

皮细胞。

本文方法所分离的肺动脉内皮细胞,细胞活力、纯度和贴壁率都较高,培养中生长良好,已传6代,生物学特征仍保持正常,冻存后复苏率较高,经鉴定是内皮细胞,可以作为肺动脉内皮细胞的体外模型进行研究。

由于肺动脉的内皮细胞与肺小血管的内皮细胞形态和代谢方面有所差异^[14],因此用肺动脉内皮细胞的实验结果在多少程度上反映肺小血管内皮细胞的改变,尚难判定。

摘 要

以新生小牛肺动脉为材料,采用灌流抽洗-0.1% 胶原酶消化法分离出小牛肺动脉内皮细胞。以199培养液培养并已传6代,生长率、分裂指数、对数生长期群体倍增时间均与国外报道近似,冻存后复苏率为 $84.2 \pm 8.3\%$ 。通过形态学特征和凝血Ⅷ因子相关抗原检测证实是内皮细胞。纤维连接蛋白或鼠尾胶原作培养基可显著提高该细胞的贴壁率。牛下丘脑和牛视网膜来源的促生长物有显著促内皮细胞生长作用。该细胞体外培养方法的建立,为体外研究肺血管内皮细胞的功能、代谢及病理变化

提供了可靠模型。

参 考 文 献

- [1] Ryan, U. S., 1984, *Environmental Health Perspectives*, 56:103—114.
- [2] Jaffe, E. A. et al., 1973, *J. Clin. Invest.*, 52:2745—2756.
- [3] Maciag, T. et al., 1981, *J. Cell Biol.*, 91: 420—426.
- [4] 鄂征主编, 1988年, 组织培养术, 第63—64页, 人民卫生出版社, 第二版。
- [5] 普里斯特, J. H., 1985年, 医学细胞遗传学和组织培养, 刘权章等译校, 第405—406页, 科学出版社。
- [6] Maciag, T. et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76:5674—5678.
- [7] Glaser, B. M. et al., 1980, *J. Cell Biol.*, 80:298—304.
- [8] Madri, J. A. & Williams, S. K., 1983, *J. Cell Biol.*, 97:153—165.
- [9] Weible, E. R. & Palade, G. E., 1964, *J. Cell Biol.*, 23:101—112.
- [10] Ryan, U. S. & White, L. A., 1985, *Tiss. & Cell*, 17(2):171—176.
- [11] Cole, O. F. et al., 1987, *Cell Biol. Intl. Rep.*, 10:399—405.
- [12] Bissel, M. J., 1982, *J. Therol. Biol.*, 99: 31—68.
- [13] Walker, C. et al., 1987, *J. Cell Sci.*, 87: 739—747.
- [14] Smith, U. & Ryan, J. W., 1973, *Fed. Pro.*, 32:1957—1966.

G 显带人体中期染色体亚显微结构的扫描电镜观察

郑高飞 应建华 宋颖 曾锋

(衡阳医学院超微结构研究室)

高岳生 阳冬玉 杨新

(衡阳医学院附二医院遗传室)

应用扫描电镜(SEM)和光镜(LM)对比观察技术研究人体中期染色体的带纹亚显微结构国外有一些报道^[1-3],他们从各个不同的角度阐述染色体的带纹的某些结构。但至今对其精细结构及其变化规律尚未彻底了解,许多问题有待进一步研究。本实验室用一种简便有效的

染色体G显带SEM技术(改良Harrison^[1]方法)制出G带型纤维结构明显的染色体样品,曾初步报道,认为染色体的纤维结构较国外报道的更为明显^[4]。现根据观察到200—300Å染色质纤维结构水平描述人体中期染色体G显带各部分的亚显微结构,并对某些问题进行探

讨,以便为SEM染色体的精细鉴别和染色体病的准确诊断提供依据。

材料与方 法

由一病例外周血培养,经LM技术处理后的正常染色体核型用Olympus光镜检查,选择理想的染色体核型标志、摄影,再将此核型作SEM技术处理后在S-570扫描电镜下观察和拍照。

中期染色体的制备 按本室常规步骤在盖玻片上制备样品^[4]。

扫描电镜样品处理 参考Harrison等的方法^[1],但未用戊二醛、四氧化钨硫糖液(Osmium-TCH)固定,丙酮脱水和CO₂临界点干燥等一系列步骤,而是将胰酶处理时间较长、显带明显的样品在光镜观察拍照后,作好标记,用乙酸乙酯洗去香柏油,取同一核型的玻片样品用导电胶粘在铜制样品台上,离子镀膜仪溅射镀金。

结 果

染色体核型的LM和SEM比较 LM与SEM样品对照观察发现:两者的G带型、着丝点、随体都有明显的界限和相同的位置。LM图像上染色体呈黑色,背景白色,G带型是以染色的深浅区分为深染带区(阳性带区)和浅染带区(阴性带区或间带区,见图版图A);SEM图像上染色体呈白色,背景是黑色,G带型是以纤维结构的排列区分为隆起带区(即LM的深染带区)和凹陷带区(即LM的浅染带区)(图版图B)。

SEM染色体的形态 在SEM下观察,染色体都是纤维结构,由直径200—300Å的纤维丝构成。染色单体彼此靠近。染色体周边呈锯齿状(与胰酶处理有关),并有许多松散包装纤维丝向外伸展^[10]。隆起带区的纤维丝较密集,并有较多的颗粒状物质。凹陷带区的纤维丝基本上是纵向排列,也有呈网状排列,如x、y和各号染色体的短臂。尚有少量颗粒状结构。

各号染色体的G带型 根据我室制备的染色体的SEM图像,从7组染色体中各组选1

条(C组3条)及性染色体x和y共11条进行分析。A组2号染色体的隆起带(↑箭头指示),短臂可见4条,中段1条较宽且明显;长臂可见7条,中段2条较宽且明显。B组5号染色体的隆起带,短臂可见2条,其中1条明显且宽;长臂有7条,近侧段有2条较平坦,中段有3条明显,远侧段有2条较窄。C组6号染色体的隆起带,短臂近侧段有1条,远侧段有2条,中段有1条宽阔的凹陷带;长臂有5条,近侧段1条紧贴着丝点,中段3条较明显,远侧段末端1条较窄。C组7号染色体的隆起带,短臂有3条,中段1条较窄且不明显,远侧段末端1条稍宽且非常明显;长臂有3条,都很明显,第2和第3条比较接近。C组8号染色体的隆起带,短臂有2条;长臂有4条,远侧段2条较明显。D组14号染色体的隆起带,长臂可见5条,近中段1条和远侧2条很明显,近侧段和中段各有1条较平坦。E组16号染色体的隆起带,在短臂中段有1条且不太明显;长臂有3条,近着丝点1条明显。F组19号染色体的隆起带在着丝点有1条很明显,长臂中段有1条不明显。G组22号染色体的隆起带,在长臂可见2条,近侧段的1条紧贴着丝点。x染色体短臂中段和远侧末端各有1条明显的隆起带;长臂可见4条,第1、第4条较窄,第2、第3条较宽,以第2条最明显,与短臂中段的隆起带对称。y染色体的长臂远端有2条隆起带。

按照上述观察程序分析其余染色体的隆起带区即可识别各号染色体的差异。例如B组4号和5号染色体的形态与隆起带的数目相同,但从长臂来看,5号染色体中段有3条明显的隆起带,而4号染色体则在近侧段有1条明显而宽的隆起带,可供识别。

着丝点 各号染色体的着丝点都是纤维丝构成(如各图▲箭头指示的部位)。有些染色体在这个窄区内纤维丝是平行于染色体纵轴排列,粗细相当,数量较其他部位少,向外伸展的纤维丝也极少。如1—10、16、17和x、y等染

染色体。有些染色体的着丝点纤维丝较多,排列紧密,向外凸出,并有少量颗粒。如7、11—16、18—22号等染色体。在2号染色体的中央着丝点的纤维组成4条束状,彼此有明显的间隙。

随体 在13、14、15、21、22号染色体的随体呈现无规则的球状,直径差异很大,但较染色体的宽度小。纤维丝的排列无规则或呈纵形,有向周围伸展的纤维丝,也有少量颗粒。随体与其他染色体之间常有纤维丝连接,如图13、14、15、21号染色体。

染色体之间的连结 相互靠近的染色体之间常有纤维丝连结。如图3、7、11—15、21、y等染色体。纤维丝的粗细与染色体本身的纤维丝类似。在3、11、14号等染色体还可见到较粗的连接纤维丝。这些连接纤维丝似乎无固定位置,长短不一。

讨 论

应用SEM研究人体中期染色体经G带显带处理后的亚显微结构,样品的处理和核型的选择是关键。为了获得染色质纤维结构,适当延长胰酶处理时间是必要的。但会使光镜下所见染色体塌陷,SEM下松散包装纤维增加。LM和SEM的对比观察也很重要。国外已报道染色体G带型的SEM图像^[1-3],其纤维丝较紧密,染色质纤维结构不大清楚。我们则适当延长胰酶的处理时间,选择染色体较长,带型较松散,而获得染色质纤维结构清晰的SEM图像,其隆起带区和凹陷带区明显,这种带型结构较之国外报道的SEM图像更易辨识。

同一人体中期染色体通过LM技术和SEM技术连续处理和观察,揭示了LM染色体的带型与SEM染色体的带型是相吻合的。由于SEM的分辨率和光学性质的不同,使LM只能看到染色体G带型的大体结构,而SEM却能显示染色体的精细结构和三维图像,因而给染色体的研究提供了一种新的手段。

在SEM下,G显带染色体展现出纤维丝

结构,这些纤维丝称为染色质纤维。Bahr, G.F.认为200Å直径是人体细胞间期和中期染色质纤维的正常直径^[6]。染色质纤维的直径因化学药品处理的影响而发生差别,正常范围是200—300Å。根据Bahr的纤维丝折迭模型^[6],染色质纤维可折迭成迴路环而形成颗粒状,这就是染色质粒。G显带人体中期染色体的隆起带区,由于染色质纤维和染色质粒的积累而形成凸起状,而凹陷带区主要是纵向排列的染色质纤维,染色质粒稀少,故成凹陷状。

关于凹陷带区中是否存在染色质粒值得探讨。本文G显带染色体SEM图像中可见凹陷带区中存在染色质粒,这种现象有两种可能:一种是在样品制作过程中人为地使隆起带区的染色质粒移到凹陷带区去。另一种是染色体自身固有的结构。我们发现几乎所有染色体的凹陷带区都有少量的染色质粒,因此,认为后一种的可能性大。

在染色体中颗粒有大有小,表明染色质粒的直径并非完全相同,这是由于染色质纤维折迭迴路环的结构不同或DNA螺旋化的程度不同所致。探讨染色质粒的结构和它在隆起带区和凹陷带区及其他部位的排列规律,是研究染色体亚显微结构的关键问题之一。

从本文24条中选出11条的G带型染色体的SEM图像中,表明了下列4个问题:1.各号染色体都有自身固定方式的G带型,说明染色质纤维和染色质粒的排列是有一定的规则;2.各号染色体G带的数量、宽度和隆起程度各不相同,说明每一染色体都有自身特有的染色质纤维和染色质粒的排列结构,这就为在SEM下精确鉴别各号染色体和准确诊断染色体病提供依据;3.隆起带区和染色质粒的凸起形状,说明染色质纤维和染色质粒是以阶梯形式排列在染色体的外围,无论是长臂或短臂都是这样,而且两条染色单体都是一致的;4.凹陷带区染色质纤维的纵行排列,揭示一条染色质纤维通过折迭成迴路环构成染色质粒后又延伸折迭成迴路环构成下一个染色质粒,如

此连续形成多个的彼此串连着的染色质粒,这是符合 Bahr 的染色质纤维折迭原理^[6]。

在 SEM 图像,染色体周边呈锯齿状,并有许多纤维丝向外伸展。这种现象与胰酶处理和冰冻滴片有关系。因为胰酶处理时间稍长,蛋白质成分较少,结构不紧密,加上冰冻滴片,使染色体处于铺展状态,因此产生锯齿状和散出的松散包装纤维丝。

Mace ML 等用扫描电镜技术报道着丝点是平行于染色体纵轴的紧紧地捆在一起的染色质纤维结构^[7]。我们观察的结果与他们报道的相符。但这个区是否有染色质粒或简单的染色质纤维折迭的迴路环尚未肯定。在本文 1、3—8 号染色体中可见到染色质粒。在 2 号染色体中,中央着丝点的染色质纤维分成 4 束,彼此还有明显的间隙,这可以证实姊妹着丝点。根据 Stubblefield, E. 等报道^[8]:中央着丝点染色体呈现 4 个密集体,其间保留一个中心孔。末端着丝点染色体只有两个密集体。本文 2 号染色体中央着丝点染色质纤维分成 4 束,可能是 4 个密集体松懈和延伸的结果。

随体染色质纤维的排列是无规律的,变化较大,纤维丝直径的变化也大,而且此处的染色质纤维与邻近染色体相连接。在随体中也有稀少的染色质粒,并非完全是纤维结构。

染色体之间常有纤维连结,纤维丝的直径通常与染色体内部的染色质纤维相似,也有稍粗的。这种连接一般是染色体之间近距离才存在的,有时也可见到染色体之间远距离的连接纤维丝,其长度比染色体的长度大几倍。Golomb 和 Bahr 认为前者是染色体之间纤维丝状的联系,后者是染色体连接纤维丝,它可分输出纤维丝和输入纤维丝,这种纤维丝常出现在染色体的端粒上^[9]。本文 14 号染色体的随体有两条较粗的纤维丝,这种粗大纤维丝可能是该染色体自身几根染色质纤维组成。也可能是 Bahr 等所说的连接纤维丝(只是较短),由 14 号染色体的输出纤维丝和 16 号染色体的输出纤维丝共同组成。但是 Elspath 等认为染色

体周围散出的纤维是松散包装纤维,与样品的处理有关^[10]。

纤维丝结构是 SEM 染色体的主要特征,深入研究与掌握这种精细结构的规律,有利于精确鉴别各号染色体及其正、异常结构,从而提高临床诊断染色体带区异常的准确性。

摘 要

经 G 带常规显带处理的人体中期染色体,通过光镜(LM)和扫描电镜(SEM)的对比观察,各号染色体的带型、着丝点和随体都是一致的。在 SEM 下, G 显带人体染色体显示亚显微结构, LM 所见的深染带区(阳性带区)呈现隆起状;而浅染带区(阴性带区)呈现凹陷状,分别称为隆起带区和凹陷带区。各号染色体都是由直径 200—300 Å 的染色质纤维构成,这些纤维丝在凹陷带区是纵向排列;在隆起带区是折迭环绕后形成许多颗粒状的染色质粒;在着丝点是纵向排列;在随体的排列是不规则。染色质粒在着丝点、随体和凹陷带区也可见到。染色体之间有长短和粗细不同的纤维丝互相连结。SEM 图象表明:各号染色体都有自身固有的染色质纤维和染色质粒的排列结构,可为在 SEM 下精细鉴别各号染色体和准确诊断染色体病提供依据。

参 考 文 献

- [1] Harrison, C. J. et al., 1981, *Expl. Cell Res.*, 134:141—153.
- [2] Hozier, J. C. et al., 1981, *Chromosa*, 82:55—64.
- [3] Harrison, C. J. et al., 1983, *Cytogenet. Cell Genet.*, 35:21—27.
- [4] 郑高飞等, 1988, 衡阳医学院学报, 16:(4) 256—258.
- [5] Bahr, G. F., 1977, In *Molecular structure of Human Chromosomes*, ed. by Yunis, J. J., pp. 179. Academic Press. 蔡良婉等译.
- [6] Bahr, G. F., 1975, *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 34:2209—2217.
- [7] Mace, M. L. et al., 1977, *Cytobios.*, 19: 27—40.

- [8] Stubblefield, E., 1971, *Chromosoma*, 32: 262—294.
 [9] Bahr, G. F. et al., 1974, *Chromosoma*,

46:247—254.

- [10] Elspath, M. J. et al., 1986, *Chromosoma*, 94395—402.

实验技术

胞质分裂阻滞细胞的微核检测及方法学初步研究

沈宗丽 薛开光

(南京江苏省肿瘤防治研究所)

培养人体外周血淋巴细胞的微核检测,是近年来常用的体外短期检测方法之一,可用来评价被检理化因子对人体细胞的遗传毒性,及监测环境、职业接触等有害因子对人类的潜在致癌作用。为了进一步提高该方法的敏感性,根据微核起源于染色体断片与落后染色体的观点, Fenech 等用松胞素-B (Cytochalasin-B, Cyt-B) 阻滞胞质分裂,计数 CB-双核细胞微核^[1]。应用这种胞质分裂阻滞微核测试法 (CB-MNT), 检测不同年龄健康人的自发微核率 (MNF), 发现较常规法敏感^[2]。近来还用于生物剂量计的研究^[3,4]。进一步将 CB-MNT 用于动物细胞, 评价化学品的遗传毒性与细胞动力学效应, 发现亦优于常规法^[5,6]。看来 CB-MNT 是一个有价值的短期检测方法, 但国内尚未见较详细的方法学报告, 故现将本实验室应用此法的体会和一些方法学的初步研究简报如下, 以供参考。

实验程序

1. 检测细胞的培养 人体外周血全血或富集白细胞层、分离淋巴细胞均可用于培养, 一般培养方法与以往报告相同^[4,7]。近来有人把啮齿类动物的外周血淋巴细胞或细胞系作为检测的细胞系统^[5,6]。

2. 细胞的处理 各种放射线如 X 线, r 线等可在培养前先行照射全血^[3,4], 化学品常与 Cyt-B 同时加入培养物。在小鼠可体内给药, 体外培养外周血。

3. 胞质分裂阻断 在全血培养后 44 小时加入终浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Cyt-B, 并同时加入不同处理浓度的化学品, 但不同的细胞测试系统加入 Cyt-B 时间可不同^[5,6]。Cyt-B 阻断人与动物细胞胞质分裂的最佳浓度亦为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[5,6]。

4. 制片 处理后继续培养 28 小时收获细胞, 制备完整淋巴细胞微核片, Giemsa 染色 (pH 6.8 PB)。细胞的处理时间视检测细胞系统而定^[5,6]。

5. 观察与分析 通常每个观察组或观察对象, 在油镜下观察 500—1000 个 CB 双核细胞以计数微核, 求出微核率或微核细胞率 (%)。由于不同 MNF 出现的频度呈 Poisson 分布, 故可用相应的统计方法进行处理。如组间平均 MNF 差异的比较可用 μ 检验等。

DMSO 对 MNF 的影响

为了观察加进培养物的 Cyt-B 贮存原液中所含 DMSO 对淋巴细胞 MNF 的影响, 我们在 5 例供血员的每瓶培养物中加入相当于原液所含量的 DMSO 7.5 μl , 设置空白对照 (原液用培养液稀释), 结果表明原液中所含量的 DMSO 对淋巴细胞 MNF 无明显影响 (参见表 1)。

表 1 DMSO 对健康人淋巴细胞 MNF 的影响

	对 照	DMSO
例 数	5	5
观察淋巴细胞数(个)	13,090	19,500
MNF(%)	6.187 \pm 5.976	5.699 \pm 4.721

CB-MNT 与常规法 C-MNT 健康人 MNF 的比较

本实验共在 8 例健康供血员中, 比较了常规法与 CB-MNT 的自发 MNF, 结果表明 CB-MNT 的平均 MNF 明显高于常规法 (参见表 2), 这与以往报告的相同^[2]。但两法检测理化因子诱发微核的敏感性, 尚待进一步研究。

表 2 CB-MNT 与 C-MNT 健康人 MNF 的比较

例数	CB-MNT	C-MNT	P 值
MNF*	8	8.30 \pm 6.00	5.71 \pm 4.76 < 0.05

* CB 法 MNF = 微核数/500 个 CB 双核细胞
 常规法 MNF = 微核数/1000 个单核淋巴细胞