genetica*, 1988, **77**(2):

149~ 158

- 10 Lu Huanzhang. Handbook of Laser Therapy. First Edition. Tianjin: Tianjin Science and Technique Translation Publishing Company, 1991. 301~ 361 (in Chinese)
- 11 Li Ting, Zhang Pin, Wang Changhua *et al.*. Clinical Applied Handbook of Laser in Medicine. First Edition. Nanning: Guangxi Science and Technique Publishing House, 1992. 112~ 274 (in Chinese)

Study on Effect of He-Ne Laser on Mice Synaptonemal Complex

Li Hongye Niu Xinhua Xu Yanyan Liu Wenbo

(*Binzhou Medical College, Binzhou 256603*)

Qu Huiqing

(*Affiliated Hospital, Binzhou Medical College, Binzhou 256603*)

Abstract Left testes of male mice in two groups were irradiated by the He-Ne laser with two different powers. Synaptonemal complex (SC) of spermatocytes with a surface microspreading technique were examined by the electron microscopy. No significant increase in frequency of SC aberrations was observed in the irradiated left testes of the two experiment groups. After irradiating the types of SC aberrations, involving breakage, LE breakage, asynapsis, synapsis irregularity and ring, were not radically different in the experiment groups from the control. The laser energy density for the experiment was much higher than for clinical treatment. The results show irradiating testes by He-Ne laser isn't able to induce SC aberrations.

Key words He-Ne laser, synaptonemal complex, aberration