

体外染色体畸变试验染色体标本制备的质量控制

贾庆文¹, 英永¹, 马会¹, 朱春花¹, 高梅^{1,2*}

(1. 山东省药学院, 山东省化学药物重点实验室, 济南 250101; 2. 山东师范大学生命科学学院, 山东省动物抗性生物学重点实验室, 济南 250014)

【摘要】 目的 探讨体外染色体畸变试验染色体制备过程的影响因素及质量控制, 总结分析体外染色体标本成功制备方法及要点。**方法** 选用中国仓鼠肺细胞(CHL)进行细胞培养及染色体制备, 阳性诱变剂选用丝裂霉素和环磷酰胺, 经过常规低渗、固定、滴片, 最后镜检阅片。**结果** CHL染色体畸变试验, 丝裂霉素、环磷酰胺处理后染色体畸变率显著增高, 均>20%; 而阴性对照组在有和无代谢活化系统两种测试条件下, 染色体结构畸变率均小于5%。所制备的染色体分散良好, 长短适中, 成功率较高。**结论** 影响体外染色体畸变试验细胞染色体标本制备的因素很多, 每一个步骤都很关键, 必须严格按照操作规程, 掌握每一个步骤的原理, 细致、耐心、科学地操作, 才能制备出好的标本。

【关键词】 染色体畸变试验; 染色体标本制备; 质量控制; 中国仓鼠肺细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0108-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.04.019

Quality control of chromosome preparation in the chromosome aberration test in vitro

JIA Qingwen¹, YING Yong¹, MA Hui¹, ZHU Chunhua¹, GAO Mei^{1,2,*}

(1. Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drugs, Jinan 250101, China. 2. Shandong Normal University, College of Life Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Resistance Biology, Jinan 250014)

【Abstract】 Objective To study the influencing factors and quality control of chromosome preparation during chromosome aberration test in vitro, and to summarize and analyze the method and key points of successful preparation of chromosome specimens in vitro. **Methods** Chinese hamster lung cells (CHL) were used for cell culture and chromosome preparation. Mitomycin and cyclophosphamide were used as positive mutagens. After routine hypotonic treatment, fixation, and squash preparation, finally, to read the film under the microscope. **Results** The CHL chromosome aberration test showed that both the chromosome aberration rates of mitomycin- and cyclophosphamide-treated cells were significantly increased (>20%), while the aberration rates in the negative control group were less than 5%, either with and without metabolic activation. The success rate was high and the prepared chromosomes were well dispersed with a moderate length. **Conclusions** Many factors can affect the specimen preparation in chromosome aberration test. Every step is very important, and it should be strictly following the operating procedures. It is of importance to grasp the principle of each step and to operate carefully, patiently and scientifically in order to prepare good specimens.

【Key words】 chromosome aberration test; chromosome specimens; preparation; quality control; Chinese hamster lung cells

【基金项目】 山东省创新公共服务平台项目(2015CXPT00001)。

【作者简介】 贾庆文(1971-), 男, 主任药师, 研究方向: 药物安全性评价。E-mail: jqw1971@163.com

【通信作者】 高梅(1983-), 女, 副主任药师, 研究方向: 药物安全性评价。E-mail: gaomei729@163.com

染色体是细胞核中遗传物质的主要载体,环境中有害因素或致突变物作用于机体或培养的细胞后可导致染色体畸变,体外细胞染色体畸变试验,是一项致突变性试验,用于检测体外细胞染色体畸变,以评价受试物致突变的可能性,亦是药物遗传指导原则推荐的评价药物遗传毒性的重要体外试验^[1]。中国仓鼠肺成纤维细胞(CHL),易在体外建立细胞系,便于控制试验条件,重复性好,自发突变率低,染色体数目正常非突变型为 25 条,便于分析,是进行染色体畸变试验常用细胞。CHL 细胞体外染色体畸变试验在整个试验过程中,特别是收获细胞制备染色体玻片过程中,操作步骤繁琐,时间较长,任何一个步骤操作不当,均可能影响制备的染色体标本的最终效果,甚至导致试验失败。本实验室经过长期的试验和不断探索,制作的染色体标本分散良好,长短适用,质量稳定,为染色体的核型分析及进一步研究染色体的数目、结构畸变奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 细胞株

中国仓鼠肺细胞(CHL 细胞)购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基, Gibco 公司;新生牛血清,浙江天杭生物科技有限公司;注射用丝裂霉素,北京索莱宝科技发展有限公司;注射用环磷酰胺,江苏盛迪医药有限公司;S9, Moltex 公司。

Thermo 3111 二氧化碳细胞培养箱, Thermo Scientific 公司;BDS200 倒置生物显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司;DM LS2 显微镜,德国 Leica 公司;SW-CJ-2FXS 超净工作台,苏州佳宝净化工程设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 试验前质量控制

对所用细胞进行细胞支原体及核型检查,确认无支原体污染,畸变率 < 5% 方可用于实验。

1.3.2 试验中质量控制

1.3.2.1 细胞培养

细胞置 RPMI 1640 培养基中培养,每 500 mL RPMI 1640 培养基中加入青霉素、链霉素各每毫升 100 单位,按 10% 加入新生牛血清配成完全培养液。试验前 1 d,取生长良好的 CHL 细胞,接种于 25 cm²

细胞培养瓶(每瓶 5 mL),接种浓度为每毫升 10⁵ 个,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。

1.3.2.2 细胞与受试物的接触

阴性对照组:1640 完全培养基。阳性对照组:不加 S9 混合液时为注射用丝裂霉素,染毒 6 h 浓度为 0.15 μg/mL,染毒 24 h 浓度为 0.05 μg/mL;加 S9 混合液时为注射用环磷酰胺,浓度为 10 μg/mL,染毒 6 h^[2-3]。细胞放入 37℃、5% CO₂ 箱,染毒 6 h 和 24 h 换液,洗 3 遍。各组于终止培养前 4 h 加入秋水仙碱,终浓度为 0.4 μg/mL。

1.3.2.3 染色体标本的制作^[4-5]

收集细胞:弃去细胞培养液,用 PBS 洗涤 2 次。胰酶消化,待细胞从瓶壁脱落时终止消化,将细胞悬液转移至玻璃离心管中,混匀,1000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。

低渗:在离心管中加入 0.075 mol/L KCl 溶液 8 mL,吹打细胞(动作宜轻,否则易致细胞破裂),使细胞分散成悬浮状态,将离心管放入于 37℃ 水浴中低渗 10~20 min,后加入甲醇和冰醋酸(3:1)固定液 1 mL 预固定,1000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。

第一次固定:加入固定液 6 mL,混匀;固定 20 min,1000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液。

第二次固定:再次加入固定液 6 mL,混匀;固定 20 min,1000 r/min 离心 10 min,倒掉大部分上清液。吸管吹打混匀细胞沉淀物,制成 0.5~1.0 mL 细胞悬液。

制片:先将洗净的载玻片保存于冰水中备用。自冰水中取出载玻片,倾斜放置,吸取细胞悬液滴在玻片一端约 1/3 处,轻吹细胞悬液使之扩散。在酒精灯上微火加热玻片底部(无细胞的一面),使细胞固定于玻片上,空气中自然晾干。

染色:将玻片放入 Giemsa 工作液中,染色 10~20 min,然后取出玻片用水冲洗,置空气中晾干。

1.3.3 阅片质量控制

试验各组选择分散较好的 200 个中期分裂相细胞,记录染色体形态的变化。染色体结构畸变类型主要包括裂隙(在计算染色体畸变率时不计入其中)、断裂、断片、缺失、微小体、环状染色体、单体互换等,结果以百分率(%)表示。细胞畸变率(%) = (细胞畸变数/分析细胞总数) × 100%。染色体的选择:先在低倍镜下选择细胞完整、轮廓清晰,染色体无重叠、分布良好的载玻片,再用高倍镜进行分

析。染色体畸变判断标准:细胞畸变率 <5% 为阴性 (-);细胞畸变率 >5% 为可疑 (±);细胞畸变率 >10% 为阳性 (+);细胞畸变率 >20% 为阳性 (++) ;细胞畸变率 >50% 为阳性 (+++) [6]。

2 结果

本实验室近年来细胞染色体畸变试验标本制备成功率较高,染色体形态和分布良好,长短适中,便于分析(见图 1、图 2)。阴性对照组在有 S9 和无 S9 两种测试条件下,染色体结构畸变率均小于 5%;注射用丝裂霉素在 0.15 μg/mL 浓度下,CHL 细胞染色体畸变率为 22.5%~41.5%,在 0.05 μg/mL 浓度下染色体畸变率为 21.5%~42%;环磷酰胺在 10 μg/mL 浓度下,并有 S9 活化条件下染色体畸变率为 25.5%~37.5%。阳性诱变剂诱发的 CHL 细胞染色体畸变率显著增高。染色体畸变试验失败或制备的染色体影响镜检,导致试验失败的因素也很多,总结实验过程中的失败案例,主要有以下几个原因:

一是细菌污染。在器皿消毒不彻底、细胞培养、加入培养液、培养液污染、培养观察时被细菌污染,此时所培养的细胞因缺少营养或培养液中有毒代谢产物堆积而逐渐死亡,导致实验失败。或者细胞培养前期未受污染,而在加入受试物或更换培养液培养时被细菌污染(后期污染),此时仍可见染色体^[7]。(见图 3)。

二是染色体聚集。秋水仙素用量太多,会导致染色体的过分凝缩;低渗时间不足则染色体聚集在一起,分散不开;滴片时细胞悬液浓度过浓;细胞悬液未充分吹打均匀;载玻片未在冰水中浸泡;滴片高度距离不够。(见图 4)。

三是染色体分散过度。低渗时间过长;离心速度过高;离心后吹打用力过大;滴片距离过高。使细胞膜破裂,导致染色体过度分散。(见图 5)。

3 讨论

体外染色体畸变试验中,所制备的染色体成功与否,主要有几个判断点,①细胞完整,轮廓清晰,染色体分布在同一水平面上。②染色体形态和分布良好,染色体长短适中。③最好无重叠,即使有个别重叠,也要能明确辨认。④所观察的细胞处于同一有丝分裂阶段,即染色体螺旋化程度或染色体长短大致相同。⑤在所观察的细胞

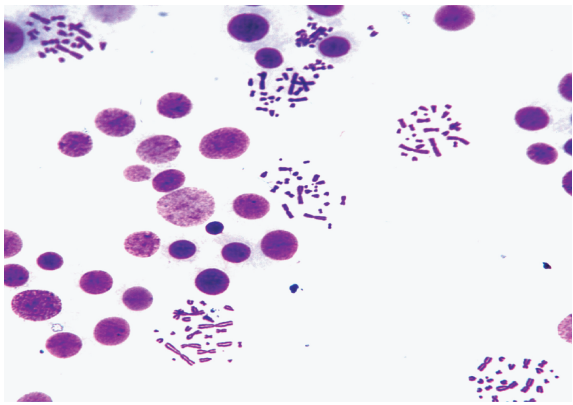


图 1 分散良好的染色体标本(×200)
Fig.1 Well dispersed chromosome specimens

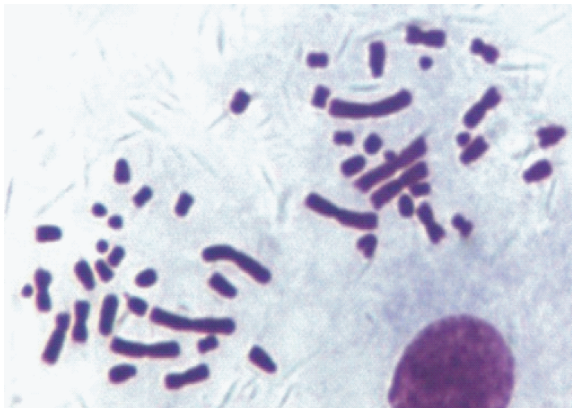


图 2 分散良好的染色体标本(×400)
Fig.2 Well dispersed chromosome specimens

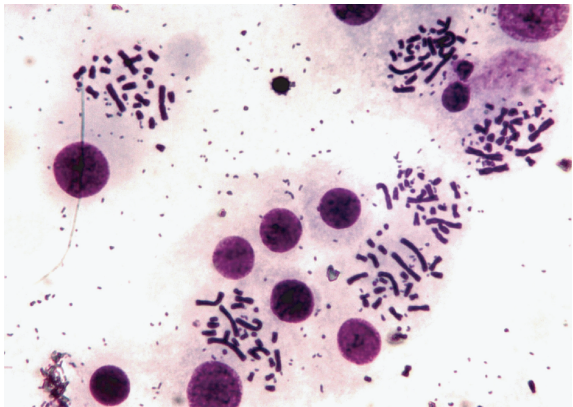


图 3 污染的染色体标本(×200)
Fig.3 Contaminated chromosome specimens

周围,没有离散的单个或多个染色体存在,以免影响计数。

通过试验过程中的质量控制,可显著提高染色体标本的质量及畸变的检出率。影响染色体标本制备的因素很多,可从以下几个方面进行质量控制:

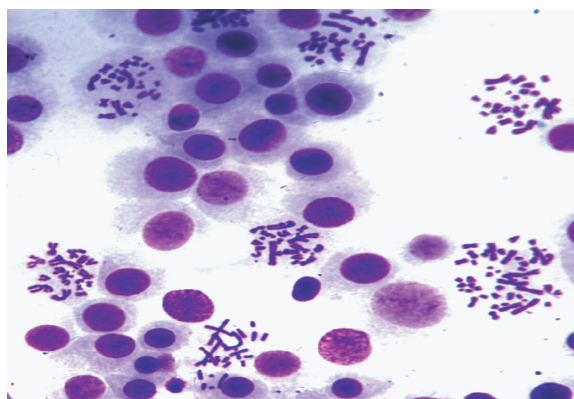


图 4 染色体聚集的标本(×200)

Fig.4 Aggregated chromosome specimens

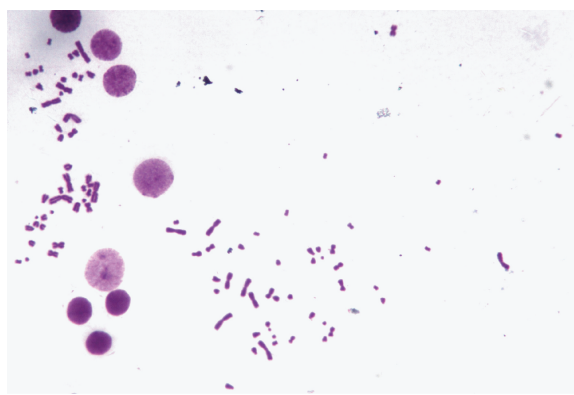


图 5 染色体分散过度的标本(×200)

Fig.5 Excessively scattered chromosome specimens

3.1 CHL 细胞培养

显微镜下生长良好的细胞透明度高、折光性强、轮廓清晰。生长不良时,胞质中常出现空泡、脂滴和其他颗粒状物质,细胞间空隙加大、细胞形态不规则。若因缺乏营养,使细胞营养不良而导致细胞分裂较少或停止分裂或细胞死亡;培养时间过长,不及时收获细胞,而导致细胞多层重叠,细胞老化或死亡,直接影响试验质量。CHL 细胞用 1640 培养液培养,pH 7.2~7.4,小牛血清的加入量一般为 10%~20%;及时镜检细胞生长情况,密度不应过大,一般单层覆盖培养容器表面,细胞之间有一定的间隙时,即可收获细胞。

3.2 秋水仙素处理

染色体畸变试验中加入秋水仙素的剂量、作用时间与获得的中期细胞数量、染色体长短密切相关。加入秋水仙素的量过多,作用时间过长,会导致染色体过分凝缩,长度短小;加入的秋水仙素剂量过小,作用时间过短,则分裂中期分裂细胞少甚至无中期分裂相,染色体稀少。若秋水仙素剂量

大,则作用时间短;秋水仙素剂量小,则作用时间适当延长^[8-10]。

3.3 低渗

低渗处理是染色体玻片制备的关键环节。低渗时间过长,可引起细胞破裂,染色体分散在整个片子,染色体丢失;低渗时间不足,细胞膨胀度不够,染色体聚集呈团状,分散不好,不利于核型分析。此外,外界温度对低渗效果也有影响,夏天低渗时间稍短,冬天可适当延长^[8-10]。

3.4 离心

离心时离心力不能太高,低渗后细胞膨胀,离心速度过高,细胞容易破裂,导致染色体丢失;离心速度过低,则细胞不能沉淀,收集不到细胞^[11-13]。

3.5 固定

固定的目的是维持染色体的形态,固定液采用甲醇:冰醋酸=3:1,需现用现配。固定液须缓慢加入低渗后的液体中,吹打细胞,使细胞分散成悬浮状态,吹打动作易轻柔,因低渗后细胞通透性增强,如果动作幅度过大,细胞容易破裂。固定时先要预固定,此步骤虽简单却很不能省略,可防止细胞在加入大量固定液时凝结成块,随后再固定 2 次。固定处理需保证足够的固定液用量及固定时间,以及细胞与固定液的充分混匀^[14]。

3.6 滴片

滴片时先用固定液制成细胞悬液,适当调整悬液浓度,固定液的加入量应视细胞而定。滴片用的玻片应提前冷冻或在冰水中浸泡,且清洗干净,滴片高度为 30~50 cm 为宜,高度过低,染色体分散不开,过高则细胞膜破裂,导致染色体分散过度。吸取细胞悬液滴在玻片一端约 1/3 处,轻吹细胞悬液使之扩散,这样可使染色体分散较好。在酒精灯上微火加热玻片底部(无细胞的一面),使细胞固定于玻片上^[15-16]。

3.7 染色

染液使用 Giemsa 原液与 9 份磷酸缓盐冲液(pH 7.4)混合而成,临用时配制,染色 10~20 min。染色完毕,立即用自来水轻轻冲洗干净玻片上的染料,再用纯水冲洗,用纱布或滤纸擦干玻片背面的水滴,空气中自然晾干。pH 太高,染色体易被染成蓝色,不易观察,染液浓度过高、染色时间太长,染色体着色太深,影响染色体结构的观察^[17]。

总之,目前染色体制备过程没有统一的质量控制标准,各实验室环境质量、人员技术、所用试剂品

质,均能影响所制备的染色体标本质量。各实验室应结合自己实验室情况,不断加强人员培训,提高制备成功率。体外染色体畸变试验细胞染色体标本制备的每一个步骤都很关键,必须严格按照操作规程,掌握每一个步骤的原理,细致、耐心、科学地操作,才能制备出好的标本,为今后实验研究提供可靠的实验数据。

参考文献:

- [1] 【ZH】GPT2-1, 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 国家食品药品监督管理局, 2007
- [2] Kasamatsu T, Ogura R, Ikeda N, et al. Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil [J]. Food Chem Toxicol, 2005, 43(2): 253-260.
- [3] Hori H, Takayanagi T, Kamada Y, et al. Genotoxicity evaluation of sesamin and episesamin [J]. Mutat Res, 2011, 719(1-2): 21-28.
- [4] 袁伯俊, 王治乔. 临床前安全性评价与实践 [M]. 第 1 版. 北京: 军事医学科学出版社, 1997: 89-102.
- [5] 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 268-271.
- [6] 彭双清, 郝卫东. 药物安全性评价关键技术 [M]. 第 1 版. 北京: 军事医学科学出版社, 2013: 238-240.
- [7] 昌业伟, 李凤, 唐瑜, 等. 人外周血染色体标本制备方法影响因素的分析 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(5): 148-149, 13.

- [8] 黄江玲, 林祥伟, 邱少雄, 等. 人外周血淋巴细胞培养及染色体制备的方法及成功率 [J]. 中国校医, 2015, 29(7): 526-527.
- [9] 庄建龙, 王元白, 庄倩梅. 外周血染色体制备方法的探讨 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(17): 2558-2560.
- [10] 刘星, 冯昆, 张青峰, 等. 小鼠骨髓细胞中期染色体标本制备方法的改进 [J]. 卫生职业教育, 2015, 33(18): 101-102.
- [11] 谢桂芬, 钟宝花. 人外周血染色体标本制备的问题分析 [J]. 航空航天医学杂志, 2012, 23(6): 683-685.
- [12] 赵小平, 陈绍坤, 黄燕, 等. 外周血淋巴细胞培养及染色体制备过程中的问题分析 [J]. 现代预防医学, 2009, 36(11): 2108-2109, 2112.
- [13] 王喜爱, 韩林, 王平, 等. 外周血淋巴细胞染色体标本制备的质量控制 [J]. 中国工业医学杂志, 2009, 22(3): 228-229.
- [14] 谢志威, 张晶, 李卫凯. 外周血染色体制备改良方法的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(1): 82-83.
- [15] 崔向青, 马鑫, 李丽, 等. 增加中期细胞数的染色体标本制备方法研究 [J]. 中国现代医药杂志, 2014, 16(7): 8-9.
- [16] 赵淑娟, 庞有志, 白俊艳, 等. 禽类骨髓细胞染色体标本制备实验方法的改进 [J]. 实验动物科学, 2010, 27(2): 17-20.
- [17] 黄燕, 赵小平, 余红, 等. 动物骨髓细胞染色体标本制备失败的原因分析 [J]. 生物学通报, 2006, 41(1): 52-53.

[收稿日期]2017-09-01

(下接第 119 页)

- controls p53 and is a critical factor in tumorigenesis [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1846(2): 524-538.
- [14] Heinzel T, Krämer OH. Pharmacodynamic markers for histone deacetylase inhibitor development [J]. Drug Discov Today Dis Mech, 2008, 4(4): 277-283.
- [15] Trivedi CM, Luo Y, Yin Z, et al. Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity [J]. Nat Med, 2007, 13(3): 324-331.
- [16] You BR, Han BR, Park WH. Suberoylanilide hydroxamic acid increases anti-cancer effect of tumor necrosis factor- α through up-regulation of TNF receptor 1 in lung cancer cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(11): 17726-17737.
- [17] Bieliauskas AV, Plüm MK. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors [J]. Chem Soc Rev, 2008, 37(7): 1402-1413.
- [18] Qu X, Yu H, Jia B, et al. Association of downregulated HDAC 2 with the impaired mitochondrial function and cytokine secretion in the monocytes/macrophages from gestational diabetes mellitus pa-

tients [J]. Cell Biol Int, 2016, 40(6): 642-651.

- [19] 赵进, 蔡兆伟, 管峰. 阿尔茨海默病与 PRNP 突变体小鼠动物模型 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(5): 541-545.
- [20] Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity [J]. Nature, 2009, 459(7243): 55-60.
- [21] Tao CC, Hsu WL, Ma YL, et al. Epigenetic regulation of HDAC1 SUMOylation as an endogenous neuroprotection against A β toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Cell Death Differ, 2017, 24(4): 597-614.
- [22] Chandran A, Antony C, Jose L, et al. Mycobacterium tuberculosis infection induces HDAC1-mediated suppression of IL-12B gene expression in macrophages [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5: 90.

[收稿日期]2017-09-20