

观察小鼠活体骨髓细胞 SCE 的新技术

王仁礼 包淳洋 张忠恕

(上海市计划生育科学研究所)

姊妹染色单体互换 (SCE) 离体测试系统由于易受方法上误差的影响, 且不能测出经动物体内代谢活化系统激活后才能转化为活性致突变因子, 因而离体试验的结果不能完全代表被测试物的活性诱变效应。为了解决活体 SCE 测试中 BrdUrd 在动物体内迅速降解的问题, 目前一般应用 BrdUrd 多次注射法或药片埋植法^[2,3], 但手续繁琐且用药量大。Kanda 等人 (1979) 和 Pedro (1980) 先后采用吸附 BrdUrd 的活性炭注射法观察小鼠活体精原细胞和骨髓细胞的 SCE, 使活体 SCE 技术大为简化^[4,6]。我们在此基础上用 IdUrd 代替 BrdUrd 将 Pedro 的二次 BrdUrd-活性炭注射观察活体骨髓细胞 SCE 的方法进一步简化为一次注射, 建立了更为简便的活体 SCE 检测技术, 以适合大规模测试需要。

材料和方法

(一) 制备高度吸附 IdUrd 的活性炭悬浮液

将研磨细的分析纯活性炭用 1 N NaOH 和 1 N HCl 分别冲洗数次后, 用蒸馏水冲洗到中性, 收集活性炭置 105°C 干燥 2 小时, 待用。在浓度为 20 mg/ml 的 IdUrd 溶液中加入干燥后的活性炭, 使浓度成 IdUrd 20 mg/活性炭 100 mg/ml。使用前磁力搅拌 2 小时成均匀的悬浮液。将上述悬浮液离心, 吸取上清液 0.2 ml 加入已培养 24 小时的人外周血淋巴细胞中, 继续培养两个细胞周期, 收获细胞作姊妹染色单体分化染色, 未发现 SCD。由于人外周血淋巴细胞 SCE 离体试验中, 达到姊妹染色单体分化染

色的 IdUrd 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 甚至更低 (5ml 培养液 IdUrd 50 μg)^[2], 因而 IdUrd 20mg/活性炭 100 mg/ml 的悬浮液中游离 IdUrd 必定低于 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (50 $\mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$, 即 5ml 培养液中 IdUrd 总量低于 50 μg)。表明上述浓度的悬浮液中至少有 98.75% 的 IdUrd 已牢固地吸附于活性炭上。

(二) 动物分组处理及制片

ICR 雌性小鼠, 6—8 周龄, 体重 20—23g, 随机分为 10、15、20、30、40 mg 5 个 IdUrd 剂量组及阳性对照组 (IdUrd 剂量为 20 mg), 腹内注射 BrdUrd-活性炭悬浮液。24 小时后, 各组动物均于腹内注射秋水仙素 100 μg (4mg/kg 体重), 2 小时后杀鼠制片。其中阳性对照组在第 9 小时时腹内注射环磷酰胺 (35 $\mu\text{g}/\text{克体重}$)。

取下小鼠股骨, 用生理盐水冲击骨髓细胞, 离心收集细胞悬浮于 0.075 M KCl 中, 37°C 低渗 10 分钟, 用甲醇:冰醋酸 (3:1) 固定 2 次, 每次 10 分钟, 最后将细胞滴于载玻片上^[8]。玻片 37°C 老化数天后, 平铺于 60°C 恒温水浴锅平面上, 玻片上盖满 2 × SSC 溶液 (0.3 M 氯化钠和 0.03 M 枸橼酸钠), 15 W 紫外灯距玻片 6 cm 照 45 分钟。蒸馏水冲洗后, 5% Giemsa 染色, 水洗干燥后镜检分析^[7]。

结果和讨论

图 1 示吸附 IdUrd 的活性炭悬浮液一次注射的小鼠骨髓细胞 SCE 图象。各组小鼠骨髓细胞的 SCE 观察结果见表 1。

由表 1 可知,随 IdUrd 剂量的增加, SCE 值相应增加。经统计学处理,求得两者相关系数 r 为 0.9842, $df = 4$, $P < 0.05$, 表明两变量间存在显著相关。以 X 表示 IdUrd 的不同剂量, Y 表示不同剂量时各组小鼠平均每个细胞 SCE 值,进行回归分析,得回归系数 $b = 0.09960$, 直线回归方程为 $\hat{Y} = 2.94 + 0.09960X$ (图 2)。如将 SCE/细胞作为描述突变率的重要参数,则说明作为观察 SCE 的核苷类似物 IdUrd 本身就具有一定的诱变性。在用活体 SCE 作为检测化学物质遗传效应的指标时,应考虑到基准 SCE 率,为了排除 IdUrd 本身诱发的 SCE 导致基准 SCE 率增加,应使用尽可能低剂量的 IdUrd。

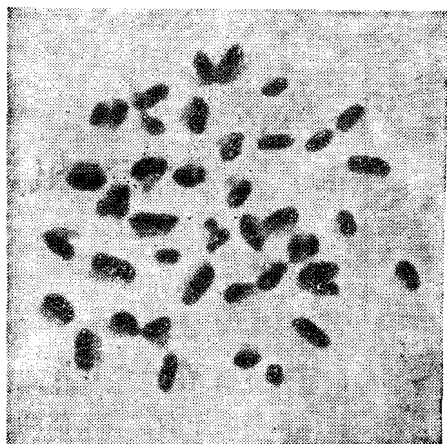


图 1 30 mg IdUrd 活性炭悬浮液注射后小鼠骨髓细胞 SCE 图象(6次互换)

表 1 小鼠活体骨髓细胞 SCE 频率

组 别	IdUrd 剂量 (mg)	动物数	观察细胞数	SCE 总数	每个细胞 SCE		t 测验	
					平均 SCE \pm SE	范围		
I	10	3	75	306	4.08 \pm 0.17	0~8	$P > 0.05$	
II	15	3	75	334	4.45 \pm 0.23	1~12		
III	20	3	75	344	4.59 \pm 0.26	2~11		
IV	30	3	75	461	6.15 \pm 0.31	1~15		$P < 0.01$
V	40	3	75	517	6.89 \pm 0.32	3~18		$P < 0.01$
阳性对照 (环磷酸胺)	20	3	75	2753	36.71 \pm 1.12	23~75	$P \ll 0.01$	

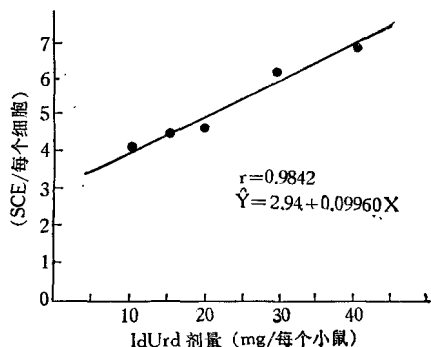


图 2 IdUrd (X)与 SCE 值 (Y) 的相关与回归线

根据我们的实验结果以 15—20 mg 为适宜。

将本实验 IdUrd 40 mg 剂量组骨髓细胞 SCE 与张忠恕等用 BrdUrd 34 mg 多次注射的骨髓细胞 SCE^[1] 作一比较,经换算 IdUrd 和 BrdUrd 微克分子数相同,而两者的 SCE 值分别为

6.89 和 2.76,相差达一倍以上。已有实验证明 BrdUrd 可以诱发 SCE^[6],因而上述相异除了可能与方法学不同有关外,说明与 BrdUrd 相比, IdUrd 可能诱变性更强。

参 考 文 献

- [1] 张忠恕等: 1980. 生殖与避孕, 创刊号, 52.
- [2] Allen, J. W. & S. A. Latt: 1976. *Nature*, 260: 449—451.
- [3] Allen, J. W., C. F. Shuler et al.: 1977. *Cytogenetics & Cell Genetics*, 18: 231—237.
- [4] Kanda, N. & H. Kato: 1979. *Experimental Cell Research*, 118: 431—434.
- [5] Ikushima, T.: 1974. *ibid.*, 87: 15.
- [6] Lambert, B., K. Hansson et al.: 1976. *Hereditas*, 83: 163—174.
- [7] Marquardt, H. & U. Bayer.: 1977. *Mutation Research*, 56: 169—176.
- [8] Pedro, M. R.: 1980. *ibid.*, 74: 61—79.