

- ture, 294 : 754.
- [8] Cuthbertson, K. S. R. et al., 1983, *J. Exp. Zool.* 226 : 311—314.
- [9] Dyban, A. P. et al., 1980, *Bull. Exp. Biol. Med.* 89 : 528—530.
- [10] Longo, F. J., 1980, *Gamete Res.* 3 : 379—393.
- [11] Szollosi, D., 1975, In "Aging Gametes" Ed. by R. J. Blandau, pp. 98—121, Karger, Basel.
- [12] Petzolt, U. et al., 1980, *Molec. gen. Genet.* 180 : 547—552.
- [13] Surani, M. A. H. et al., 1977, *Nature (London)* 270 : 601—603.
- [14] Christopher, A. and C. L. Markert, 1986, In "International Minisymposium on Developmental Biology, Proceedings", Beijing, 1986., 10, pp. 1—10.

B7-2 胚胎性癌细胞与其分化细胞的周期特性*

丛笑倩 施渭康

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

近年来,小鼠恶性畸胎瘤研究使有可能分析哺乳动物早期发育和肿瘤发生中复杂的生物学问题;就发育潜能而言,恶性畸胎瘤干细胞——胚胎性癌(简称EC)细胞极类似于胚泡的内细胞团(ICM)细胞,可作为研究早期哺乳类发育中某些问题的模型^[1,2];同时,鉴于EC细胞在一定条件下能直接分化成非恶性的细胞,因此又可用以探讨肿瘤生物学的一些问题^[3,4]。我们曾报道,B7-2多能EC细胞克隆株在体外能保持较均一的未分化状态,经环六亚甲基双乙酰胺(HMBA)体外处理能被诱导分化为内胚层性质的细胞。在诱导分化过程中,细胞发生了P53转化蛋白、植物凝集素受体等表型转变。同时,细胞增殖速率明显减缓。接种到同系宿主皮下,失去原有的恶性生长性质^[5,6]。然而,细胞分化期间,细胞周期的时相变化参数迄今还未被完全阐明。本文报道了B7-2 EC细胞经HMBA处理前后两种不同表型的细胞周期特点,为分析EC细胞诱导分化的基因表达与周期关系提供了参数。

材 料 和 方 法

一、细胞株和诱导剂 HMBA 处理

1 未分化细胞 B7-2 EC细胞^[5]生长在含10%

小牛血清的RPMI-1640培养液中,不经胰酶消化,每隔三天传代一次。对数生长期的细胞悬浮于培养液,以每毫升 1×10^5 细胞接种5毫升于 $2.5 \times 5 \text{ cm}^2$ 培养瓶中,瓶塞上插上一注射针头,置5%CO₂培养箱,37℃培养72小时,这时细胞又处于对数生长期。

2 分化细胞 对数生长的B7-2 EC细胞悬浮在含5 mol/L HMBA和10%小牛血清的RPMI-1640培养液中,使每毫升细胞数为 1×10^5 。接种10毫升细胞悬液于 $3.5 \times 7 \text{ cm}^2$ 培养瓶,置5%CO₂、37℃培养。由于B7-2细胞用HMBA处理48小时后,90%的细胞已完成定向分化^[6]。因此,细胞经药物处理96小时后,换以不含诱导剂HMBA的新鲜培养液,按实验要求继续培养不同时间。

二、细胞生长曲线

经HMBA处理96小时的B7-2分化细胞,根据继续培养在无诱导剂的常规培养液中的时间,分为24, 48, 72和96小时四组。每组各取3瓶细胞,0.25%胰酶消化,收集细胞,计数,取平均值作出分化细胞的生长曲线。未分化B7-2细胞的生长曲线测定同分化细胞,分别对相应于分化细胞接种后培养的时间进行细胞计数。

* 本文由中国科学院R 850595号基金资助,并承姚鑫教授指导,包林平同志参加实验。部分内容收集于中国细胞生物学学会第3次会议论文摘要汇编,1986年10月,成都。

三、细胞周期测定

1 细胞的连续标记和脉冲标记

(1) 连续标记 未分化 B 7-2 EC 细胞和 HMBA 处理 96 小时的分化细胞, 离心后按每毫升 1×10^5 细胞悬浮在含 $1 \mu\text{Ci}$ /毫升 ^3H -TdR (41 居里/毫克分子, 上海原子核研究所) 的 RPMI-1640 培养液中, 分别连续标记 24 小时和 36 小时。离心收集细胞, 用含 0.01 mmol/L TdR (Sigma 产品) 培养液洗两次, 悬浮在适量 0.01 mol/L PBS 液中, 涂片, 冰醋酸: 甲醇 (1:3) 固定。涂核乳胶 (中国科学院原子能研究所产品), 4°C 曝光两星期。ID₁₉B 显影液 ($18-20^\circ\text{C}$) 显影 10 分钟。酸性定影液定影 20 分钟。水冲洗。Giemsa 液染色, 镜检。一般计数 500 个以上的核, 算出被标记核的百分数。

(2) 脉冲标记 B 7-2 未分化和分化的两种细胞分别用含 $4 \mu\text{Ci}$ /毫升 ^3H -TdR 培养液脉冲标记 15 分钟。收集细胞, 用含 0.01 mmol/L TdR 的培养液洗两次, 同上细胞涂片, 固定和放射自显影, 计算细胞核标记百分数。

2 $G_2 + \frac{M}{2}$ 时期

细胞周期测定基本上按 Liskay 方法^[7]。5 mmol/L HMBA 处理 96 小时的 B 7-2 细胞用 Hanks' 液洗一次, 换以含 $4 \mu\text{Ci}$ /毫升 ^3H -TdR 培养液。脉冲标记 15 分钟后, 弃去含 ^3H -TdR 的培养液, 用预冷的含 0.01 mmol/L TdR 培养液洗两次。0.25% 胰酶消化半分钟, 收集细胞。Hanks' 液洗两次, 再以含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液配成 1×10^5 毫升的细胞悬液, 接种 5 毫升于 $2.5 \times 5 \text{ cm}^2$ 的培养瓶内, 分四组, 每组两瓶, 置 5% CO_2 培养箱, 分别培养 1、2、3 和 4 小时取样品, 按我们实验室常规方法^[8]制备染色体。光学镜检, 每个核区域大于 10 个银颗粒的作为标记细胞。计算染色体被标记的细胞百分数, 用以计算 $G_2 + \frac{M}{2}$ 时期。

B 7-2 EC 细胞接种后 96 小时, 由于细胞处于密度依赖抑制而有局部自发分化现象。因此, 我们选用培养 72 小时的细胞作为未分化细胞。用 Hanks' 液洗一次, ^3H -TdR 标记, 分组和计算方法都同 HMBA 处理的分化细胞组。

3 细胞周期各时相分析

按 Rosenstraus 等人 (1982) 方法^[9]对细胞周期各时相进行分析和计算。根据生长曲线可以测定细胞的倍增时间; 未分化细胞从传代后第二天 (24 小时) 起

算, 而分化细胞从撤除 HMBA 并换以常规培养液的第二天 (24 小时) 起算。细胞周期的 S 时相用 Cleaver 氏公式^[10]计算: 即

$$LI = \exp\left(\frac{\ln 2 \cdot t_2}{T}\right) \left(\exp\left(\frac{\ln 2 \cdot t_s}{T}\right) - 1 \right)$$

式中

LI = 脉冲标记百分数

$t_2 = G_2$ 期时间

T = 细胞周期时间

$t_s = S$ 期时间

最后, G_1 期时间 = 细胞周期时间 - ($S + G_2 + M$) 时间。

结果和讨论

一、B 7-2 未分化和已分化细胞的生长速率

我们分别测定了经 5 mmol/L HMBA 处理 96 小时后再撤除药物的 B 7-2 分化细胞的和未经药物处理的未分化细胞的生长曲线 (图 1)。

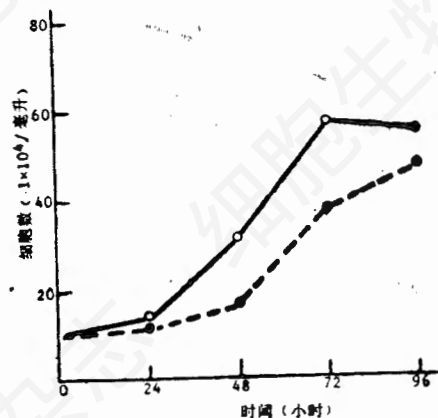


图 1 未分化和已分化 B 7-2 细胞的生长曲线

○—○ 未分化细胞
×——× HMBA 处理的已分化细胞,
二次实验的平均值

两次平行实验结果表明, 经药物诱导的分化细胞在常规培养液中的倍增时间平均为 30.5 小时; 而未分化的 B 7-2 EC 细胞培养 72 小时的细胞数已增加为原初接种时的 5.7 倍, 细胞倍增时间平均是 18.7 小时。显然, 分化细胞的细胞倍增时间比未分化的慢 11.8 小时。细胞生长速

率变化与细胞表型改变有关。我们先前报道, B7-2 细胞在 HMBA 诱导处理期间, 一些细胞表型发生了不可逆性变化, 并分化为内胚层样细胞^[5,6]。由于层粘连蛋白 (Laminin) 是内胚层细胞标志之一^[11]。最近我们使用层粘连蛋白免疫酶染色法检测 B7-2 诱导分化细胞, 发现 HMBA 处理 48 小时以后的细胞质显示阳性染色反应; 而不经药物处理的未分化细胞则为阴性(未发表资料)。进一步确证了 B7-2 诱导分化细胞的内胚层性质, 细胞形态和生化性质上已完全不同于未分化细胞。

二、B7-2 未分化和已分化细胞的周期

未分化和已分化的 B7-2 细胞分别经 ^3H -TdR 脉冲标记后, 各自培养 1、2、3 和 4 小时后制备染色体。计数被标记染色体的细胞百分数。根据制片上有丝分裂细胞达到 50% 所需要的时间, 可以获得细胞周期的 $G_2 + \frac{M}{2}$ 的时相。结果表明, 未分化 B7-2 EC 细胞的 $G_2 + \frac{M}{2}$ 时相为 2.5 小时; 而已分化细胞为 3.75 小时(图 2), 比未分化细胞的稍有所增长。

根据 ^3H -TdR 连续标记和脉冲标记未分化和已分化 B7-2 细胞所得到的数据, 按照 Cleaver 氏公式分别计算出各自的细胞周期, S

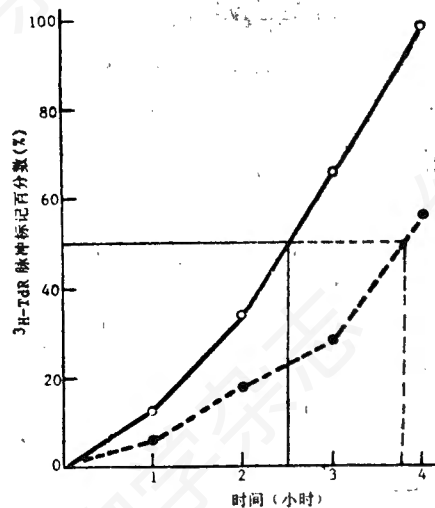


图 2 未分化和已分化 B7-2 细胞的 $G_2 + \frac{M}{2}$ 时相

○——○未分化细胞

×——×已分化细胞

未分化细胞组为三次实验; 分化细胞为二次实验

期和 G_1 期的时间。结果表明未分化细胞的周期为 18 小时, 其中 G_1 期 1.7 小时; S 期 13.6 小时; $G_2 + M$ 期是 2.7 小时(表 1)。经 HMBA 诱导的分化细胞生长速率明显减缓, 细胞周期的时间长达 30 小时, 其中 G_1 期 8.6 小时; S 期 17.1 小时; $G_2 + M$ 期为 4.0 小时(表 2)。因此, B7-2 已分化细胞与未分化 EC 细胞相

表 1 未分化 B7-2EC 细胞的细胞周期分析

实 验	细胞倍 增 时 间	连续标记 核百分数	脉冲标记 核百分数	时 间 (小时)			
				细胞周期	G_1	S	$G_2 + M$
1	19	0.95	0.66	18.05	1.9	13.4	2.75
2	18.5	0.97	0.74	18.0	0.9	14.4	2.70
3	18.8	0.96	0.70	18.05	2.3	13.0	2.75
平 均	18.7	0.96	0.70	18.03	1.7	13.6	2.73

表 2 HMBA 处理后 B7-2 分化细胞的细胞周期分析

实 验	细胞倍 增 时 间	连续标记 核百分数	脉冲标记 核百分数	时 间 (小时)			
				细胞周期	G_1	S	$G_2 + M$
1	31	0.98	0.50	30.4	8.6	17.8	4.0
2	30	0.97	0.48	29.1	8.6	16.5	4.0
平 均	30.5	0.97	0.49	30.0	8.6	17.1	4.0

比,主要是G₁期和S期的时间分别增长了6.9小时和3.5小时,从而使分化细胞具有缓慢的生长速率。

三、EC细胞及其分化细胞的周期特点

在小鼠胚胎发育中,早期胚胎细胞的G₁期都很短暂,细胞生长速率改变主要受细胞周期的S期时间增长的影响^[12]。这种现象在多能EC细胞诱导分化的初期也存在^[13]。Mummery等(1984)^[14]已证明,PC 13 EC细胞经维生素A酸处理48小时,虽然G₁期时间有所增长,但细胞生长速率改变主要由于细胞周期的S期时间增加。许多实验也表明,真核细胞成为终末分化细胞时的生长速率改变则主要依赖于细胞周期的G₁期时间变化^[15]。我们的实验材料是HMBA处理前后的未分化和已分化的B7-2细胞,实验结果可能并不反映细胞诱导分化期间,特别是药物处理初期的细胞周期时相。但将已分化细胞的周期与未分化B7-2 EC细胞的相比较,前者的G₁期和S期时间都增长,分别增长80.2%和20.5%。因此,象其它终末分化细胞一样,B7-2诱导分化细胞的生长速率除了受细胞周期的S时相影响外,主要是G₁期的变化。

有证据表明,其它一些EC细胞的周期也存在类似B7-2 EC细胞的周期特点。在细胞分化期间,G₁期和S期逐渐拉长。F9克隆株OTF 9-63 EC细胞在未分化状态的G₁期仅为0.2小时;用维生素A酸处理4天后,细胞的G₁期为2.3小时^[9]。然而,不同的EC细胞G₁期尽管都很短暂,但似乎不象早期胚胎细胞那样;G₁期越短,这种细胞所处的发育阶段就越早,发育潜能也越大。例如许多动物胚胎的卵裂期细胞,G₁期完全缺乏,随着胚胎发育和细胞分化,细胞的G₁期逐渐拉长^[12,16,17]。Sennerstam和Strömberg(1984)^[18]分析过F9、PCC₄Azal和PCC₃N/1三种不同的未分化EC细胞的周期与它们的发育潜能之间的关系。发现三者各自的G₁期分别为1.5, 1.8和3.4小时,就各自的发育潜能而言,

F9 EC细胞几乎无自发分化能力^[19];而PCC₃N/1细胞是一种自发分化能力很强的多能EC细胞^[20],PCC₄Azal细胞的发育潜能则介于两者之间。由此可见,未分化F9细胞的G₁期尽管比PCC₃N/1细胞的短得多,但其发育潜能却比PCC₃N/1的低得多。就G₁期而言,我们的未分化B7-2 EC细胞非常近似于PCC₄Azal EC细胞,但两者的发育潜能和生长行为却有所不同:后者呈细胞聚集生长,且易自发分化。因此,现有证据还难以阐明EC细胞的G₁期短暂和其发育潜能的关系。但是,随着细胞分化,G₁期时间的增长却是分化细胞所具有的共同特点,至于细胞分化与G₁期时间增加的内在联系也还有待进一步研究。

摘 要

本文用³H-thymidine标记B7-2 EC细胞及其经HMBA诱导的分化细胞。根据连续标记和脉冲标记核百分率,计算和分析这两种细胞的细胞周期各时相特点。结果表明,未分化EC细胞的周期是18小时,其中G₁期1.7小时,S期13.6小时;分化细胞的周期是30小时,G₁期8.6小时,S期17.1小时。因此,B7-2分化细胞与未分化的相比,主要是G₁期和S期时相相应拉长。

参 考 文 献

- [1] Graham, C. F., 1977, In "Concepts in mammalian embryogenesis". (M. I. Sherman, ed.) pp 315-394. MIT Press. Boston.
- [2] Martin, G. R., 1975, *Cell*, 5: 229-243.
- [3] Gardner, R. L., 1983, *Cancer surveys*, 2: 1-19.
- [4] Strickland, S., 1981, *Cell*, 24: 277-278.
- [5] 丛笑倩, 姚 鑫, 1984, 实验生物学报 17: 309-321.
- [6] 丛笑倩, 陈振国, 姚 鑫, 1986, 实验生物学报 19: 369-379.
- [7] Liskay, R. M., 1978, *Exp. Cell Res.*, 114: 69-117.
- [8] 丛笑倩, 姚 鑫, 1987, 实验生物学报 20 (2): 237-251.

- [9] Rosenstrauss, M. J., et al., 1982, *Dev. Biol.*, 89: 516-520.
- [10] Cleaver, J. E., 1967, In "Frontiers of Biology". (E. L. Tatum and A. V. Neuburger, eds.), Vol. pp 245-247.
- [11] Adamson, E. D., et al., 1985, *Differentiation*, 29: 68-76.
- [12] Solter, D., et al., 1971, *Exp. Cell Res.*, 64: 331-334.
- [13] Rayner, M. I. and Graham, C. F., 1982, *J. Cell Sci.*, 58: 331-334.
- [14] Mummery, C. L., et al., 1984, *Dev. Biol.*, 104: 297-307.
- [15] Prescott, D. M., 1976, The reproduction of eukaryotic cells. Academic Press, New York.
- [16] Gamow, E. I., and Prescott, D. M., 1970, *Exp. Cell Res.*, 59: 117-123.
- [17] Streffer, C., et al., 1980, *Cell Tissue Kinet.*, 13: 135-143.
- [18] Sennerstam, R. and Strömberg, J. O., 1984, *Dev. Biol.*, 103: 221-229.
- [19] Sherman, M. I., and Miller, R. A., 1978, *Dev. Biol.*, 63: 27-34.
- [20] Jacob, H., et al., 1973, *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 124 B, 269-282.

花烟草叶肉原生质体再生植株

王光远 夏镇澳

(中国科学院上海植物生理研究所)

花烟草是一种观赏植物,染色体数少($2n=18$),植物形态和花型与其他烟草有较大差异,是较好的细胞融合材料。文献中已报道了从花烟草叶肉原生质体再生植株,但都是由愈伤组织分化芽而来^[1,2,3];尚未见有经胚状体途径的资料。而这一途径已在多种植物的组织培养中观察到,并越来越多地引起人们的重视。本文报道在花烟草叶肉原生质体培养过程中形成大量球形胚,心形胚,再生成完整植株的结果。

材 料 和 方 法

实验材料 花烟草(*Nicotiana glauca*) (由中国农业科学院烟草所提供)种子播于温室(日25℃,夜13℃,自然光照),用45天以上苗龄的伸展叶片。取下叶片用肥皂水表面清洗后放入3%漂粉精水溶液内表面灭菌15分钟,无菌水洗涤二次滤纸吸干。撕去下表皮,放入已抽滤的酶液内(酶液组成EA 3-867纤维素酶1%,甘露醇0.6 mol/L, pH 5.5), 28℃恒温箱内保温4小时;然后过滤,离心,洗涤,用原生质体培养基(NT)制备成 2.1×10^4 个/ml原生质体悬浮液。

原生质体培养基: NT^[4]培养基,附加2,4-D

2 mg/l, KT 0.25 mg/l, 蔗糖2%, 甘露醇0.6 mol/L, pH 6.0。

愈伤组织继代培养基: 改良的MS (MS的大量元素和微量元素, B₅ 维生素), 附加2,4-D 2 mg/l, 蔗糖3%, pH 6.0。(液体培养基中不加琼脂)。

分化培养基: 与上述改良的MS相同, 附加6-BA 2 mg/l, IAA 0.25 mg/l。

结 果 和 讨 论

一、原生质体培养 将制备好的原生质体悬浮液进行浅层培养(图1)。24小时原生质体明显长大, 3天后有70%原生质体呈椭圆形。7天出现一次分裂(图2), 15天观察到2—3次细胞分裂(图3), 5周后观察到细胞团(图4), 而且有20%左右的球形而结构紧密的细胞团。将细胞悬浮液移入新鲜NT培养液内继续培养, (甘露醇降低为0.2 mol/L)。组织移入改良的MS眼可见的愈伤组织, 把2 mm大小的愈伤组织移入改良MS培养基上继代培养, 愈伤组织继续生长一个月后, 将愈伤

* 照片由陈乃先同志帮助拍摄, 特此致谢