

## 实验技术

## 一种高效率细胞同步化方法的改良与运用

梁云燕 王代树 方家椿 牛敏英 石永进 王永朝\*

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物学室)

细胞同步化对于深入研究细胞增殖和增殖周期中的各种事件,以及临床上利用细胞动力学规律治疗肿瘤具有重要意义。自 1959 年 Oastler 和 Sherman 明确提出细胞周期包括 4 个时相的概念以来,科学家们从各个方面探索和建立了各种各样的细胞同步方法。其中最为广泛使用的有:血清饥饿法<sup>[1]</sup>、有丝分裂选择法<sup>[2]</sup>及过量胸腺嘧啶核苷阻断法<sup>[3]</sup>。这些方法虽然对细胞的损伤与副作用较小,但收获率或同步率较低,往往不能满足实验需要。且有的不适用于肿瘤细胞(如血清饥饿法)。很多药物性周期阻断法<sup>[4-6]</sup>虽有较高的同步率和收获率,但副作用较大,干扰实验。为了避免外界因素的干扰,常根据细胞的物理性质——细胞大小(重量)、形状、密度、表面电荷的差异,采用沉降法、电泳、电磁场、纤维柱(碟)以及流式光度术等方法来大量分离单纯类型细胞。其中离心淘洗法较优<sup>[7]</sup>。可一次同时收获大量不同时相的活细胞,但普及与推广极为困难。为此几年前我们参考 Rao 的高压装置图<sup>[8]</sup>自行加工改进了设备装置。并对 N<sub>2</sub>O(笑气)阻断实验进行改良,用不同上皮性细胞进行同步,均获得高活力、高同步率和较高收获率的各时相细胞。可满足实验中较大细胞量的需要,宜于在一般实验室推广使用。

## 材料与 方法

## 一、高压罐结构与材料

选用不锈钢(管材与板材)为材料,以防止长期使用中氧化生锈与腐蚀。可根据实验工作量的大小确定罐的容积,即钢管的内径和长度。本文所用的装置,钢管内径为 15 cm,长 33 cm,钢管厚 5 mm,钢板厚

16 mm(根据国家有关 6 kg/cm<sup>2</sup> 高压容积大小的标准所定)。高压罐的结构如图 1 所示。罐盖上接有三通阀门,作为 N<sub>2</sub>O 进出口,并联压力表。罐冠下面用一钢筋环套八个可转动的螺丝(12 mm),以增加密闭罐盖的固定强度。N<sub>2</sub>O 购自北京有色金属研究院。

## 二、细胞同步化

本研究曾选用了人胃低分化粘液腺癌 MGC 80-3、人胃淋巴转移腺癌 SGC 7901、Hela 及 V<sub>79</sub> 等细胞为材料进行同步化,均按下述步骤进行。(1) M 期细胞的同步化,将细胞按常规接种于培养瓶(或皿)中,当细胞进入指数生长期时加入胸腺嘧啶核苷(TdR 终浓度 2.5 mmol/L),经 16 小时培养,洗脱解除 3—5 小时,将瓶盖扭松(或换上带孔的胶塞,孔内塞有棉花)放入高压罐,罐内充入 400 ml CO<sub>2</sub> 气体,迅速加盖密封,从进气口徐徐通入 N<sub>2</sub>O 气(如 N<sub>2</sub>O 气很久未用需先放出上层废气)。0.5 小时使罐内压力升至 5.5 kg/cm<sup>2</sup>,关闭阀门,将罐放入 37℃ 恒温培养箱,经 14 小时后

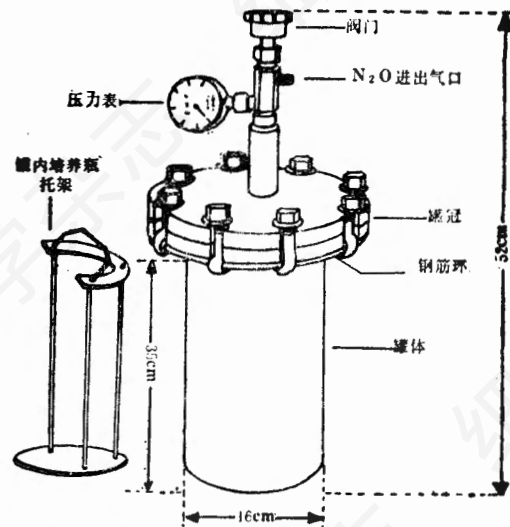


图 1 改良后高压罐装置图

\* 北京师范大学生物系。

在通风橱或对准窗口放气减压,取出培养瓶轻轻振荡,M期细胞脱落、悬浮,收集待用。(2)收集M期细胞接种于培养瓶中,于37℃培养,经一定时间(一般为2小时)细胞进入G<sub>1</sub>期。可根据需要在不同时间内收集早G<sub>1</sub>期和中G<sub>1</sub>期细胞。(3)S期与G<sub>2</sub>期细胞的同步,M期细胞释放5小时后,再次加入TdR,经16小时培养、洗脱、释放。释放后用<sup>3</sup>H-TdR脉冲标记培养物,然后以放射自显影术测定S期长短,以此为根据获取S期和G<sub>2</sub>期细胞。

### 三、放射自显影

将M期细胞接种于带有多个盖片的大皿中,按第2步方法经TdR阻断、释放,每2小时取两片,用<sup>3</sup>H-TdR(0.5—1 μCi/ml)进行脉冲标记。按放射自显影方法计算标记指数(LI)和有丝分裂指数(MI),确定S、G<sub>2</sub>期时相的适当时间及整个周期时相(TC)时间与S期细胞同步率。

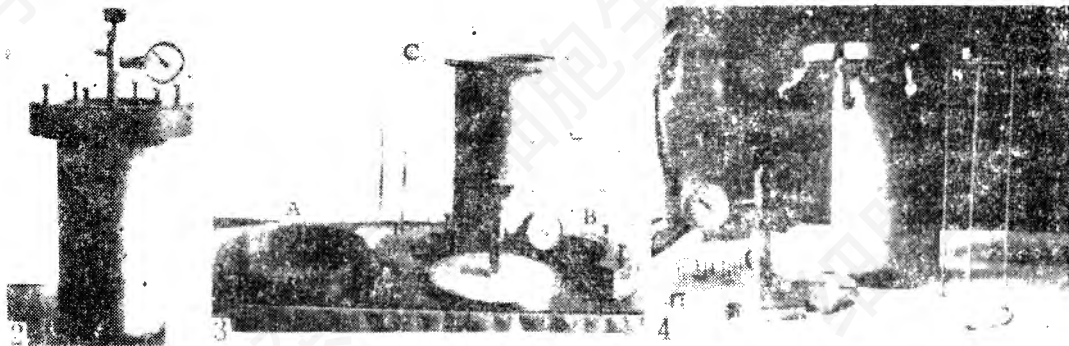


图 2、3 改良前的高压罐外观与结构

A 固定圈, B 固定夹槽, C 培养瓶托架

图 4 改良后的高压罐结构

力。这两个部件需用整钢材,且精密度要求高,工序复杂,在国内加工成本较大;而经改良简化后的装置(图1,4),在罐冠下用一钢筋环套八个螺丝,取代了固定夹槽和固定圈,不仅节约钢材和费用,而且一般工厂均能加工制造。在恒温装置上,Rao采用外循环水,由于恒温时间较长(14小时),昼夜温差大,往往使保温水随温差的变化致使罐内温度也产生相应波动,导致罐内压力超过阈值,使部分细胞出现微核或多核。如遇夜间暂时停电,还会导致循环水溢出。我们改用恒温箱保温,保证了同步化细胞的质量。Rao证明:N<sub>2</sub>O对细胞的DNA、RNA和蛋白质的合成无影响。但不

### 四、细胞DNA含量的测定

按同步化步骤收集不同时相细胞,分别用70%乙醇固定,PI(碘化丙啶)染色、用流式光度术测定\*,各时相细胞均为一个峰。

### 五、MGC 80-3 各时相细胞的形态及膜表面ConA受体复合物再分布的观察

将M期细胞接种在盖片上,经释放、阻断、再释放等步骤获得不同时相细胞,用含钙、镁的PBS洗3次,加FITC-ConA(26 μg/ml),在暗处37℃孵育30分钟,再用PBS洗3次,PBS:甘油(1:9)封片,于荧光显微镜下观察照像。

## 结果与讨论

### 一、装置

Rao的高压罐在罐冠与罐盖之间有固定夹槽和固定圈(图2、3),以耐受6 kg/cm<sup>2</sup>压

能超过6个大气压力<sup>[8]</sup>。恒温设备改换后,实验操作大大简化,还可用一般无缝钢管取代不锈钢材(因免除了外循环水的锈蚀)。

### 二、细胞同步化

为了提高同步率与收获率,人们早已放弃了单一同步化方法,常常将2-3种方法交叉组合使用。其中以TdR阻断加秋水仙素的再阻断,经有丝分裂选择等联合使用最为广泛。如Doide等人将悬浮细胞先用TdR阻断,再加秋水仙胺处理,其M期细胞同步率与收获率比单纯用TdR高得多。我们曾用这些方法

\* 感谢北京中医研究院中心实验室的池旭生、庞大本二位大夫为我们测定。

在 MGC 80-3 细胞进行过比较, 无论是同步率还是收获率都不如 TdR 加高压  $N_2O$  气阻断方法好。国内叶秀珍等人对 BEL-7402 肝癌细胞 M 期和 S 期同步化的最佳结果在国内外相同方法中具有一定代表性。他们先用 TdR 一次阻断, 后经解除 14 小时, M 期细胞的比率最高为 17.3%, 如双阻断再加秋水仙素处理, M 期细胞的比率最高达 44.8%。我们采用 TdR 一次阻断, 再经高压  $N_2O$  处理, MGC 80-3 细胞 90% 以上被阻断在 M 期 [图版图 1、2]; 在同步 S 期细胞中。BEL-7402 细胞用 TdR 双阻断解除 5 小时, 标记细胞数 (LI) 最高达 68%; 放射自显影结果表明采用本方法 MGC 80-3 细胞经解除 5 小时, LI 可达 90%, 最高可达 99%。LI 和 MI 不仅表明 MGC 80-3 细胞 S 期时相同步率高 (99%), 而且表明经 TdR 第二次阻断后 11—12 小时, 细胞进入  $G_2$  期。表 1 的结果同时表明采用本方法可获得高同步的  $G_2$  期细胞。为了进一步鉴定四个不同时相的同步化细胞, 我们用流式光度术测定, 结果如图 5 所示。  $G_0 + G_1$  期细胞 DNA 相对含量的波峰在横座标轴上靠左, 峰值在 118 道处; M

期细胞波峰靠右, 峰值在 204 道处; S 期在两峰之间, 峰值在 160 道处;  $G_2$  期细胞波峰与 M 期波峰部分重合, 其峰值位于 119 道处。峰值的差异反映了细胞周期中 DNA 复制过程的动态。

表 1 MGC 80-3 细胞阻断; 释放后  $^3H$ -TdR 脉冲标记指数

LI 与 MI 释放后时间 (T)	标记细胞数 (LI)	未标记 细胞数	有丝分裂 标记 细胞数 (MI)
5	906 (90.6%)	94	
7	950 (95%)	50	
9	992 (99.2%)	8	2 (0.2%)
11	8 (0.8%)	992	3 (0.3%)

近年来不少人采用淘洗离心法分离不同时相细胞。此方法虽有不受药物干扰并适用于各类细胞的优点, 但我们在试用中深感不适于国内推广使用。一是成本太高, 需进口设备 (Beckman 离心机和特殊转头), 每次实验需大量培养液 (至少 3000 ml); 二是测定分析比较复杂。而我们的装置成本低, 测定分析简单,

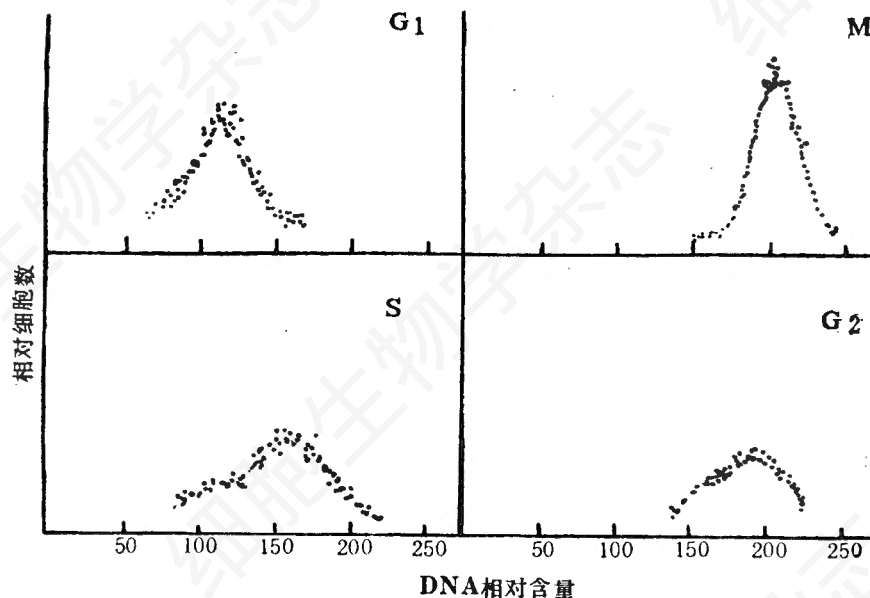


图 5 流式光度计 (型号 FACS 420) 测定 MGC 80-3 细胞各时相的图象

收获率高,特别适用于不同数量的细胞。我们还先后对人胃癌细胞, V<sub>79</sub>、Hela等细胞进行了同步都得到满意结果。但本方法不适于成纤维细胞。

### 三、MGC 80-3 各时相细胞的形态及膜表面 ConA 受体再分布

在同步化的工作中,通常 G<sub>2</sub> 与 M 期细胞很难分开,常以 G<sub>2</sub>+M 的混合时相报道。本文介绍的方法对某些细胞株的 G<sub>2</sub> 与 M 期分离较好。不仅有流式光度计的测试证明,而且在形态和 ConA 受体复合物的分布上进一步显示了 G<sub>2</sub> 与 M 期细胞的差异性。以 MGC 80-3 细胞为例: M 期细胞呈圆形,膜表面 ConA 受体复合物呈连续均匀的荧光分布,胞质与核为阴性(图版图 3); G<sub>1</sub> 期细胞开始铺展,细胞体积较小,膜表面 ConA 受体复合物呈断续的、簇斑状荧光分布(图版图 4); S 期细胞体积最大,全部铺展,斑块面积也缩小(图版图 5); G<sub>2</sub> 期细胞形态有 3 种,早 G<sub>2</sub> 期与 S 期近似,中 G<sub>2</sub> 期具有明显向圆形过渡的趋势,晚 G<sub>2</sub> 期变圆的趋势更为明显。从膜表面 ConA 受体复合物的分布来看:早、中 G<sub>2</sub> 期与 S 期近似,但荧光更弱,少数晚 G<sub>2</sub> 期细胞荧光变强,不均匀,其形状与荧光分布都显著地表现出向 M 期过渡(图版图 6)。综上所述看出: MGC 80-3 细胞 G<sub>1</sub> 期的荧光弱于 M 期,但簇斑多。S 期与 G<sub>2</sub> 期细胞荧光强度比 G<sub>1</sub> 期弱,但簇斑极少。说明簇斑的多少与荧光强弱无关,而是与不同时相细胞膜表面性状有关。这一点在其受体复合物的侧向运动及运动方式的不同得到了证明<sup>[9]</sup>。簇斑多少的差异与细胞处于不同周期时相的骨架组装密切相关<sup>[10]</sup>。从而也证明了本文所用同步方法所获得的单一时相细胞纯度很高。

采用高压 N<sub>2</sub>O 气方法获得的各时相细胞进行某些物质的摄取、转运及分布的实验,也反映出细胞处在不同时相具有的显著区别<sup>[11,12]</sup>。总之,我们利用同步化细胞进行了一系列实验

均取得了非常满意的效果。

### 摘 要

本实验改良了 Rao 的高压 N<sub>2</sub>O 气阻断方法,获取高同步率和收获率的 4 个周期时相细胞,并进行了测定分析。

将指数生长的细胞用过量的 TdR (2.5 mmol/L) 预处理后,放在新设计的高压罐内,并将罐放入恒温箱内,经高压 N<sub>2</sub>O 气处理,细胞被阻断在有丝分裂中期。收集 M 期细胞在 37℃ 下解育释放 2 小时,细胞即可进入 G<sub>1</sub> 期;在中 G<sub>1</sub> 期再次用过量的 TdR 处理与释放,于不同时间分别收集 S 期与 G<sub>2</sub> 期细胞。

各时相细胞通过膜表面 ConA 受体再分布也表现进显著的时相差异性。每个时相细胞均能继续贴壁生长,活力高,适于各种相关实验研究。

### 参 考 文 献

- [1] Tobey R. A., 1973, *Methods in cell Biol.*, Edited by David M. Prescott. 6: 67—112.
- [2] 张鸿卿等, 1982, *药学报*, 17(10): 755—760.
- [3] 叶秀珍等, 1979, *实验生物学报*, 12: 207—212.
- [4] Fallon R. J. and R. P. Cox., 1979, *J. Cell. Physiol.*, 100: 251—262.
- [5] Woodcock D. M. and I. A. Cooper., 1979, *Exp. Cell. Res.*, 123: 157—166.
- [6] Scher C. D. et al., 1979, *Nature (London)*, 281: 390—392.
- [7] Keng P. C. et al., 1981, *Cell. Biophys.*, 3: 41—56.
- [8] Rao T. N., 1968, *Science (wash. D. C.)* 160: 774—776.
- [9] 王代树等, 1989, *实验生物学报*, 22(4): 407—415.
- [10] Slaroseisky A. et al., 1986, *Cell Biol. Int. Reports.*, 10(2): 121—129.
- [11] 牛敏英等, 1987, *北京医学*, 9(5): 260—262.
- [12] 王代树等, 1988, *实验生物学报*, 21(1): 35—45.