

- 166.
- [21] Carreira, S. et al., 2000, *J. Biol. Chem.*, **275**(29): 21920-21927.
- [22] Tachibana, M., 1999, *J. Investig. Dermatol Symp Proc.*, **4**(2): 126-129.
- [23] Shibahara, S. et al., 1998, *Pigment Cell Res.*, **11**:329-336.
- [24] Furumura, M. et al., 1996, *Pigment Cell Res.*, **9**:191-203.
- [25] Aberdam, E. et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**:19560-19565.
- [26] Bertolotto, C. et al., 1998, *Cell Biol.*, **142**:827-835.
- [27] Hemesath, T.J. et al., 1998, *Nature*, **391**:298-301.
- [28] Wu, M. et al., 2000, *Genes Dev.*, **14**:301-312.
- [29] Takeda, K. et al., 2000, *J. Biol. Chem.*, **275**:14013-14016.
- [30] Selzer E., et al., 2002, *Cancer Res.*, **2**(7):2098-2103.
- [31] Granter SR, et al., 2002, *Appl Immunohistochem Mol. Morphol.*, **10**(1):47-51.

## 细胞增殖寿命的延长研究进展

屈 艺\* 黄 翔\*\* 王正荣\* \*\*\*\* 谢慧琪\*\*\* 杨志明\*\*\*

(\* 四川大学基础医学与法医学院分子生物研究室 成都 610041)

(\*\* 四川省人民医院泌尿外科 成都 610072)

(\*\*\* 四川大学华西医院修复重建研究室 成都 610041)

细胞具有增殖能力的关键是能顺利通过细胞周期的各个控制点。在体外培养的条件下,细胞会因生长环境的不适宜而触发 p16、p53 等因子表达,从而导致细胞不能顺利通过 G<sub>1</sub>→S 限制点而进入休眠(G<sub>0</sub>)状态。即使细胞能在体外培养环境下顺利增殖,但随着有丝分裂的进行,染色体端粒的缩短,细胞也必然会进入 M<sub>1</sub> 期(Mortality stage 1)而逐渐凋亡。现在,人们已经找到了一些方法,通过控制细胞周期调控的某一环节及延长细胞端粒长度来逆转细胞衰老与凋亡的命运。现有的这些方法主要采用了基因改造的策略,通过向种子细胞中导入一定的基因而使其能大量地、快速地甚至永久地生长。

### 一、导入病毒癌基因延长细胞寿命

常用的病毒癌基因包括 SV40 病毒 LT 抗原(SV40-LT)、腺病毒蛋白、人乳头状瘤病毒 E<sub>6</sub>、E<sub>7</sub> 蛋白等。

#### 1. SV40 的结构

SV40 是 60 年代初发现分离的猴肾细胞病毒,人为其自然宿主,它由结构蛋白(VP1, VP2, VP3 和两种抗原(LT 和 st)组成<sup>[1]</sup>。SV40 病毒早期转录区转化基因(A 基因)编码 LT 和 st 抗原。LT 抗原分子量为 94ku(1Da=0.9921 u),含 708 个氨基酸,98% 定位于细胞核内,具有 ATP 酶和 DNA 解旋酶

活性,使蛋白质丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化、ADP 糖基化和乙酰基化。LT 抗原还有活化宿主细胞核糖体基因、诱导 DNA 合成、修饰蛋白质合成起始因子等作用。st 抗原的分子量为 17ku,定位于核内及胞质内,能反式激活 RNA 多聚酶 II 和 III 基因的启动子,以及 c-myc 和 c-fos 癌基因转录,使细胞质肌动蛋白缺失和细胞黏附性下降,LT 抗原为细胞转化启动所必需的,对转化起决定作用,而且转化细胞表型的维持必须要 LT 抗原的连续表达。st 抗原对细胞的转化是非必需的,但可起加强作用,两者共同维持转化表型。

#### 2. SV40-LT 延长细胞寿命的机制

LT 延长细胞寿命并使细胞永生化的功能依赖于其与生长抑制因子 pRB 和 p53 的相互作用。衰老细胞积聚较多低磷化 pRB 结合 E<sub>2</sub>F 是 G<sub>1</sub> 期的关键性抑制点<sup>[2]</sup>。LT 抗原通过其 aa101-118 结合位点结合 pRB-E<sub>2</sub>F 复合物,该结合位点和 J 区(aa 17-32 和 42-47)的相互作用使 E<sub>2</sub>F 从 LT-pRB 的复合体上解离下来<sup>[3]</sup>。小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryo fibroblasts, MEF)培养中,涉及在 N-末端(T1-147)这两个序列的研究较多。当编码 aa1-

\*\*\*\* 联系人。

E-mail: Wangzr-76@hotmail.com

47的序列导入原代或第二代MEF中时,细胞生命期延长,并形成克隆。然而,这些克隆不会较高频率地产生永生化亚系,导入C-末端区(aa251-708)也会出现类似结果。该片段包括p53结合区(aa351-450, 533-626)<sup>[4]</sup>和抗凋亡区(aa525-541)<sup>[5]</sup>。现认为每一个区都可使细胞暂时渡过衰老,但不能供永生化的足够条件。

由LT转染人成纤维细胞寿命的延长是有限的。经过一段超出正常期的旺盛增长后,培养的LT阳性细胞群体逐渐减慢生长,且大多数细胞在正常生命期以后20-30代内死亡,称之为培养终止的“危机”期,可能有一系列复杂的因素与该现象有关。

### 3. SV40 LT 延长细胞寿命的应用实例

近10年来,众多学者尝试用SV40-LT转染了多种细胞并成功地延长了其寿命。

Reilly<sup>[6]</sup>用SV40转化建立血管平滑肌细胞株(SV40CF-SMC),研究肝素对血管平滑肌的抑制作用机制。Su<sup>[7]</sup>等利用经SV40转化的角化上皮细胞株(HE-Ts和HE-Tc)来分析上皮细胞内蛋白质合成的调控作用。Miquel<sup>[8]</sup>等用经SV40转化的角化上皮细胞株(LSV5)研究层粘连蛋白5介导的细胞黏附过程。Webber<sup>[9]</sup>等用经Ad12-SV40转化的前列腺上皮细胞株(PWR-IE)研究前列腺上皮细胞的生理功能和分泌功能。Racusen<sup>[10]</sup>等用经Ad12-SV40转化的肾小管上皮细胞株(LC-RK1、OK、HE-2)研究近曲小管的损伤和疾病。Houghton等<sup>[11]</sup>用SV40转化建立骨髓基质细胞株(HOP7),研究在一定培养条件下,细胞具有向脂肪细胞和成骨细胞双向分化的潜能,进一步研究骨质疏松的原因。肝细胞移植研究中应用最多的是SV40大T抗原基因转染的永生化肝细胞。用SV40 T基因转染胎肝细胞或成熟的肝细胞后,部分获得了分裂增殖能力,体外培养多次传代且生长良好;能完成分泌白蛋白等部分肝细胞功能;接种裸鼠未见体内形成肿瘤,呈现出非恶性细胞表型<sup>[12,13]</sup>。近来,杨志明教授领导的研究小组将SV40-LT导入体外培养的肌腱细胞后,使细胞寿命从13代延长到了65代,且未出现恶性化表型<sup>[14]</sup>。

另外,SV40-LT的许多温度敏感(ts)突变体已经获得;Inga等<sup>[15]</sup>将SV40感染昆虫细胞使SV40-LT的tsA58T抗原在昆虫细胞中表达,在33℃时能启动DNA复制,当温度开始升高到41℃并持续20分钟时,该抗原不能启动蛋白质复制。Inga等<sup>[16]</sup>进一步比较SV40-LT的tsA58T抗原与tsA30T抗原在41℃

使基因失活的时间,前者是后者的4倍,即tsA30T抗原失活时,tsA58T抗原仍保持一定的功能。

当人成纤维细胞由编码条件温度依赖性LT抗原(如SVtsA58)的序列转染后,细胞可在允许温度(35℃)下转化并延长寿命。然而,当人或小鼠细胞培养温度调至39℃时,LT的功能失活,细胞增殖能力发生改变,寿命也恢复至未转染时的状态。如细胞传代次数仍在“正常”生命期内时,细胞可继续增殖,停滞于复制衰老期。当细胞传代次数已超过“正常”期时,将在一代或几代内经历生长停滞和/或细胞死亡。

### 4. 其他病毒癌基因

其他病毒癌基因导入后延长细胞寿命的机理与SV40-LT相似。

腺病毒E1B的55ku蛋白,人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的E6蛋白都能与p53结合而灭活其转录功能,使细胞避开G<sub>1</sub>停滞,进入增殖。同样腺病毒的E1A蛋白,HPV的E7蛋白能与脱磷酸化的pRB结合形成复合物,而使E2F游离,促进细胞进入S期(图1)。

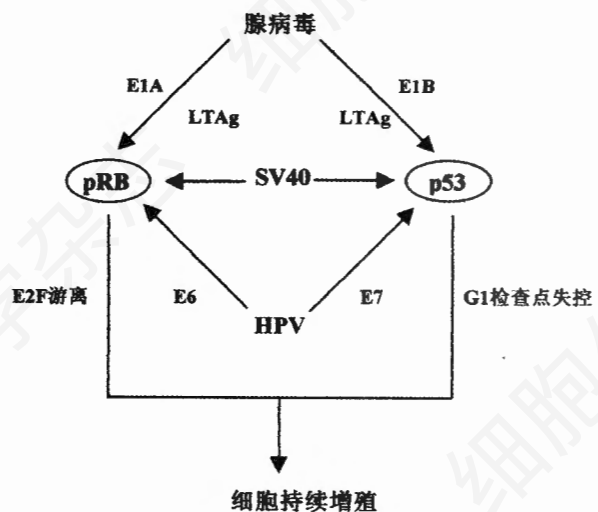


图1 病毒基因对pRB、p53功能的抑制

Tohru<sup>[17]</sup>等详细研究了人乳腺癌上皮细胞(human mammary epithelial cells, HMEC)和人皮肤角质细胞(human foreskin keratinocyte, hFKC)永生化的条件。HEMC的衰老有两条途径:①体外培养20代左右,由于Rb/p16途径激活而进入G<sub>0</sub>期;②未进入G<sub>0</sub>期的细胞在分裂一定代数后也会进入M<sub>1</sub>期,并逐渐凋亡。对于G<sub>0</sub>期的HMEC,单纯导入E6蛋白可以使细胞端粒酶活化,p53蛋白失活,但细胞

不能永生;单纯导入 E7 蛋白不能激活端粒酶活性,但可一定程度失活 p53,细胞也不能永生。同时导入 E6 和 E7 蛋白,可使端粒酶激活,p16 和 p53 失活,细胞得以永生化;而单纯导入 hTERT 可激活端粒酶,但不失活 p16 和 p53,细胞不能永生化。HFKC 永生化需要与 HEMC 相似的条件。

## 二、端粒酶与细胞寿命

### 1. 端粒的结构和功能

端粒是真核细胞线形染色体末端的一种特殊结构,含有许多简单重复的 DNA 序列及相关蛋白质。端粒有稳定染色体,防止染色体末端融合,保护染色体结构基因,调节正常细胞生长等多种重要的生物学功能。

人和其他哺乳动物端粒 DNA 序列由 5'→3'方向的 (TTAGGG)<sub>n</sub> 反复串联组成,在人类有 2-15kbp,是非结构基因,不具有编码蛋白质的功能。端粒 DNA 的 3'末端较 5'末端伸出 12-16bp 的一段,而且弯回呈帽状保护着染色体,防止其断裂、重组或降解,并促进核膜黏着以及减数分裂时生殖细胞的配对。

细胞每次分裂后,染色质丢失 50-200 个端粒序列核苷酸,因此,端粒酶缩短是正常细胞分裂与老化的分子信号<sup>[18]</sup>,随着细胞分裂的不断进行,端粒不断缩短,当其长度减小到一定临界值时,细胞即趋向衰老、死亡。

### 2. 端粒酶的作用及延长细胞寿命的机理

影响端粒长度的因素有许多,其中主要有端粒结合蛋白、端粒帽蛋白、端粒酶及 DNA 复制酶等。其中端粒酶是最主要的影响因素,其他一些因素对端粒的调节作用也与端粒酶有关。端粒酶是一种能延长端粒末端的核酸蛋白酶,由蛋白质和 RNA 组成,可以其自身的内源性 RNA 为模板,发挥 RNA 指导 DNA 合成的作用,向端粒末端添加 (TTAGGG)<sub>n</sub> 序列,使端粒延长,延长细胞的寿命。

迄今,端粒酶的三个主要成分,即人端粒酶 RNA (human Telomere RNA, hTR),端粒酶相关蛋白 (Telomerase protein1, TP1) 及端粒酶逆转录酶 (human Telomerase Reverse Transcriptase, hTERT) 基因已被克隆出来。在构成端粒酶的这三个成分中,hTERT 与端粒酶活性最为相关。研究发现,正常细胞已存在端粒酶的 hTR 和 TP1 组分表达,但没有 hTERT 表达,而具有端粒酶活性的肿瘤细胞则无一例外存在 hTERT 表达。将 hTERT 基因导

入端粒酶阴性的正常体细胞,可以发现端粒酶活性的重建,使细胞端粒延长并得以永生化<sup>[19]</sup>。研究表明 hTERT 必需保持其完整性,才能正确行使其功能。hTERT 蛋白 C 端序列不是其逆转录酶活性所必须,但对保持新合成端粒的稳定性具有重要作用<sup>[20]</sup>。

在 M<sub>1</sub> 期到来之前将 hTERT 导入细胞,可重建细胞端粒酶活性,延长或维持端粒长度,从而避免了 M<sub>1</sub> 期的触发机制,使细胞增殖周期一直进行下去。此外,研究发现端粒酶活性的重建可以激活细胞内 C-myc 等基因的表达上调,从而使外于 G<sub>0</sub> 期的细胞跨越 G<sub>1</sub>→S 期限制点而继续增殖<sup>[21]</sup>。对于已处于 M<sub>1</sub> 期的细胞,重建端粒酶活性具有双重作用,既可延长端粒长度从而消除 M<sub>1</sub> 期触发机制的发生,又可通过激活 C-myc 等基因表达促进细胞周期进程,从而使细胞获得无限增殖能力。然而,对于某些类型的细胞来说,单纯导入 hTERT 基因并不能有效越过细胞周期调控点,尚需要 SV40-LT 等病毒基因的协同作用。

### 3. 端粒酶重建延长细胞寿命的应用实例

#### 1) 单一 hTERT 基因导入使细胞永生化

1997 年, Bodnar 等<sup>[19]</sup>将 hTERT 真核表达质粒导入人皮肤成纤维细胞 BJ、人视网膜上皮细胞 RPE 中使其端粒酶活性得以重建,端粒延长。未转染细胞寿命只有 40-50 代,重建端粒酶后传了数百代,呈现永生化趋势。对其进一步的研究发现,两种细胞均无恶性表型出现,体外培养时保持血清依赖性,在软琼脂培养基上不呈集落性生长,接种裸鼠也无致瘤能力,细胞内 PRb 和 p16 基因表达水平及活性与母代细胞相比无差异性。人皮肤成纤维细胞是皮肤组织工程中重要的种子细胞,人视网膜上皮细胞对于治疗视网膜疾病具有重要作用,因而它们已成为美国 Geron 公司开展相关组织工程研究的重要技术平台。

此后, Yang<sup>[22]</sup>等将 hTERT 导入人静脉内皮细胞中表达获得了永生化的细胞株,为血管组织工程的开展提供了丰富的种子细胞。在肝细胞中重建端粒酶活性也使肝细胞寿命显著延长,但表现出了一定的恶性表型倾向。最近, Yudoh 等<sup>[23]</sup>,在成骨细胞中重建了端粒酶活性,使细胞寿命从 17 代延长到了 37 代且仍在继续分裂生长,为骨组织工程种子细胞来源开辟了一条有效途径。

#### 2) hTERT 协同病毒癌基因转染使细胞永生化

对大多数细胞来说,单纯的病毒癌基因转染,由于不能延长或维持端粒长度,尽管细胞可从  $G_0$  期继续分裂增殖,仍然不能避免  $M_1$  期的到来,摆脱不了最终凋亡的命运。只有与 hTERT 基因协同转录,才能使细胞真正永生化。但个别种类细胞如人乳腺上皮细胞,转入一定的癌基因后也可同时激活端粒酶活性而永生化。另一方面,对于某些类型的细胞来讲,单纯重建端粒酶活性不足以越过细胞周期的限制点,需要其他癌基因的协同作用才能推进细胞周期的进程。

例如,在人胚肾细胞 HEK,从肺成纤维细胞 LM216,IMR90 中导入 SV40-LT 或  $E_7$  蛋白后,细胞寿命可延长到 60 代以上,但不会永生化,如再转导 hTERT 进入细胞,细胞即可永生化<sup>[24]</sup>。又如,人皮肤角质上皮细胞单纯导入  $E_7$  蛋白可加速细胞群体增殖,但也不能永生化,只有同时导入  $E_7$  和 hTERT 才能使细胞永生化<sup>[24]</sup>。

除上述病毒蛋白和端粒酶外,采用生长因子刺激细胞周期进程是细胞体外培养时常用的方法。体外培养的肝细胞、软骨细胞都具有很强的生长因子依赖性,而用 IGF-1 刺激肌腱细胞的增殖也取得了很好的效果<sup>[14]</sup>。采用基因转移技术向血管内皮细胞和平滑肌细胞中导入 KGK、VEGK 等基因,可显著加快工程化组织新生血管的长出<sup>[25]</sup>。

#### 4. 恶性表型的控制

永生化细胞解决了细胞增殖难题,但由于运用了抗凋亡和摆脱正常细胞周期,以达到无限增殖的机制,其安全性受到质疑。虽然对端粒酶永生化成纤维细胞的研究显示其不具恶性表型,但对端粒酶重建肝细胞的研究则发现有一定恶性化倾向,为这类细胞的体内移植带来一定困难。目前已有一些方法可人为控制移植后细胞的永生化表型,可采取如下措施:①选择分化高、功能最接近正常的永生化细胞株用于移植。②条件永生化细胞,由于体内环境的改变,细胞将失去其永生化表型。如将 SV40-LT 基因置于四环素依赖性启动子之下转染细胞,在体外培养条件下,加入四环素使其表达,移植入体内后由于脱离了四环素环境,外源基因可不再表达而清除了永生化表型。③采用基因工程技术杀灭瘤细胞或剪除癌基因,使增殖后的永生化细胞在体内恢复正常,如可通过自杀基因 Hygro-TK 的表达来杀灭瘤细胞或 Cre 重组酶剪除位于 LoxP 靶点之间的 SV40 基因,使增殖后的永生化细胞恢复正常。目前,作者正在尝试一种新的

策略,即用 hTERT 和 SV40-LT 蛋白或 mRNA 代替其基因导入种子细胞以刺激其生长,延长其寿命,由于这种施药方式是瞬时的、可控的,因而有望消除种子细胞潜在的恶性表型。

虽然永生化细胞的瘤性倾向不容忽视,但永生化细胞多为单一原癌基因表达,不像多基因、多因素的肿瘤细胞那样复杂,其瘤性倾向的表型较易控制,功能上也十分接近或等同于正常细胞,作为组织工程种子细胞的标准株加以利用是很有前景的。

#### 参 考 文 献

- [1] Fanning E and Knippers R., 1992, *Annu Rev Biochem.*, 61:55-59.
- [2] Stein GH. et al., 1990, *Science*, 249(4 969):666-671.
- [3] Srinivasan A. et al., 1997, *Mol. Cell Biol.*, 17(8):4761-4766.
- [4] Kierstead TD and Tevethia MJ., 1993, *J. Virol.*, 67(4):1817-1823.
- [5] Conzen SD. et al., 1997, *J. Virol.*, 71(6):4536-4541.
- [6] Reilly CF., 1990, *J. Cell Physiol.*, 142(2):342-347.
- [7] Su R T., 1993, *Exp. Cell Res.*, 205(2):403-409.
- [8] Miquel C. et al., 1996, *Exp. cell Res.*, 224(2):279-285.
- [9] Webber MM. et al., 1996, *Carcinogenesis*, 17(8):1641-1647.
- [10] Racusen LC. et al., 1997, *J Lab Clin Med*, 129(3):318-325.
- [11] Houghton A. et al., 1998, *Bone*, 22(10):7-12.
- [12] Wood worth CD and Isom HC., 1987, *J. Virol.*, 61(11):3570-3 579.
- [13] Miyazaki M. et al., 1993, *Exp. Cell Res.*, 206(1):27-35.
- [14] 项舟等,2000,肌腱细胞体外转化的实验研究,现代康复,4(8):1188-1189.
- [15] Inga R. et al., 1990, *J. Virology*, 64(12):6234-6301.
- [16] Inga R and Carol R., 1992, *J. Virology*, 66(11):6517-6525.
- [17] Kiyono T. et al., 1998, *Nature*, 396(5):84-92.
- [18] Lange T., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(28):2882-2890.
- [19] Bodnar AG. et al., 1998, *Science*, 279:349-352.
- [20] Zhu J. et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:3723-3728.
- [21] Park NH. et al., 2001, *Int J Oncol*, 19(4):755-761.
- [22] Yang JW. et al., 1999, *J Biol Chem*, 274(37):26141-26148.

- [23] Yudoh K. et al., 2001, *J Biol Miner Res.*, 16(8): 1453-1464.
- [24] Hahn WC. et al., 1999, *Nature*, 400(29):464-470.
- [25] Salyaapongse AN. et al., 1999, *Clinics in plastic surgery*, 26(4):663-669.

## 姐妹染色单体交换(SCE)的检测原理及其分子机理\*

郑科 潘建伟 姜志明 朱睦元\*\*

(浙江大学生命科学院 杭州 310012)

全球工业化趋势带来的环境污染问题已成为人们日益关注的焦点。环境保护与自然资源的可持续利用,与人类自身的命运息息相关,具有非常深远的意义。如何建立能有效检测环境状况的技术和可靠而灵敏的污染指标是环保的关键问题之一。各种环境胁迫因子包括物理的、化学的、生物的均会引起细胞内DNA不同程度的损伤,并可能进一步导致染色体畸变(chromosomal aberration, CA),甚至引发癌变。在检测DNA损伤的几十种方法中,姐妹染色单体交换(sister-chromatid exchange, SCE)技术具有灵敏、快速等优点,与Ames氏实验同样有效,比微核(micronucleus)实验灵敏几十到几百倍<sup>[1]</sup>。因此,目前SCE技术已在环境科学、医学、生物学等研究领域中得到广泛应用。植物细胞SCE检测因其灵敏、快速、简便、经济等特点适合于检测环境胁迫因子对细胞DNA分子的遗传损伤<sup>[2]</sup>。戴修道等<sup>[3]</sup>通过体外试验研究了不同区段的黄浦江水(上海市主要的饮用水源)提取物与SCE的关系,为江水污染的针对性治理提供了科学依据。SCE作为一种反映DNA损伤和遗传不稳定性(genetic instability)的敏感指标,也可应用于遗传病和肿瘤等疾病研究。Balcl等<sup>[4]</sup>报道了常染色体隐性遗传病Bloom综合征(Bloom syndrome, BS)具有很高的SCE率和CA率,说明患者体细胞DNA的不稳定性和较弱的修复能力。Roy等<sup>[5]</sup>用SCE和CA两种指标研究了家系中自发染色体不稳定性与癌症发生的相关。医学工作者通常以外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocytes)为研究对象进行SCE检测,因为淋巴细胞与组织癌细胞中的染色体损伤程序存在一定的相关性<sup>[6]</sup>。SCE率长期高于正常范围,可能会导致肿瘤的发生,因此把SCE率作为癌症早期诊断的临床前指标具有一定的参考价值。卢洁等<sup>[7]</sup>通过对急性白血病患儿的骨髓细胞SCE率的观察和分析探讨了SCE检测在病情转归、免疫学分型、治疗效果和

预后等各医疗环节中的意义。在遗传毒理学方面,通过SCE检测技术对食品、药物等产品的有效成分进行必要的遗传安全性评价。此外,SCE技术为深入研究染色体分子结构、DNA复制、损伤和修复、染色体畸变和细胞周期等重要的基础问题提供了有用的工具。鉴于目前国内外有关SCE的研究性报道较多,而对SCE的综述性报道较少,本文拟就SCE的研究作一扼要介绍,以供国内同行参考。

### 一、SCE的由来

1938年,McClintock<sup>[8]</sup>首次提出了姐妹染色单体交换(SCE)的概念。SCE是指来自一个染色体的两条姐妹染色单体之间同源片段的互换。这种互换是完全的,对称的。1958年,Taylor<sup>[9]</sup>首次证实了植物细胞染色体存在SCE的现象。当时世界各国关于SCE的研究工作进展缓慢,直到1973年Latt<sup>[10]</sup>首次建立SCE检测技术才引起了SCE研究热潮。该技术的核心环节是姐妹染色单体色差显示(sister-chromatid differentiation, SCD),即利用5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)对DNA分子的掺入来观察姐妹染色单体,或者说,观察不同数量胸腺嘧啶核苷(thymidine, T)组成的染色体区域。SCD是SCE检测最重要的一步。Taylor曾用<sup>3</sup>H来标记DNA中的T,再通过放射自显影的方式观测SCE,但这种方法效果不好,对SCE也很难计数。若用荧光素(一般是Hoechst-33258)染色来显示SCE,由于荧光消失快,只能立刻照相而不能长期保存。荧光素-吉姆萨染色(fluorescent-plus-Giemsa, FPG)法也因程序繁杂而难以推广,但FPG改良法目前已成为大多数实验室所采用。BrdU-Giemsa法改进和简化了SCD的步骤。此后,活

\* 本研究得到国家自然科学基金(39770420, 30100115)、浙江省自然科学基金(300255)和浙江省科技厅重点项目(011102186)资助。

\*\* 通讯作者。 E-mail: Lsczhumy@mail. hz. zj. cn