

- [35] Barbier-Brygoo, H. et al., 1989, in *Plant Gene Transfer, UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. (NS)* ed. C. Lamb, R. Beachy 129: 165-173, New York, Liss.
- [36] Maurel, C. et al., 1991, *Plant Physiol.*, 97: 212.
- [37] Cross, J. W. 1991, *New Biol.*, 8: 813.
- [38] Thiel, G. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 11493.
- [39] Kelly, M. O. et al., 1986, *Plant Physiol.*, 82: 713.
- [40] Jacobi, A. et al., 1993, *Z. Naturforsch Teil C*, 48: 35.
- [41] Droog, F. N. et al., 1993, *Plant Mol. Biol.*, 21: 965.
- [42] Mohnen, D. et al., 1985, *EMBO J.*, 4: 1631.
- [43] Campos, N. et al., 1992, *Plant J.*, 2: 675.
- [44] Ohmiya, A. et al., 1993, *Plant Cell Physiol.*, 34: 177.

研究工作

秋水仙碱(COM)诱发小鼠骨髓细胞C-有丝分裂效应的研究

史庆华* I.-D. Adler* G. Schriever-schwemmer* 张锡然 陈宜峰

(南京师范大学生物系 南京 210097)

非整倍体是人类出生缺陷、死胎和自发流产的主要因素。约2%成活出生的婴儿和30—50%自发流产的胎儿都具有染色体数目异常^[1,2]。在体细胞中,越来越多的证据表明,染色体数目异常与肿瘤尤其是白血病有着非常密切的关系^[3,4]。非整倍体是细胞分裂时,染色体分离紊乱造成的。因此,影响细胞分裂的因素,如纺锤体毒剂,也很可能是非整倍体诱导因子^[5-7]。C-有丝分裂是Levan(1938)发现的,又称秋水仙素效应。Miller和Adler首次对10余种化合物的C-有丝分裂效应进行了定量分析,并与它们诱发非整倍体的能力作了比较,结果表明两者之间有良好的 consistency^[8]。而且C-有丝分裂分析简便快速,因此被欧共体非整倍体研究委员会推荐为环境化合物中非整倍体诱导剂的初筛方法^[9]。

秋水仙碱(colcemid, COM)是化学合成的秋水仙素(Colchicine, COL)的衍生物。和COL一样,COM也被非常广泛地用于细胞遗传学研究中。但对其本身的细胞遗传学效应则缺乏

应有的了解,对它们的生物活性尚存在一些误解,因此,我们对COM诱导小鼠骨髓和生殖细胞(另文报道)的遗传学效应进行了比较系统的研究,并对COM诱发小鼠骨髓细胞C-有丝分裂效应和有丝分裂指数(Mitotic index, MI)升高的生物学机制等进行了讨论。

材料与方 法

一、动物

实验小鼠为两种纯系101/E1和C3H/E1的杂交第一代,体重24—29克,年龄10—14周,由德国GSF研究中心动物中心提供。

二、药物及动物处理

COM和COL均由欧州共同体非整倍体项目协调人Parry教授(School of Biological Sciences, University College of Swansea, UK)提供。用双蒸水溶解,一次性腹腔注射给药后,分别于第2, 6, 10, 14和18小时取材。每个取材时间点设8只动物,随

* GSF-Institute of Genetics, D-85758 Germany

机从中取2只,用双蒸水处理后作为阴性对照;其余6只,分别以COM(1 mg/kg体重和3 mg/kg体重)和COL(3 mg/kg体重)处理。

三、标本制备与分析

氮气窒息法处死动物,取出两股骨,以常规空气干燥法制备骨髓细胞染色体标本,2%醋酸地衣红染色。双盲法分析MI和C-有丝分裂。

1. MI观察 在相差显微镜下,每只动物计数1000个细胞,以确定该动物的MI。药物处理后,MI的变化则以处理动物的平均MI与相应的阴性对照的平均MI之比(factor)来表示。

2. C-有丝分裂效应分析 在相差显微镜下,每只动物分析100个染色体分散良好的中期相,并按以下标准将其划分为5组(图版a—e):

A——所有的染色体都具有细长而且相互平行的染色单体。

B——大多数染色体具有相互平行的染色单体。

C——大多数染色单体出现轻微的收缩和相互分开,并有3条或3条以下染色体的姐妹染色单体位于一条直线上。

D——染色单体呈现较强烈的收缩和相互分开,而且有至少5条(包括5条)染色体其两条染色单体几乎位于一条直线上。

E——染色单体收缩成点状。

计数每组细胞的数目,求出C-E组细胞所占的百分比。药物处理诱发的C-有丝裂效应,则以被处理动物C-E组细胞的算术平均数与相应阴性对照动物C-E组细胞的算术平均数之比(factor)来表示。

四、统计学处理

在COM和COL处理组及其相应的阴性对照之间,对MI和C-有丝分裂进行t-检验。

结 果

一、骨髓细胞MI

如表1所示,经1 mg/kg COM处理后2小时,骨髓细胞平均MI为3.80%,是阴性对照的3.62倍;但随处理时间延长,MI迅速下降,在第6小时为1.68%,但仍显著高于阴性对照组($P < 0.01$)。至第14和18小时,则下降到对照水平($P > 0.05$)。值得注意的是,经3 mg/kg COM处理后18小时,MI显著低于阴性对照组。COL处理后18小时,平均MI高达27.60%,为对照组的34.5倍;也远远高于COM处理组(表1)。

表1 小鼠骨髓细胞有丝分裂指数

化合物	剂量 (mg/kg)	取材时间 (小时)	MI(Mean±SD)(%)		
			处理组	对照组	factor
COL	3	18	27.60±2.07	0.80±0.10	34.5**
COM	1	2	3.80±0.44	1.05±0.35	3.62**
	1	6	1.68±0.25	1.05±0.45	1.60**
	1	10	1.28±0.13	0.95±0.05	1.35*
	1	14	0.90±0.13	0.75±0.05	1.20
	1	18	0.88±0.23	0.95±0.15	0.93**
	3	18	0.58±0.13	0.90±0.00	0.64***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与阴性对照组比较; *** $P < 0.01$ 与COL处理组比较。

表2 小鼠骨髓细胞C-有丝分裂效应

化合物	剂量 (mg/kg)	取材时间 (小时)	C-E组细胞数(Mean±SD)(%)		
			处理组	对照组	factor
COL	3	18	94.33±0.75	23.00±1.00	4.10**
COM	1	2	91.83±4.88	17.00±1.00	5.40**
	1	6	77.67±6.21	17.50±0.50	4.44**
	1	10	55.67±1.80	17.50±1.50	3.18**
	1	14	67.00±1.63	24.50±2.50	2.73**
	1	18	70.33±5.56	27.50±0.50	2.56****
	3	18	47.83±2.41	29.50±0.50	1.62****

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与阴性对照组比较; *** $P < 0.01$ 与COL处理组比较。

二、C-有丝分裂效应

COM 处理后 2 小时, 小鼠骨髓 C-有丝分裂效应即达最高, 为阴性对照的 5.40 倍; 随着取材时间延长, C-有丝分裂效应逐渐减弱, 但至 18 小时仍显著高于未处理组 ($P < 0.01$) (表 2)。COL 处理后 18 小时, 处于 C-E 阶段的中期相平均高达 94.33%, 是阴性对照的 4.10 倍, 也显著高于 COM 处理组 ($P < 0.01$) (表 2)。

讨 论

一、COM 和 COL 诱发小鼠骨髓细胞遗传学效应的比较

COM 和 COL 都是著名的有丝分裂抑制剂。COL 是从秋水仙属 (*Colchium*) 植物中提取出来的, COM 则是化学合成的 COL 衍生物。两者均是通过结合于微管蛋白 (tubulin) β 亚基的末端而阻止微管的装配, 进而抑制有丝分裂纺锤体的形成, 使细胞分裂停止在中期^[10]。但它们对小鼠骨髓的细胞遗传学效应亦不尽相同。如表 1、表 2 所示, COM 处理后 2 小时, 小鼠骨髓细胞 MI 和 C-有丝分裂即已达到最高, 并随处理时间的延长而下降; 特别是 MI, 在 COM 处理后第 18 小时, 已分别降至 (1 mg/kg) 或显著低于 (3 mg/kg) 对照水平。而本实验室用 COL 所做的平行研究显示, 经 1 mg/kg COL 处理后, 小鼠骨髓细胞 MI 和 C-有丝分裂在第 1 小时虽已开始升高, 但在第 6 和第 3 小时才分别达到最高, 随后迅速下降, 但至第 18 小时, 仍显著高于阴性对照组 (资料未显示)。我们此处的结果也表明, 3 mg/kg COL 处理小鼠 18 小时, 骨髓细胞 MI 和 C-有丝分裂效应也显著高于对照组 (表 1、表 2)。类似的现象, Kleinfeld 和 Siskin (1966) 在从事 COM 和 COL 对离体培养的 Hela 细胞的生物学效应的比较研究时, 也曾观察到^[11]。在 COM 和 COL 与微管蛋白的体外结合实验中, Bancarjee 和 Bhattacharyya (1979) 发现: 1. COM 能迅速与 tubulin 结合, 在 45 分钟

内, 这一结合反应即可达到平衡状态; 而 COL 与 tubulin 结合缓慢, 在相同实验条件下, 达到平衡状态则需要 2 小时。2. COM 与 tubulin 间的反应是完全可逆的, 而 COL 与 tubulin 的结合几乎是不可逆的^[12]。Wertz 和 Ficsor (1978) 指出, 当有阳性反应发生时, MI 和 C-有丝分裂效应可以作为受试化合物的生物学效应及其代谢特性的指标^[13]。因此, 我们推测, 在小鼠骨髓细胞中, COM 比 COL 也能更迅速地与 tubulin 结合, 也能更快更容易地从 COM-tubulin 复合体中游离出来; 另外, COM 的代谢灭活或/和排出也比 COL 快。

二、COM 对小鼠骨髓细胞 MI 的影响

MI 是指处于有丝分裂期的细胞在全部分析细胞中所占的百分比, 它决定于两个因素, 即从间期进入有丝分裂期的细胞数和克服了有丝分裂抑制剂的阻止而进入间期的细胞数。如表 1 所示, 经 1 mg/kg COM 处理后 2 小时, 小鼠骨髓细胞平均 MI 即达 3.80, 为阴性对照的 3.62 倍。随着取材时间延长, MI 迅速下降, 但在第 10 小时仍显著高于阴性对照 ($P < 0.05$), 而 C-有丝分裂效应在此期间均显著高于对照组 ($P < 0.01$) (表 2)。因此认为, COM 处理后 10 小时内, 小鼠骨髓细胞的 MI 主要取决于由于纺锤体损伤而停止在有丝分裂中期的细胞数。但随 COM 处理时间延长, MI 继续下降, 在 14 小时降至对照水平 (表 1)。在 18 小时, MI 虽低于对照组, 但无统计学意义 (表 1)。3 mg/kg COM 处理后 18 小时, MI 显著低于对照组 (表 1)。而 C-有丝分裂效应在各个取样时间点, 均明显高于对照组 (表 2)。我们推测, 随 COM 处理时间的延长 (>10 小时), 骨髓细胞的 MI 则越来越主要地取决于由间期进入有丝分裂期的细胞数 (表 1、表 2)。Wang 和 Adler (1990) 在用 COL 处理小鼠后 24 和 36 小时, 骨髓细胞 MI 降至对照水平以下的发现也证实了这种观点^[14]。

早在 1970 年, Fitzgerald 和 Brehaut 即发现, COL 可阻止离体培养的人淋巴细胞 DNA

合成的起始,降低DNA合成的速度,继而导致S期和G₂期的延长,并指出,MI的降低在很大程度上取决于COL对DNA合成的抑制^[15]。的确也有文献报道,COM能阻止离体培养的中国仓鼠细胞和豚鼠耳皮肤细胞DNA合成的起始^[16,17],阻止胚胎DNA合成^[18]。据此,我们考虑,COM可能是通过抑制DNA合成从而阻止或延缓了间期细胞进入有丝分裂期,最终导致小鼠骨髓细胞MI的降低。

综上所述,COM主要通过阻止纺锤体的形成和抑制DNA合成两种机制影响小鼠骨髓细胞MI,而且,两种机制所起的作用与COM处理动物的时间长短有关。

三、COM的C-有丝分裂效应与非整倍体诱导能力

C-有丝分裂是细胞在受到纺锤体毒剂作用时,分裂虽然停止在中期,但染色单体的收缩和相互分开仍然继续进行的现象。根据染色单体收缩和分开的程度,把中期相划分为几个阶段,并对处于不同阶段的细胞进行统计分析,则称为C-有丝分裂效应分析。Miller和Adler利用此方法评价了COL、长春花碱(VCR)等10余种化合物的纺锤体毒性,并与它们诱发非整倍体的能力进行比较,发现两者之间有良好的—致性^[8]。

如表2所示,COM能强烈地导致小鼠骨髓细胞C-有丝分裂效应。且已有大量工作表明,COM在研究过的所有离体培养细胞中均能诱发染色体数目异常。小鼠骨髓细胞微核分析和染色体计数的结果也表明COM确能诱发非整倍体^[19,20]。这进一步证实了徐道觉等C-有丝分裂效应可以作为化合物非整倍体诱导活性的评价指标^[5]。另外C-有丝分裂分析比较省时,一般分析100个细胞约需1—2小时,而计数100个细胞的染色体则需6个多小时,因此在化学物质日益增多的情况下,用C-有丝分裂方法对非整倍体诱导剂进行筛选是可行的。但需要指出的是,在同样实验条件下,未发现COM能诱发小鼠生殖细胞非整倍体,这

可能与COM作用的组织特异性有关。

摘 要

本文以101/E1和C3H/E1的杂种第一代小鼠为材料,一次性腹腔注射秋水仙碱(COM)后,于不同时间取材,观察分析了小鼠骨髓细胞有丝分裂指数(MI)和C-有丝分裂的变化。结果表明:COM处理后2小时,MI和C-有丝分裂均已达到最高;并随处理时间延长而降低;至18小时,MI已降到(1 mg/kg)或显著低于(3 mg/kg)对照水平,而C-有丝分裂仍显著高于对照组。并对COM影响MI的可能机制以及C-有丝分裂效应与非整倍体诱导活性之间的关系进行了讨论。

关键词: 有丝分裂指数(MI) C-有丝分裂效应 秋水仙碱 小鼠骨髓细胞

参 考 文 献

- [1] Baird, P. A. et al., 1988, *Am. J. Hum. Genet.*, 42: 677—693.
- [2] Hernandez, A. et al., 1990, *Mutat. Res.*, 232: 23—29.
- [3] Oshimura, M. and Barrett, J. C., 1986, *Environ. Mutagenesis*, 8: 129—159.
- [4] Heim, D. J. and Mittelman, F., 1986, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 22: 99—108
- [5] Hsu, T. C. et al., 1983, *Anticancer Res.*, 3: 155—160.
- [6] Liang, J. C. and Satya-Prakash, K. J., 1985, *Mutat. Res.*, 155: 61—70.
- [7] Onfelt, A., 1987, *Mutat. Res.*, 182: 135—154.
- [8] Miller, B. M. and Adler, I. -D., 1989, *Mutagenesis*, 4: 208—215.
- [9] Parry, J. M. and Sors A., 1993, *Mutat. Res.*, 287: 3—16.
- [10] Margolis, R. L. and Wilson, L., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 74: 3466—3470.
- [11] Kleinfeld, R. G. and Siskin, J. E., 1966, *J. Cell Biol.*, 31: 369—379.
- [12] Bancarjee, S. and Bhattacharyya, B., 1979, *FEBS Letters*, 99: 333—336.
- [13] Wertz, G. F. and Ficsor, G., 1978, *Environ. Health Persp.*, 23: 129—132.
- [14] Wang, X and Adler, I. -D., 1990,

- Mutagenesis*, 5: 371—374.
- [15] Fitzgerald, P. H. and Brehaut, L. A., 1970, *Exp. Cell Res.*, 59: 27—31.
- [16] Stubblefield, E., 1964, *Cytogenetics of Cells in Culture* (Academic Press, New York) pp. 223—248.
- [17] Hell, E. and Cox, D. G., 1963, *Nature*, 197: 287—288.
- [18] Williams, J. P. G., 1968, *Eur. J. Pharmacol.*, 3: 337—340.
- [19] Yamamoto, K. and Kikuchi, Y., 1980, *Mutat. Res.*, 71: 127—131.
- [20] Rainaldi, G., et al., 1987, *Mutat. Res.*, 177: 255—260.

C-MITOTIC EFFECTS OF COLCEMID (COM) ON MOUSE BONE MARROW CELLS

SHI Qing Hua et al.

(Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

ABSTRACT

Colcemid (COM) was tested for induction of increase of mitotic indices (MI) and c-mitotic effects in bone marrow cells of male(101/E1×C3H/E1) F1 mice post single injection (i.p.). The doses of 1 mg/kg of COM were used and sampled at 2,6,10,14 and 18 hour. At 2 h post COM treatment, the MI and c-mitotic effect reached the highest, then decreased from 6 h to 18 h. At 18 h, the MIs decreased to (1 mg/kg) or significantly below(3 mg/kg) the control level respectively; whereas, the corresponding frequencies of cells in class C—E were still significantly higher than in the controls. The possible mechanism by which COM induces increase of MI and the correlation between c-mitotic effects and induction of aneuploidy were discussed.

Key words: Mitotic Index(MI) C-mitotic effect Colcemid Mouse bone marrow cells

人胎盘滋养层细胞培养与体外 hCG 释放的研究

郑伟 石一复

(浙江医科大学附属妇产科医院 杭州 310006)

胎盘滋养层由两层形态不同的滋养上皮细胞组成,即细胞滋养层(Cytotrophoblast)和合体滋养层(Syncytiotrophoblast),参与胚胎发育过程中营养、代谢、内分泌和免疫等功能。绒毛膜促性腺激素(hCG)是由滋养层细胞合成与分泌的主要激素之一^[1]。已有研究表明,合体滋养层细胞分泌和释放hCG,但对于细胞滋养层细胞是否参与hCG的合成与分泌以及细胞滋养层细胞是通过有丝分裂或是通过细胞融合过程转化为合体滋养层细胞,至今看法仍不一致。我们采用酶消化和percoll密度梯

度离心对胎盘细胞滋养层细胞进行分离、纯化与培养。观察细胞滋养层细胞和合体滋养层细胞的生长与转化,并测定培养上清液hCG的含量。现将实验结果报道如下。

材 料 和 方 法

1. 细胞分离、纯化与培养

本实验取材于足月正常妊娠孕妇剖宫产和正常分娩的胎盘组织。无菌条件下,将胎盘小叶剪成约1—3 mm³的组织块,分别用PBS液和Ham's F10培养液(GIBCO产品)漂洗两次,用0.125%胰蛋白酶和0.1%胶原酶A(Sigma产品)混合液消化,并置于