

- [2] Karl Schmitt, et al, 1988, *J. Immuno. Methods*, 109: 17—25.
- [3] 吕沅冈, 喻峰, 1992, 细胞生物学杂志, 14: 87—91.
- [4] Jorg Schmidt, et al, 1984, *Exp. Cell Res* 152: 565—570.
- [5] Theodore Gurney, JR., et al, 1981, *In Vitro*, 17: 993—996.
- [6] Hitoshi Kotani, et al, 1991, *In Vitro* 27 A: 509—513.
- [7] Menashe Marcus, et al., 1980, *Nature*, 285: 659—661.
- [8] Stig eansson, et al, 1985, *Exp. Cell Res.*, 161: 181—188.
- [9] H. W. L. Ziegler-Heitbrock, et al, 1987 *Exp. Cell Res.*, 173: 388—394.
- [10] L. Schimmelpfeng, et al. 1980, *Nature*, 285: 661—662.

## STUDY ON THE ELIMINATION OF MYCOPLASMA WITH CIPROFLOXACIN FROM CELL CULTURES

Chen Ru-ying, Yu Feng, Zhu De-hou

(Cell Bank, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031)

### ABSTRACT

The infection of Mycoplasma in cell cultures remains a bothering problem in the biological research using cell biological technology and in the biotechnological products. Treated with Ciprofloxacin (10  $\mu$ g/ml culture medium) for 14 days, vero, Sp 2/0-Ag 14 and other cell lines became negative in the tests for mycoplasma. These decontaminated cell lines kept negative in the above tests after at least 4 months of cultivation, subcultivation storage in the nitrogen and recovery from the liquid nitrogen. The growing characteristics of cell line Vero and the secreting activity of hybridoma cell line LSC-116 which had been both cultured in the Ciprofloxacin-contained medium were also tested while no side-effects were found.

**Key words:** Cell culture Mycoplasma Elimination Ciprofloxacin.

### 实验技术

## 预测鼻咽癌放射敏感性的CB微核法

史剑慧 程文英 杨 星 徐 萍 王建平 罗伟华

(上海医科大学放射医学研究所 200032)

淋巴细胞胞质分裂阻滞微核法(Cytokinesis-Block Micronucleus Method), 简称CB微核法, 由 Fenech 和 Morley 在 1985 年首先建立<sup>[1]</sup>。已被用来评估肿瘤患者的放射敏感性, 预测肿瘤的放射治疗效果。研究表明, 外周血淋巴细胞微核率与累积剂量呈良好线性正比关系<sup>[2]</sup>。最近文献报道, 将人及小鼠肿瘤细胞株接种于裸鼠, 其肿瘤组织的微核剂量效应, 无论在整体照射还是离体照射的结果是一

致的; 且 CB 微核法与克隆形成法的剂量效应也呈高度相关<sup>[3]</sup>。由于带有微核的细胞丧失了克隆形成的能力<sup>[4]</sup>, 因而对那些不能进行克隆法测定的肿瘤标本仍有可能进行 CB 微核分析, 更由于其费时短, 成功率高, 适于临床应用。本文以鼻咽癌细胞株及活检标本为研究对象, 探讨了 CB 微核法作为鼻咽癌放射敏感性预测指标的可能性。

## 材料与方 法

### 一、鼻咽癌细胞株(CNE-1)

CNE-1 来自中科院细胞所。培养条件: 含 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液。每 3 天消化传代一次。

#### 1. 微核测定

将指数生长期细胞( $2 \times 10^5/\text{ml}$ )接种于 60 mm 大小的培养皿内, 24 h 后以  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射, 照射剂量 0—8 Gy, 剂量率 1.12 Gy/min, 照后 2 h 更换培养液, 加入松胞素 B(Cyt-B)  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 继续培养 24 h 后, 原位固定染色, 计数双核细胞中的微核数, 共计数 1000 个双核细胞。

#### 2. 存活曲线

将指数生长期细胞接种于 60 mm 大小的培养皿内, 24 h 后照光, 照射条件及剂量同上。照后继续培养 10 天, 固定染色, 计数所形成的肿瘤克隆数, 并根据公式:

$$\text{存活率} = \frac{\text{肿瘤克隆数}}{\text{细胞种植数} \times \text{集落形成率}}$$

计算各种剂量下的存活分数, 并在半对数纸上绘制存活曲线。

### 二、鼻咽癌活检标本的微核测定

标本取自 20 例确诊病人, 其中男 14 例, 女 6 例, 年龄 29—62 岁, 平均年龄 47.6 岁, 随访时间 1.5—2 年。

标本于采集当天或在含抗生素的培养液中过夜后剪碎, 以 IV 型胶原酶和 DNase 振荡消化成单细胞悬液, 洗涤后以  $3 \times 10^4/\text{ml}$  浓度接种于涂有纤维结合素的培养皿内。次日细胞贴壁, 继续培养 2 天后以  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线照射, 每份标本照射三个剂量点, 分别为 0, 2, 4 Gy。照后立即更换培养液, 加入松胞素-B  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 继续培养 48 小时, 原位固定染色, 计数双核细胞中的微核数。

## 结 果

### 一、CNE-1 的放射效应

#### 1. CNE-1 微核剂量效应曲线

见图 1。由图 1 可见, 随着照射剂量的递增, 双核细胞中的微核数也明显增加, 两者呈

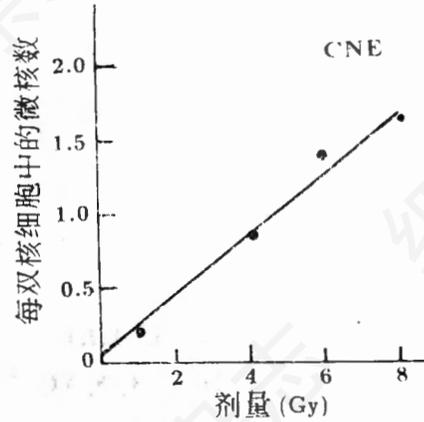


图 1 不同剂量照射 CNE-1 每个双核细胞中的微核数

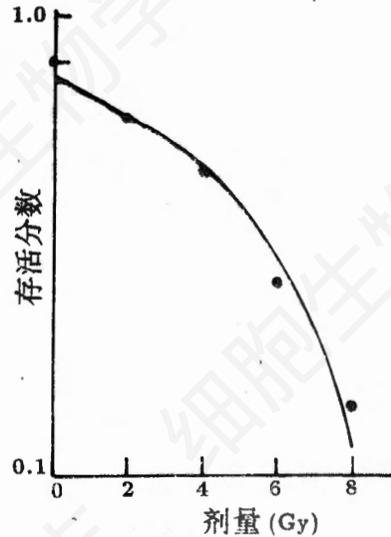


图 2 细胞存活曲线

良好的线性关系, 符合方程  $Y = 0.048 + 0.204D$ , 相关系数( $r$ )为 0.996,  $p < 0.001$ 。

#### 2. CNE-1 细胞存活曲线(见图 2)

结果显示随剂量的增加, CNE-1 的存活分数显著下降, 将曲线进行拟合, 符合方程  $\lg Y = -0.051 - 0.092D$ ,  $r = -0.977$ ,  $p < 0.05$ 。

#### 3. CNE-1 微核与存活分数的关系(见图 3)

结果显示在 0—8Gy 剂量之间, CNE-1 双核细胞中的微核数与其存活分数之间存在良好的负相关。回归方程  $Y = \lg Y = -0.031 - 0.449x$   $r = -0.970$   $p < 0.05$   $r = -0.998$ ,  $p < 0.001$ 。

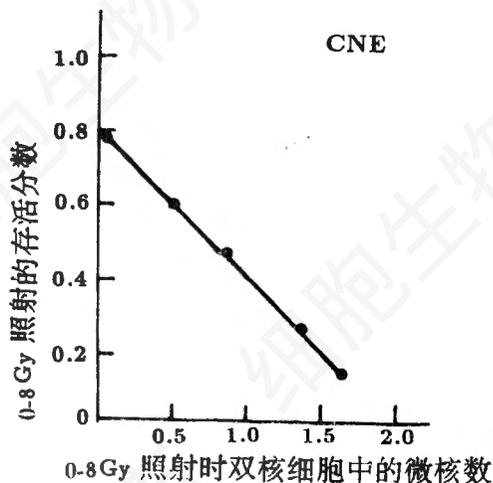


图3 微核率与存活分数间的相关性

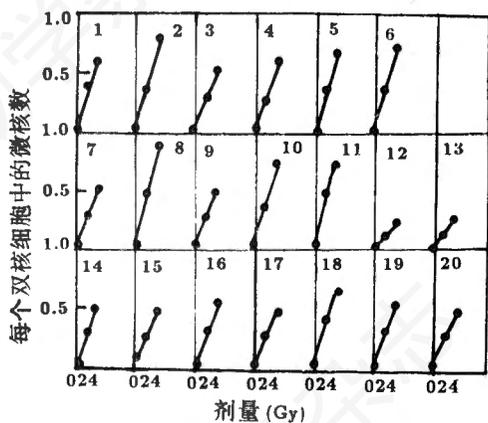


图4 鼻咽癌活检标本照射后每个双核细胞中的微核数

### 二、鼻咽癌活检标本的微核形成

微核形成情况如图4所示。20例中8例反应较高，7例反应中等，5例反应偏低。经随访1.5—2年，18例局部控制良好，未见复发。反应偏低者2例，即12、13号患者近有淋巴结肿大，疑有复发倾向。

## 讨 论

微核技术在评介电离辐射的损伤效应方面起了很大作用<sup>[6]</sup>。Cyt-B是一种霉菌代谢产

物，在细胞有丝分裂过程中，可抑制某些细胞胞质分裂而不影响核分裂。Fenech等报道获得多量双核细胞的Cyt-B最适浓度为3 μg/ml<sup>[1]</sup>。由于应用Cyt-B的CB微核法只计数一次核分裂后双核细胞中的微核数，因此它克服了常规培养微核法不能识别一次核分裂后的细胞所造成的实验结果不准确，难以重复等缺陷，实验的敏感性、准确性和重复性均得到提高<sup>[6]</sup>。近几年来，人们已利用CB微核法探讨了肿瘤患者外周血淋巴细胞与累积剂量之间的关系，取得了一些有意义的结果<sup>[7]</sup>，但以人肿瘤活检标本为研究对象的还很少有人报道。

由于肿瘤活检标本的原代培养较复杂，克隆形成率相当低，而且费时长，易污染等缺点<sup>[8]</sup>，因此我们仅对CNE-1进行克隆形成法和微核法的相关比较，在发现两者呈高度相关的基础上，我们对20例患者的鼻咽癌活检标本仅作了微核分析，并进行1.5年—2年的随访。文献表明，照射后细胞微核形成率高的患者，较少复发，照后细胞微核增高不明显者较易复发<sup>[9]</sup>。我们的实验提示18例局部控制良好，而微核形成率偏低者中有2例，即12、13号患者，近有复发趋势，由于鼻咽癌属放射中度敏感的肿瘤，因此，是否那些CB微核形成较低的其它患者以后有可能复发或较早复发，这还有待于进一步随访证实。我们相信，通过更多病例的累积和验证，CB微核法将有希望成为鼻咽癌放射敏感性预测的一项有价值的指标。

## 摘 要

本文介绍一种预测鼻咽癌放射敏感性的方法——CB微核法。以该法评介了鼻咽癌细胞株及20例鼻咽癌患者活检标本的放射敏感性，随着剂量增加，微核率也明显增加。CB微核的剂量-效应与克隆法的剂量效应呈高度负相关( $r = -0.970$ )。活检标本微核实验表明，20例中8例反应较高，7例中等，5例反应偏

低; 随访表明, 反应偏低者中已有2例有复发倾向。由于CB微核法具有简便、快速、正确性较高等优点, 适于临床应用。

**关键词:** 鼻咽癌 放射敏感性 微核测定

### 参 考 文 献

- [1] Fenech M et al, 1985, *Mutation Res*, 147, 29—36.
- [2] Weissenborn U et al., 1990, *Int J Radiat Biol*, 59, 373—383.
- [3] Shibamoto Y et al., 1991, *Radiat Res*, 128, 293—300.
- [4] Streffler C, 1992, *Br J R supplement*, 24, 70—73.
- [5] Ban, S et al., 1993, *Radiat Res*, 134, 170—178.
- [6] 唐卫生等, 1991, 国外医学, 放射医学核医学分册, 15, 10—13.
- [7] Fenech M et al, 1990, *Int J Radiat Biol*, 57, 373—377.
- [8] 小野公二他, 1989, 癌の临床, 35, 1566—1571.
- [9] Zamboglou N et al., 1992, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 25, 15—19.

## THE CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS ASSAY IN PREDICTING THE RADIOSENSITIVITY OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

Shi Jian-hui, Cheng Wen-ying, Yang Xing

(Shanghai Institute of Radiation Medicine, Shanghai Medical University Shanghai 200032)

### ABSTRACT

We have made use of the cytokinesis-block micronucleus method to evaluate the radiosensitivity of a nasopharyngeal carcinoma cell line (CNE-1) and biopsies obtained from 20 patients with nasopharyngeal carcinoma. The number of micronuclei increases with the radiation dose. A good correlation was found between the radiosensitivity determined by the micronucleus assay and that measured by the colony-forming assay in CNE-1 cell line ( $r = -0.970$ ). Moreover, the results of micronucleus assay for tumor cells from biopsies of patients with primary carcinoma look promising for the prediction of tumor radiosensitivity. These results are encouraging but need to be confirmed with a larger number of patients with a longer follow-up.

**Key words:** Micronucleus assay Radiosensitivity Nasopharyngeal carcinoma

### (上接插页二)

克隆、重组等)紧密结合起来是当前细胞生物学研究在方法学上的特点之一。我国在亚显微形态学研究方面已有好的基础, 在方法学这方面的改进, 将显著地提高我国细胞生物学的水平。

4. 我国代表在细胞骨架、STM在核酸和蛋白质大分子研究上的应用等工作引起了较大的兴趣。但在总体上和国际上还有很大的差距。如何应用最新的分子遗传学方法和概念, 贯彻到细胞研究中, 促进我国细胞生物学的现代化发展仍然是一个很大的挑战。

5. 细胞生物学教学和实验的现代化, 特别是分子生物学方法在细胞研究中的推广应用是会议上发展中国家关心的问题。我国同样存在这方面的问题, 如何更新大学细胞生物学教材和实验设备是急需解决的问题。

以上几点对于制定我国细胞生物学发展战略, 重点课题的选择以及改进细胞生物学教学和研究工作都可能具有参考的意义。

(王亚辉 中科院上海细胞所 200031)