

小鼠脾脏与骨髓细胞在微核试验和染色体畸变分析中的应用

殷学军 刘德祥 黄世友¹⁾ 王河川

(兰州军区乌鲁木齐总医院遗传室)

由于小鼠骨髓多染红细胞微核 (PCEMN) 试验法具有简便快速等优点, 在遗传毒理学研究中得到了广泛应用, 但与中期细胞染色体畸变 (CA) 分析法相比, 能检测的染色体畸变类型较少^[1]。虽然小鼠骨髓染色体畸变分析可弥补其不足, 但认为难以得到足够的分裂相^[2]。自 Nowell 发现植物血凝素 (PHA) 在体外有刺激细胞分裂的能力^[3]; Moorhead 等建立人外周白细胞培养以来^[4], PHA 已广泛用于血细胞转化试验。作者受吴氏启发^[5], 应用 PHA 直接注射于小鼠背部皮下, 刺激脾脏、骨髓淋巴细胞转化, 有效地提高了它们的分裂指数, 观察到 PHA 对脾脏、骨髓 PCEMN 和 CA 无任何影响。经丝裂霉素 C (MMC) 验证表明, 此法可同时完成细胞染色体畸变率和微核率两项指标的观察, 不仅有利于活体样本中微核 (MN) 和 CA 的相关性研究, 而且脾脏和骨髓可以相互替代, 为评价被检物的毒理效应提供了方便。

材料和方法

(一) 动物及试剂

动物选用津白 I 小鼠, 体重 19—22 克。PHA, 广州制药厂生产 (针剂)。MMC (日本) 药用粉剂。

(二) 实验方法

1. PHA 对小鼠脾脏、骨髓淋巴细胞有丝分裂相的影响 动物分 7 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 逐一称重。PHA 以生理盐水稀释, 按 50、100、200、300、400、500mg/kg 体重 6 个

不同剂量组分别行背部皮下注射, 对照组注射生理盐水。观察 48 小时内小鼠反应和体重情况。待注射 66 小时, 每 10 克体重腹腔注射 0.1 ml 秋水仙素 (100 μ g/ml), 4 小时后处死小鼠, 先取出脾脏剪成 3 块, 放在培皿中的输血滤网上, 以注射器蕊轻挤研使细胞通过滤网而悬于 3ml 无菌小牛血清内。剥离小鼠后肢两根股骨, 去股骨头, 用无菌小牛血清冲出骨髓细胞于离心管中。脾脏、骨髓细胞悬液先各涂两张玻片, 晾干, 甲醇固定 25 分钟晾干, 备 PCEMN 观察。其余细胞悬液 1000rpm 离心 5 分钟, 去上清液后加 10ml 生理盐水再洗一次。加 0.075M KCl 10ml 充分混匀 37 $^{\circ}$ C 水浴中低渗 25 分钟, 甲醇:冰醋酸 (3:1) 固定 4 次, 每次 15 分钟, 气干法制片。脾脏、骨髓 PCEMN 标本均以吡啶橙 (AO) 染色^[6], 染色体标本均为常规 Giemsa 染色。每只小鼠脾脏和骨髓的染色体标本分别随机计数 10000 个细胞中出现的分裂相, 以分裂指数均数 (%) 表示。染色体畸变类型的判断以人类细胞遗传学命名的国际体制 (1978) 非显带标本规定的定义为标准, 以染色体细胞畸变率 (%) 表示。微核观察于荧光显微镜下进行, 以微核细胞率 (‰) 表示。

2. MMC 诱发脾脏、骨髓 PCEMN 和 CA 的观察 根据前述实验结果 (表 1), 小鼠皮

Yin Xuejun et al.: Analysis of MN and CA in Mouse Spleen and Bone Marrow Cells

1) 阿克苏市东城医院。

本文于 1987 年 4 月 2 日收到。

下注射 PHA 量取 200mg/kg 体重, MMC 给药量按标定的 LD₅₀(i.v = 5mg/kg 体重)的 1/2、1/4、1/8、1/16 取量,即 2.5、1.25、0.625、0.3125mg/kg 体重。考虑到 MMC 诱发 DNA 损伤通常是在 S 期的特点^[7],按 Heddle 推荐的一次染毒方案^[6],待 PHA 注射 46 小时将生理盐水稀释的上述不同剂量的 MMC 注入小鼠腹腔,20 小时后注射秋水仙素(同上),4 小时后按方法 1 制备标本和观察。

结果与讨论

(一) 不同剂量 PHA 刺激小鼠脾脏、骨髓细胞的分裂指数

如表 1 所示, PHA 各剂量组脾脏和骨髓细胞分裂指数均高于相应对照组, 差异非常显著 ($P < 0.001$), 表明 PHA 能有效地提高脾脏和骨髓细胞分裂指数, 同 PHA 肌注能使小鼠体内淋巴细胞转化率增高的结论相吻合^[3]。

表 1 不同剂量 PHA 对小鼠脾脏、骨髓细胞分裂指数的影响

PHA (mg/kg 体重)	动物(只)	分析细胞数	脾 脏			骨 髓		
			分裂相数	分裂指数 (%)	P 值(同对照组比较)	分裂相数	分裂指数 (%)	P 值(同对照组比较)
0	10	100000	200	0.2	—	549	0.6	—
50	10	100000	630	0.6	<0.001	4093	4.1	<0.001
100	10	100000	758	0.8	<0.001	5257	5.3	<0.001
200	10	100000	1814	1.8	<0.001	5612	5.6	<0.001
300	10	100000	1607	1.6	<0.001	3295	3.3	<0.001
400	10	100000	1415	1.4	<0.001	1490	1.5	<0.001
500	10	100000	533	0.5	<0.001	847	0.9	<0.001

PHA 剂量与分裂指数呈曲线关系(图 1), PHA 200mg/kg 体重时脾脏细胞分裂指数是对照组的 9 倍, 骨髓细胞分裂指数是对照组的 9.3 倍, 此量是最佳有效剂量, 小鼠亦无不良反应(表 2)。

(二) 不同剂量 PHA 对小鼠脾脏和骨髓 PCEMN 及 CA 的影响

表 3、4 所示, PHA 各剂量组诱发脾脏和骨髓 PCEMN 及 CA 频率与相应对照组自发频率比较均无差异 ($P > 0.05$), 故作者认为 PHA 剂量在 50—200mg/kg 体重范围内对小鼠脾脏和骨髓细胞染色体无损伤, 对脾脏、骨髓 MN 试验和 CA 分析无直接影响。

(三) 不同剂量 MMC 对小鼠脾脏、骨髓 PCEMN 和 CA 的影响

为了验证注射 PHA 小鼠对已知诱变剂检测 MN 与 CA 的有效性, 我们选用 MMC, 观察它对小鼠脾脏、骨髓 PCEMN 和 CA 的影响(表 5、6)。图 2、3 表明 PCEMN 和 CA 频率随着 MMC 剂量的增加而增高, 而且随着 CA 频率的增高 MN 频率亦增高(图 4), 均呈正相关, 相关系数 $r_1, r_2, r_3, r_4, r_5, r_6$ 间比较无差异 ($P > 0.05$), $tr(H_0: \rho = 0)$ 和 $tb \times (H_0: \beta = 0)$ 是相同的, 即 $tr = tb$, 回归系数间亦无显著差异 ($P > 0.05$)。结果表明活体小鼠遗传毒理学检测中, MMC 诱发小鼠脾脏和骨髓 PCEMN 与 CA 的剂量效应是一致

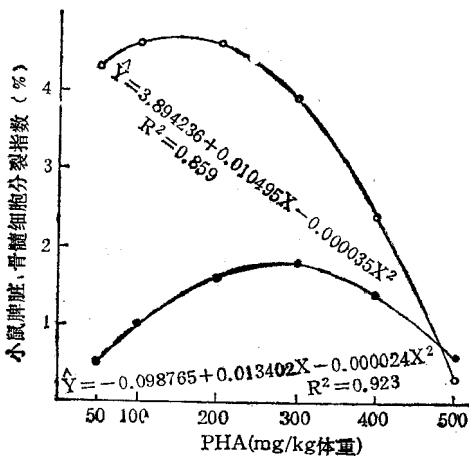


图 1 PHA 对小鼠脾脏、骨髓细胞分裂指数的剂量效应曲线
●—● 脾脏; ○—○ 骨髓。

表 2 PHA 对小鼠的毒效应和体重的影响

PHA (mg/kg 体重)	动物(只)	毒效应		注射前体重	注射后体重	P 值(注射前后 体重比较)
		表现	死亡	均数±标准差	均数±标准差	
0	10	无异常	无	20.9±0.82	20.9±0.82	>0.05
50	10	无异常	无	20.9±0.74	20.5±0.69	>0.05
100	10	无异常	无	21.2±0.79	20.8±0.73	>0.05
200	10	无异常	无	21.1±0.66	20.7±0.65	>0.05
300	10	轻微竖毛	无	21.7±0.31	20.6±0.54	<0.01
400	10	竖毛,软便	无	21.4±0.65	19.8±0.96	<0.001
500	10	活动明显减少,竖毛闭眼	无	21.6±0.50	19.8±0.49	<0.001

表 3 PHA 对小鼠脾脏、骨髓多染红细胞微核的影响

PHA (mg/kg 体重)	动物(只)	分析 细胞数	脾 脏			骨 髓			P 值(脾脏、 骨髓微核率 比较)
			微核 细胞数	微核细胞率 (%)	P 值(同对照 组比较)	微核 细胞数	微核细胞率 (%)	P 值(同对照 组比较)	
0	10	10000	18	1.8	—	17	1.7	—	>0.05
50	10	10000	18	1.8	>0.05	12	1.2	>0.05	>0.05
100	10	10000	15	1.5	>0.05	13	1.3	>0.05	>0.05
200	10	10000	18	1.8	>0.05	16	1.6	>0.05	>0.05
300	10	10000	14	1.4	>0.05	17	1.7	>0.05	>0.05
400	10	10000	20	2.0	>0.05	14	1.4	>0.05	>0.05
500	10	10000	19	1.9	>0.05	15	1.5	>0.05	>0.05

表 4 PHA 对小鼠脾脏、骨髓细胞染色体畸变的影响

PHA (mg/kg 体重)	动物 (只)	分析 细胞数	脾 脏						骨 髓						P 值(脾 脏、骨髓 细胞畸变 率比较)
			染色体畸变类型				细胞 畸变率 (%)	P 值(同对 照组比较)	染色体畸变类型				细胞畸 变率 (%)	P 值(同 对照组比 较)	
			ctg	csg	ctb	f			ctg	csg	ctb	f			
0	10	500	1	1	1		0.6	—	1		1		0.4	—	>0.05
50	10	2000	4	2		2	0.4	>0.05	2	2	4	2	0.5	>0.05	>0.05
100	10	2000	6	1	2	3	0.6	>0.05	2	5	2	3	0.6	>0.05	>0.05
200	10	2000	4	5	2	3	0.7	>0.05	3	2	2	1	0.4	>0.05	>0.05
300	10	2000	1	1	4	2	0.4	>0.05	2	1	2	3	0.4	>0.05	>0.05
400	10	2000	3	4	2	1	0.5	>0.05	4	2	4	2	0.6	>0.05	>0.05
500	10	2000	1	3	1	3	0.4	>0.05	3	5	1	3	0.6	>0.05	>0.05

的,而且 MN 和 CA 具有良好的相关性,这种相关性和其它离体试验结论相同^[4]。根据试验结果,作者同意 Yasuhiro 小鼠脾脏可用作骨髓的替代物进行微核试验的看法^[10],本实验还表明在 CA 分析上小鼠脾脏和骨髓亦可相互替代(图 5)。

综上所述,PHA 皮下注射能有效地提高小

鼠脾脏和骨髓细胞分裂相,其剂量以 200mg/kg 体重最佳,PHA 本身对脾脏和骨髓细胞染色体无损伤。MMC 验证表明 PHA 可成功地用于小鼠脾脏、骨髓 PCEMN 和 CA 分析。在本法的常规检测中,每只小鼠脾脏、骨髓染色体标本各分析 200 个核型是很容易的,故本法具有实用价值。

表5 MMC 诱发小鼠脾脏、骨髓多染红细胞微核频率

MMC (mg/kg 体重)	动物(只)	分析细胞数	脾 脏			骨 髓		
			微核细胞数	微核细胞率 (%)	P 值(同对照组比较)	微核细胞数	微核细胞率 (%)	P 值(同对照组比较)
0	10	100000	200	2.0	—	180	1.8	—
0.3125	10	100000	800	8.0	<0.001	560	5.6	<0.001
0.625	10	100000	1516	15.2	<0.001	1428	14.3	<0.001
1.25	10	100000	4167	41.7	<0.001	3969	39.7	<0.001
2.5	10	100000	7543	75.4	<0.001	7283	72.8	<0.001

表6 MMC 诱发小鼠脾脏、骨髓细胞染色体畸变率

样本	MMC (mg/kg 体重)	动物(只)	分析细胞数	染色体畸变类型 ¹⁾									细胞畸变率 (%)	P 值(同对照组比较)
				ctg	csg	ctb	csb	f	tr	qr	pvs	其它		
脾脏	0	10	2000	4	2	1	3	2					0.6	—
	0.3125	10	2000	58	46	55	11	74				2	12.4	<0.001
	0.625	10	2000	176	60	32	41	189	4	3	5	6	25.8	<0.001
	1.25	10	2000	107	99	43	217	203	20	19	54	7	38.5	<0.001
	2.5	10	2000	235	265	94	86	406	21	17	179	3	65.3	<0.001
骨髓	0	10	2000	2	1	3	1	3					0.5	—
	0.3125	10	2000	57	47	30	19	29	2	2		2	9.4	<0.001
	0.625	10	2000	43	93	79	36	108	20	1	200	5	29.3	<0.001
	1.25	10	2000	83	200	94	134	189	13	9	95	8	41.3	<0.001
	2.5	10	2000	198	265	77	197	380	16	12	205	10	68.0	<0.001

1) ctg: 单体裂隙; csg: 染色体裂隙; ctb: 单体断裂; csb: 染色体断裂; f: 断片; tr: 三射体; qr: 四射体; pvs: 粉碎化。

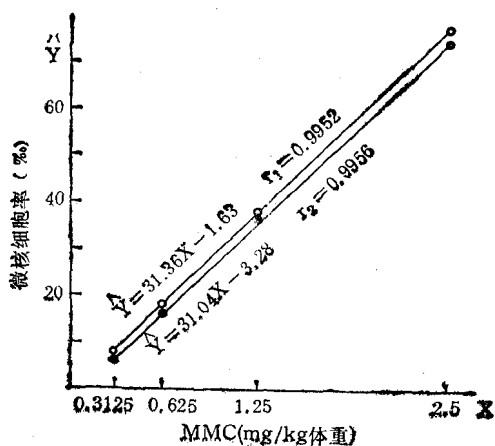


图2 MMC 诱发小鼠脾脏、骨髓 PCEMN 的剂量效应曲线

●—● 脾脏; ○—○ 骨髓。

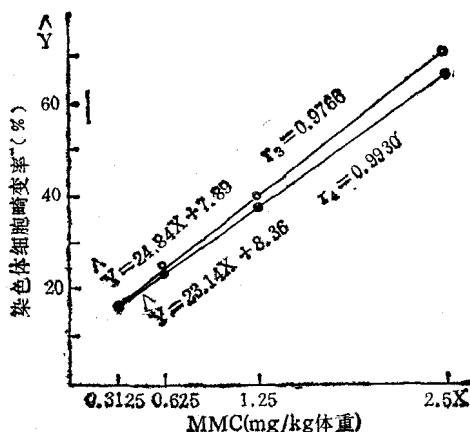


图3 MMC 诱发小鼠脾脏、骨髓细胞染色体畸变的剂量效应曲线

●—● 脾脏; ○—○ 骨髓。

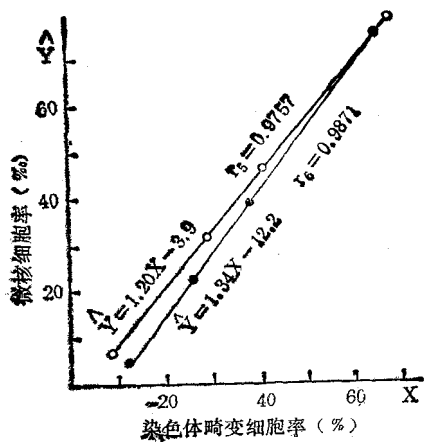


图4 染色体畸变细胞率和 PCEMN 细胞率的相关曲线

●—● 脾脏; ○—○ 骨髓。

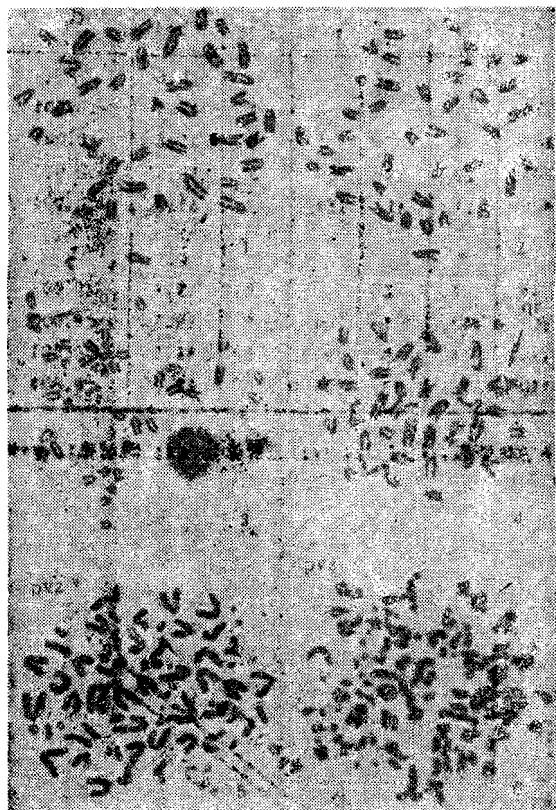


图5 正常与畸变的小鼠核型

1.脾脏细胞正常染色体核型; 2.骨髓细胞正常染色体核型;
3,5. MMC 诱发脾脏细胞染色体畸变的部分核型;
4,6. MMC 诱发骨髓细胞染色体畸变的部分核型。

参 考 文 献

- [1] 黄幸纾等: 1985. 环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法, 浙江科学技术出版社, 第229页。
- [2] 项维等: 1980. 细胞生物学杂志, 4: 25—26。
- [3] 吴铁等: 1984. 上海免疫学杂志, 4(1): 57。
- [4] 程文英等: 1981. 遗传, 3(3): 11—13。
- [5] Hayashi, M.: 1983. *Mutat Res.*, 120(4): 241—247。
- [6] Heddle, J. A.: 1973. *Mutat Res.*: 18: 187。
- [7] Hogstedt, B. et al.: 1985. *Mutat Res.*, 153(3): 229—232。
- [8] Moorhead, R. S. et al.: 1960. *Exp. Cell Res.*, 20: 613—616。
- [9] Nowell, P. C.: 1960. *Cancer Res.*, 20: 462—466。
- [10] Yasuhiro, S. et al.: 1983. *Mutat Res.*, 121: 53—57。

(上接第24页)

参 考 文 献

- [1] 马涛、朱才宝、朱秉仁: 1987. 水生生物学报, 11(4): 329—336。
- [2] 林义浩: 1982. 水产学报, 6(3): 201—208。
- [3] Chourrout, D.: 1982. *Reprod. Nutr. Develop.*, 22(3): 569—574。
- [4] Fukuoka, H.: 1972. *Japan J. Genet.*, 47: 455—458。
- [5] Hartly, S. E. et al.: 1982. *Chromosoma (Berl.)*, 87: 461—468。
- [6] Hartly, S. E. et al.: 1984. *Chromosoma (Berl.)*, 90: 229—237。
- [7] Lou, Y. D. et al.: 1984. *J. Fish. Biol.*, 25(3): 345—351。
- [8] Ohno, S. et al.: 1965. *Cytogenetics.*, 4: 117—119。
- [9] Refstie, T. et al.: 1977. *Aquaculture.*, 10: 65—74。
- [10] Refstie, T.: 1981. *Aquaculture.*, 25(1): 51—58。
- [11] Thorgaard, G. H.: 1976. *Cytogenet Cell Genet.*, 17: 174—184。
- [12] Thorgaard, G. H. et al.: 1981. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 110: 546—550。
- [13] Thorgaard, G. H.: 1983. *Copeia.*, 3: 650—662。
- [14] Ueda, T.: 1983. *Proc. Jpn. Acad. Ser.*, B59: 168—169。