

参 考 文 献

- [1] Vosa, C. G., 1985, In: Advances in chromosome and cell genetics, A. K. Sharma & A. Sharma eds. Oxford & IBH Publishing Co., 79-104.
- [2] Caspersson, T. et al., 1968, *Exp. Cell Res.*, 49:219-222.
- [3] Caspersson, T. et al., 1970, *Chromosoma*, 30: 215-217.
- [4] Paris Conference, 1971, *Cytogenetics*, 11: 307-362.
- [5] Bostock, C. J. and A. T. Sumner, 1978, The eukaryotic chromosome, North-Holland Publishing Company.
- [6] Greilhuber, J., 1977, *Theor. Appl. Genet.*, 50: 121-124.
- [7] Okada, T. A. and D. E. Comings, 1974, *Chromosoma*, 48: 65-71.
- [8] Luciani, J. M. et al., 1975, *Chromosoma*, 52: 275-282.
- [9] Bhattacharya, S., 1978, *Cytologia*, 43: 581-583.
- [10] Greilhuber, J., 1975, *Plant Syst. Evol.*, 124: 139-156.
- [11] Nagl, W., 1974, *Nature*, 249: 53.
- [12] Anderson, L. K. et al., 1982, *Exp. Cell Res.* 138: 433-436.
- [13] Kurata, N. et al., 1981, *Japan. J. Genet.*, 56: 41-50.
- [14] Kurata, N. and T. Omura, 1984, In: Biology of rice, S. Tsunoda and N. Takahashi, eds., Japan Sci. Sco. Press, 31-67.
- [15] Drewry, A., 1982, *J. Hered.*, 73: 305-306.
- [16] Murata, K. and T. J. Orton, 1984, *J. Hered.*, 75: 225-228.
- [17] Rybak, J. et al., 1982, *Hum. Genet.*, 60: 328-333.
- [18] 朱凤绥等, 1986, 作物学报, 12 (3): 213-214.
- [19] 朱凤绥等, 1988, 中国农业科学, 21 (5): 91-93.
- [20] 张自立等, 1986, 植物学报, 28(6): 595-598.
- [21] 张自立等, 1988, 遗传, 10 (2): 11-12.
- [22] 杨晓峰等, 1988, 植物学报, 30 (5): 468-472.
- [23] 陈瑞阳等, 1986, 武汉植物学研究, 4 (2): 111-117.
- [24] 陈瑞阳等, 1987, 植物学报, 29(4): 341-346.
- [25] 詹铁生等, 1987, 植物学报, 29(5): 465-468.
- [26] 宋运淳等, 1987, 遗传学报, 14(6): 424-427.
- [27] 何立珍, 1986, 湖南农学院学报, 3: 105-108.
- [28] 夏晓敏等, 1986, 林业科学, 22 (2): 169-171.
- [29] Wang, H. C. and Kao, K. N., 1988, *Genome*, 30: 48-51.
- [30] Chuprevich, J. W., 1973, *Lancet*, I: 484-486.
- [31] Hsu, T. C. et al., 1973, *Exp. Cell Res.*, 79: 484-487.
- [32] Ohnuki, Y., 1968, *chromosoma*, 25: 402-428.
- [33] Fukui, K., 1986, *Theor. Appl. Genet.*, 72: 27-32.

小鼠胚胎瘤及其分化细胞的细胞光度法分析

郝京生 陈汉源

(广州第一军医大学生物教研室)

小鼠胚胎瘤(EC)细胞具有多种分化潜能, 经过诱导剂的促进后, 其形态结构、生化特性、基因表达和致癌性等发生改变^[1-4]。本实验对诱导分化的EC细胞进行染色体数目、DNA合成和DNA含量的分析, 以期阐明三

者在癌细胞分化中的变化。

材 料 和 方 法

一、癌细胞的诱导分化

小鼠胚胎瘤 B7-2 EC 细胞株从中国科学院上海

细胞生物学研究所引进, 培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 液中。实验分为 5 组, 将收集的 EC 细胞经 Hanks 液洗涤后, 以 $1.3 \times 10^5/\text{ml}$ 密度悬浮于含 5 mmol/L 环六亚甲基双乙酰胺(HMBA)的培养液中, 于 37°C 分别温育 24、48、72、96 和 120 h。对照组不经 HMBA 处理。通常培养时间增长, EC 细胞的自发分化增多, 其中以培养 48 h 的分化比例最低, 以此为对照。收集的细胞经甲醇和冰醋酸(3:1)固定 2 h 后涂片, 复以 10% 中性福尔马林固定 2 h。

二、染色体计数

采用常规气干法制备 EC 细胞染色体标本, 各组计数 100 个中期细胞的染色体数目, 有的排列核型。

三、放射自显影、福尔根反应和细胞光度法

这三种方法均按前报告进行^[5]。各组细胞经 $1.85 \times 10^4 \text{Bq/ml}$ 的 $^3\text{H-TdR}$ 于 37°C 参入 6 h, HW₄ 型乳胶涂片于 4°C 曝光约 2 个月后, 显影和定影。各组制片在高倍镜下任意选取 40 个视野, 计算细胞的银粒标记指数(LI)。然后随机测量 80 个细胞的福尔根光密度。以小鼠脾细胞为二倍体(2C)的衡量标准, 求出 DNA 指数(DI)或倍体值(C)。由于 EC 未分化和分化细胞的主要区别在细胞质形态特征, 前者圆球形, 后者核形、多边形或上皮样。为此, 将福尔根反应后的制片, 再以亮绿复染。先在白光下辨认两种不同形态的细胞, 再于 546 nm 单色光分别测定两者的光密度。

结 果

一、HMBA 对癌细胞生长、分裂和形态的影响

当接种 EC 细胞数为 $1.3 \times 10^5/\text{ml}$ 时, 经过 72 h 培养后, 对照组细胞数增至 $7.5 \times 10^5/\text{ml}$, 经 HMBA 处理的实验组只增至 $2.2 \times 10^5/\text{ml}$ 。 $^3\text{H-TdR}$ 放射自显影显示, 对照组细胞的 LI 为 53.6%, 经 HMBA 处理的实验 1—5 组分别为 51.1%, 31.3%, 29.5%, 29.8% 和 27.6%。结果表明, HMBA 对癌细胞的增长和 DNA 合成明显抑制。经过 HMBA 诱导后, 实验 1—5 组的细胞分化率分别为: 36%, 80%, 85%, 90% 和 90% (图版图 1, 2)。

二、经 HMBA 处理的癌细胞染色体数目变化

比较对照组和实验 5 组的中期细胞表明(表 1), 含 40 条染色体的细胞数从 35% 下降到 7%, 而含 60 条以上染色体的细胞数从 15% 增至 37%。此外, 对照组有 18% 中期细胞含有 1—2 条中间着丝粒染色体, 而实验组则增至 30% 到 50%。这染色体乃由两条端着丝粒染色体融合而成(图版图 3, 4)。

表 1 中期细胞染色体数目

染色体数	≤37	38	39	40	41	42—59	≥60	总数
对照组	18	6	17	35	4	5	15	100
实验 1 组	24	14	15	22	1	6	18	100
实验 2 组	16	3	15	16	3	9	38	100
实验 3 组	10	16	20	10	1	6	37	100
实验 4 组	16	10	15	10	0	12	37	100
实验 5 组	19	12	16	7	1	8	37	100

三、全部癌细胞的福尔根光密度

未经放射自显影的制片随机测定 80 个 EC 细胞的福尔根光密度(表 2), 实验 1—5 组光密度平均值分别为: 23.25, 25.27, 25.48, 25.20 和 20.45。除最后数值外, 其余各值均显著高于对照组 19.22。在直方图中(图 1), 对照组和实验 1—3 组在 4C 处有一主峰, 在 8C 处有一小峰。经 HMBA 诱导后, 主峰细胞数略减, 小峰细胞数略增。实验 4 组和 5 组主峰位置提前, 小峰不明显, 可能由于部分细胞退化死亡之故。

表 2 全部细胞核面积和福尔根光密度

	核面积 μm^2	光密度	变异系数
对照组	94.22 ± 25.76	19.22 ± 6.56	0.34
实验 1 组	150.22 ± 56.12	23.25 ± 10.06	0.43
实验 2 组	131.86 ± 39.55	25.27 ± 9.91	0.39
实验 3 组	177.00 ± 58.71	25.48 ± 10.41	0.41
实验 4 组	205.14 ± 74.33	25.20 ± 11.09	0.44
实验 5 组	193.28 ± 70.44	20.45 ± 7.63	0.37

实验 1—4 组和对照组比较, 福尔根光密度差异显著 ($P < 0.01$)。

四、未标记癌细胞的福尔根光密度

对放射自显影制片随机测定 80 个未标记细胞的福尔根光密度(表 3)。实验 2—5 组光

表 3 未标记细胞核面积和福尔根光密度

	核面积 μm^2	光密度	变异系数	DI
对照组	119.92 \pm 36.33	12.82 \pm 4.49	0.35	1.72
实验 2 组	131.85 \pm 36.92	14.62 \pm 5.07*	0.35	1.96
实验 3 组	158.86 \pm 43.73	14.95 \pm 5.25**	0.35	2.00
实验 4 组	171.47 \pm 51.78	14.75 \pm 5.12*	0.35	1.97
实验 5 组	144.55 \pm 49.88	14.66 \pm 5.42*	0.37	1.96

实验 2—5 组与对照组比较, 福尔根光密度差异显著。

(*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$)。

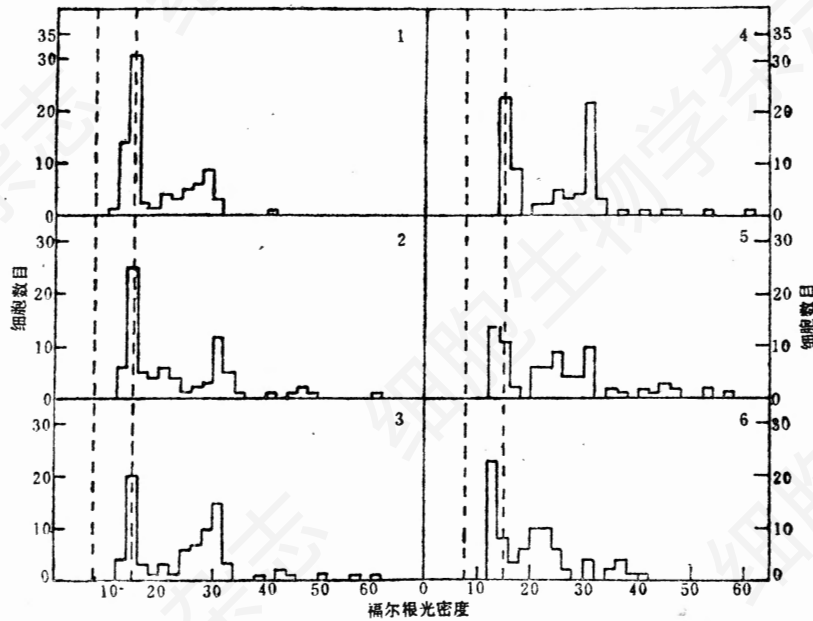


图 1 全部细胞的 DNA 分布直方图

虚线代表二倍体和四倍体值 (1) 对照组, (2—6) 实验 1 组—5 组。

密度平均值分别为: 14.62, 14.95, 14.75 和 14.66, 都显著高于对照组 12.82。在直方图中(图 2), 各组在 3C 处均有主峰, 在 6C 处有一小峰。经 HMBA 作用后, 主峰细胞数减少, 小峰细胞数增加, 表明多异倍体值的细胞数目增多。

五、未分化细胞和分化细胞的福尔根光密度

实验 2 组制片经福尔根反应和亮绿复染后, 分别测定 80 个未分化和分化细胞的福尔根光密度(表 4), 分化细胞的平均值 23.64 显著高于未分化细胞 21.33。而且, 表 3 中未标

记的对照组细胞主要为未分化的 G_0/G_1 细胞, 表 4 中分化细胞主要处于 G_0/G_1 状态, 均不合成 DNA, 比较两组的福尔根光密度值, 证实上述结果。

表 4 未分化细胞和分化细胞核面积及福尔根光密度

	核面积 μm^2	光密度	变异系数
未分化细胞	141.45 \pm 38.44	21.33 \pm 6.15	0.29
分化细胞	133.89 \pm 36.61	23.64 \pm 7.89	0.33

分化细胞和未分化细胞比较, 福尔根光密度差异显著($P < 0.05$)。

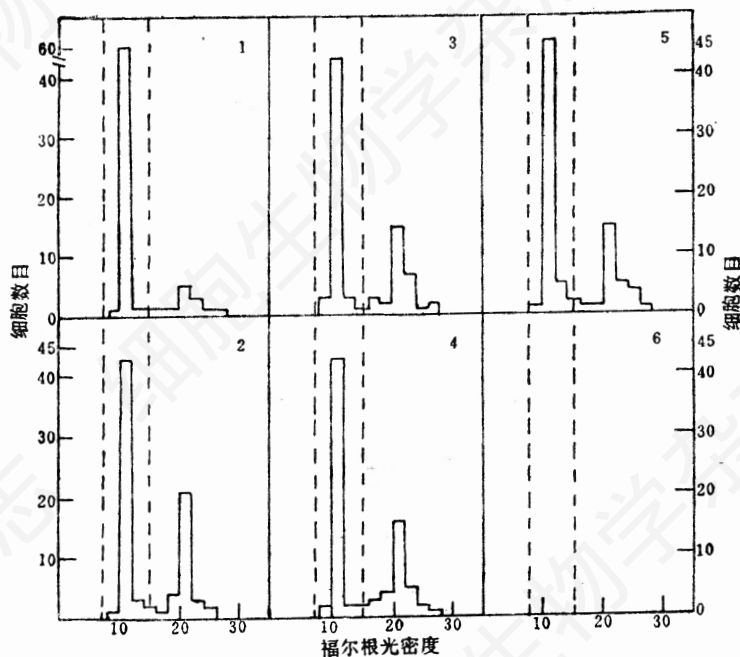


图 2 未标记细胞的 DNA 分布直方图

(1) 对照组, (2—5) 实验 2 组—5 组

讨 论

我们实验结果表明, HMBA 对 EC 细胞的生长有明显的抑制作用, 并能阻遏 EC 细胞的 DNA 合成, 阻碍进入 S 期。而且, 大部分 EC 细胞染色体数为二倍体或近二倍体, 只有少数为近四倍体。经 HMBA 处理后, 含 40 条染色体的细胞数减少, 而含 60 条以上染色体的多异倍体细胞数增加。国外报告过有关结果^[6-8]。Lehman 等^[9]和 Swartzendruber 等^[10]曾经测定非同步分裂的 EC 细胞 DNA 含量, 包括未分化和分化细胞。我们应用 ³H-TdR 放射自显影和细胞光度法结合, 排除制片中银粒标记细胞, 后者代表大部分 S 和 G₂ 细胞, 只测定未标记的 G₀ 和 G₁ 期细胞的福尔根光密度, 以期比较准确地反映细胞倍体值或基因组的变化。结果显示, EC 细胞经过 HMBA 诱导分化后, 无论是全部细胞, 还是未标记细胞, 实验组 DNA 平均值均显著高于对照组。而且, 分化细胞 DNA 值显著高于未分化细胞, 这主要由于含多异倍值的细胞增多所致。虽然经

HMBA 作用 120 h 后, 90% 的 EC 细胞发生形态分化, 但是其中含多异倍体值细胞只有 29%, 说明部分分化细胞的 DNA 含量没有或少量增加。综上所述, EC 细胞经过诱导分化后, 虽然失去部分恶性, 恢复某些正常表型, 但其染色体数目和 DNA 含量不仅没有趋向正常, 而且变化加剧, 其中原委, 尚待进一步分析。

摘 要

HMBA 对小鼠胚胎癌细胞的生长和 DNA 合成均有抑制作用。经过诱导分化后, 癌细胞 DNA 含量平均值增加, 这部分由于含多异倍体值的细胞数增多所致, 同时含 40 条染色体的细胞数减少, 而含 60 条以上染色体的细胞数增加, 结果说明, 胚胎癌的分化细胞虽然发生形态改变, 并非就是正常细胞。

参 考 文 献

- [1] Chen, K. Y. et al., 1983, *Cancer Res.*, 43: 2812-2818.

- [2] 施渭康等, 1982, 实验生物学报, 15: 41-55.
- [3] Thomas, S. et al., 1986, *J. Cell Physiol.*, 127: 274-280.
- [4] 丛笑倩、姚鑫, 1984, 实验生物学报, 17: 309-321.
- [5] 陈汉源、钟启平, 1987, 实验生物学报, 20: 187-195.
- [6] Nishimune, Y. et al., 1983, *Exp. Cell Res.*, 146: 439-444.
- [7] Cronmiller, C. et al., 1978, *Develop. Biol.*, 67: 465-477.
- [8] Iles, S. A. et al., 1977, *J. Exp. Embryol.*, 38: 77-92.
- [9] Lehman, J. M. et al., 1974, *J. Cell Physiol.*, 84: 13-20.
- [10] Swartzendruber, D. E. et al., 1976, *Cancer Res.*, 36: 1894-1899.

大鼠肝和 BERH-2 肝癌 5 kb BamHI DNA 片段的克隆及其转录研究*

叶 锋**

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

已有文献报告指出, 转录产物在细胞核、质间的选择性运转机制的失控, 与细胞癌变有关。如与大鼠肝细胞相比, 大鼠肝癌细胞有更多的与重复顺序 DNA 互补的细胞核 RNA 出现在细胞质中^[1-7]。本实验室曾用饱和杂交实验证明与中度重复顺序 DNA 互补的细胞核 RNA 的顺序复杂性比肝细胞减少 60.0%, RNA 由细胞核向细胞质内的运转, 肝癌细胞高于正常肝细胞^[8]。本文对在大鼠肝和肝癌 BERH-2DNA 中与细胞核 RNA 杂交有差异^[9]的 5 kb BamHI 重复顺序 DNA 片段进行了克隆, 进一步以来自正常肝 DNA 的克隆质粒、pL5 B-4, 和来自肝癌 DNA 的克隆质粒、pH 5 B-1 的插入片段为探针, 比较它们的转录产物在大鼠正常肝和肝癌细胞核和质中分布的变化。结果提示其转录产物在正常肝细胞核、质间的选择性运转特征, 在肝癌细胞中发生变异。

材 料 和 方 法

一、实验材料

正常大鼠肝取自 3 个月左右的 Wistar 大鼠, 饥饿过夜。

移植性大鼠肝癌 BERH-2, 是本所用二乙基亚硝胺诱发的 Wistar 大鼠原发性肝癌移植到刚断奶的 Wistar 大鼠腹腔建株而成^[10]。移植后 10-13 天取肿瘤块, 去除坏死组织。

二、核酸抽提

1. 大分子 DNA 抽提: 根据 Gross-Bellard 等方法^[11], 略有改变。DNA 样品经 0.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 分子量大于 T₄ DNA (160 kbp)。

2. RNA 的分离:

细胞核 RNA 和细胞质 RNA 抽提同前^[12]。

多聚核蛋白体 RNA 抽提则采用蔗糖密度梯度离心法分离多聚核蛋白体^[13], 再从多聚核蛋白体抽提多聚核蛋白体 RNA。

rRNA 的抽提同前^[14]。

poly A⁺核 RNA 和 poly A⁻核 RNA 用 oligo(dT) 纤维素(本所产品)吸附柱分离, 方法同前^[15]。

所有采用的 RNA 样品均经过 1% 或 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 无明显降解。poly A⁺核 RNA, 没有

* 硕士学位论文, 指导教师张玉砚。本课题得到中科院科学基金资助、中科院上海分院青年科技工作鼓励基金的部分资助。徐亚男、麻孙恺协助工作, 孙兰英提供 BERH-2 肝癌材料, 特此致谢。

** 现工作单位: 中国科学院上海生物工程实验基地。