张静,程东,姚文环,等. 改良消化富集法提高小鼠精原细胞染色体制备效率的研究及应用［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(8): 75-79, 85.
Zhang J, Cheng D, Yao WH, et al. Study and application of a modified enrichment method to improve the efficiency of chromosome preparation in mouse spermatogonial cells［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 75-79, 85.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.010

改良消化富集法提高小鼠精原细胞染色体制备效率的研究及应用

张　静,程　东,姚文环,杨　非,唐　慧,孙昌华,颜　燕,周　雯*,李　慧*

(山东省疾病预防控制中心,济南　250014)

【摘要】　目的　建立一种改良的小鼠精原细胞染色体畸变试验方法,以获得大量结构清晰的中期分裂相精原细胞利于阅片,并将改进后的方法应用于玛咖的致突变实验。**方法**　选取雄性 ICR 小鼠 30 只,随机分为 6 组,每组 5 只,将原染色体制备方法增加了剪碎曲细精管及精原细胞消化富集,采用 1.5 mg/mL 的胶原酶,35℃消化 15 min,每隔 3 min 搅拌 1 次,消化富集精原细胞,经低渗、固定、滴片,封片后镜检阅片,同时与国标方法所制备的滴片进行比较阅片。**结果**　改良消化富集法所制备的滴片背景清晰,染色体分散良好,收缩适中,易于观察。分析每只动物 100 个中期分裂相精原细胞所需观察的高倍视野数(25±3.9)与国标方法组(75±5.6)比较明显减少($P<0.01$),精原细胞有丝分裂指数(18.04±2.47)与国标方法组(8.83±2.04)比较明显增加($P<0.01$);环磷酰胺处理组染色体畸变率(15.40±2.30)与空白对照组(3.60±1.14)比较显著增加($P<0.01$);玛咖各剂量组染色体畸变率与空白对照组比较无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　改良消化富集法能明显提高精原细胞富集效率及实验成功率,可获得大量分散良好、背景清晰的中期分裂相精原细胞,明显优于国标方法;在本次实验条件下,玛咖对小鼠精原细胞染色体无致突变作用。

【关键词】　改良消化富集法;小鼠精原细胞;染色体畸变;玛咖

【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2023)08-0075-05

Study and application of a modified enrichment method to improve the efficiency of chromosome preparation in mouse spermatogonial cells

ZHANG Jing, CHENG Dong, YAO Wenhuan, YANG Fei, TANG Hui, SUN Changhua, YAN Yan, ZHOU Wen*, LI Hui*

(Shandong Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014, China)

【Abstract】　Objective　To establish an improved method for chromosome aberration testing in mouse spermatogonia, obtain large amounts of constant and clear metaphase chromosomes for reading, and apply the improved method to assess the mutagenic effect of Maca. **Methods**　Thirty male ICR mice were randomly divided into six groups with five mice in each group. Seminiferous tubules were minced for spermatogonial cell enrichment. The fragments were treated with a 1.5 mg/mL collagenase solution (in serum-free culture medium at 35℃ for 15 minutes with intermittent agitation (3 minute intervals). After routine hypotonic treatment, fixation, and cell smearing, slides were observed under a microscope and compared with those prepared by the conventional method. **Results**　A large number of well-dispersed metaphase phase spermatogonium with a clear background and compact chromosome structure were prepared and observed by our method, and the chromosome slides prepared by this method were easy to read. Compared with the result with the

[基金项目]山东省中医药科技发展计划项目(Z-2022061);山东省中医药科技发展计划项目(2020M055)。
[作者简介]张静(1975—),女,副主任技师,研究方向:安全性评价。E-mail:378715301@qq.com
[通信作者]周雯(1975—),女,副主任技师,研究方向:安全性评价。E-mail:fredz2005@163.com
李慧(1976—),女,主任技师,研究方向:安全性评价。E-mail:lwlh163@163.com　*共同通信作者

conventional method, the number of high magnification fields required for observation was significantly decreased ($P<0.01$) and the mitotic index was obviously increased ($P<0.01$). The chromosomal aberration rate of the cyclophosphamide-positive control group was significantly higher than that of the control group ($P<0.01$). No significant differences were found in the chromosome aberration rate between the Maca groups of various dosages and the control group ($P>0.05$). **Conclusions** The enrichment efficiency of spermatogonial cells and the success rate of experiments were improved by the modified method, and this method was significantly better than conventional method. Maca had no effect on the chromosomes of mouse spermatogonial cells under the experimental conditions.

【**Keywords**】 modified digestion and enrichment method; mouse spermatogonial cells; chromosomal aberration; Maca

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

我国曾经应用的食品安全国家标准 GB 15193.8-2003《小鼠睾丸染色体畸变试验》中用于观察染色体畸变作用的细胞为精母细胞,而目前 OECD、USEPA 等国际组织推荐采用的细胞为精原细胞,而且精原细胞作为体细胞比精母细胞更容易获得和操作,标准于 2014 年进行了重新修订[1],此次修订在不删除我国原有精母细胞试验方法的基础上增加了精原细胞的试验方法。但在本实验室实际工作中,按照该标准提供的试验方法制备的滴片,存在背景杂乱,染色体模糊不清,精原细胞及中期分裂相稀少等问题,研究人员必须分析多张滴片,观察大量视野,以便收集 100 个中期分裂相精原细胞进行评估,既耗时又费力,而且很难保证试验质量。本实验室经不断探索,多次试验验证,通过对曲细精管进行剪碎及消化处理,建立了一种富集精原细胞的简单方法,制作的滴片质量稳定,背景清晰,轮廓清楚,中期分裂相精原细胞多,更利于染色体畸变的观察和判定。本文通过对改良消化富集法所制备的滴片,与国标方法[1]所制备的滴片进行阅片比较,验证改良消化富集法在小鼠精原细胞染色体畸变试验中的可靠性及优越性;通过玛咖的小鼠精原细胞染色体畸变试验,了解玛咖对小鼠生殖功能的影响,并进一步验证改良实验方法的可靠性及有效性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康成年雄性 ICR 小鼠 30 只,体重 30~32 g,购于济南朋悦实验动物繁殖有限公司[SCXK(鲁)2019-0003]。饲养于山东省疾病预防控制中心实验室[SYXK(鲁)2018-0014],饲养环境为屏障环境,室温 20~22℃,相对湿度 45%~65%,饲养期间各组大鼠自由饮水。饲喂普通维持饲料由北京华阜康生物科技股份有限公司提供[SCXK(京)2019-0008]。所有动物实验均通过山东省疾病预防控制中心实验伦理审查并批准(A2022-1),按照《实验动物管理条例》要求的实验动物使用 3R 原则给予人道关怀。

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);秋水仙素(sigma 进口分装);环磷酰胺(Sigma 公司);胶原酶 IV(Solarbio 公司);Giemsa 染液工作液(Sigma 公司);冰醋酸、无水甲醇和氯化钾(国药集团化学试剂有限公司)。电子天平、离心机(美国热电);SW23 振荡水浴槽(JULABO);CX21 生物显微镜、QImaging MicroPublisher 5 RTV 扫描仪及 cellSens Standard 软件(OLYMPUS)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及实验干预

健康成年雄性 ICR 小鼠 30 只,随机分为 6 组,每组 5 只,分别为纯化水空白对照组、阳性对照组和玛咖 10 mg/kg、5 mg/kg、2.5 mg/kg 三个剂量组,以环磷酰胺(40 mg/kg)作为阳性对照组,单次腹腔注射给药。玛咖高、中、低剂量组以纯化水配制,经口灌胃给药,空白对照组给予纯化水,灌胃量为 0.2 mL/10 g,1 次灌胃给予受试物。处死前 6 h 腹腔注射给予秋水仙素(4 mg/kg)。玛咖高剂量组于末次灌胃后的 24 h 和 48 h 处死动物取样,其余各组动物于末次灌胃后 24 h 处死动物取样。

1.3.2 染色体标本的制作

(1)取材

脱臼处死小鼠,取双侧睾丸,生理盐水洗 2 次。

(2)剪碎曲细精管

在平皿中加入生理盐水,将睾丸剪一小口,剥除睾丸被膜,分离曲细精管,吸管吹打,静置 30 s,弃

上清。剪碎曲细精管,加入生理盐水 10 mL,并转移至离心管,吸管吹打,静置 1 min,弃上清。加入生理盐水 10 mL,混匀,1500 r/min 离心 2 min,弃上清,留取组织沉淀。

(3)消化富集精原细胞

加入 1.5 mg/mL 的胶原酶 2 mL,35℃水浴 15 min,期间每 3 min 吹打混匀 1 次,消化结束时加入 15% DMEM 完全培养液 4 mL 混匀,1500 r/min 离心 8 min,弃上清。

(4)低渗及预固定

加入 0.075 mol/L 氯化钾 10 mL 进行低渗处理,35℃水浴 20 min,期间每 3 min 轻轻吹打混匀 1 次,低渗结束时加入固定液(甲醇:冰乙酸=3∶1)2 mL 进行预固定,轻轻混匀,1100 r/min 离心 10 min,弃上清。

(5)第一次固定

加入固定液 10 mL,并轻轻混匀,室温固定 10 min,1100 r/min 离心 10 min,弃上清。

(6)第二次固定

加入固定液 10 mL,并轻轻混匀,4℃冰箱过夜固定。

(7)软化

固定结束后,1100 r/min 离心 10 min,弃上清。加入 60%冰乙酸 2 mL 进行软化处理,室温 3~5 min,加入固定液 8 mL,并轻轻混匀,1100 r/min 离心 10 min,弃上清。吸管吹打混匀沉淀,制成 0.5~1.0 mL 细胞悬液。

(8)制片

提前将干净的载玻片置于冰水中备用,取细胞悬液滴片后,自然晾干。

(9)染色

Giemsa 染色 12 min,流水冲洗,自然晾干,封片。

1.3.3　镜检阅片

(1)对本试验所制备滴片进行阅片

选取背景清晰、分散良好、染色体收缩适中的中期分裂相精原细胞(n=(40±2))进行观察,每只动物至少记录 100 个中期分裂相精原细胞,每个剂量组至少观察 500 个中期分裂相精原细胞。每只动物至少观察 1000 个细胞以确定精原细胞有丝分裂指数。记录每个中期分裂相精原细胞的染色体数目以及染色体结构畸变,主要包括断裂、断片、微小体、无着丝粒环、环状染色体、双或多着丝粒染色体、单体交换等。

(2)对两种方法所制备滴片进行阅片比较

本实验室保存国标方法[1]所制备的多批滴片,选取空白对照组 25 只小鼠的滴片,与本文空白对照组和玛咖各剂量组共 25 只小鼠的滴片,进行比较阅片。选取背景清晰、分散良好、染色体收缩适中的中期分裂相精原细胞(n=(40±2))进行观察,记录每只动物分析 100 个中期分裂相精原细胞所需观察的高倍视野数,同时每只动物至少观察 1000 个细胞,并记录其中可用于观察分析的中期分裂相精原细胞,确定精原细胞有丝分裂指数。

1.4　统计学分析

记录每只动物含染色体结构畸变的细胞数和每个细胞的染色体畸变数,并列表给出各组不同类型的染色体结构畸变数目和频率。试验组与空白对照组的断片、异位、畸变细胞率等分别按二项分布进行统计分析,染色体裂隙记录和报告,但不计入畸变率。两种方法所制备滴片的阅片结果比较中,高倍视野数与有丝分裂指数均按照 t 检验进行统计分析。$P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　两种方法所制备滴片的阅片比较

2.1.1　一般形态学观察

400 倍显微镜下观察结果显示:国标方法所制备滴片组玻片背景杂乱,杂细胞多,细胞膨胀不好,体积小且分散差,细胞相互重叠甚至聚集成团,中期分裂相精原细胞稀少(图 1A)。改良消化富集法所制备滴片组玻片背景清晰,杂细胞较少,细胞膨

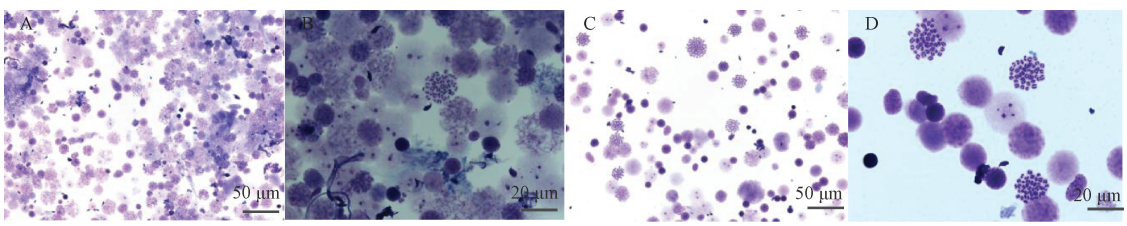

图 1　两种方法对小鼠精原细胞染色体畸变试验滴片的影响

Figure 1　Effects of old and new methods on chromosome aberration test drops' slides in mouse spermatogonial cells

胀好,体积大且分散好(图 1B)。

1000 倍显微镜下观察结果显示:国标方法所制备滴片组玻片染色体形态正常,但分散不好,模糊不清,甚至相互重叠(图 1C)。改良消化富集法所制备滴片组玻片染色体分布在同一水平面,较少见染色体重叠现象,轮廓清晰,收缩适中,形态正常,分散良好(图 1D)。

2.1.2 对阅片所需高倍视野数及精原细胞有丝分裂指数的影响

每只动物分析 100 个中期分裂相精原细胞,与国标方法所制备滴片组比较,改良消化富集法所制备滴片组所需观察的高倍视野数明显减少,差异有极显著性($P<0.01$);每只动物至少观察 1000 个细胞,与国标方法所制备滴片组比较,改良消化富集法所制备滴片组精原细胞有丝分裂指数明显增加,差异有极显著性($P<0.01$)。观察结果见表 1。

2.2 玛咖对小鼠精原细胞染色体畸变的影响

环磷酰胺阳性对照组与空白对照组比较,染色体结构畸变的细胞数、染色体结构畸变细胞率、染色体结构畸变(断裂、断片、微小体等)明显增加,差异有极显著性($P<0.01$);玛咖各剂量组与空白对照组比较,小鼠染色体结构畸变细胞率、断裂、断片、微小体等均无显著性差异($P>0.05$),观察结果见表 2、表 3。

表 1 两种方法对阅片所需视野数和及有丝分裂指数的影响($n=25$)

Table 1 Effects of old and new methods on the number of visual fields and mitotic index

分组 Groups	受检细胞数 Number of observed	视野数 Visual field	有丝分裂指(‰) Mitotic index
国标方法组 National standard method group	25×100	75±8.7	8.80±2.28
改良消化富集法组 Modified digestion and enrichment method group	25×100	23±3.6**	17.80±1.79**

注:与国标方法组比较,** $P<0.01$。

Note. Compared with the national standard method group, ** $P<0.01$.

表 2 玛咖对小鼠精原细胞染色体畸变率的影响($n=5$)

Table 2 Effects of Maca on chromosome aberration rate of spermatogonial cells in mouse

剂量(g/kg) Dose	受检细胞数 Number of observed	畸变细胞数 Aberrant cells	畸变细胞率(%) Aberration rate	有丝分裂指数(‰) Mitotic index
2.5(24 h)	5×100	17	3.40±1.14	17.60±2.61
5.0(24 h)	5×100	15	3.00±1.22	18.00±2.92
10.0(24 h)	5×100	16	3.20±1.10	18.60±3.05
10.0(48 h)	5×100	17	3.40±0.55	18.20±2.86
空白对照组 Blank control group	5×100	18	3.60±1.14	17.80±1.79
阳性对照组 Positive control group	5×100	77	15.40±2.30**	17.00±1.41

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$。

Note. Compared with the blank control group, ** $P<0.01$.

表 3 玛咖对小鼠精原细胞染色体结构畸变类型的影响(n,%)

Table 3 Effects of Maca on chromosome structure aberration of spermatogonial cells in mouse

剂量(g/kg) Dose	断裂 Break	断片 Fragment	微小体 Minute	无着丝点环 Acentric ring	环状染色体 Circular chromosom	双或多着丝点染色体 Double or multiple centromeric chromosom	单体交换 Exchange
2.5(24 h)	14(77.78)	1(5.56)	1(5.56)	0(0)	1(5.56)	0(0)	1(5.56)
5.0(24 h)	15(88.24)	1(5.88)	1(5.88)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
10.0(24 h)	14(87.50)	1(6.25)	1(6.25)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
10.0(48 h)	14(82.35)	1(5.88)	1(5.88)	0(0)	0(0)	0(0)	1(5.88)
空白对照组 Blank control group	15(78.95)	1(5.26)	1(5.26)	1(5.26)	0(0)	0(0)	1(5.26)
阳性对照组 Positive control group	97(85.09)	3(2.63)	3(2.63)	4(3.51)	1(0.88)	2(1.75)	4(3.51)

3　讨论

小鼠精原细胞染色体畸变试验是目前常用的一种比较好的监测外源性化学物生殖毒性的方法,在遗传安全性评价中具有非常重要的意义,被广泛应用于评价保健食品、药品、化学品、化妆品、消毒剂等是否对雄性小鼠生殖功能产生影响。

本实验室根据国标方法所制备的滴片成功率低,存在背景杂乱、模糊不清、中期相精原细胞稀少等各种问题。本实验室结合 Nagano 等[2] 和胡卫等[3] 传统精原干细胞消化富集法,在反复试验验证的基础上对小鼠精原细胞染色体畸变试验方法进行了改良并验证。改良方法主要体现在以下几点:(1)增加了剪碎曲细精管,更好地去除精子等杂质,更利于组织与消化酶充分接触,加快消化;(2)增加了精原细胞消化富集法:剪碎曲细精管并用生理盐水洗两次,留取沉淀,加入 1.5 mg/mL 的胶原酶 2 mL 进行消化处理,35℃ 水浴 15 min,期间每 3 min 吹打混匀一次,消化结束时加入 15% DMEM 完全培养液 4 mL 混匀,终止消化,这一步是精原细胞染色体制备最关键的步骤。本实验室既往研究发现,国标常规制备方法所获得的细胞悬液中期相精原细胞少,而在软化后未分散的组织碎片中仍含有大量的中期相精原细胞,结合精原干细胞消化富集法[2-3],考虑可以利用胶原酶消化曲细精管组织,达到富集精原细胞的目的。胶原酶通过水解细胞间质的脯氨酸,从而使细胞离散。胶原酶对胶原的消化作用很强,它仅对细胞间质有消化作用而对细胞损害不大,因此适于消化分离纤维性组织。经多次试验验证,探索出胶原酶消化并最大程度富集精原细胞的最适条件。(3)在消化过程中采用机械吹打结合酶消化的方法,使消化液与组织充分接触,加快细胞分散;(4)将消化温度及低渗温度调整为 35℃。这些改进方法不仅有效去除绝大部分的精子、支持细胞以及精母细胞,也最大程度富集精原细胞,为小鼠精原细胞染色体畸变试验探索出一条成功率高、重现性好地实验方法。

为更好地验证改良消化富集法的有效性,将两种方法所制备的滴片进行比较阅片,结果显示:国标方法所制备的滴片背景杂乱,杂细胞多,细胞膨胀不好,体积小且分散差,细胞相互重叠甚至聚集成团,染色体形态正常但分散不好,甚至相互重叠模糊不清,增加了阅片难度,中期分裂相精原细胞稀少,阅片时间长、效率低;改良消化富集法所制备的滴片背景清晰,杂细胞较少,细胞膨胀好,体积大且分散好,染色体分布在同一水平面,轮廓清晰,收缩适中,染色体形态及分散良好,易于阅片,中期分裂相精原细胞多,阅片时间明显缩短,阅片效率高;阅片比较统计结果显示,改良消化富集法所制备滴片组的精原细胞有丝分裂指数明显增加,工作人员所需观察的高倍视野数大大减少,阅片时间明显缩短,工作效率显著提升。阅片比较试验的形态观察分析及数据统计结果显示,在小鼠精原细胞染色体畸变试验中,应用改良消化富集法制备滴片,能够明显提高实验结果的有效性、可靠性及稳定性。

阅片比较试验发现,显微镜同等放大倍数下,国标方法所制备滴片的细胞较小,而改良消化富集法所制备滴片的细胞较大,其原因可能是国标方法制备滴片时,分离曲细精管直接进行低渗处理,导致组织块太大,无法与低渗液充分接触,细胞膨胀不够,体积略小,滴片时细胞及染色体的分散差。改良消化富集法制备滴片时,剪碎曲细精管,组织与消化酶充分接触,精原细胞被消化成单个细胞,能够与低渗液充分接触,细胞膨胀好,体积大,滴片时细胞及染色体的分散更好,利于阅片,提升了实验结果的准确性及可靠性。

玛咖原产于海拔 3500~4500 m 的南美安第斯山区,已经有几千年的栽培历史,是当地印加人重要的食物来源之一。2011 年我国卫生部批准玛咖粉作为新食品原料,并在云南等地引种成功,国内外对玛咖的研究[4-7] 也越来越多,目前市场可见多种玛咖的保健食品上市,本实验室也对玛咖的抗疲劳功能[8-9] 以及安全性评价[10] 进行深入研究。参考急性经口毒性试验结果,研究玛咖对小鼠精原细胞染色体的致畸变作用,实验结果为阴性,证实玛咖以“食药物质”为基础的安全优势,为玛咖的安全性应用提供了实验依据,同时也进一步验证了改良消化富集法应用于小鼠精原细胞染色体畸变试验的有效性。

本文通过对两种方法所制备滴片的阅片比较,验证了改良消化富集法所制备滴片的优越性及可靠性。通过研究玛咖对小鼠精原细胞染色体畸变试验的影响,进行了详细的系统试验,进一步验证小鼠精原细胞染色体畸变试验中,应用改良消化富集试验方法进行制片,实验结果更加稳定可靠,重复性好,成功率高,是值得推广应用的有效实验方法。

(下转第 85 页)