

## 由 G<sub>0</sub> 期过渡到 S 期时温度敏感突变株 tsAF-8 的 Pre-rRNA 基因的活化

李春华 张鸿卿\* 成汝宣\* 刘俊兰\*\* 薛绍白\*

(山西医学院中心实验室细胞室)

哺乳类细胞按其增殖状况可分为三类：连续分裂的细胞、不分裂的细胞和静止期细胞(G<sub>0</sub>期)<sup>[1]</sup>。连续分裂的细胞在一定条件下可以进入G<sub>0</sub>期，并在一定的刺激条件下G<sub>0</sub>期细胞可重新进入S期，合成DNA。所以研究G<sub>0</sub>→S的过渡对细胞增殖的调控以及肿瘤的治疗都有很大意义。在G<sub>0</sub>向S过渡时细胞进行一系列的生物化学变化，其中已有大量事实证明rRNA合成之增加是细胞生长前要求<sup>[2]</sup>。为了探讨pre-rRNA基因转录是否是G<sub>0</sub>→S期的必需条件，我们在温度敏感突变株AF-8细胞于不同条件下用银染NOR的方法探讨pre-rRNA基因活化与G<sub>0</sub>→S期过渡之间的关系。

### 材料与 方法

1. 细胞培养 tsAF-8细胞为幼龄仓鼠肾细胞(BHK)的温度敏感突变株(由美国Temple大学R. Baserga教授赠予)，培养在含10%小牛血清的Eagle培养液中，允许温度为33—33.5℃，非允许温度为39.4℃。

2. <sup>3</sup>H-TdR放射自显影：细胞经74 KBq/ml <sup>3</sup>HTdR(比活性(10—40)×37 GBq/mmol/L,中国科学院原子能研究所产品)用脉冲标记20分钟，甲醇:冰醋酸(3:1)固定，涂布核4乳胶(中国科学院原子能研究所产品)，4℃曝光，显影、定影后用Giemsa染色。

3. 银染核仁组织区(NOR) 按Howell<sup>[3]</sup>一步法，先以2%明胶显色剂滴于已固定好的长有tsAF-8细胞的盖玻片上，再滴以加倍量的50%硝酸银溶液，混合后并在溶液上加一盖玻片，放在70℃恒温加热器上2分钟，以后用去离子水漂洗。用相差和反射光显微镜计数Ag-NOR。核呈淡黄色，核仁轮廓清晰，Ag-NOR染成深棕色。

### 结 果

1. 温度、低浓度放线菌素D(0.03 μg/ml)(33.5℃)或5 mmol/L丁酸钠(33.5℃)对G<sub>0</sub>期tsAF-8细胞进入S期的影响 tsAF-8细胞生长至对数生长期时，换入含0.5%小牛血清的培养液，继续培养48小时，使其进入G<sub>0</sub>期。再换入含10%小牛血清的培养液，分别在33.5℃、39.5℃、0.03 μg/ml放线菌素D(33.5℃)或5 mmol/L丁酸钠(33.5℃)的情况下，用<sup>3</sup>H-TdR放射自显影检测tsAF-8细胞由G<sub>0</sub>期进入S期的动态过程。结果见图1。

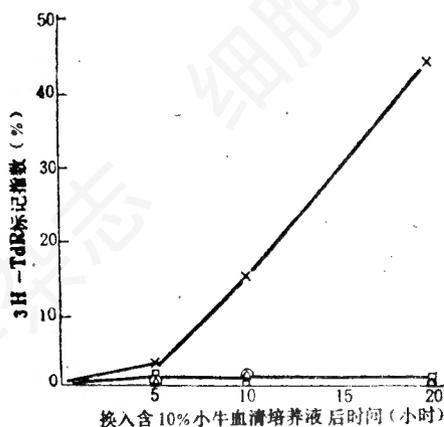


图1 G<sub>0</sub>期tsAF-8细胞在含10%血清培养液中处于不同条件下进入S期情况

×33.5℃ □5 mmol/L丁酸钠(33.5℃)  
○39.5℃ △0.03 μg/ml放线菌素D(33.5℃)

本课题为自然科学基金资助项目，在北京师范大学生物系细胞生物学研究室完成，工作中得到薛绍白教授和其他老师的指导和帮助，胡云英和常虹同志协助技术工作，特此致谢。

\* 北京师范大学生物系。

\*\* 吉林医学院生物学教研室。

在 33.5°C *tsAF-8* 细胞可由 G<sub>0</sub> 进入 S 期，血清刺激后 10 小时，<sup>3</sup>H-TdR 标记的细胞已达 14.5%，20 小时达 44%，说明在允许温度将 G<sub>0</sub> 期细胞恢复在含正常血清量之培养液中培养可进入 S 期。但在 39.5°C、0.03 μg/ml 放线菌素 D(33.5°C) 或 5 mmol/L 丁酸钠(33.5°C) 条件下虽均恢复在正常血清量中培养，却都抑制 *tsAF-8* 细胞由 G<sub>0</sub> 期向 S 期的过渡。

**2. 对 pre-rRNA 基因活化的影响** 在 0.5% 血清之培养液中处于 G<sub>0</sub> 期的 *tsAF-8* 细胞，经上述同样处理后，用银染核仁组织区 (Ag-

NOR) 方法测定 pre-rRNA 基因活化的情况。图版图 A. C. 示银染后 *tsAF-8* 细胞的形态表现，可见核的轮廓清楚，呈淡黄色，银粒只限于核仁中，核质中不存在银粒，(胞浆中散在少数银粒为本底)。对每个细胞中核仁银粒 (Ag-NOR) 的计数表明：换入含 10% 血清培养液后，在允许温度(33.5°C) 情况下，经过 0.5 小时就出现含 20 个以上银粒的细胞，至 9 小时绝大部分细胞都呈阳性，并出现带 40 个以上银粒的细胞，15 和 19 小时几乎全部计数细胞均呈阳性，且带 40 个以上银粒细胞增多(图

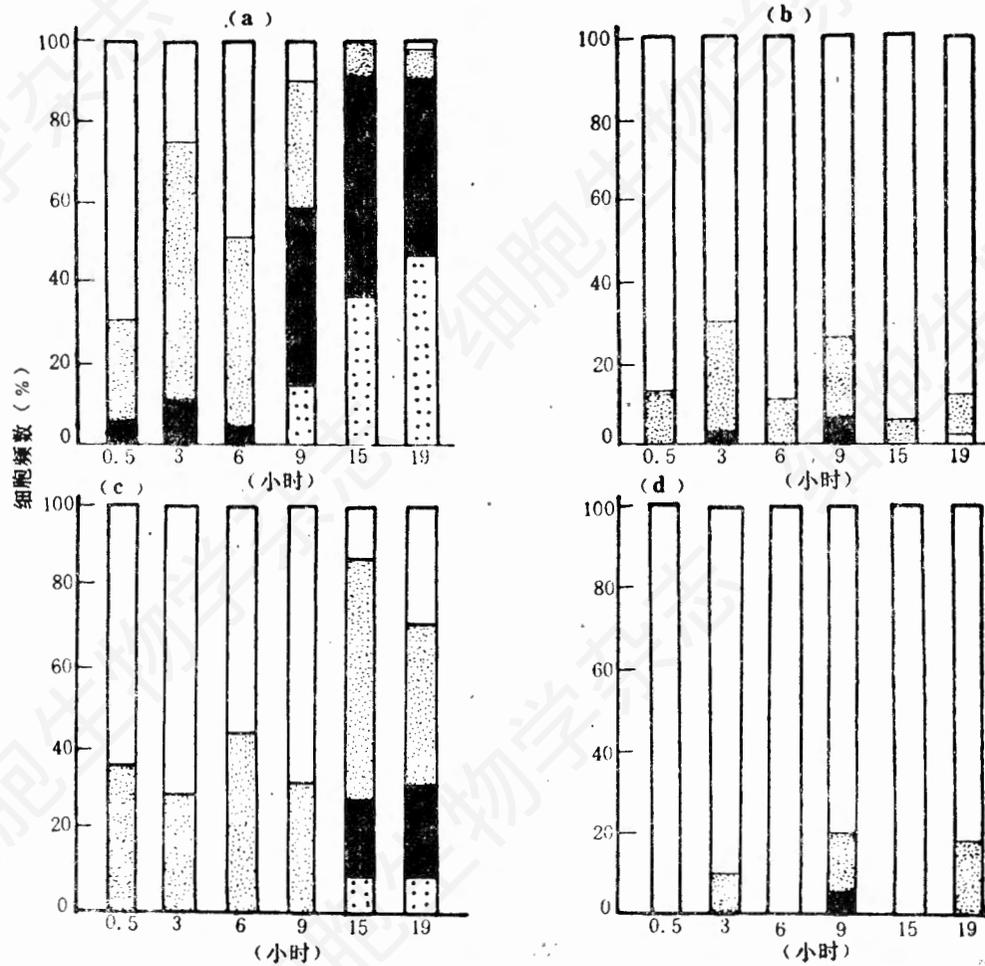


图 2 G<sub>0</sub> 期 *tsAF-8* 细胞被 10% 血清刺激后，在不同条件下每个细胞核仁中银粒数量的分布(每个时相统计 35 个细胞)

a. 33.5°C b. 39.5°C c. 5 mmol/L 丁酸钠(33.5°C)

d. 0.03 μg/ml 放线菌素 D(33.5°C)

□ 0 银粒/细胞    ▨ 10-20 银粒/细胞    ■ 20-40 银粒/细胞    ▩ 40 以上银粒/细胞

2a, 图版图 A), 39.5°C 或放线菌素 D (33.5°C) 组中, 加入 10% 血清后至 19 小时, 绝大部分细胞为阴性, 仅偶然出现含 20—40 个银粒的细胞, 没有发现 40 个银粒以上的细胞 (图 2b, d, 图版图 B. D), 5 mmol/L 丁酸钠 (33.5°C) 处理组中, 换入含 10% 血清培养液 15 小时后, 70% 以上细胞带有银粒, 并出现含 40 个以上银粒的细胞 (图 2c, 图版图 C)。

以上结果表明, tsAF-8 细胞在低浓度血清进入 G<sub>0</sub> 期后, 换以 10% 血清培养液, 在 33.5°C 进入 S 期的过程中伴随着 pre-rRNA 基因的活化, 其活化程度随着细胞进入 S 期而逐渐增加。在非允许温度 (39.5°C) 或放线菌素 D (33.5°C) 作用下, 细胞不能进入 S 期, 其 pre-rRNA 基因也没有活化。在 5 mmol/L 丁酸钠 (33.5°C) 作用下, G<sub>0</sub> 期细胞不能进入 S 期, 但 pre-rRNA 基因被活化, 其活化程度低于允许温度组, 并且出现也较晚。

## 讨 论

G<sub>0</sub> 期细胞向 S 期过渡时 rRNA 合成增加<sup>[2]</sup>。rRNA 是由 18 S + 28 S 的 pre-rRNA 顺反子转录而来<sup>[4]</sup>。应用 DNA-RNA 分子杂交技术证明人类的 18 S、28 S rRNA 原初转录本基因 (pre-rRNA 基因) 定位于 NOR, 用银染技术可使 NOR 呈特异性着色, 但是只有当 pre-rRNA 基因具有转录活性或者已经转录过而其上仍有残余的与 rRNA 相连接之蛋白质 (C<sub>23</sub>、B<sub>23</sub>) 的 NOR 才被银染着色, 没有转录活性的, 其 NOR 则不着色<sup>[5-6]</sup>。NOR 着色频率与 pre-rRNA 的合成相一致<sup>[7-10]</sup>。所以可用银染 NOR 的方法来研究 pre-rRNA 基因的活化。

本实验用 Ag-NOR 方法探讨 tsAF-8 细胞 pre-rRNA 基因活化与 G<sub>0</sub>→S 期过渡之间的关系, 显示: 在允许温度 tsAF-8 细胞由 G<sub>0</sub> 进入 S 期, 伴随着 pre-rRNA 活化, 而非允许温度或低浓度放线菌素 D (33.5°C) 条件下, G<sub>0</sub> 期细胞不能进入 S 期, 其 pre-rRNA 基因也没有活化, 上述 3 种情况存在平行关系。但 Rossini

等<sup>[11]</sup>发现在非允许温度 rRNA 合成和积累也不受抑制。他们是用分离的细胞核和核仁测定的, 而本实验系非允许温度对 tsAF-8 完整细胞的作用, 故不能排除有胞质存在时, 在非允许温度情况下胞质对 pre-rRNA 基因的抑制作用。

本实验观察到 5 mmol/L 丁酸钠 (33.5°C) 抑制 G<sub>0</sub>→S 期的过渡, 和薛绍白等报道的丁酸钠阻断 L<sub>1210</sub><sup>[13]</sup> 和 HeLa 细胞<sup>[14]</sup> 在早 G<sub>1</sub> 期的结果是一致的, 因为 G<sub>0</sub> 期细胞也可视为生长期延长的 G<sub>1</sub> 期细胞。在 33.5°C 时丁酸钠虽然抑制 tsAF-8 细胞由 G<sub>0</sub>→S 期的转移, 但对 pre-rRNA 基因的活化无明显影响。因此从本实验上述的结果证实了 pre-rRNA 基因的活化不是进入 S 期的唯一先决条件。这和 Kawasaki 等<sup>[12]</sup> 在 3T3 细胞中发现丁酸钠抑制了 G<sub>0</sub>→S 期过渡, 而对 RNA 积累没有影响的结果也是一致的。

## 摘 要

用 0.5% 低血清培养液使 tsAF-8 细胞进入 G<sub>0</sub> 态后, 再培养于含正常量 (10%) 血清的培养液中, 分别在允许温度 (33.5°C)、非允许温度 (39.5°C)、放线菌素 D (0.03 μg/ml) (33.5°C) 或丁酸钠 (5 mmol/L) (33.5°C) 的条件下, 用 <sup>3</sup>H TdR 放射自显影检测 G<sub>0</sub> 期 tsAF-8 细胞进入 S 期的过程, 并用银染核仁组织区 (NOR) 的方法观察 pre-rRNA 基因 (rDNA) 的活化程度。在允许温度时 G<sub>0</sub> 期细胞进入 S 期, pre-rRNA 基因被活化。在非允许温度或低浓度放线菌素 D (33.5°C) 条件下, G<sub>0</sub> 期细胞不进入 S 期, pre-rRNA 基因也不活化。5 mmol/L 丁酸钠 (33.5°C) 条件下细胞不能进入 S 期, 而 pre-rRNA 基因被活化, 但活化程度较低。

## 图 版 说 明

G<sub>0</sub> 期 tsAF-8 细胞换入含 10% 小牛血清之培养液经

- 19 小时示不同条件下 pre-rRNA 基因活化程度
- A. 33.5°C 细胞核内 Ag-NOR 明显增多, >40 个以上。
- B. 39.5°C 可见胞浆及核轮廓, 核内无活化之 pre-rRNA 基因。
- C. 5 mmol/L 丁酸钠(33.5°C)与A所见相似。
- D. 0.03 μg/ml 放线菌素 D(33.5°C)同B所见。

## 参 考 文 献

- [1] Baserga R., 1985, *The Biology of Cell Reproduction*. ed. by Baserga, R. pp, 5—7 Harvard University, Cambridge Massachusetts London, England.
- [2] 汪堃仁等, 1990, 细胞生物学, 北京师范大学出版社, pp, 308—390.
- [3] Howell, W H et al, 1980, *Experientia*, 36:1014—1015.
- [4] Hsu, T C, et al., 1975, *Chromosoma*, 53: 25—36.
- [5] J. H 普里斯特著, 1985, 刘权章译, 医学细胞遗传学和细胞培养, 北京: 科学出版社 pp, 450—455.
- [6] Daskal, Y., K., et al., 1980, *Exp. Cell Res.*, 127:285—291.
- [7] Hubbell, R. H., et al., 1979, *Cell Biology International Reports*, 3:615—622.
- [8] Busch, H, Y et al., 1979, *Cancer Res.*, 39:857—863.
- [9] Schnarzacher, H G, et al., 1978, *Cytogenet, Cell Genet*, 20:24—39.
- [10] Hernandez-Verdum, D., J et al., 1980, *Chromosoma*, 74:349—362.
- [11] Rossini, M, and R. Baserga, 1978, *Biochemistry*, 17:858—863.
- [12] Kawasaki, S., L. Diamond and R. Baserga, 1981, *Mole. Cell. Biol.*, 1:1038—1047.
- [13] Darzynkiewicz, A. and S. B. Xue et al., 1981, *Exp. Cell Res.*, 136:279—293.
- [14] Xue S. B., et al., 1981, *J. Cell Sci.*, 51: 163—171.

## 人子宫内膜上皮膜内颗粒的菱形排列\*

王 自 能

(暨南大学医学院妇产科及暨南大学电镜室)

利用冰冻断裂技术研究人子宫内膜上皮的细胞连接时, 我们发现有些膜内颗粒呈菱形排列。形态上, 这种型式的颗粒排列与典型的间隙连接明显不同。据我们所知, 中外文献至今尚无有关膜内颗粒的菱形排列出现在人子宫内膜的上皮的报道。本文将就此排列作一简介并探讨它的功能。

## 材 料 和 方 法

材料取自6位月经周期正常, 且未服用过含性激素药物的育龄妇女, 均因患其他非内源性妇科疾病而做子宫切除术。在子宫后壁近宫底处取下一块内膜组织并将它分成两部分, 其中一部分用甲醛溶液固定, 经常规技术制备后供组织学分期用<sup>[1]</sup>。(注: 月经周期增生中、晚期各1例; 分泌早期1例, 中期2例, 晚期1例)另一部分被切成约1 mm<sup>3</sup>小块, 在室温下用含2.5%戊二醛及2%多聚甲醛溶液(用0.1 mol/L二

甲酸钠缓冲液配制)固定2小时后, 在30%甘油(用同一缓冲液配制)浸泡1小时, 经液态Freon 22快速冷却后, 在液氮贮存。用Balzer 360 M冰冻断裂装置制成的复型膜经次氯酸盐漂白剂处理及蒸馏水多次冲洗后, 最后置于铜网上, 在Elmiskop IA型透射电镜下观察。

## 结 果

在冰冻断裂的复型膜上, 典型间隙连接的识别是聚集的颗粒群(P面)或浅窝群(E面)。颗粒的直径为8.0—10.0 nm, 相邻的颗粒排列成六边形, 颗粒间的中心距离约为9.0 nm。在月经周期的增生期, 间隙连接的数量少, 面积也小; 在分泌期, 特别是分泌中期, 其数量及面积增加明显。

\* 本文获国家自然科学基金会及联邦德国Volkswagen基金会资助。