

3Gy 范围内仅观察到 MI 卵母细胞对称性互换,互换率平均为 0.00995/配子、0.01667/配子和 0.02632/配子。非对称互换属于非稳定性畸变,细胞每分裂 1 次,大约丢失 1/2 左右<sup>(10)</sup>。另外,非对称与对称性单体互换在发生机率上近似相等<sup>(11)</sup>。本实验观察的是经过第二次减数分裂,除去 1/2 进入第二极体的畸变量和一次细胞分裂非对称互换丢失 1/2 机率的剩余产额,因此,推测子代平衡易位的再现在 2Gy 时应为  $0.9950 \times 2 \times 2 \times 1/16 = 0.25\%$ ; 2.5Gy 时为  $1.6667 \times 2 \times 2 \times 1/16 = 0.42\%$ ; 3Gy 时为  $2.6316 \times 2 \times 2 \times 1/16 = 0.66\%$ 。

大量资料证明,人类生殖细胞的辐射敏感性高于小鼠<sup>(12)</sup>。因此,要将小鼠生殖细胞的诱变结果直接外推到人类,还需对辐射诱发人类和小鼠配子染色体畸变进行系统比较,从中找出二者之间的规律性。目前,还无在同一实验室进行这种比较的研究,但从已有的研究结果来看,这种外推已成为可能<sup>(13)</sup>。总之,配子染色体分析是一个新领域,无论在遗传学还是辐射细胞遗传学方面,都还有许多问题有待于解决。

#### 参考文献

1. WHO. Methods for the analysis of human chromosome aberrations. Geneva. 1973;66.
2. 白玉书. 辐射细胞遗传学研究中的统计分析方法. 中华放射医学与防护杂志. 1989;9(6):429.
3. Maihes JB, et al. Mammalian in vivo assays for aneuploidy in female germ cells. *Mutat Res*, 1986;167:139.
4. Albanese R. Induction and transmission of chemically induced chromosome aberrations in female germ cells. *Environ Mol Mutag*, 1987;10:231.
5. Tease C, et al. X-ray-induced chromosome aberration in immediately preovulatory oocytes. *Mutat Res*, 1986;173:211.
6. Mutsuda Y, et al. Dose-response relationship of  $\gamma$ -ray-induced reciprocal translocations at low doses in spermatogenesis of crab-eating monkey. *Mutat Res*, 1985;151(1):121.
7. Katch M, et al. X-ray-induced chromosome aberrations in postmeiotic stages of mice. *Jap J Genet*, 1983;58:337.
8. Mutsuda Y, et al. In vitro fertilization rate of mouse eggs with sperm after X-irradiation at various spermatogenic stages. *Mutat Res*, 1985;142:59.
9. 周焕庚,等. 人类染色体. 第一版. 北京:科学出版社, 1987,314—317.
10. 金瑞珍,等. 电离辐射对人血淋巴细胞分裂周期的影响. 辐射防护, 1985;5(4):273.
11. 蔡露. 体外受精技术在辐射遗传学中的应用. 国外医学放射医学核医学分册, 1989;13(3):101.

## 小鼠着床后全胚胎培养方法的建立和应用\*

张天宝 孙棉龄<sup>1</sup> 杨在昌<sup>1</sup>

第二军医大学卫生毒理学教研室 上海 200433 <sup>1</sup>华西医科大学环境卫生学教研室 成都 610041

**摘要** 本文报导昆明种小鼠着床后全胚胎培养方法。通过体内外自身对比以及对阳性对照物 MMC 的试验

\* 国家自然科学基金资助

观察,表明所建方法是成功的。用该方法对已知动物致畸物敌枯双的试验结果显示,敌枯双可诱致明显的畸形等发育毒性。该方法的建立为今后开展致畸研究提供了另一种手段。

**关键词** 全胚胎培养;小鼠;敌枯双;致畸性

## THE ESTABLISHMENT AND APPLICATION OF CULTURE OF POST — IMPLANATION WHOLE EMBRYO OF KUN — MING MOUSE

Zhang Tianbao<sup>1</sup>, Sun Mianlin<sup>2</sup>, Yang Zaichang<sup>2</sup>

Department of Health Toxicology, Second Military Medical University, Shanghai 200433,<sup>2</sup>Department of Environmental Health, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041

**Abstract** In this paper, described the procedures for the culture of post-implantation embryo of Kun-Ming mouse. Half of the mouse embryos in utero were explanted at early somites stage (8.5-days) and grown in vitro by culture method described in this paper. Compared with littermates in vivo, very similar rate of growth and morphodifferentiation were observed over a period of 48 hours. Mitomycin C(MMC) and N,N-methylene-bis(2-amino-1,3,4-thiadiazole) (NSC-143019) were added respectively to 48 hours culture of 8.5 days whole mouse embryos. Significant yolk sac and embryonic growth retardation, morphological abnormalities of embryos, including unfused neural tube, deficits in axial rotation and tail, heart defects were found in MMC and NSC-143019 treated groups. It was showed that both MMC and NSC-143019 exerted teratogenic effects on embryo of mouse in vitro.

**Key words** Whole-embryo culture; Mouse; Teratogenicity; MMC; N,N-methylene-bis(2-amino-1,3,4-thiadiazole)

小鼠着床后全胚胎培养(WEC)是在大鼠着床后 WEC 的基础上建立起来的一种体外致畸试验方法。由于大、小鼠均为致畸试验的常用动物,建立小鼠 WEC 方法既可与体内试验相配套,又可与体外大鼠 WEC 方法相配套,为研究致畸等发育毒性的种属差异、作用机理等提供手段,因此受到研究者的重视。目前,国内已建立大鼠着床后 WEC,但尚未见小鼠着床后 WEC 的报道。本研究的目的是建立小鼠着床后 WEC 方法,为今后开展这方面的研究奠定基础。

### 材料和方法

1. 实验动物:采用昆明种小鼠,雄性体重 30~35g,雌性体重 25~30g,购自华西医科大

学实验动物中心。本室动物房饲养条件:室温 23±2℃,湿度 50~60%,黑暗 14h,光照 10h,自由饮水/摄食,适应性饲养两周后选用健康鼠进行试验。于当日 18:00p.m 按雌:雄 2:1 合笼,次日 8:00a.m 检查交配情况,以查见阴栓之日为妊娠第 0 天,并把妊娠第 8 天 14:00p.m 定为胚胎第 8.5 天龄。

2. 实验装置:采用隔水式恒温孵箱和自制的旋转培养装置,转速为 35 次/min。

3. 培养基:采用按 New 方法制备的即刻离心的 Wistar 大鼠血清,经过滤除菌,56℃水浴灭活 30min, -20℃冰箱保存不超过两周。

4. 试剂:小牛胸腺 DNA(Sigma 公司产);标准蛋白和 Folin-酚试剂购自华西医大激素受体研究室;丝裂霉素 C(MMC)日本产;敌

枯双由四川省化工研究所提供,含量为 97.3%;其余试剂均采用国产分析纯。

5. 胚胎移植和培养方法:参照 Sadle 的方法稍加修改<sup>(1)</sup>。主要步骤是:将 8.5 天龄孕鼠脱颈椎处死,无菌条件下取出子宫,沿系膜对侧剪开子宫,将被蜕膜组织包裹的胚胎移入 Hanks 液中,依次剥去蜕膜和 Rehchert's 膜,分离出胚胎,选择 3~5 个体节数的胚胎并随机分配到各组。将胚胎移入 30~50ml 培养瓶中,每瓶 3 只,3ml 培养液(内含青、链霉素各 100u/ml,0.1ml 的受试物或溶剂)。把培养瓶置旋转培养装置上,在 37℃ 下旋转培养 48h。分别在培养开始时,16h 和 24h 时充入无菌过滤的混合氧气,混合氧气比例依次分别为 O<sub>2</sub>5%:CO<sub>2</sub>5%:N<sub>2</sub>90%;O<sub>2</sub>20%:CO<sub>2</sub>5%:N<sub>2</sub>75%;O<sub>2</sub>40%:CO<sub>2</sub>5%:N<sub>2</sub>55%。

6. 结果观察:将培养 48h 后收获和胚胎置于解剖显微镜下,用目镜测微尺测量卵黄囊直径并观察卵黄囊血管发育情况,然后剥去卵黄囊膜和羊膜,测量头长、体长;在低倍显微镜下观察胚胎各器官的形态分化情况。将观察后的胚胎用 95%乙醇保存,用于测定胚胎蛋白质和 DNA 含量。测定时先用三氯醋酸浸泡过夜,将胚胎匀浆后,用 95%乙醇、95%:氯仿(1:3)、95%乙醇依次在 70℃ 水浴中作用 20min<sup>(2)</sup>,离心后上清液用二苯胺法测量 DNA 含量<sup>(3)</sup>,沉淀用 Folin-酚试剂法测定蛋白质含量<sup>(4)</sup>。

## 7. 实验设计

7.1 体内/外对比:将 8.5 天孕龄鼠用乙醚麻醉后,无菌操作手术切于腹部,在子宫角处结扎一侧子宫,切除并取出按上述方法进行体外培养;然后常规关腹,让另一侧子宫中的胚胎继续在体内生长,48h 后脱颈椎处死,取出子宫,选择位于子宫中部的胚胎与体外培养的胚胎进行对比。

7.2 阳性对照物的验证:用 2μg/ml MMC 观察其对胚胎的致畸等发育毒性。

7.3 枯双对小鼠胚胎发育毒性的观察:设 1.25、2.5 和 5.0μmol 三个剂量组和一个溶剂对照(三蒸水)。

8. 统计分析方法:定量指标采用方差分析和 t 检验进行比较,率的比较采用 χ<sup>2</sup> 检验,均按中国医学百科全书医学统计学软件在计算机上进行处理。

## 结果

### 1. 体内/外小鼠胚胎生长发育的比较

表 1 结果显示,8.5 天龄小鼠胚胎在体外培养 48h 生长发育良好,除体长值稍低于体内组外,其余指标与体内组相比均无明显差异。从形态分化来看,除卵黄囊血管发育程度较体内稍差外,其余均与体内一致或相近。由于昆明种小鼠的体外培养尚未见报道,无法进行比较,但与国外报道的 Swiss 小鼠胚胎结果比较,本试验的生长发育各指标均接近或高于国外报道的结果<sup>(5~6)</sup>。

Table 1. Comparison of 10.5 days mouse embryo growth and development between studies in vivo and in vitro

	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
	( $\bar{x} \pm S$ )	( $\bar{x} \pm S$ )
Number of embryos	13	13
Yolk sac diameter (mm)	5.1 ± 0.19	5.1 ± 0.13
Crown-rump length (mm)	4.9 ± 0.42	4.6 ± 0.13*
Head length (mm)	2.7 ± 0.40	2.5 ± 0.50
Number of somites	28.8 ± 1.92	30.2 ± 2.54
Protein content (μg/embryo)	267.7 ± 199.5	316.8 ± 73.6
DNA content (μg/embryo)	56.9 ± 4.9	58.2 ± 7.2

\* Values differ significantly between in vivo and in vitro

## 2. MMC 和敌枯双对小鼠胚胎生长发育的影响

Table 2. Effects of mitomycin c and N,N-methylene-bis(2-amino-1,3,4-thiadizole) on growth and development of 8.5 days mouse embryo *in vitro*

	Control	MMC	NSC-143019( $\mu\text{mol}$ )		
			1.25	2.5	5.0
Number of embryos	13	13	9	9	6
Percent viable	100	72	100	82	60
Yolk sac diameter(mm)	4.9 $\pm$ 0.37	3.2 $\pm$ 0.38*	4.7 $\pm$ 0.35	4.3 $\pm$ 0.35	3.8 $\pm$ 0.51*
Crown-rump length(mm)	3.9 $\pm$ 0.37	2.6 $\pm$ 0.44*	3.7 $\pm$ 0.53	3.4 $\pm$ 0.43*	3.4 $\pm$ 0.68*
Head length(mm)	1.8 $\pm$ 0.30	1.2 $\pm$ 0.29*	1.9 $\pm$ 0.46	1.6 $\pm$ 0.46*	1.7 $\pm$ 0.46*
Number of somites	27.8 $\pm$ 1.42	17.6 $\pm$ 2.75*	24.8 $\pm$ 2.49*	22.1 $\pm$ 3.26*	22.1 $\pm$ 2.99*
Protein content( $\mu\text{g}/\text{embryo}$ )	308.4 $\pm$ 113.6	125.3 $\pm$ 39.3*	249.9 $\pm$ 36.8	207.4 $\pm$ 19.4*	212.3 $\pm$ 36.0
DNA content( $\mu\text{g}/\text{embryo}$ )	65.6 $\pm$ 12.3	—	32.4 $\pm$ 1.9*	34.2 $\pm$ 4.4*	31.3 $\pm$ 2.7*

\* Compared with control group  $P < 0.05$

表 2 结果显示, MMC 在  $2\mu\text{g}/\text{ml}$  浓度时可明显影响小鼠胚胎的生长, 并可导致胚胎死亡。敌枯双也可导致明显的胚胎毒性, 并有一定的剂量-反应关系; 既可影响卵黄囊的生长发育, 又可影响胚胎的生长。表 3 结果还显示, MMC 和敌枯双均可诱致小鼠胚胎发育异常, 主要表现躯干翻转异常、体节紊乱、神经管未闭合、心包积液等。敌枯双的畸形发生率还有明显的剂量-反应关系。

### 讨 论

小鼠着床后 WEC 方法是目前国外应用

较多的一种体外致畸研究方法, 由于其成本低, 除可用于致畸物的筛检及致畸作用机理的研究外, 还可与大鼠 WEC 方法相结合, 用于研究致畸物的种属差异等。因此, 是一种很有前途的方法<sup>(7)</sup>。

本研究结果显示, 用本实验室所建方法培养的昆明种小鼠胚胎在体外生长发育良好, 基本与体内生长发育水平一致。用阳性对照物验证试验表明, MMC 可诱致胚胎生长发育迟缓和多种发育异常, 与国外报道结果一致<sup>(8)</sup>。上述结果表明, 本研究所建方法是可行的。

Table 3. Malformation rates for 8.5 days mouse embryos exposed to mitomycin c and N,N-methylene-bis(2-amino-1,3,4-thiadizole) in whole-embryo culture

	Control	MMC	NSC-143019( $\mu\text{mol}$ )		
			1.25	2.5	5.0
Number of embryos	13	13	9	9	6
Trunk turning defects(%)	1(7.7)	2(15.4)	1(11.1)	5(55.6)	0(0)
Disorder somites(%)	0(0)	6(46.2)	1(0)	4(44.4)	2(33.3)
Neural tube unfused(%)	0(0)	5(38.5)	1(11.1)	4(44.4)	3(50.0)
Hydrops pericardii(%)	0(0)	5(38.5)	0(0)	4(44.4)	2(33.3)
Tail abnormal(%)	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	2(33.3)
Rate of malformation(%)	7.7	69.2*	22.2*	55.6*	83.3*

\* Compared with control group  $P < 0.05$

敌枯双是一种已知的动物致畸物,整体动物试验已证明对昆明种小鼠有致畸作用。对体内外大鼠胚胎也有致畸作用(本室资料),但用小鼠着床后 WE 法的研究结果尚未见报道。本试验结果显示,敌枯双可诱致小鼠胚胎多种发育异常,而且发生率较高,并有一定的剂量-反应关系。这也进一步证实了所建方法的可靠性。

#### 参考文献

1. Sadler TW. Culture of early somite mouse embryos during organogenesis. *J Embryol Exp Morphol*, 1979; 49: 17-25.
2. Webb JM, et al. Acid solubilization of animal tissue nu-

cleic acids as related to their extraction and estimation. *Arch Biochem Biophys*, 1965; 112: 273-281.

3. Giles KW, et al. An improved diphenyl-amine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 1964; 206: 93.
4. Lowry OH, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-275.
5. Wan YJ, et al. Development of early somitic mouse embryos in static culture in vitro. *J Exp Zool*, 1982; 220: 219-225.
6. Naruse I, et al. Strain differences in the teratogenicity induced by sodium valproate in culture mouse embryos. *Teratology*, 1988; 38: 87-96.
7. 张天宝. 全胚胎培养方法及其在致畸研究中的若干进展. 国外医学卫生学分册, 1992; 1: 29-33.
8. Maele-Fabry G Van and Picard JJ. Evaluation of the embryotoxic potential of ten chemicals in the whole mouse embryo culture. *Teratology*, 1987; 36: 95-106.

## 大肠杆菌氧化适应反应及其 oxyR 基因调节作用的研究\*

柴荣奎 金中初

浙江医科大学病理生理教研室 杭州 310006

**摘要** 本研究采用大肠杆菌 PQ66 及其 oxyR 基因缺失突变体 OG400 作为生物指示体,观察到 PQ66 经低剂量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 预处理后,能诱导出对高剂量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 毒性作用的适应反应,且对其他过氧化物 BHP、CHP 诱导的 SOS 反应也具有明显的抑制效应,但在 OG400 中,并不存在这种由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化适应反应。结果表明,这种氧化适应反应对过氧化物的毒性作用可能具有普遍的适应性,而 oxyR 基因可能参与了这种适应反应的调节作用。

**关键词** oxyR 基因;氧化适应反应;SOS 反应;过氧化物

### THE STUDY ON OXIDATIVE ADAPTATION RESPONSE AND REGULATIVE EFFECT OF OXYR GENE IN ESCHERICHIA COLI

Chai Rongkui, Jin Zhongchu

Department of Pathophysiology, Zhejiang Medical University, Hangzhou, 310006

**Abstract** E. coli strains PQ66 and its oxyR deletion mutant OG400 were used as bioindica-

\* 国家自然科学基金资助项目