

# DETECTION OF THE SEQUENCES HOMOLOGOUS TO C-MYC IN MAIZE AND THEIR CHROMOSOME LOCATIONS VIA *IN SITU* HYBRIDIZATION

NING Shun Bin SONG Yun Chun WANG Ling YANG Zheng LIU Li Hua

(Center for Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

## ABSTRACT

The highly conserved proto-oncogene *c-myc* in animals has been shown to play a central role in regulating multiple developmental processes including growth, proliferation, differentiation and apoptosis. Since *c-myc* is highly conserved, investigation of it in plants is warranted. In this paper, we detected and localized the sequences homologous to *c-myc* in maize (*Zea mays L.*) via chromosome in situ hybridization for the first time. It showed that the signals of the probe corresponding to *c-myc* from human were detected in the long arms of the fifth and the fourth chromosomes and in the short arm of the first one repeatedly. The average percentage distances from centromere to signal site were  $96.21 \pm 4.46$ ,  $24.11 \pm 0.47$  and  $10.02 \pm 1.04$  respectively. The results provided a valuable insight into searching for genes associated with apoptosis in plants.

Key words: Gene *c-myc* Homologous sequence Apoptosis Maize Chromosome in situ hybridization

## 人卵黄囊造血的探讨

邢佩霓 韩秀蕊 杨娣娣 魏续仓 李梅生

(陕西省人民医院血液病研究室 西安 710068)

近年来,人们为骨髓移植和基因治疗获得理想的细胞来源已对骨髓,外周血及脐带血中的干/祖细胞进行了深入的研究。而对胚胎造血的发源地——卵黄囊造血的干/祖细胞研究,迄今仅有关于小鼠的报道。本文就人卵黄囊造血及造血干/祖细胞进行初步探讨。

### 材料与方 法

取胎龄4周—5周的药物流产胚胎,经消毒后置洁净工作台中解剖分离卵黄囊。

#### 1. 卵黄囊结构观察

用10%福尔马林固定卵黄囊,石蜡包埋后做成 $4\mu\text{m}$ 组织切片,进行苏木素-伊红染色(HE)后在光学显微镜下观察。

#### 2. 卵黄囊细胞印片观察

将卵黄囊切开,在玻片上直接印片,置4℃冷丙酮

中固定半小时,彻底晾干后做瑞氏-姬姆萨染色及血红蛋白等细胞化学染色观察。

#### 3. 卵黄囊细胞悬液制备

将卵黄囊置于无菌培养皿中,用机械方法切碎,毛玻璃研磨后经5号针头反复抽吸3次或加入胶原酶(sigma),终浓度 $1\text{mg/ml}$ ,置4℃过夜,经RPMI 1640洗涤2次后用Hypaque-Ficoll分离液(比重:1.077,上海)分离,取界面层细胞,加入IMDM培养液(pH:7.2—7.4, Sigma)制备非贴壁细胞悬液。

(1) 造血祖细胞体外培养 半固体培养体系为本室常规培养体系<sup>[1]</sup>。

(2) 细胞涂片观察 细胞经离心涂片机(cytospin 2 Shandon. Co)进行离心 $800\text{rpm/分}$ ( $57.2\text{g}$ ) $\times 10\text{min}$ ,涂片经冷丙酮固定后瑞氏-姬姆萨染色。

本课题系人事部留学回国人员科技资助项目及省卫生厅科研基金项目。

(3) 单克隆抗体免疫荧光检测 将  $1 \times 10^7$  单个核细胞悬液按常规方法加入  $CD_{34}$  单克隆抗体 (Yale 大学惠赠), 置  $4^\circ\text{C}$  1—2hr, 洗涤 3 次, 加带异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的二抗 (羊抗鼠),  $4^\circ\text{C}$  下 40min, 洗 3 次, 于荧光显微镜下分析计数, 胞膜上有 3 个以上荧光亮点的细胞为阳性细胞。

## 结 果

4—5 周胚龄的人卵黄囊为 2—3mm 的椭圆形、淡黄色透明的囊状物。内含卵黄囊液 20—50 $\mu\text{l}$  左右。卵黄囊以体蒂 (connecting stalk) 与胚芽相连, 体蒂长短不一, 长蒂可使卵黄囊远离胚芽, 大于 4 周胚胎的卵黄囊壁上可见到纤细的红色血管网络。显微镜下发现卵黄囊中存在一簇簇团块样红色造血岛, 随胚龄不同, 血岛的数量和大小亦不同。剪断体蒂时, 随卵黄囊液流出的细胞经涂片染色证实为不同阶段的有核红细胞 (图版图 1)。显示胚胎时期卵黄囊造血通过体蒂与胚芽的血运途径。

组织切片可观察到人卵黄囊内为单个囊腔, 囊壁由内胚层柱状上皮细胞、中胚层扁平上皮细胞和血细胞 3 种成分组成 (图版图 2)。壁层内, 部分区域形成血岛, 岛内聚集大量造血细胞, 其中以中、晚幼红细胞为主, 约占 95%, 见到红系分裂相 (图版图 3), 以及同步发育幼红细胞的群体成熟现象 (图版图 4)。未见无核成熟红细胞。亦可见到少量核呈圆形, 细胞核染色质细致、核仁不清晰、胞浆量少的细胞 (图版图 5)。此外, 尚见到由扁平上皮细胞围绕血岛形成的血管 (图版图 6)。

卵黄囊涂片进一步清楚地显示旺盛的红系造血状态。多数红细胞胞体偏大, 胞浆丰富呈巨幼样改变 (Megaloblastoid changes), 部分为核分裂畸形及双核、4 核甚或 8 核的幼红细胞 (图版图 7, 8)。

人卵黄囊内存在造血干/祖细胞由下述实验证实: 1. 红系祖细胞 (BFU-E)、粒系祖细胞 (CFU-GM) 体外半固体培养。培养至第 14 天可见到 BFU-E 集落生长, 但较骨髓细胞形成的集落小。无 CFU-GM 集落生长。2. 用抗  $CD_{34}$

抗体经免疫荧光检测 3 个卵黄囊,  $CD_{34}^+$  细胞为  $3.74 \pm 0.75\%$ , 对照 3 例 7—8 周胎肝和正常成人骨髓,  $CD_{34}^+$  细胞分别为  $0.83 \pm 0.25\%$ 、 $0.75 \pm 0.49\%$ 。由于例数少, 未进行统计学处理。以上证实人卵黄囊内存在具有  $CD_{34}^+$  膜标志的造血干/祖细胞。

## 讨 论

国内外学者的动物实验<sup>[2,3]</sup>提出造血起源于卵黄囊。卵黄囊由内胚层柱状上皮细胞与中胚层造血血管母细胞组成。造血血管母细胞进一步分化为血母细胞和血管母细胞 (扁平内皮细胞), 前者渐渐形成血岛, 后者形成血管。血岛内存在未分化的原始细胞及红系造血细胞。本研究显示人卵黄囊壁的组成类似动物。但人卵黄囊为单个囊腔, 而 Palis<sup>[4]</sup>报道小鼠是由 3 个囊腔组成。另外, 人卵黄囊血岛中见到的一类胞浆量少, 核染色质细致而核仁不清晰的细胞是否属于 Tavassoli<sup>[2]</sup>模式图所提及的未分化细胞或造血干/祖细胞尚有待确定。血岛延续的毛细血管网集中到体蒂的造血迹象说明人卵黄囊确为胚胎造血的发源地。

Moore 等<sup>[5,6]</sup>研究指出动物卵黄囊是造血干细胞形成的唯一场所, 那里存在  $CD_{34}^+$  细胞, 即造血干/祖细胞。Zon<sup>[7]</sup>曾报道在卵黄囊造血期, 由于造血微环境的特点致使此期造血仅限于红系造血。Huang 等<sup>[5,8]</sup>实验亦证明微环境对此期造血的重要性, 当将鼠 8 天或 9 天卵黄囊及胚胎细胞置于体外的不同培养条件下, 则分别表达出可以向髓系集落 (粒系、红系),  $SmIg^+B$  细胞, 成熟 T 细胞分化的能力。本文经形态学、细胞化学染色和体外培养等方法进一步证实了人卵黄囊造血期, 造血岛中造血原始细胞仅限于向红系分化成熟的现象, 未见到形态可以辨认的粒单系及巨核系细胞。利用单克隆抗体不但检测到人卵黄囊中同样存在  $CD_{34}^+$  细胞膜标志的造血干/祖细胞, 而且此类细胞在体外可以获得红系集落 (BFU-E) 生长。但是, 体外粒系祖细胞 (CFU-GM) 培养尚未成功,

是否与实验条件或受某些因素影响所致有待研究。

值得指出的是由于卵黄囊造血属血管内造血,成熟红细胞不需经过血管壁进行脱核,故本文观察到人卵黄囊血岛中的红细胞均为有核红细胞,这与动物造血相同。另外,此期有核红细胞形态呈现巨幼样改变的机理是否与造血环境中叶酸和维生素 B<sub>12</sub>代谢或其他因素有关尚未明了。

人卵黄囊造血研究无论是从造血的发生学角度还是从血液、遗传等疾病的治疗方面都具有十分重要的意义。

### 摘 要

采用卵黄囊组织切片、涂片的形态学、细胞化学染色、造血干/祖细胞体外培养及 CD<sub>34</sub>单克隆抗体免疫荧光检测等方法研究表明:人卵

黄囊中存在造血岛,造血岛内由于造血微环境的特点致使此期造血主要向红系分化。血岛中检测出 CD<sub>34</sub><sup>+</sup>细胞,比例高于胎肝及成人骨髓,干/祖细胞于体外培养形成红系集落。结论:人胚胎期造血源于卵黄囊。

关键词: 卵黄囊 造血岛 造血干/祖细胞

### 参 考 文 献

- [1] 邢佩霓等,1992,临床血液学杂志,5:63-65.
- [2] Tavassoli M. 1991, *Blood Cells*, 1: 269-281.
- [3] 施斐曼,1986,细胞生物学杂志,8:168-170.
- [4] Palis J. et al. ,1995, *Blood*, 86:156-163.
- [5] Moore A. S. et al. ,1970, *British Journal of Haematology*, 18:279-296.
- [6] Fennie C. et al. , 1995, *Blood*, 86: 4454 - 4467.
- [7] Zon L I. ,1995, *Blood*, 86:2876-2891.
- [8] Huang H. et al. ,1994, *Exp Hematol*, 22:19-25.

## STUDY ON HUMAN YOLK SAC HEMATOPOIESIS

XING Pei Ni HAN Xiu Rui YANG Di Di WEI Xu Cang LI Mei Sheng

(Department of Hematology, Shaanxi Provincial Hospital Xian 710068)

### ABSTRACT

The hematopoiesis of human yolk sac and the biological characteristics of hemopoietic stem/progenitor cells are investigated by using morphological analysis of histological sections, smears, culture of hemopoietic stem/progenitor cells in vitro and detecting of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells by monoclonal antibodies. It is found that there are many blood islands in human yolk sac. The yolk sac hematopoietic cells are restricted to the erythroid lineage due to characteristics of the hematopoietic microenvironment. The stem/progenitor cells can form erythropoietic colonies in vitro. There are CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells in blood islands and the percentage is higher than cells from embryonic liver and adult bone marrow. It is concluded that the human yolk sac is the original site of hematopoiesis.

Key words: Yolk sac Blood island Hemopoietic stem/progenitor cells

## 利用气液界面无血清培养原代兔气管上皮细胞的研究\*

黄 宁 吴 琦 李胜富\*\* 唐 彬 王伯瑶

(华西医科大学病理生理教研室 成都 610041)

体外培养的气管上皮细胞广泛应用于呼吸道上皮电生理、跨膜离子转运、毒理学实验、细胞癌变机制等许多重要领域的研究<sup>[1-3]</sup>。然而采用传统方法培养的呈单层生长的气管上皮细

胞仅能有限表达其生理功能,这使得体外实验

\*国家自然科学基金资助项目(39670305)。

\*\*现在附一院移免中心工作。