

- Biophys. Res. Commu.*, 128:1455—1460.
- [28] Guron, K. et al., 1992, *Photochem. Photobiol.*, 56: 691—695.
- [29] Chandok MR and S. K. Sopory, 1992, *Phytochemistry*, 31: 2255—2258.
- [30] Deng, XW. et al., 1991, *Genes. Dev.*, 5: 1172—1182.
- [31] Wei N and X. W. Deng, 1992, *Plant Cell*, 4: 1507—1518.
- [32] Deng, X. W., 1994, *Cell*, 76: 423—426
- [33] Duckett CM and J. C. Gray, 1995, *BioEssays*, 17: 101—103.
- [34] Wei, N. et al., 1994, *Cell*, 78: 117—124.
- [35] McNellis, TW. et al., 1994, *Plant Cell*, 6: 1391—1400.
- [36] Wei, N. et al., 1994, *Plant Cell*, 6: 629—643.
- [37] von Arnim A G and X. W. Deng 1994, *Cell*, 79: 1035—1045.
- [38] Ang L H and X. W. Deng, 1994, *Plant Cell*, 6: 613—628.
- [39] Hou, Y. et al., 1993, *Plant Cell*, 5: 329—339.
- [40] McNellis, TW. et al., 1994, *Plant Cell*, 6: 487—500.
- [41] Pepper, A. et al., 1994, *Cell*, 78: 109—116.
- [42] 孙大业、郭艳林, 1993, 细胞信号系统, 科学出版社, 北京.
- [43] Elich TD and J. Chory, 1994, *Plant Molecular Biology*, 26: 1315—1327.

研究工作

C57 BL/6 J 小鼠 ES 细胞系的建立及其特性分析*

柴桂莹 韩 嵘 尚克刚

(北京大学生命科学学院细胞生物学与遗传学系 100871)

自从1981年首次从小鼠的囊胚中分离出可在体外连续培养的ES细胞(Embryonic Stem Cell)^[1,2]以来,ES细胞的研究与应用已成为生物学领域的热点研究课题之一。在细胞生物学、反向遗传学、发育生物学、神经生物学和医学等领域的研究中,发挥着愈来愈重要的作用。国内近年来有关小鼠ES细胞方面的研究报道日益增多^[3-10]。目前国内外常用的ES细胞系几乎都是从129小鼠品系中建立的,如能从小鼠其它品系中建系,将扩大ES细胞的来源品系,为充分利用其他品系的优良遗传背景提供了前提条件。

自交系C57 BL/6 J小鼠,由于具有致癌性不敏感和对鼠痘病毒有良好的抗性等优点,在我国生物学、医学研究中使用十分广泛。从C57 BL/6 J小鼠中建立ES细胞系有可能获得C57 BL/6 J的基因工程小鼠,这对我国生物学和医学的研究有着重要的意义。此外,C57 BL/6 J小鼠的毛色为黑色,如以白化小鼠胚胎为受体,ES细胞嵌合体可以从毛色上清晰地判断,因此从C57 BL/6 J小鼠建系是一项

十分必要的工作。Ledermann^[11]曾报道从C57 BL/6 J小鼠中建立了ES细胞系,囊胚注射产生了嵌合体,并可进入种系。本文报道采用了与其有所不同的方法建成了三个细胞系,并得到与其有所不同的结果,为今后从C57 BL/6 J品系中建立ES细胞系提供了有益的参考资料。

材料与方 法

一、动物及胚胎来源

C57 BL/6 J, BALB/c, 昆明鼠购自北京医科大学实验动物中心和中国医学科学院实验动物中心。雌雄小鼠按2:1合笼,次日晨发现阴道栓时记为受孕的第一天。在怀孕的第三天14时和第四天14时,用补加5%的新生牛血清(天津生化制品厂)的PBS分别从输卵管或子宫中冲胚,分别获得处于8细胞期和囊胚的胚胎。

二、建立ES细胞系的方法

收集C57 BL/6 J小鼠的囊胚,移入含有小鼠胚胎原代成纤维细胞(简称ME)的饲养层上,培养基为DMEM(高糖)培养基(GIBCO, 4,500 mg/l 葡萄糖,

* 本研究是863计划资助项目。

无丙酮酸钠)补加10%新生牛血清和10%胎牛血清(GIBCO), 1000 IU/ml LIF(ESGRO), 1 mmol/L β -巯基乙醇, 40 IU/ml 庆大霉素。37℃, 5%CO₂培养, 囊胚贴壁和内细胞团增殖后, 用含0.25%胰蛋白酶和0.04%EDTA的消化液, 将ICM离散并移入新的含有ME饲养层细胞的四孔板(NUNC)中。4—5天后, 观察各种细胞集落出现的情况, 分离ES细胞集落, 经扩增后, 转入3.5 cm的塑料培养皿中, 常规维持与传代^[6]。

三、ES细胞系的鉴定

1. 碱性磷酸酶染色: 取培养的细胞, 无水乙醇固定, 经染色液(25 mmol/L Tris-顺丁烯二酸缓冲液(pH 9.0) 1 ml, α -磷酸萘酯0.4 mg/ml, 坚牢红TR 1 mg/ml, 氯化镁0.8 mg/ml), 染色15—20分钟。

2. 核型分析: 以终浓度为0.5 μ g/ml的秋水仙素(BDH)处理细胞2小时, 将细胞消化为悬液, 离心去上清, 用0.56%氯化钾(37℃)低渗处理15分钟。经3甲醇:1冰醋酸固定三次后, 空气干燥法制片, Giemsa染色。

3. 体外分化能力: 用胰蛋白酶-EDTA液轻微消化, 使ES细胞集落脱离培养皿表面, 使之成团并进行悬浮培养, 用DMEM(高糖)培养基培养, 11天后收集培养物, 石蜡切片。HE和三色法染色。

4. 体内分化: 取离散的ES细胞, 接种在C57BL/6J雄性小鼠的腹腔或腹股沟内, 每只接种 1.5×10^7 个细胞, 六周后, 取肿瘤制作石蜡切片, HE和三色法染色。

四、嵌合体制作

1. 囊胚显微注射: 选用昆明鼠和BALB/c小鼠的囊胚为受体胚胎, 每个囊胚注射5—15个细胞, 注射后的囊胚立即转入培养基中, 在5%CO₂, 37℃培养箱中培养。用补加20%新生牛血清的DMEM(低糖)培养基, 培养2—3小时后移胚。

2. 8细胞期胚显微注射: 选用昆明鼠的8细胞期胚为受体胚胎, 向透明带内注入3—6个细胞。培养过夜, 次日待发育到囊胚后移胚^[12]。

3. 共培养法: 制备ES细胞悬液 $1-10 \times 10^5$ 个细胞/ml, 取20 μ l细胞悬液做3—5个小滴, 液体石蜡(SIGMA)覆盖后在每滴细胞悬液中加入10—15个昆明鼠8细胞期脱带胚, 培养2—4小时后将胚胎移出, 转移到培养基中培养过夜, 待发育至囊胚后移胚^[12,13]。

4. 胚胎移植: 选用昆明小鼠做假母, 将恢复或

发育到囊胚的胚胎移植到交配3天的假孕昆明鼠的子宫中, 假孕鼠是用雌性昆明鼠与结扎输精管的雄性昆明鼠交配获得。每侧子宫移植4—7个胚胎。

5. 嵌合体识别: 根据洗美薇^[9]和吴白燕^[8]的报道, 毛色嵌合与脏器嵌合成正相关, 因此嵌合体的判断以毛色的嵌合为依据。

结 果

一、C57BL/6J小鼠ES细胞系及其克隆的建立

收集3.5天的囊胚, 培养48小时后, 囊胚腔略有增大, ICM集中于囊胚的一侧, 部分胚开始脱透明带, 72小时后所有的胚胎均已脱带。脱带的囊胚贴壁后, 囊胚外层的滋养层细胞长出, 推开饲养层细胞, 在培养皿表面铺展, ICM迅速增殖, 胚胎培养4—6天后, ICM呈圆柱状达到可以离散的状态。在离散ICM5—7天后, 可出现上皮细胞集落、内皮细胞集落、滋养层细胞集落和ES细胞集落。在总共培养的25个囊胚中, 3个胚出现了ES细胞集落, 细胞小, 排列紧密, 边缘折光性强。分别离散这3个胚的ES细胞集落, 接种到含ME饲养层的四孔板中, 4—5天后, 再次离散扩增至含有ME的四孔板中。2—3天后, ES细胞集落长满四孔板, 扩增到3.5 cm平皿上并记为第一代。三个细胞系分别命名为MESPU 17, MESPU 18和MESPU 19。细胞按1:2传代, 两天后换液, 第三天传代。扩增到第四代开始部分冻存备用。它们是可以连续传代的细胞系, MESPU 17传至第11代, MESPU 18传至第24代, MESPU 19传至第21代后, 人为终止传代实验。

我们曾用210个C57BL/6J的囊胚进行了为期一年的预备试验(待发表), 与从129品系中建立ES细胞系的过程相比, 从C57BL/6J小鼠中建系要求更为苛刻的条件。最重要的是需使用新出厂和新配制的培养基, 严格选择适宜的血清, 在操作时, 由于细胞较大(见下文), 适度的消化和吹打是离散ICM和早期

传代的关键。

二、MESPU 17, MESPU 18, MESPU 19 细胞系的特性

1. 形态与特征

细胞具有干细胞特征,核大,胞浆少,平均直径约为 15 μm 。体外培养时,细胞排列紧密,呈集落形生长,集落边缘折光性强(图版图 1)。这 3 个细胞系均需 3 天传代一次。碱性磷酸酶染色呈强阳性。

2. 核型检查

MESPU 17/4, MESPU 18/4, MESPU 19/4(斜杠后数字表示传代数)的核型检查表明,它们的正常二倍体细胞分别占 70%、88%和 59%,核型均为 XY 型。

3. 分化能力

(1) 体外分化能力 MESPU 17, MESPU 18, MESPU 19, 细胞悬浮培养 11 天后,

形成简单类胚,细胞团分为二层,没有腔出现,组织学切片显示出双层结构。

(2) 体内分化能力 把 MESPU 17/9, MESPU 18/9 和 MESPU 19/7 的细胞分别接种在雄性 C57 BL/6 J 的腹腔内,6 周后在体腔内形成直径为 1.5—2 mm 的瘤块 4—6 个。MESPU 18/10 的细胞接种在腹股沟皮下,6 周左右长成直径 7 mm 左右的肿瘤。组织学切片显示,这三个细胞系都能分化成来自 3 个胚层的细胞和组织(图版图 2 a, 2 b, 2 c),但干细胞巢很少。

三、嵌合体的制作

以 BALB/c 和昆明鼠为受体胚胎,分别使用囊胚注射法、8 细胞期胚注射法和共培养法,对 MESPU 17 和 MESPU 18 进行了嵌合能力的检查(表 1, 表 2)。

表 1 嵌合体制作及胚胎移植

嵌合体制作方式	细胞种类	处理胚数	移植胚数	移植假母数	受孕假母数(%)
囊胚注射	MESPU 17	89	71 a + 1 b	6	4(67)
	MESPU 18	69	54 a + 15 b	7	4(57)
8 细胞期胚注射	MESPU 17	73	49 c + 8 d	6	2(12)
	MESPU 18	80	57 c + 20 d	7	3(43)
共培养法	MESPU 17	49	10 c + 39 d	4	2(50)
	MESPU 18	50	14 c + 32 d	4	0(0)

a. 恢复完全的囊胚 b. 恢复不完全的囊胚 c. 发育到囊胚 d. 未发育到囊胚

表 2 受孕假母的产仔及嵌合情况

嵌合体制作方式	细胞种类	孕鼠数	移植胚数	产仔数(%)	嵌合体数(%)
囊胚注射	MESPU 17	3	38 a + 1 b	15(38)	0(0)
	MESPU 18	3	30 a + 6 b	16(44)	0(0)
8 细胞期胚注射	MESPU 17	2	15 c + 6 d	8(38)	2(25)
	MESPU 18	3	23 c + 9 d	14(44)	4(29)
共培养法	MESPU 17	2	6 c + 24 d	6(2)	1(17)

a. 恢复完全的囊胚 b. 恢复不完全的囊胚 c. 发育到囊胚 d. 未发育到囊胚

1. 囊胚注射法

以 BALB/c 鼠胚为受体囊胚,在有阴栓的 13 只小鼠中,只有 9 只有胚(占 69%),在总共 54 个胚中,没有透明带或异常胚 31 个(占 57%),正常胚只占 43%,共注射 45 个胚,移入 4 只假母子宫中,其中 1 只怀孕,出生 8 只,

没有可察觉的毛色嵌合。

以昆明鼠的囊胚为受体囊胚,共注射 158 个囊胚,囊胚恢复率占 96%,141 个注射胚移入 13 个假母中,8 只受孕(受孕率为 62%),出生 31 只小鼠(产仔率为 31/75 = 41%),没有毛色嵌合发生。

2. 8 细胞期胚注射法

以昆明鼠的 8 细胞期胚胎为受体胚,进行了显微注射。共注射了 153 个胚,次日发育到囊胚 105 个,占 67%。135 个胚移入 13 只假母中,5 只受孕(受孕率占 38%),在出生的 22 只小鼠中有 6 只嵌合体。这 6 只嵌合体眼睛均为黑色,毛色嵌合为 10—50%(图版图 3)。

3. 共培养法制作嵌合体

以昆明鼠胚为受体胚胎,尝试了用共培养法制作 MESPU 17, MESPU 18 的嵌合体,发育到囊胚的百分比很低(9%),假母的受孕率也很低(8%)。在出生的 6 只小鼠中有 1 只嵌合体毛色嵌合面积为 10%。

讨 论

近年来, Ledermann^[11] 从 C 57 BL/6 小鼠中建立了 ES 细胞系, Yagi^[14] 从 C 57 BL/6 × CBA 的 F1 中建立了 ES 细胞系,但他们都没有对所建立的 ES 细胞系进行全面的特性分析。我们将新建的 3 个 ES 细胞系与来自 129 品系的 ES 细胞系 MESPU 13(本室自建,经过鉴定的 ES 细胞系)^[15] 和国际上常用的 CCE 细胞进行了比较,观察到 MESPU 17, MESPU 18, MESPU 19 细胞在细胞形态、生长特性、分化能力、碱性磷酸酶活性^[15] 及可参与胚胎发生等方面具有 ES 细胞的基本特征,其核型的变化亦在常规建立 ES 细胞系的变化范围之内^[11]。但它们又具有自己的特点,首先, MESPU 17、MESPU 18、MESPU 19 细胞比 MESPU 13 的 ES 细胞大,平均直径约为 15 μm,而后者平均直径约为 13 μm。在进行显微注射时可以明显感觉到细胞“粘”,很容易粘在毛细血管口和壁上。C 57 BL/6 J 的 ES 细胞的这种“大”而“粘”的特性,暗示了 C 57 BL/6 J 品系小鼠的 ES 细胞在建立和培养时的困难,需要更细微和适度的操作。其次,它们的生长速度较慢,以同样密度接种培养时, MESPU 17, MESPU 18, MESPU 19 约需三天传一代,而 MESPU 13 和 CCE 最多只需两天。最后,

在同种小鼠腹腔接种时, MESPU 13 细胞在 2 周后形成许多 2 mm 左右直径的瘤块,组织学切片显示干细胞巢丰富。而 MESPU 17, MESPU 18, MESPU 19 在 6 周后才形成 4—6 个 2 mm 的瘤块,并仅在一处发现干细胞巢, MESPU 18, MESPU 19 在体外悬浮培养时,不能形成囊状胚。

经过嵌合体的制作证明,新建的来自 C 57 BL/6 J 小鼠的 ES 细胞系,在以昆明鼠为受体胚胎时嵌合能力偏低。其原因可能是:

1. 与动物的品质有关。绝大多数 ES 细胞均来自 129 品系,这不是没有原因的,129 品系是畸胎瘤高发的动物,自发率可高达 30%。正常胚胎异位移植时可诱导产生畸胎瘤,而 C 57 BL/6 J 小鼠品系无此特性,其原因尚不明。但这一基因型上的差别是不能忽视的因素。此外, C 57 BL/6 J 是 C 57 BL 小鼠的一个亚系,我国 1975 年从日本引进。但我们购进的 C 57 BL/6 J 小鼠多数带有白色尾尖,这与标准体色是不一致的^[16]。因此,与 Ledermann 所建的 C 57 BL/6 小鼠 ES 细胞系相比, MESPU 17 和 MESPU 18 嵌合能力偏低的原因不能排除基因型的变异。

2. MESPU 17 和 MESPU 18 细胞在体外生长的速度慢,可能也是一个重要的原因。生长慢的 MESPU 17, MESPU 18 导入囊胚中,有可能被宿主胚胎超过或排除。Ledermann 在建系的培养时,除了使用 ME 饲养层以外,还使用了人膀胱癌细胞系 5637 的条件性培养基,这可能有利于来自 C 57 BL/6 J 品系 ES 细胞的生长。因此,在建系和培养细胞的培养基中,加入各种附加营养成分和生长因子,是可以尝试的改进细胞生长状况和嵌合能力的一种选择。

3. 供体细胞与受体胚胎之间的品系搭配,是利用 ES 细胞建立嵌合体时一个十分重要的问题。XY 型的 ES 细胞应当在胚胎建成中提供更多的贡献,才有可能得到理想的结果。根据 Ledermann 的报道,他们用 129/sv 胚胎作

为受体未得到嵌合体,使用 BALB/c 时得到较好的结果。我们也首选了 BALB/c 小鼠的胚胎做为受体,但在实验中发现多次购进的 BALB/c 小鼠的质量很差,妊娠率很低,胚胎畸形率高,其中 57% 无透明带,这给注射带来了困难。根据张锁链等入报道, C 57 BL/6 J 与昆明胚用聚合法产生的嵌合体中, C 57 BL/6 J 细胞有大面积的嵌合^[17],因此我们选用了昆明鼠作为受体胚胎制作嵌合体。实验结果表明,新建的 C 57 BL/6 J 的 ES 细胞以昆明胚为受体,使用囊胚注射法没有得到嵌合体,使用 8 细胞期注射法与共培养法得到了 7 只嵌合体,这一结果与 Yagi 的报道是相似的^[14],他们使用 C 57 BL/6 × CBA 胚胎所建立的 ES 细胞 TT 2,囊胚注射时没有获得嵌合体产生,而 8 细胞期注射法获得了种系嵌合体。

8 细胞期注射法是一个非常好的制作嵌合体的方法,可能是在使用生长慢、分化能力弱的 ES 细胞系制作嵌合体时的一种选择。8 细胞注射能克服囊胚注射的弊端,只需要穿过透明带,不会因损伤滋养层细胞而带来不良的后果,注射的细胞比囊胚注射要少,从而加快注射的速度,不足之处是发育至囊胚的比例偏低。共培养法是一个比较吸引人的制作嵌合体的方法,它不需要昂贵的注射系统,简单易学一次能操作几十个甚至上百个胚胎^[18,19]。但这种方法有不可避免的弊端,大约有 20%—50% 的胚粘不上细胞,粘上细胞的数量也无法控制。

总之,我们认为,如能采取相应的措施改进从 C 57 BL/6 J 小鼠胚胎中建系与培养的条件,用昆明小鼠 8 细胞期胚为受体,并控制发育至正常囊胚的条件,提高受孕率,以及选择多个克隆进行操作,从该品系小鼠中有可能建成具有高嵌合能力并能实现种系传递的有用的 ES 细胞系。

摘 要

本文报道从 C 57 BL/6 J 小鼠的囊胚中,建立了三个 ES 细胞系 MESPU 17, MESPU 18,

MESPU 19。这些细胞的细胞学特征和强 AKP 反应,表明这三个细胞系具有干细胞的特征。这三个细胞系均为 XY 型,正常二倍体核型分别占 70%、88% 和 59%。体外分化可形成简单类胚,体内分化可形成瘤块。与国际上通用的 CCE 和来自 129/ter 的 ES 细胞 MESPU 13 相比,这三个细胞系的 ES 细胞较大;在体外培养时,生长较慢;细胞也较粘,进行显微注射时,很容易粘在注射针壁上。MESPU 17, MESPU 18 进行了嵌合体制作,以 BALB/c 和昆明鼠的囊胚为受体,采用囊胚注射法未获嵌合体,但使用昆明鼠的 8 细胞胚注射法和共培养法得到嵌合体。

关键词: C 57 BL/6 J 小鼠 ES 细胞系
嵌合体

参 考 文 献

- [1] Evans, M. J., et al., 1981, *Nature*, 292: 154—156.
- [2] Martin, G. R., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7634—7638.
- [3] 从笑倩等, 1993, *实验生物学报*, 26: 429—439.
- [4] 从笑倩等, 1995, *实验生物学报*, 28: 173—183.
- [5] 胡新立等, 1996, *北京大学学报(自然科学版)*, 32: 134—139.
- [6] 尚克刚等, 1992, *遗传学报*, 19: 491—496.
- [7] 尚克刚等, 1994, *北京大学学报(自然科学版)*, 30: 119—127.
- [8] 吴白燕等, 1995, *遗传学报*, 22: 336—342.
- [9] 洗美薇等, 1996, *遗传*, 18: 7—10.
- [10] Tsung, H. C., et al., 1990, *Cell Res.*, 1: 35—51.
- [11] Ledermann, B., et al., 1991, *Exp. Cell Res.*, 197: 254—258.
- [12] Stewart, C. L., 1993, *Methods in Enzymology*, 225: 223—255.
- [13] Susan, J. A., *Methods in Enzymology*, 225: 823—830.
- [14] Yagi, T., et al., 1993, *Animal Biochem.*, 214: 70—76.
- [15] Pease, S., 1990, *Dev. Biol.*, 141: 344—352.

- [16] 李原达, 1992, 实验动物学, 农业出版社, p. 116.
 [17] 张锁炼等, 1989, 细胞生物学杂志, 11, 165—167.
 [18] Stephen, A. W., et al., 1993, *Nature*, 365: 87—89.
 [19] Stephen, A. W., et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 4582—4585.

ESTABLISHMENT AND CHARACTERISTICS OF ES CELL LINES DERIVED FROM C 57 BL/6 J MICE

CHAI Gui Xuan HAN Rong SHANG Ke Gang

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

ABSTRACT

Three embryonic stem cell lines, designated MESPU 17, MESPU 18 and MESPU 19 were established from C57 BL/6 J blastocysts. The stem cell pattern of the new lines was demonstrated by cytological observations and strong AKP activity. All of the ES lines were XY type karyotype with normal diploid composition of 70%, 88% and 59% respectively. They were able to grow and differentiate to form simple embryoid bodies in vitro and to form teratocarcinoma tumors in vivo. Comparing these cells with CCE and MESPU 13 derived from 129/ter, the cells were comparatively large, the rate of growth of the cells was relatively slow in vitro, and the cells were considerably sticky and easier to adhere to microinjection pipet. No chimera of MESPU 17 or MESPU 18 was got by the method of the blastocyst injection of BALB/c or KMW (Kun Ming White), but by the method of injection of ES cells of MESPU 17 or MESPU 18 into 8-cell embryos of KMW and co-culture with KMW embryos, the chimeras had been obtained.

Key words: ES cell lines C₅₇BL/6 J mouse Chimeras

(上接封三)

- [4] Ledda-Columbano, G. M., et al., 1992, *Am. J. Pathol.*, 140: 545—549.
 [5] Ijiri, K., and S. Potten, 1987, *Br. J. Cancer.*, 55: 113—123.
 [6] Martin, S. J., et al., 1990, *J. Immunol.*, 145: 1859—1867.
 [7] Raviola, E., 1994, In Bloom and Fawcett, a text book of histology, ed. by Fawcett D. W., PP 460—417, Chapman & Hall, New York.

A METHOD FOR RAPID INDUCTION OF APOPTOSIS IN RAT SPLEEN BY CYCLOHEXIMIDE

CHEN Xue Qing et al.

(PLA Institute for Digestive Diseases, and Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515)

ABSTRACT

The present study was designed to establish a method for rapid induction of apoptosis in rat spleen by the inhibitor of protein synthesis, cycloheximide. Female SD rats were given cycloheximide via i. v. or i. p. and scarified in 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 h. Apoptotic cells were recognized morphologically in tissues with H&E staining and with in situ end-labeling (ISEL) procedure. The results showed that a single administration of cycloheximide (>2.0 mg/kg) results in the occurrence of apoptosis in rat spleen, particularly in germinal centers of spleen in 2 h later. Detected by ISEL, the apoptotic cells were positive. Our results for the first time provide evidences that cycloheximide is able to induce cell apoptosis, especially B-lymphocytes in germinal centers of rat spleen. It will be a useful model for the investigation of immune cell's function.

Key words: Cycloheximide/pharmacology Spleen/pathology Apoptosis Lymphocytes