

小鼠睾丸生殖细胞染色体分析最佳实验条件的探讨

李袭丽 白成江 许尔怡
(天津医学院卫生毒理教研室)

由于生殖细胞染色体标本制作和畸变鉴别较为困难,血液睾丸屏障等因素影响与体细胞遗传毒理等研究相比,生殖细胞的资料报道很少。

Evans等^[1]改进了睾丸染色体的空气干燥法,国内也报道了改进的小鼠睾丸染色体畸变试验方法^[2,3]。但各实验使用的秋水仙素剂量作用时间,染毒方法及制片时间均不尽相同,本文对实验方法进行了多次探讨,综合报道如下:

在小鼠睾丸生殖细胞染色体制片的实际工作中虽按文献报道的常规方法制片,经常见到初级精母细胞第1次减数分裂中期分裂相(简称中期I)较少,无法分析,浪费人力物力。据Clark^[4]报道小鼠骨髓有丝分裂高峰在中午12点,最低在下午4点。徐淮安也报道小鼠骨髓细胞的分裂有一定的昼夜周期和高峰。我们推想睾丸细胞分裂是否也有一定的时间规律,在本实验中对小鼠睾丸生殖细胞减数分裂进行了昼夜周期的观察。

此外文献报道用染色体断裂剂丝裂霉素C给小鼠染毒后观察睾丸生殖细胞效应时所用的染毒次数及杀鼠制片时间也不一致^[5,6,7,8]。为此我们又进行了丝裂霉素C染毒后在不同时间杀鼠制片以探讨丝裂霉素C诱发中期I细胞畸变时间效应关系。

1. 材料与方法

实验(一) 小鼠睾丸生殖细胞减数分裂昼夜周期的探讨。

根据正交试验设计法,对秋水仙素量,秋水仙素作用时间及杀鼠时间3个因素进行

探讨。混合水平 $L_{32}(8 \times 4^2)$ 设计。

实验日期1987年5月20日至23日,实验室气温19~27℃,实验动物为本室繁殖TA₁雄性小鼠,体重36至41g,每组4只动物共32只,每3h杀一组动物,21h共杀8次即6Am、9Am、12Am、15_{pm}、18_{pm}、21_{pm}、24_{pm}及3Am,秋水仙素剂量分别为2、4、6、8mg/kg,作用时间为2、4、6、8h。

按照实验设计要求时间,腹腔注射秋水仙素,颈椎脱臼处死,取出一侧睾丸在盛有生理盐水的小烧杯中放入冰箱保存备用,另一侧睾丸用眼科镊子去掉外膜,反复撕开待曲精细管松散,立即放入盛有10ml低渗液的离心管中用毛细滴管反复吹打至曲精细管散开呈细丝状,放置40min吸出上清液,加入甲醇,冰醋酸(3:1)固定液10ml,吹打均匀20min后,再次固定,吸出上清液,剩约1ml左右加入60%冰醋酸2ml吹打至云雾状,立即加入3ml固定液,离心(1000r/min)5min,吸出上清液剩约0.4ml去掉其中块状物用微量加样器吸180μl在冰片上滴片,为使条件一致每次均由一人滴片,每只动物制片两张,用1:9Giemsa染液染色15min,高倍镜下计数1000个中期I数。

实验(二) 丝裂霉素C染毒后,于不同时间制片观察中期I畸变的时间效应关系。

用TA₁小鼠32-39g,雄性21只,随机分为7组,每组3只鼠,1至6组为实验组,均用1次腹腔注射丝裂霉素C 2.5mg/kg染毒,并分别在染毒后1、3、5、7、9、11d早上10点,腹腔注射秋水仙素4mg/kg,

下午2点制片。第7组为对照组，腹腔注射同量的生理盐水，第6天杀鼠制片。方法同实验(一)，每片均在油镜下观察，每只鼠均观察记录100个中期I中畸变情况。

2. 结果

小鼠睾丸生殖细胞染色体多因素条件实验的结果和方差分析见表1。

我们观察到在一天(24h)中，在9Am和12_{pm}有两个峰，秋水仙素8mg/kg，作用时间4h有1个峰，但经方差分析结果(表1)，无论杀鼠时间，秋水仙素剂量及作用时间均对中期I的出现数量无显著性影响。

丝裂霉素C染毒后，中期I畸变时间效应关系结果见表2。

表1 小鼠睾丸生殖细胞染色体多因素实验的方差分析

| 变异来源 | 离差平方和 | 自由度 | 均方 | F | P |
|--------|-------|-----|--------|-------|-------|
| 杀鼠时间 | 6569 | 7 | 938.4 | 0.479 | >0.05 |
| 秋水仙素剂量 | 5612 | 3 | 1870.7 | 0.955 | >0.05 |
| 作用时间 | 1793 | 3 | 597.7 | 0.305 | >0.05 |
| 误差 | 35275 | 18 | 1959.7 | | |

表2 丝裂霉素C染毒后不同时间中期I细胞畸变情况

| 组别 | 杀鼠时间(d) | 观察细胞数(个) | 畸变数 | | | | | 总畸变数 | 常染色体单体数 | 性染色体单体数 | | | | |
|----|---------|----------|--------|------|--------|------|----|------|---------|----------|----|----------|----|----------|
| | | | 性染色体易位 | | 常染色体易位 | | 断片 | | | | | | | |
| | | | 数 | 率(%) | 数 | 率(%) | | | | | 数 | 率(%) | | |
| 1 | 1 | 300 | 1 | 0.33 | 0 | 0 | 7 | 2.33 | 8 | 2.67* | 5 | 1.67 | 14 | 4.67** |
| 2 | 3 | 300 | 0 | 0 | 1 | 0.33 | 11 | 3.61 | 12 | 4.00** | 1 | 0.33 | 3 | 1.00 |
| 3 | 5 | 300 | 7 | 2.33 | 3 | 1.00 | 11 | 3.67 | 21 | 7.00**Δ | 15 | 5.00**Δ | 42 | 14.00**Δ |
| 4 | 7 | 300 | 2 | 0.67 | 1 | 0.33 | 12 | 4.00 | 15 | 5.00**Δ | 8 | 2.67*Δ | 21 | 7.00**Δ |
| 5 | 9 | 300 | 9 | 3.00 | 6 | 2.00 | 9 | 3.00 | 24 | 8.00**ΔΔ | 13 | 4.30**Δ | 18 | 6.00**Δ |
| 6 | 11 | 300 | 4 | 1.33 | 3 | 1.00 | 19 | 6.33 | 26 | 8.67**ΔΔ | 20 | 6.67**ΔΔ | 33 | 11.00**Δ |
| 7 | 6 | 300 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.33 | 1 | 0.33 | 3 | 1.00 | 3 | 1.00 |

注：1. 各实验组与对照组相比 * P≤0.05 ** P≤0.01
 2. 各实验组与第1组相比， Δ P≤0.05 ΔΔ P≤0.01
 3. 第1至第6组为实验组，第7组为对照组

试验的数据经Kastenbaum-Bouman表统计处理可见丝裂霉素C染毒后，第1、3、5、7、9、11d的中期I细胞总畸变率都显著的高于对照组，其中第5、7、9、11d的畸变率又显著的高于第1和第3d的畸变率，且染毒后随着时间的延长，畸变率有逐渐增加的趋势，而以第11d最高。

本实验所见易位均为链状4价体及断片，由于染色体间隙作为遗传危害的表现尚有争论，故表中未列此项。

3. 讨论

关于小鼠睾丸细胞减数分裂的昼夜周期，Clark^[4]报道小鼠骨髓有丝分裂指数高峰在中午12点，最低值在下午4点。而且小鼠其他器官如胃粘膜^[4]、表皮肝^[9]与骨髓有丝分裂有非常类似情况。徐惟安^[10]也报道小鼠骨髓细胞有丝分裂有明显的高峰，分别在9-10Am及9-12pm。本实验结果表明小鼠睾丸减数分裂昼夜周期虽在9-12Am与12_{pm}有两个峰，但经统计处理各时间点无显

著差异。

秋水仙素剂量及作用时间。

在 8 mg/kg 秋水仙素和作用时间 4 h 有个较明显的峰值, 虽经统计分析在本文使用的秋水仙素剂量和作用时间内对初级精母细胞中期 I 数量高低未见显著影响, 我们认为可能与观察例数不够多有关, 有必要做进一步的观察和探讨其他可能存在的影响因素。

畸变特点

本实验初级精母细胞的畸变除断片外, 用丝裂霉素 C 染毒后第 3 d 就开始出现易位, 可导致不平衡的配子形成是遗传危害的重要指标, 对照组未见易位, 说明实验组出现易位是丝裂霉素 C 所诱致。实验组中性染色体单价体除染毒后第 3 d 组外均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 但在正常情况下性染色体单价体也较常见, 于对照动物中可高达 6-10%, 但常染色体单价体认为是由于不联会或联会消失造成, 在正常动物较少见。本文除染毒后第 1、3 d 外均比对照组显著增高, 应认为系由丝裂霉素 C 诱致。

丝裂霉素 C 给小鼠染毒后, 何时杀鼠制片, 效果最好, 文献报告不一致。吴金龙^[6]报道丝裂霉素 C 2.5 mg/kg 染毒后, 第 11 d 杀鼠, 中期 I 畸变率显著高于 5 d 染毒后第 6 d 制片。Adler^[7]认为 1 次性染毒, 随时间延长, 中期 I 畸变率逐渐增加, 于第 12 d 达高峰, 本实验结果与上述报告基本相符。即用丝裂霉素 C 1 次染毒后, 第 11 d 杀鼠制片可获得较多的中期 I 畸变细胞, 但 1 次染毒, 第 5 d 杀鼠制片即可使各种畸变显著高于第 1、3 d, 故我们认为在小鼠睾丸染色体畸变试验中染毒后第 5-11 d 制片均可得阳性结果。

综上所述小鼠睾丸生殖细胞减数分裂昼夜周期可见在 9-12_{Am} 及 12_r_m 有两个峰, 制片条件以秋水仙素 8 mg/kg 及作用时间 4 h 较好, 虽经统计分析未见显著差别, 估计与观察例数少有关, 有待进一步探讨, 丝裂霉素 C 1 次染毒后第 11 d 杀鼠制片可获得较多的中期 I 畸变细胞。

参考文献

1. Evans ED, et al. An air drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* 1964; 3: 289.
2. 徐惟安, 黄幸纡。染色体畸变试验法简介。《环境保护》1979, 1: 30.
3. 施立明。顺铂对雄性小鼠生殖细胞的细胞遗传学效应。《遗传学报》1985, 12(5): 362.
4. Clark RH, et al. Circadian periodicity of bone marrow mitotic activity and reticulocyte counts in rats and mice. *Science* 1969, 166: 236.
5. 冯静仪, 凌宝根。农药克菌丹对小鼠睾丸细胞遗传效应。《中华预防医学杂志》1982, 16(5): 300.
6. 吴金龙。不同染毒程序对丝裂霉素 C 诱发小鼠初级精母细胞染色体畸变频率的影响。第二届全国环境诱变剂学术讨论会论文。
7. Adler ID. Aberration induction by mitomycin C in early primary spermatocytes of mice. *Mutat Res* 1976; 35: 247.
8. Shiraishi Y. Chromosome aberration induced by monomeric acrylamide in bone marrow and germ cell of mice. *Mutat Res* 1978; 57: 313.
9. Blumeufeld CM. Studies of normal and of abnormal mitotic activity. *Arch Pathol* 1943, 35: 667.
10. 徐惟安。关于小鼠骨髓细胞分裂昼夜周期及染色体最佳试验条件的探讨。《劳动卫生与环境医学》1980, 6: 46.