

小鼠体细胞(骨髓细胞与外周血细胞) 染色体“自然畸变率”的比较观察*

王天宇 周素华 杨丽君 陶毓顺

(南京医学院七〇九研究组)

随着细胞遗传学研究工作的深入和技术操作的突破,已经出现了应用小鼠染色体分析的方法来作药物筛选、肿瘤疾病的观察以及辐射效应方面的实际研究^[1,3]。为排除外源性因素的干扰,研究小鼠体细胞染色体的自然畸变率,是十分必要的。以往,研究中多用骨髓细胞,由于取材小鼠骨髓细胞用断椎活杀法;因而,能观察到在染色体畸变上反映出来的辐射效应与药物

效应等,仅为有限的一次。为着眼于同一个体间隔时相能多次分析观察染色体畸变这一指标,我们参考了国外有关资料^[5-7],快速制备小鼠外周血细胞染色体^[4]。本文着重报道小鼠体细胞(骨髓细胞与外周血细胞)染色体“自然畸变率”的比较观察结果。

* 江苏省肿瘤防治研究所周道兰同志参加了部分制片的观察,致谢。

材料与方法

1. 小鼠选择和来源

采用南京生物制品厂引入的昆明种杂交繁殖小白鼠,要求毛色光泽,表现灵活,体表健康,无肿瘤结节。体重自 17.5—25 克(♂ 10 只; ♀ 18 只)。

2. 小鼠体细胞染色体制备方法:

小鼠骨髓细胞与外周血细胞染色体制备方法均按本实验室建立的条件及操作进行^[3,4],其操作流程(见表 1)。

3. 小鼠体细胞染色体观察和分析:

(1) 骨髓细胞染色体观察、分析、记录,每只小鼠统计 100 个细胞中的实际资料。相对应的小鼠外周血细胞按所观察到的细胞中的资料统计。

(2) 考虑到小白鼠系端着丝粒染色体,对染色体型及染色单体型畸变的类型,按畸变发生机理拟定一个观察记录“标准”^[5],属染色体型畸变的有:(三)双着丝粒体,着丝粒环,无

着丝粒环,微小体、末端缺失,易位等;属染色单体型畸变的有:染色单体间隙,染色单体断裂,染色单体互换等。实验小鼠中所见到的染色体型、染色单体型畸变均须由另一位观察者(有时甚至是 3 人或 4 人同时)过目议定。

(3) 统计资料均用百分率±泊松标准误。

结果与讨论

实验鼠的体细胞染色体观察结果(见表 2)。

1. 28 只实验鼠均可分别记数分析 100 个骨髓中期分裂相细胞,总计数为 2800 个。 $2n=40$ 的计数为 2744 个,其百分率±泊松标准误(以下同)为: $98.00 \pm 0.22\%$,亚二倍体细胞 55 个, $1.96 \pm 0.16\%$ (其中, $2n \approx 40$, 为 38 的计 7 个, $0.25 \pm 0.08\%$; 为 39 的计 48 个, $1.71 \pm 0.21\%$)。未见到超二倍体细胞。只见到 1 个多倍体细胞,为总计数的 $0.04 \pm 0.04\%$ 。

属染色体型畸变的只查见末端缺失,其他

表 1 小鼠体细胞染色体制备方法流程

小鼠按 5 微克 (μg)/克 (gm.) 体重腹腔

注入秋水仙素溶液

5 小时后

骨髓细胞染色体制备过程以生理盐水
冲出骨髓细胞,经 1200 转(rpm)/分,
离心 10 分钟

留 0.5 毫升沉淀物,加入 37°C 预温的
 $0.05\text{--}0.06\text{ M}$ 氯化钾溶液至
 $8.0\text{--}10.0$ 毫升

外周血细胞染色体制备过程
以肝素抗凝自眼窝内取血
0.5 毫升

置于 10 ml 离心管内,加入 37°C
预温的 $0.05\text{--}0.06\text{ M}$ 氯化钾溶
液至 $8.0\text{--}10.0$ 毫升

(以下两种制备过
程,基本相同)

各自分别加入甲醇: 冰醋酸(3:1)固定液(新鲜配制)
1.0 毫升,混匀,5 分钟后低速离心(700—800 转/分,5—7 分钟)

留 0.5 毫升沉淀物,加固定液至 5.0 毫升
20—30 分钟 此过程重复一次。

1200 转/分离心 10 分钟

留 0.2—0.3 毫升沉淀物,轻
轻吸匀,气干法制片

Giemsa 染色后,镜检,
分析,统计。

表 2 小鼠体细胞染色体的“自然畸变率”观察 (百分率±泊松标准误)

小鼠序号	性别		体重(克)	小鼠骨髓细胞染色体观察										小鼠外周血细胞染色体观察									
	雄	雌		分析细胞数	2n=40数	2n±40数	多倍体细胞	末端缺失	染色体单体型畸变		分析细胞数	2n=40数	2n±40数		多倍体细胞	末端缺失	染色体单体型畸变						
									间隙	断裂			38	39			38	39	间隙	断裂			
1	✓		24	100	98	2				74	73					1							
2	✓		24	100	99	1				2	2												
3	✓		23.5	100	99	1				52	50	1											
4		✓	24	100	99	1				33	32	1											
5		✓	24.5	100	98	2				43	43												
6		✓	24	100	100			1		100	99	1				1							
7	✓		24	100	97	1				55	54	1		1		1							
8	✓		22	100	97	1				45	45												
9		✓	24	100	98	2			1	53	52	1											
10		✓	22	100	98	2				67	66	1					1						
11		✓	24.5	100	99	1			1	100	98	2				1							
12		✓	25	100	98	1				26	25	1											
13		✓	23	100	97	1				2	2												
14		✓	25	100	99	1				13	13												
15		✓	25	100	99	1				21	21												
16	✓		23	100	97	3				6	6												
17	✓		19	100	97	2				89	88												
18		✓	21	100	98	2				14	14						1						
19		✓	22	100	97	3				14	14						2						
20	✓		17.5	100	95	5				100	99	1											
21	✓		17.5	100	98	2				62	61	1											
22		✓	18	100	97	2				52	50	1					1						
23	✓		18	100	99	1				100	99	1					1						
24	✓		18	100	98	2				100	99	1					1						
25	✓		17.5	100	96	4				100	97	3			1		1						
26	✓		17.5	100	98	2				100	99	1					1						
27	✓		17.5	100	99	1				86	84	1					1						
28	✓		17.5	100	100					94	93	1					2						
合计	10	18	17.5-25	2800	2744	7	48	1	4	3	1	1603	1578	2	21	2	2	14	4				
					98.00±0.22	0.25±0.08	1.71±0.21	0.04±0.04	0.14±0.07	0.11±0.06	0.04±0.04	1603	98.67±0.25	0.11±0.08	1.10±0.20	0.12±0.08	0.10±0.07	0.81±0.27	0.19±0.11				
								百分率±泊松标准误								1.21±0.23							

均未发现。所见末端缺失4个, 占总计数的 $0.14 \pm 0.07\%$ 。属染色单体型畸变的染色单体间隙与染色单体断裂分别见到3个与1个, 占总计数细胞的 $0.11 \pm 0.06\%$ 与 $0.04 \pm 0.04\%$ 。

2. 28只实验鼠相应地作了外周血细胞染色体的观察分析, 计数到的中期分裂相细胞从2个到100个不等, 总计数为1603个。 $2n=40$ 的为1578个, $98.67 \pm 0.25\%$ 。其他统计项(见表2)。

外周血细胞与骨髓细胞一样, 所查中, 均查见末端缺失, 出现的频度是相当的。同时, 两者都没有见到其他的染色体型畸变, 这是一致的。 $2n=40$ 的染色体数分布从大的方面看也是相当的。值得注意的一个问题, 是染色单体型畸变(包括间隙和断裂), 在外周血中期分裂相

的观察值要比骨髓中期分裂相的观察值高, 特别是染色单体间隙明显地高于骨髓细胞中的观察值。从表2中所示, 外周血中的计数, 28只小鼠中尽管中期分裂相细胞可供分析的也有计数到100个的, 但有相当一部分只能计数到25个以下(有7只鼠)。因此, 与28只鼠骨髓中期分裂相细胞的观察结果相比较, 这两者之间的差异包括着计数细胞不相当的误差因素在内。

3. 为进一步分析在小鼠体细胞(骨髓与外周血)染色体畸变观察之间造成误差的原因, 以及确定在怎样的细胞计数值才算适宜, 我们以50个以上作为界限, 那末, 28只小鼠外周血细胞中期分裂相可分析计数达50个以上的有17只小鼠, 占实验鼠的61%。并且, 将所观察的项目与骨髓细胞(对应小鼠)中期分裂相的观察

表3 17只小鼠骨髓细胞、外周血细胞染色体畸变的比较观察*
(百分率±泊松标准误)

		骨髓细胞染色体		外周血细胞染色体	
		数	(%)	数	(%)
分析细胞数		1700		1384	
2n=40数		1666	98.00±0.32	1361	98.21±0.25
2n≠40	38	4	0.24±0.11	2	0.18±0.13
	39	30	1.65±0.33	19	1.41±0.16
多倍体细胞				2	0.19±0.13
染色体型畸变	末端缺失	4	0.24±0.11	2	0.17±0.12
染色单体型畸变	间隙	3	0.18±0.10	13	0.92±0.17
	断裂	1	0.06±0.06	4	0.31±0.17
非整倍体细胞	亚二倍体	34	1.88±0.36	21	1.60±0.22

* 17只小鼠骨髓细胞均计数100个, 外周血细胞均计数至50个以上。

表4 小鼠体细胞染色体分析法比较

	细胞染色体分析法	
	外周血细胞	骨髓细胞
相同点	两法同样可以用于辐射损伤以及有关药物对动物机体作用和影响的实验研究。	
相异点	1. 采取眼眶取血法, 小鼠在一般情况下, 可以免于死亡。 2. 能使小鼠活存一个时期, 作分割实验, 进行数次取血法观察, 最后还可以借助于骨髓细胞染色体法观察。	1. 一般均以断椎活杀, 肢解分别取出股骨骨髓细胞, 小鼠死亡。 2. 只能观察一次, 同一个体, 难于作不同同时相的效应方面的观察研究。

项目比较,其中除多倍体以及染色单体型畸变外,其他项的比较,都是相当的,而且,这些观察值都在正常的变动范围之内,其对应的比较(见表3)。从实验的统计分析中,可以明确地看到,骨髓与外周血细胞染色体畸变观察之间存在着相对对应关系。以外周血中期分裂相细胞的观察来说,同样地可以相应地反映骨髓中期分裂相细胞所观察的结果。这就表明了外周血细胞染色体分析方法可以用于一般的实验研究工作。它比单纯用骨髓细胞染色体分析方法要好一些,一则可使小鼠免于死亡;二则可作分割实验,进行时相效应观察(见表4)。

4. 小鼠体细胞染色体数的分布频度,我们在实验观察中以 $2n \pm 2$ 作为本实验的统计分析范围。观察中,非整倍体细胞,均属亚二倍体细胞,其中又以 39 个的居多。国内虽有小鼠染色体组型以及染色体显带组型的报道^[2],还未见到小鼠体细胞染色体“自然畸变率”方面的报告。就国外有关实验研究报告中所提及的 $2n \pm 2$ 的染色体数分布,非整倍体细胞在 1—5% 的范围之内,偶见有染色体数为 41 的。

小鼠和人体细胞染色体一样,在正常状况下,其(三)双着丝粒体及着丝粒环的出现率是极低的,这在我们的实验观察中也得到了证实。我们所选用的实验鼠在中期分裂相细胞的逐个顺序观察分析中,无论是骨髓细胞还是外周血细胞,均未见到(三)双着丝粒体及着丝粒环,它们的出现率在本实验中应小于 $1/2.8 \times 10^3$ 与 $1/1.6 \times 10^3$,也即应小于 0.36‰ 与 0.62‰。

拿末端缺失来说,在骨髓资料中,分别在 4 只小鼠各查见 1 个,占总计数的 $0.14 \pm 0.07\%$; 在外周血资料中,分别在 2 只小鼠各查见 1 个,占总计数的 $0.10 \pm 0.07\%$,两者均在正常范围之内。部分动物(包括人体细胞在内)的研究资料表明,细胞染色体中末端缺失的自然畸变率也多在 0—0.5% 的变动范围之内。一个值得注意的事实是有 1 只小鼠在骨髓和外周血细胞中期分裂相中均查见有 1 个末端缺失;另外 4 个体中,分别查见 1 个末端缺失,多数是雌性小

鼠,这是否反映其特征,不能贸然而定。在我们应用小鼠细胞染色体指标观察的有关实验研究中所见,末端缺失的出现,雌雄之间的比率分配大体相当,没有显著差异^[1]。

5. 实验中,有一个问题是值得引起重视的,我们选用了 36 只实验鼠作为体细胞染色体的“自然畸变率”观察^[4]。注射秋水仙素溶液量按小鼠每克体重给予 5 微克,在这样浓度剂量腹腔注入状况下,绝大多数小鼠均可收获相当数量的中期分裂相细胞。以小鼠骨髓资料来说,左右两根股骨,各制备 3 张染色体片,大多数只须看半张到 1 张制片就足以达到实验要求,有的只要看 1/4 张制片就已足够统计分析。

可是,在本实验最初 36 只小鼠中,发现有 6 只小鼠的骨髓与外周血细胞染色体制片,全部在油镜下顺序细查,极少见到中期分裂相细胞,与不注射秋水仙素的正常小鼠资料比较,几乎是相同的。秋水仙素的实际作用,在于作为阻断剂,使处于增殖状态的细胞中止在细胞分裂的中期。从本实验可以看出,在正常小鼠中存在着对秋水仙素用量反应敏感程度上的差异问题,或者说,有一个相对不应性问题。

在制备小鼠体细胞染色体的过程中,还摸索过小鼠按克体重腹腔注射 3—5 微克的秋水仙素溶液量,一个后果是实验小鼠难以保持较长时期的活存。为要使小鼠存活期延长,曾试图降低秋水仙素用量,将腹腔注射量控制在 0.5—1.0 微克/克体重状况下,实验小鼠是有可能延长活存期的。为减少秋水仙素对小鼠全身状态的影响以及对体细胞的不良作用,以外周血取样为例,若能在体外采取有效的实验方法(不经培养又能快速)来获得一定数量的中期分裂相细胞,那将会有助于这一方法的更多应用。这是一个值得研究和需要解决的实际问题。

应用细胞遗传学的方法(即染色体分析的方法),对有关课题的研究,有着越来越明确的实用价值。我们的结果表明,小鼠体细胞(骨髓细胞与外周血细胞)染色体的“自然畸变率”是很低的。28 只小鼠均未查见(三)双着丝粒体,着丝粒环,无着丝粒环以及微小体这类畸变,所

见到的末端缺失也极少。就是染色单体间隙与染色单体断裂的出现率也不高。本实验方法，操作简便，只要具备一般的常规条件的实验室，就可以顺利地进行这方面的研究。

参 考 文 献

- [1] 王天宇、陶毓顺、周素华、杨丽君 1981 蜂毒的抗辐射作用和染色体畸变的关系。中华放射医学与防护杂志 1(6): 58—59 页。
- [2] 计雪文 1965 小白鼠的染色体组型。动物学杂志 7(6): 251—253 页。
- [3] 白玉书、关树荣、张秀霞 1980 ^{60}Co γ 射线照射小鼠诱发的骨髓细胞染色体畸变：剂量——效应关系。放射医学与防护 3(1): 32—35 页。
- [4] 杨丽君、王天宇、陶毓顺、周素华 1981 快速制备小鼠外周血细胞染色体。细胞生物学杂志 3(3): 32—35 页。
- [5] Clement, B.S. et al. 1976 Rapid Chromosome Preparations from Mouse blood, *Acta Cytologica.* 20(4): 390—393.
- [6] Ford, C.E. and Hamerton, J.L. 1956 A Colchicine, hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes, *Stain Technology.*, 31(6): 247—251.
- [7] Festenstein, H. 1968 Mouse peripheral blood lymphocytes in culture, *Lancet.*, I: 182—183.