

# 一种观察小鼠活体精原细胞 SCE 的简便方法\*

彭 鲁 英

(上海海科院生理医学研究室)

王 滢

(上海实验动物研究中心)

姐妹染色单体互换 (sister-chromatid exchange, SCE) 作为反映生物体 DNA 损伤的一个敏感测定方法, 已被广泛应用于环境诱变因子和致癌因子等方面的研究<sup>[1]</sup>。而体内 SCE 技术由于具备完整的代谢活化系统, 更能客观地反映生物体与环境化学因子的接触情况, 因此日益受到重视<sup>[2]</sup>。但由于胸腺嘧啶核苷的替代物——BrdU 在体内极易被分解和破坏, 如何将其标记到 DNA 链上成为此方法的关键技术问题。1979 年, Kanda 等人<sup>[3]</sup>采用活性炭吸附 BrdU 注入受试动物体内的方法对该问题予以了较好的解决。我们参照此方法, 并作了较大的改进, 取得了良好的效果。

## 材料与 方法

1. 实验药品: BrdU (美国 Sigma 公司产品), 767 针剂型活性炭 (上海活性炭厂产品), 秋水仙碱 (瑞士 Fluka 公司产品), 环磷酰胺 (上海第十二制药厂产品)。

2. 实验动物: 采用 6—8 周龄、23—25 克体重的雄性 BALB/C 小鼠。

3. 吸附 BrdU 活性炭混悬液的配制: 用双蒸水配成 10 mg/ml 浓度的 BrdU 溶液, 在每毫升 BrdU 溶液中加入 100 毫克活性炭, 室温、避光条件下磁力搅拌 2 小时, 使活性炭充分吸附 BrdU, 配成最终浓度为 10 mgBrdU/100 mg 活性炭·ml 的溶液。

4. 实验分组及给药方案: 将实验动物随机分为二组, 每组 6 只小鼠。分别一次腹腔内注射吸附 BrdU 的活性炭溶液 0.6 毫升; 26 小时后, 取其中一组小鼠分别腹腔内注射环磷酰胺 (30 mg/kg) 作为阳性对照, 另一组作为正常对照, 注射 BrdU 54 小时后, 两组小

鼠均脱颈椎处死, 小鼠在处死前 4 小时均一次腹腔内注射秋水仙碱 (4 mg/kg 小鼠)。

## 5. 标本制备及染色处理:

(1) 将处死的小鼠睾丸取出, 按 Adler 方法<sup>[4]</sup>制备精原细胞染色体, 即剥去白膜, 松散曲细精管, 室温条件下用 1% 柠檬酸钠低渗液处理 20~25 分钟, 新鲜固定液 (甲醇:冰醋酸 3:1) 固定 3 次, 50% 冰醋酸消化后制成细胞悬液, 按气干法常规制片。

(2) 玻片在 37—38°C 恒温条件下干燥 3 天, 然后置于 55—60°C 的 2×SSC 溶液 (0.3 mol/L NaCl + 0.03 mol/L Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) 中, 使液面刚覆过玻片, 经 30 瓦紫外灯照射 45 分钟, 灯距 6 厘米, 最后用 2.5% 的 Giemsa 磷酸缓冲液 (pH 6.8) 染色 8 分钟, 即可用于 SCE 观察。

## 结果与 讨论

经过两个细胞周期的复制, 注入小鼠体内的 BrdU 掺入到精原细胞染色体中, 呈现出清晰的姐妹染色单体色差 (SCD), 为分析实验结果提供了良好的图像。

七十年代为解决 BrdU 对 DNA 的标记问

表 1 小鼠活体精原细胞 SCE 频率

组别	动物数	BrdU 量 (mg/只)	观察细胞数	SCE 总数 ( $\bar{x} \pm SD$ )
正常组	6	6	319	308 0.96 ± 0.19
环磷酰胺组 (阳性对照)	6	6	284	1908 6.73 ± 1.18*

\* p < 0.001

\* 本文在南通医学院病理生理室完成, 并在撰写过程中得到上海医科大学许由恩教授的指正, 特此致谢。

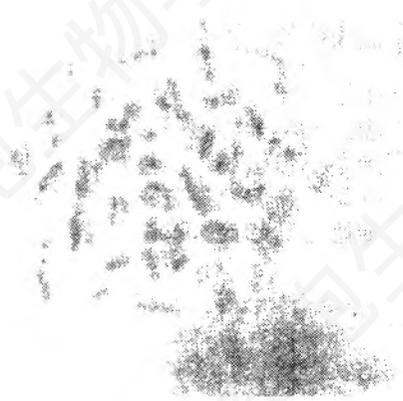


图 环磷酰胺诱发小鼠精原细胞多个 SCE

题, 国外多采用连续注射半个细胞周期(1次/小时)或连续静脉灌注二个细胞周期的方法<sup>[5,6]</sup>, 但此法耗药量大, 费时且操作繁琐, 给动物的不良刺激也过多。后有学者<sup>[7]</sup>改用 BrdU 片剂包埋于受试动物腹股沟皮下的方法使 BrdU 缓慢释放, 以维持血中所需浓度, 但手术切口的创伤易造成动物的感染死亡。我们在实验中参照 Kanda 等人的方法, 作了以下改进:

(1) 利用市售针剂型活性炭作为 BrdU 的载体, 省去了以往制备活性炭反复研磨, 酸、碱洗涤、离心及消毒等繁杂过程, 节省了人力和物力。

(2) 用 Adler 方法制备精原细胞染色体, 可以获得较多中期分裂相的标本, 便于观察分析。

(3) 以 UPG(紫外线加 Giemsa)技术代替 FPG(荧光加 Giemsa)技术处理玻片, 使标本不易褪色, 有利于保存, 并且节省了昂贵的荧光试剂。

从表 1 可看出: 正常组小鼠的细胞 SCE 为 0.96, 而阳性对照药物环磷酰胺诱发的细胞 SCE 则高达 6.73 个, 呈现显著的统计差异 ( $P < 0.001$ )。与国外报道的自发和诱发的结果基本一致<sup>[3,5,6,8]</sup>。由于本方法使用的 BrdU

浓度低于能诱发 SCE 的浓度<sup>[3]</sup>(仅为连续给药的 1/2—1/10), 而且吸附在活性炭上缓慢释放, 可以排除 BrdU 本身对 SCE 频率的影响, 对此, 正常组较低的 SCE 频率值也已予以证明。另外我们还观察到: 受试小鼠睾丸表面吸附有一层活性炭, 提示 BrdU 的载体活性炭注入体内后, 通过腹股沟管到达睾丸的浆膜腔, 释放出来的 BrdU 扩散穿过睾丸白膜直接吸入精原细胞或通过睾丸动脉在其降解前转运给精原细胞, 从而达到了标记 DNA 的效果<sup>[3]</sup>。实验结果表明: 改进后的小鼠活体 SCE 技术经济, 简便, 易操作且稳定可靠, 适于一般细胞遗传实验室应用。

### 摘 要

本方法参照 Kanda 等人方法作了以下改进: 用市售针剂型活性炭作为 BrdU 的载体, 省去了繁杂的制备过程, 节省了人力和物力; 用 Adler 方法制备精原细胞染色体标本, 可获得较多的中期分裂相, 便于观察分析; 以 UPG 技术代替 FPG 技术处理玻片, 使标本不易褪色, 便于保存且节省了昂贵的荧光试剂。实验结果表明: 改进后的小鼠体内 SCE 方法经济、简便, 易操作, 效果良好。

### 参 考 文 献

- [1] Perry, P. et al., 1975, *Nature*, 258: 121.
- [2] Schneider, E. L. et al., 1982, *Mut. Res.*, 106: 85.
- [3] Kanda, N. et al., 1979, *Exp. Cell. Res.*, 118: 431.
- [4] Adler, I-D., 1984, In, *Mutagenicity testing—a practical approach.*, IRL Press, Oxford., 275-306.
- [5] Allen, J. W. et al., 1976, *Nature.*, 260—449.
- [6] Kanda, N. et al., 1979, *Chromosoma.*, 74: 299.
- [7] 吕群等, 1981, 科学通报, 26: 1329.
- [8] Vogel, W. et al., 1976, *Nature.*, 260: 448.