



微核试验的改进

马宝良¹, 鲁克庆²

(1. 兰州大学第二医院泌尿外科研究所, 甘肃省泌尿系统疾病研究重点实验室, 兰州 730030;
2. 甘肃省泌尿系统疾病临床医学中心, 兰州 730030)

【摘要】 目的 将传统的骨髓采集方法与改良的方法进行比较, 明确两种方法在细胞数量、组织污染情况和涂片染色背景的差异, 为以后微核试验的应用提供参考。**方法** 将处死小鼠的胸骨取出, 一部分, 使用传统的骨髓采集方法, 将小鼠的骨髓挤压于含胎牛血清的载玻片上, 常规涂片; 另一部分, 用1 mL注射器抽取胎牛血清100 μL刺入胸骨中, 将骨髓冲出, 涂环形薄片。**结果** 两种方法均能达到实验要求, 但是改良骨髓采集法, 采集的细胞数量更多, 组织污染细胞少, 制片背景更加清晰。**结论** 与传统的骨髓采集方法相比较, 改良的骨髓采集法更具优势, 使微核试验的细胞计数简易。

【关键词】 骨髓采集; 胎牛血清; 细胞; 小鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0086-03

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 03. 017

Experience exchange in vitro micronucleus assay

MA Bao-liang¹, LU Ke-qing²

(1. Institute of Urology, Second Hospital, Lanzhou University, Gansu Provincial Key Laboratory of Urological Diseases, Lanzhou 730030, China; 2. Gansu Nephro-Urological Clinical Center, Lanzhou 730030, China)

【Abstract】 Objective To compare the conventional marrow collection with new marrow collection, in the number of cell, other tissues pollution and the background of the smear, providing the reference for future micronucleus test. **Methods** The mice was euthanasia and the sternums were taken. One group, using the conventional method of marrow collection, squeezing the marrow to the slide with fetal bovine serum; the other group, using 1-mL injector extracting fetal bovine serum 100μL, injecting into mice sternums and rushing out the bone marrow for circle smear. **Results** Two methods can meet the requirement of test, but the new marrow collection can acquire more number of cells, less the tissues pollution and more clear in the background of smear. **Conclusions** Comparing with the conventional marrow collection, the new method has more superiority to simplify the next cell counting.

【Key words】 Marrow collection; Fetal bovine serum; Cell; Mice

微核是存在于细胞核以外的异常染色体或染色体片段, 与细胞核的染色一致, 直径小于主核的1/3, 能够被光学显微镜观察。当外来有害因素(物理, 化学, 生物)作用于细胞后, 染色体发生断裂或

丢失, 细胞胞浆中出现一个或多个小核, 这些微核是检测遗传毒的一种重要的手段。微核试验是一种检测基因染色体断裂或丢失的一种基本的遗传学毒性试验, 它主要是应用于检测药物和化学物质

对基因的损伤,明确这些物质的遗传毒性,目前的微核试验已经应用于环境卫生、临床疾病和病毒的遗传毒性的检测^[1]。对于能够引起染色体断裂和有丝分裂紊乱的药物、射线、疾病均可以使用微核试验进行检测^[2],微核试验是最为公认的遗传毒性检测方法。

在药物临床前期的遗传毒性检测过程中,推荐使用的动物为啮齿类,以大小鼠最为常用^[3],以骨髓染色计数微核细胞数为公认的检测手段,但是小鼠的骨髓腔较细,无法直接抽取,因此骨髓的采集成为实验成败的关键性的一步。如采集的细胞存在较多的杂质或其他细胞如脂肪细胞,将会为后续的细胞计数增加难度,或是无法进行计数。目前推荐的两种方法,一种是胸骨^[4]取材,使用钳子将胸骨中的骨髓挤出骨髓腔,另为一种采集股骨的骨髓^[4-6],用 1 mL 的注射器吸胎牛血清将骨髓冲出,反复吹打过滤或离心制成悬液,涂片。但是两种采集制片方法均容易受到杂质和其他细胞的污染,对于操作者的要求较高。我们在进行微核试验的过程中,为了克服污染问题,探讨了一种新的骨髓采集方式,骨髓的采集部位为胸骨,使用 1 mL 的注射器改带 5 号钢化针头吸入胎牛血清后穿刺入骨髓腔中,冲出骨髓,涂环形薄片,显微镜下评估细胞数后,自然干燥,甲醇固定,Giemsa 染色。

1 材料和方法

1.1 动物

清洁级的昆明小鼠 12 只,体重 18 ~ 21 g,1.5 月龄,购于甘肃省中医药大学动物实验中心【SCXK(甘)2011-0006】,饲养于其屏障动物实验设施【SYXK(甘)2011-0002】。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。随机分成 A、B 两组,每组 6 只。A 组使用传统的方法采集骨髓;B 组采用改良的采集方法采集骨髓。

1.2 仪器和试剂

剪刀、镊子、止血钳、1 mL 注射器、钢化针头、胎牛血清、光学显微镜、载玻片,Giemsa 染液

1.3 方法

A 组:最后一次染毒后,在确定时间行 3% 戊巴比妥钠麻醉小鼠后,迅速剪取其胸骨,剔去肌肉,用干净纱布擦拭,剪去每节骨骺端,用小型弯止血钳挤出骨髓液,点在载玻片一端预先滴好的一滴胎牛血清中。混匀后推片。长度为 2 ~ 3 cm。

B 组:3% 戊巴比妥钠麻醉小鼠后,迅速剪去其胸骨,剔去肌肉。用微湿润或干燥的脱脂棉签擦拭,除去胸骨周围残留的肌肉组织,以上步骤均在滤纸上操作。用规格为 5 号钢化针头、1 mL 一次性无菌注射器吸取 100 μ L 的胎牛血清,在近剑突段剪去软骨段至显露骨髓处。从远软骨段的一侧骨骺端用 5 号针头垂直穿刺进入骨膜后水平继续穿刺至针头微外显,倒针至穿刺点 1/3 处,打出针内少量胎牛血清冲出腔内骨髓,点在洁净的载玻片上,用针头环形涂直径为 1 cm 的圆形薄片即可。对中间段胸骨,可剪去每节骨骺端,将针头直接从骨髓腔隙边穿刺边回抽骨髓,然后轻轻打出吸取的骨髓滴 1 小滴在载玻片上,用针头环形涂直径为 1 cm 的薄片即可。

1.4 染色:使用磷酸盐缓冲液,将 Giemsa 染液配成 10% 的应用液,染色 10 min。

2 结果

涂好的湿片可在显微镜下及时直接观察,分别在 $\times 20$ 、 $\times 40$ 物镜下看细胞分布及相对密度。以尿沉渣镜检细胞数的标准为参考^[7],将 $\times 20$ 物镜下细胞分布均匀,细胞数满视野(++++);在 $\times 40$ 物镜下细胞分布均匀,细胞数达 50 ~ 100 个/视野。染色后油镜下细胞数可达到 30 ~ 50 个/视野为制片合格。在油镜下按一定顺序进行 PCE 和微核计数。PCE 细胞呈灰蓝色、成熟红细胞呈橘黄色。微核多数为圆形,边缘整齐,嗜色性与核质一致,呈紫红色或蓝紫色。PCE 细胞中微核多为一个,也可有两个或以上微核,此时仍按有微核的 PCE 计算。

3 讨论

微核试验是细胞基因损伤检测的生物学标志之一^[8],小鼠骨髓微核实验是最常用的微核实验。美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA),欧洲药监局(European medicines agency, EMA)等部门均要求:基因毒性的检测为药物安全性评估的必须一部分^[9]。在过去的几十年里,此实验被广泛应用于药品、食品等的遗传毒性的检测,以及环境污染的检测、临床疾病的诊断等。但是如何获取满意的骨髓涂片,进行有效的细胞计数,仍有一定的困难。

我们采用穿刺取骨髓细胞和挤压取骨髓细胞,

都能获得满意的细胞数。但挤压后点滴采集的骨髓,虽然方法相对容易和迅速获得骨髓细胞,但因挤压过程中在胸骨上残留很少的组织细胞等也会一起被点滴收集,有一定的组织污染,增加额外的细胞背景。穿刺法或抽吸骨髓法可很好地减少污染,相对显示好的细胞染色背景。另我们借鉴血液制片厚滴法^[7]和细菌涂片技术中菌落制片方法^[10],采取环形涂直径为 1 cm 的圆形骨髓细胞薄片,较常规推片制片技术,在获取骨髓细胞量一定的情况下,通过减小制片面积,增加细胞密度,还可在显微镜下及时直接评估采集的骨髓细胞数,对细胞量少的制片补充穿刺一次增加细胞量。

参考文献:

- [1] Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review [J]. *Retour Au Numéro*, 2015, 72:74 - 82; 2015, 72:74 - 82.
- [2] Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications [J]. *Diagnostic cytopathology*, 2012, 40(1):84 - 90.
- [3] Araldi RP, Rechiutti BM, Mendes TB, *et al.* Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs [J]. *Genetics and molecular research*, 2014, 13(3):5207 - 5220.
- [4] 师长宏,冯秀亮,张海. 基础动物实验技术与方法 [M]. 西安:第四军医大学出版社,2011. 56 - 57
- [5] 白殿卿,郑颖. 藏药旺拉毒理学安全性试验研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 12(7):740 - 742
- [6] 刘仕杰,方展强. 流式细胞仪筛选环磷酰胺诱导骨髓嗜多染红细胞微核的技术方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(3):53 - 59
- [7] 李其英,徐勉忠,孔祥云. 实用临床医学检验 [M]. 武汉:湖北人民出版社, 1980. 133.
- [8] Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, *et al.* Report from the in vitro micronucleus assay working group [J]. *Mutation research*, 2003, 540(2):153 - 163.
- [9] Massey ED, Hinchliffe S. 2-Aminoanthracene, diethylstilboestrol and vinblastine tested in the in vitro mammalian cell micronucleus test at British American Tobacco UK in support of the OECD draft Test Guideline 487 [J]. *Mutation research* 2010, 702(2):208 - 211.
- [10] 倪语星,尚红. 临床微生物学与检验(第 4 版) [M]. 北京:人民卫生出版社, 2007. 39.

[修回日期] 2016 - 01 - 13