

# 瑞 - 姬氏混染在 Cr(VI) 诱导的 HepG2 细胞微核试验中的应用

# Utilization of Wright-Giemsa Mixed Stain in Cr(VI) -Induced HepG2 Cells Micronuclei Test

边寰锋<sup>1</sup>/安飞云<sup>1</sup>/钟才高<sup>1,\*</sup>/廖春华<sup>2</sup>

(1. 中南大学公共卫生学院卫生毒理学系, 湖南长沙 410078 2. 江西省疾病预防控制中心, 江西 南昌 330029)

BIAN Huan-feng<sup>1</sup>, AN Fei-yun<sup>1</sup>,  
ZHONG Cai-gao<sup>1,\*</sup>, LIAO Chun-hua<sup>2</sup>

(1. Department of Health Toxicology, School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China;  
2. Jiangxi Center for Disease Prevention and Control, Nanchang 330029, China)

**【摘要】**背景与目的：将瑞 - 姬 (Wright-Giemsa) 氏混染法用于 Cr(VI) 诱导的 HepG2 细胞微核试验, 探讨瑞 - 姬氏混染配比浓度和不同染色时间对染色效果的影响。材料与方法：以瑞 - 姬氏混染对 HepG2 细胞进行染色, 采用不同的染液配比和染色时间, 观察其对染色效果的影响。结果：3 : 1 瑞 - 姬氏混染 3 ~ 5 min 可以获得较瑞氏或姬氏单一染色更好的染色效果。结论：瑞 - 姬氏混合染色法可应用于微核试验中的细胞染色, 并可获得良好的染色效果。

**【关键词】**瑞氏染色；姬氏染色；瑞 - 姬氏混染；双核；HepG2 细胞

中图分类号：Q355 文献标识码：A 文章编号：1004 - 616X(2007)02 - 0146 - 03

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: To explore the influence of different concentrations and different proportions of Wright-Giemsa dye on its staining effect, through application to micronucleus test of HepG2 cells induced by hexavalent chromium[Cr(VI)]. MATERIALS AND METHODS: HepG2 cells were stained with different proportions of Wright-Giemsa dye and for different stain time, and their influence on staining effects were assessed. RESULTS: Better results could be obtained when cells were stained with a concentration of Wright-Giemsa at 3 : 1 for 3-5 minutes. CONCLUSION: Wright-Giemsa stain could be applied to micronucleus test with favorable effects.

**【KEY WORDS】** Wright stain; Giemsa stain; Wright-Giemsa stain; binuclei; HepG2 cells

微核是在细胞分裂过程中由于纺锤体功能受损, 在有丝分裂后期滞留于子细胞胞质中的染色体或染色体断片, 微核的检测可用于评价化学物质对染色体的损伤。在微核的检测过程中, 细胞染色的质量对微核的观察有重要的影响。目前常用的是姬姆萨 (Giemsa) 染色法, 虽然胞核着色清楚, 但胞浆着色较淡, 有时细胞边界不清, 不利于微核的正确辨认。考虑到瑞氏 (Wright) 染料对胞浆染色较好, 能否结合瑞氏、姬氏染料的染色特点, 控制适当的比例与染色时间, 获得满意的染色效果。为此我们在评价六价铬 [Cr(VI)] 诱导肝癌细胞株 HepG2 细胞 DNA 损伤过程中, 采用瑞 - 姬 (Wright-Giemsa) 氏混染法用于微核的检测, 探讨瑞 - 姬

氏混染配比浓度和不同染色时间对染色效果的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 HepG2 人类肝癌细胞株, 由中南大学湘雅医学院细胞生物室提供。

1.1.2 主要仪器 XSZ-107B(N)型双目生物显微镜 (宁波永新光学股份有限公司); HHCP-1 型二氧化碳培养箱 (上海一恒科技有限公司); XD-101 型倒置生物显微镜 (JNOEC 公司, 美国)。

1.1.3 主要试剂 重铬酸钾 (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 基准级, 上海浦江化工厂); 细胞松弛素 B (Sigma 公司, 美国);

收稿日期：2006 - 06 - 13; 修订日期：2006 - 10 - 30

作者简介：边寰锋 (1979 - ) 男, 浙江省绍兴人, 硕士研究生, 研究方向：分子毒理学。

\* Correspondence to: ZHONG Cai-gao, Tel: 0731 - 4805461, E - mail: zcg54@hotmail.com

DMEM 培养基 (HyClone 公司, 美国); 类标准胎牛血清 (中美合资兰州民海生物工程有限公司); 姬姆萨染料 (北京化工工厂); 快速瑞氏染色试剂 (迈克科技公司); 其余试剂均为国内市售, 分析纯。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 染料的配制** 姬姆萨染液: 称取 0.5 g 姬姆萨染料于乳钵内, 逐渐加入 33 ml 甘油研磨均匀成悬浮状, 56 °C 水浴 90 min, 加入 33 ml 甲醇充分摇匀后, 普通滤纸过滤, 室温保存备用。临用前取姬姆萨原液 1 份, 加 9 份磷酸盐缓冲液 (pH = 6.8), 充分混匀后即可使用。瑞氏染液: 采用快速瑞氏染色液 (即用型)。

**1.2.2 胞质分裂阻断 (Cytokinesis-blocking, CB) 微核试验** 参照 Natarajan 等<sup>[1]</sup> 所介绍的方法, 稍加改进。将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 25 ml 培养瓶, 接种密度为  $5 \times 10^5$ /ml, 置 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养过夜后, 加入终浓度分别为 0、2.5、5、10  $\mu$ mol/L 的 Cr(VI) 后继续培养 24 h。染毒结束后, 吸出培养基, 加 0.5 ml 0.25% 的胰酶消化细胞, 收获的细胞经离心、PBS 洗涤后, 重悬于含细胞松弛素 B (终浓度为 5  $\mu$ g/ml) 的 DMEM 培养基中继续培养 24 h。最后按常规收获细胞, 用新鲜配制的甲醇: 冰乙酸固定液 (3:1) 固定后, 取细胞悬液滴于预冷的玻片上, 室温自然干燥后备用。

**1.2.3 染色** 瑞氏和姬氏单染按常规方法进行, 瑞氏法和姬氏法单染的时间分别为 3 min 和 5 min。瑞 - 姬氏混染, 首先配制成不同比例的瑞 - 姬氏混染液, 配比范围在 3:1~1:3 之间, 同时在 1~15 min 内设置不同的染色时间点。

**1.3 统计学方法** 采用  $\chi^2$  检验进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 不同染色时间及混染液配比的染色效果

为了观察瑞 - 姬氏混染液浓度和染色时间对染色效果的影响, 我们选择了瑞 - 姬氏混染液 5 个不同的配比浓度, 分别染色 1、3、5、10 min 和 15 min, 从胞核、胞浆颜色深浅、鲜明度以及细胞轮廓等方面评价了不同染色条件对染色质量的影响。由表 1 可见, 不同的染色时间对染色质量和微核的观察影响很大, 1 min 的染色时间过短, 染料未充分粘附到细胞上, 染色偏淡; 10 min 及其以上时间的染色, 胞核染色过深, 胞浆与胞核对比度差, 且玻片底色不易洗脱; 而染色时间在 3~5 min 之内, 胞浆和胞核着色清晰、对比好, 便于微核的观察和辨认。瑞 - 姬氏混染液的配比浓度为 1:3, 1:2 和 1:1 时, 染色偏淡, 胞浆与胞核的对比不明显; 而 2:1 的配比浓度虽胞浆与胞核易于区分, 但着色不太鲜明, 对比度也不甚理想, 当配比浓度为 3:1 时, 胞浆与胞核对比适中,

表 1 染色时间和混染液配比浓度对染色效果的影响

Table 1 Influence of different stain time and Wright-Giemsa dye proportions on stain effect

Wright: Giemsa	Stain time (min)				
	1	3	5	10	15
3:1	Light stain in nucleus	Clear stain, apparent comparison	Vivid stain, distinct comparison	Deep stain, deep colour in slides	Excessively deep colour in slides
2:1	Light stain in nucleus	Good comparisons between plasm and nucleolus	Good comparisons between plasm and nucleus	Red stain, deep colour in slides	Excessively deep colour in slides
1:1	Light stain in nucleus	Light stain in plasm	Difficult to distinguish plasm	Red stain, difficult to distinguish	Only cell outline visible
1:2	Blue stain in nucleus	Blue stain in plasm	Light stain in plasm	Bad stain in plasm	Blue stain
1:3	Blue stain in nucleus	Blue stain in plasm	Clear-cut cell outline	Light stain	Light stain in plasm

边界清晰, 着色鲜明, 轮廓清楚, 微核易于辨认。

**2.2 不同染色方法染色效果的比较** 取对照组细胞制备的玻片, 分别用瑞氏、姬氏或 3:1 的瑞 - 姬氏混染, 观察不同染色方法对染色效果的影响。瑞氏、姬氏单染的时间依次为 3 min 和 5 min, 瑞 - 姬氏混染的时间为 5 min, 由图 1a 可见瑞 - 姬氏混染的细胞胞核呈紫红色, 胞浆呈半透明状, 整个细胞着色清晰, 对比鲜明; 细胞边缘明显, 微核清晰可辨, 姬氏单染胞核染色较深, 呈深蓝紫色, 胞浆着色模糊, 胞核边界不清晰, 细胞边缘较清楚 (图 1b); 瑞氏单染虽可见到较明显的细胞轮廓, 胞

核和胞浆对比亦可, 但鲜明度不够, 且细胞边界不甚清楚 (图 1c)。

**2.3 Cr(VI) 对 HepG2 细胞微核形成的影响** 采用细胞分裂阻滞法<sup>[2]</sup>, 以 3:1 瑞 - 姬氏混合染料染色 5 min, 观察了 Cr(VI) 诱导的 HepG2 细胞微核的形成。HepG2 细胞经不同剂量的 Cr(VI) 染毒 24 h 后, 再用细胞松弛素 B 阻滞细胞的分裂, 可见双核细胞明显增多, 双核细胞率为  $(71.2 \pm 0.13)\%$ , 而未经细胞松弛素 B 处理的细胞仅为  $(3.4 \pm 0.25)\%$ 。通过计数不同 Cr(VI) 染毒剂量组的双核细胞微核率可见, Cr(VI) 处理的 HepG2



细胞,微核形成率明显增加,与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ) (图 2 表 2)



图 1 三种染色方法的染色效果( $\times 400$ ) a 混合染色 b Giemsa 染色; c Wright 染色

Figure 1 Effect of three kinds of stain methods ( $\times 400$ ) a Giemsa-wright mixed stain b Giemsa stain c Wright stain

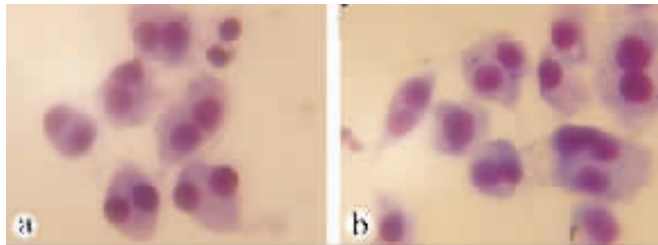


图 2 混合染色检测  $\text{Cr}(\text{VI})$  诱导的 HepG2 细胞微核的形成( $\times 400$ ) a 对照组; b 实验组

Figure 2 Micronuclei induced by  $\text{Cr}(\text{VI})$  on HepG2 cells stained by the mixture of Giemsa and Wright( $\times 400$ ). a control group; b test group

表 2 六价铬对双核HepG2细胞微核率的影响

Table 2 Effect of hexavalent chromium on micronuclei rate of HepG2 cell

Hexavalent chromium concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	Binuclear cells	Binuclear cells with micronuclei	Micronuclei rate (%)
Control	3 000	64	21.33 $\pm$ 5.17
2.5	3 000	102	34.00 $\pm$ 6.49 *
5.0	3 000	256	85.33 $\pm$ 9.99 *
10.0	3 000	555	185.00 $\pm$ 13.90 *

Compared with control, \*  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

姬姆萨染色是微核实验常规的染色方法,由伊红和美蓝两种成分所组成,对细胞核的着色较好,但对胞质着色不理想,染色过浅或过深都严重影响微核的辨认。而瑞氏染料主要由美蓝、伊红、天青组成,对胞浆着色较好,而对胞核的着色力相对较差,因此单纯用于微核的观察其染色效果也不甚理想。Celik<sup>[3]</sup> 以及国内有些学者<sup>[4]</sup> 将吖啶橙(acridine orange)染料用于体内外微核试验,虽然微核容易辨认,但是染色持续时间不长,一般在染色后几小时内必须阅片和计数,因此实际应用有一定

的局限性。最近国外采用 Diff-Quik 染色剂<sup>[5]</sup>用于微核的检测获得了较好的染色效果,胞浆和胞核着色都很清晰,微核容易辨认,但 Diff-Quik 这种染色试剂比较昂贵,难以在国内推广应用。周海良等<sup>[6]</sup>将瑞氏和姬氏染色液按 3 : 1 混染血涂片,用于观察血细胞,获得了满意的效果,提示瑞 - 姬氏混染具有一定的应用价值。本实验以 HepG2 细胞作用实验材料,采用细胞松弛素 B 胞质分裂阻滞法观察了  $\text{Cr}(\text{VI})$  对微核形成的影响,结果显示瑞 - 姬氏染色液以 3 : 1 比例混合,染色 5 min 可获得满意的染色效果。瑞 - 姬氏混染后细胞轮廓清晰,胞质、胞核边界明显,着色对比鲜明,较单纯的瑞氏或姬氏染色其染色质量有明显的提高,因而有利于微核的识别。根据我们在制片以及镜检过程中的经验,认为以下几方面应该注意:玻片需事先用酸浸泡,冲洗干净后,用无水乙醇擦干;染色时间最好控制在 3 ~ 5 min 之内,否则将由于染色过浅或过深,影响染色质量;如采用 HepG2 细胞,制片过程无需低渗,否则将导致胞浆不易着色,影响微核的辨认。

### 参考文献:

- [1] Natarajan AT, Darroudi F. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/ carcinogens [J]. *Mutagenesis*, 1991, 6(5): 399 - 403.
- [2] Ban S, Konomi C, Iwakawa M, et al. Radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes obtained from patients with cancers of the breast, head and neck or cervix as determined with a micronucleus assay [J]. *J Radiat Res*, 2004, 45(4): 535 - 41.
- [3] Celik A, Ogenler O, Comelekoglu U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate [J]. *Mutagenesis*, 2005, 20(6): 411 - 415.
- [4] 孙立平, 李德志, 曹佳, 等. 大鼠骨髓嗜多染红细胞微核的流式细胞仪自动化检测 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2004, 16(3): 155 - 158.
- [5] Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures [J]. *Mutat Res*, 2003, 534(1-2): 65 - 75.
- [6] 周海良, 戴启宇, 于贺军. 介绍一种末梢血片血细胞单一染色法 [J]. *临床军医杂志*, 2000, 28(2): 69 - 70.