

仅能够提高原生质体的分裂频率,而且能够加速原生质体的发育进程;除木糖外,葡萄糖、甘露醇和山梨醇均可作为原生质体培养初期的渗透稳定剂。

来源于下胚轴原生质体的愈伤组织在含13毫克/升BA、0.1毫克/升GA₃或3毫克/升BA的MS培养基上诱导出了芽,含0.05毫克/升IBA的MS培养基上诱导出根,从而获得了完整植株。

图版说明

1. 刚游离的下胚轴原生质体 400×
2. 原生质体发生第一次分裂 400×
3. 原生质体发生第二次分裂 400×
4. 原生质体再生的大细胞团 400×
- 5、6. 原生质体发育成的胚性和非胚性愈伤组织
7. 愈伤组织出现芽的分化
8. 原生质体培养再生成完整植株

参考文献

- [1] Karatha, K. K., M. R. Michayluk, K. N. Kao, O. L. Gamborg, and F. Constabel, 1974, *Plant Sci. Lett.* 3 (4): 265-271.
- [2] Bidney, D. L., J. F. Shepard, and E.

- Kaleikau, 1983, *Protoplasms*, 117: 89-92.
- [3] Glimelius, K., 1984, *Physiol. Plant*, 61: 38-44.
- [4] Chatterjee, G. and S. R. Sikdar, 1985, *Plant Cell Reports*, 4 (5): 245-247.
- [5] Chuong, P. V., K. P. Pauls, and W. D. Bebersdorf, 1987, *In vitro Cellular developmental biology*, 23 (6): 449-452.
- [6] Chuog, P. V., K. P. Pauls, and W. D. Bebersdorf 1987, *Plant Cell Reports*, 6: 67-69.
- [7] 李文彬, 陈正华, 宋玉华, 张大卫, 1986, *遗传学报*, 13(3): 184-187.
- [8] Xu, Z. H., M. R. Davey, and E. C. Cocking, 1981, *Z. Pflanzphysiol.*, 104: 289-298.
- [9] Durand, J., I. Potrykus, and G. Donn, 1973, *Z. Pflanzenphysiol.*, 69: 26-34.
- [10] 杨美珠, 贾士荣, 1989, *植物学报*, 31 (2): 89-94.
- [11] Bhatt, D. P. and G. Fassuliotis, 1981, *Z. Pflanzenphysiol.* 104: 81-89.
- [12] Qian, Y. Q., Y. L. Zhou, Q. G. Cai, Z. G. Zhang, and X. Yan, 1984, the Abstracts of Internat. Sym. Genetic Manipulation in Crops, Beijing, China, pp, 100.
- [13] Li, L. C. and H. W. Kohlenbach, 1982, *Plant Cell Reports*, 1: 209-211.

cAMP 对癌细胞增殖周期的影响和膜表面 ConA 受体分布相关性

陈莉* 梁云萍 牛敏英 石永进 王代树
(北京市肿瘤防治研究所细胞生物学室)

癌细胞和正常细胞的增殖都是通过细胞周期运转而实现的。而细胞周期可直接受到环核苷酸(cAMP)的调节控制,用外源性cAMP及其衍生物对细胞周期的影响有不同结果^[1-3]。伴随周期的改变,一些重要的细胞膜性质如膜表面受体分子的表达与运动^[4-6]、膜抗原^[7]、膜结合酶^[8]以及膜电荷等等也随之发生变化。但是在癌细胞周期变化中,特别是一些已知的

细胞膜表面转化标志^[9,10]与周期及各种表型之间的相关性等尚不完全清楚。

本文研究了在艾氏腹水瘤细胞(EAC)生长增殖过程中cAMP对其周期影响和细胞膜表面

本工作系自然科学基金资助项目。

* 内蒙医学院组织胚胎教研室。

FCM分析由北京医科大学细胞室流式光度术组测试处理,特此致谢。

刀豆球蛋白 A(ConA)受体分布状态与DNA合成之间相关性。结果表明: EAC细胞在cAMP诱导下, S期与G₂+M期细胞比率和LI(³H-TdR标记指数)和MI(有丝分裂指数)发生显著变化, 这些变化和细胞膜表面ConA受体复合物分布状态密切相关。

材料与 方法

一、材料和试剂

1. 动物的处理: 昆明种小白鼠(18—22 g), 每批30只, 分组和处理方法与以前相同^[11,14]。接种EAC后5、7、9、11天从实验组(经cAMP处理)和对照组各选3只, 先分别抽取少量腹水待用。然后腹腔注入³H-TdR(0.7 μCi/克), 1小时后, 处死动物, 取腹水

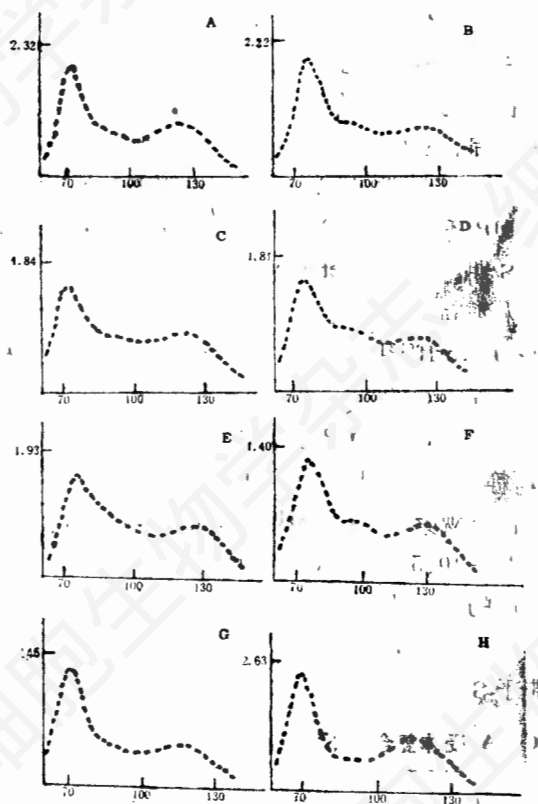


图 cAMP对EAC细胞周期分布影响

对照组: A、C、E、G, 接种后5、7、9、11天
实验组: B、D、F、H, 接种后5、7、9、11天
纵座标: 细胞数量($\times 10^4$);
横座标: DNA相对含量;

涂片。

2. 试剂: cAMP(Sigma); 氨茶碱(国产); 剂量同(11、14); 异硫氰酸荧光黄-刀豆球蛋白A[CF-ConA]200 μg/ml(Sigma); 碘化丙啶(Sigma)按Dean^[12]方法配制; 核4乳胶(北京401所)。

二、cAMP对EAC细胞周期分布影响

取上述待用腹水各3滴于含有PBS的试管内, 离心洗涤两次, 进行以下测定: (1) 台盼蓝(Trypanblue)排除法测定活细胞比率。(2) DNA荧光标记和流式细胞光度术(FCM)分析: 细胞用70%酒精固定, 按Dean等人^[12]方法用碘化丙啶(Propidiumiodide PI)进行荧光标记, 再用FCM测定每个细胞DNA相对含量。光源为氩离子激光器, 激发波长514.5 nm, DNA发出的荧光通过570 nm滤光片, 光信号经光电倍增管放大、转换、再经多道脉冲分析器分析, 最后微机贮存。经拟合程序对细胞周期进行拟合(见图), 计算出G₀+G₁S、G₂+M各时相细胞所占百分比(表1)。

三、LI测定(³H-TdR掺入)

处死动物后, 各取1滴腹水涂片, 经固定、涂核4乳胶、曝光、显影、Giemsa染色等步骤, 观察1000个细胞, 算出LI。

四、MI测定

每只动物取腹水1滴涂片, 固定、Giemsa染色, 计数1000个细胞中有丝分裂的细胞数。

五、ConA受体复合物的分布

取腹水5滴, 用PBS离心洗涤, 然后调整细胞浓度至 1×10^6 /ml。混匀后取5滴, 避光加入F-ConA 100 μl(200 μg/ml), 于37℃孵育8分钟, 经PBS洗涤去除游离F-ConA, 用PBS:甘油(10:1)混合液悬浮细胞, 取1滴封片, 在荧光显微镜下观察照像, 并计数1000个细胞, 以观察ConA受体复合物的各种分布状态。

实验结果

一、cAMP对EAC细胞周期分布的影响

结果如图、表1所示, 图中可见均为两个峰, 左侧高峰为G₀+G₁期细胞分布, 右侧低峰为G₂+M期细胞分布; 两峰之间为S期细胞分布。各时相细胞百分比如表1所示, 接种后5—9天实验组与对照组的G₀+G₁细胞比率均急剧下降。但实验组的S期细胞比率显著上升达45.3%, 且高于对照组; 对照组的G₂+M期细胞比率上升达3倍多, 高于实验组。至11

表 1 EAC 细胞在 cAMP 诱导下细胞周期分布(%)

时间(天)	5		7		9		11	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
G ₀ +G ₁	40	35	23	20	13	19	39	45
S	53	61	67	64	77	68	57	53
G ₂ +M	7	4	10	15	10	13	4	2

天实验组 S 期细胞比率明显下降, 与对照组差异变小, 但 G₂+M 细胞比率反而高于对照组。

二、LI 测定(³H-TdR 掺入)

如表 2 所示, 实验组 5—9 天 LI 增加, 显著高于对照组, 至第 11 天 LI 急剧下降, 反而略低于对照组。

表 2 cAMP 对 EAC 细胞 ³H-TdR 掺入率(LI)的影响

时间(天)	5		7		9		11	
组别	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
5	42.33	32.8	53.45	38.75	48.26	34.32	32.86	36.24
7	53.45	38.75	48.26	34.32	32.86	36.24		
9	48.26	34.32	32.86	36.24				
11	32.86	36.24						

三、MI 测定

如表 3 所示, 接种后 5—9 天实验组显著低于对照组, 至第 11 天实验组 MI 显著上升, 而对照组仍在下降。

四、ConA 受体复合物的分布

如表 4 所示, 接种后 5—9 天实验组帽状

表 3 cAMP 对 EAC 细胞 MI 的影响

时间(天)	5		7		9		11	
组别	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
5	3.2	5.6	2.9	4.5	2.6	4.2	3.3	3.8
7	2.9	4.5	2.6	4.2	3.3	3.8		
9	2.6	4.2	3.3	3.8				
11	3.3	3.8						

表 4 cAMP 对 EAC 细胞膜表面 ConA 受体复合物不同分布%

时间(天)	5		7		9		11	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
受体分布(%)								
帽状	13.4	10.8	26.43	17.32	22.6	16.7	22.15	18.37
不连续簇状	3.67	3.44	4.34	11.57	2.35	10.67	16.87	8.97
连续簇状	82.28	86.15	69.23	71.7	74.23	72.6	61.3	72.47

分布高于对照组, 以 7—9 天最为显著, 分别高 34% 和 26%, 与此同时对照组的断续簇状分布都显著高于实验组 1.67 倍和 3.54 倍。至 11 天实验组断续簇状分布反比对照组高出 88%, 而连续簇状分布比对照组低。

讨 论

从图、表 1 所示, 接种后 5—9 天两组的 G₀+G₁ 期细胞比率急剧下降, 说明细胞进入增殖状态的数量增多, 但两组细胞的进程却有显著不同。实验组 S 期细胞比率上升; 对照组是 G₂+M 期细胞比率上升, 说明 EAC 细胞在 cAMP 诱导下未能进入 G₂+M 期, 而是被阻滞于 S 期, 这与 Meeteren 等人^[1]结果一致, 而与他人不同^[2,3], 这是由于用药和靶细胞不同所致。Jastorff^[1,5]认为这些差异可能是由于 cAMP 和不同细胞的受体蛋白质分子间相互作用的类型不同所致。cAMP 对细胞周期阻断作用 Tisdale 等人曾证明是与调节 DNA 合成有关。因此我们还观察了 LI 和 MI 的影响。实验组 LI 上升 29%—40.5% (与对照组比), 说明进入 DNA 合成的细胞比率增加, 然而 MI 却低于对照组 55.17%—75%。这就进一步说明细胞确被阻滞于 S 期。在接种后 11 天, 实验组 S 期细胞比

率下降(26%), $G_2 + M$ 期细胞比率上升, 说明被阻滞细胞释放进入 $G_2 + M$ 期, 因此导致 LI 下降(31.9%)和 MI 上升(27%)。这就阐明了实验组在接种后 11 天癌细胞急剧增殖^[11]的原因。同时还说明 EAC 细胞在 cAMP 诱导下于接种后 5—9 天各种“逆转”表型, 特别是癌细胞增殖抑制^[11,14]并不是癌细胞的分化表现, 仅仅是由于癌细胞暂时阻滞于 S 期所引起。

除上述实验外, EAC 细胞在生长过程中还有自己的生长特征^[15]和其周期时间^[16]的变化。接种 9 天以后, 细胞从快速生长期进入平稳生长期, 周期延长, 并逐渐趋于衰亡, 因此表 1—3 均可见到 9 天以后, 实验组与对照组各种指标基数趋于下降, 特别是 MI(表 3)和 11 天的 $G_2 + M$ 期(表 1)更为明显。但实验与对照之间的平行对比仍表现出显著差异。

伴随细胞周期的改变, 细胞转化或分化都将在膜表面出现各种表型变异。细胞膜表面一些受体的分布与表达往往是细胞增殖、分化的重要标志^[9,10]。图版照片表明: 无论是实验组或对照组细胞膜表面 ConA 受体复合物的荧光分布均有 3 种方式: 即连续均匀性分布、断续簇状和帽状分布。这是由于每组细胞都是混合群体细胞, 处于不同周期和不同性能的表现。其机制是随着细胞骨架(微管、微丝)组装变异而变化^[17,18]。经 cAMP 诱导后 5—9 天, 实验组帽状分布的细胞比率显著高于对照组(24.1%、12.6%、35.3%)(表 4)。Bourguignon 等人^[14]在小鼠 L_{1210} 细胞中证明: ConA 受体复合物呈帽状分布者主要是 S 期细胞特征。说明本实验组这一结果的趋势和前面结果一、二之间相符。对照组的断续簇状分布比率又显著高于实验组。(2.6—4.5 倍)。这是由于对照组细胞仍按原有的周期运转, 所以 S 期细胞与受体复合物帽状分布的比率均低于实验组。至第 11 天实验组呈簇状分布的细胞比率急剧增加, 高出第 9 天 6.18 倍, 比对照组高 1 倍(表 4), 反应出 S 期细胞比率下降, 说明 S 期细胞释放进入周期运转。

导致上述结果的原因可能与细胞内多个癌

基因表达变化密切相关(待发表)。同时还有待我们进一步探讨 cAMP 和其他信使系统在增殖调控中相互拮抗和协调的关系, 以寻找上述 S 期阻滞与释放的机制。

摘 要

用流式光度计、放射自显影和荧光标记等方法研究了体内艾氏腹水癌(EAC)细胞经 cAMP 诱导后, 在其增殖过程中细胞周期和细胞膜表面 ConA 受体复合物分布之间的相关性。结果表明: 接种后 5—9 天实验组 S 期细胞增加 45.3%, 同时 ConA 受体复合物分布呈帽状的比率和 LI(3H -TdR 掺入)均大于对照组。但 $G_2 + M$ 期细胞的比率及 MI 却小于对照组, 后者呈断续簇状分布的细胞比率大于实验组。至接种后 11 天, 实验组细胞断续簇状分布的比率急剧增加, 达 6.18 倍。这时 S 期细胞比率和 LI 均下降, 而 $G_2 + M$ 期细胞反而大于对照组。

参 考 文 献

- [1] Meeteren Van A. et al., 1982, *In vitro* 18: 891-899.
- [2] 赵孟莲等, 1986, 生物化学生物物理进展, 1: 44-47.
- [3] Knightbridge A. and R. K. Ralph. 1981, *Mol. cell Biochem.*, 34: 153-164.
- [4] Bourguignon L. Y. W. et al., 1983, *Cell Biol. International reports*, 7: (2) 109-119.
- [5] Lustig S. and D. H. Pluznik. 1983, *J. cell Physiol.*, 115: 87-92
- [6] 王代树等, 1989, 实验生物学报, 22 (4): 407-415.
- [7] Britten R. A. and J. E. D. Dyson. 1987, *Cell Biochem. Funct.* 5 (b) 17-26.
- [8] Takase K. et al., 1988, *Leuk. Res.*, 12 (7) 583-590.
- [9] Chaplinsk T. J. et al., 1986, *Cancer Res.* 46: 1203-1207.
- [10] Martin Bur and W. A. Franklin, 1983, *Lab. Invest.* 48: (1) 11 A.
- [11] 王代树等, 1983, 解剖学报, 1: 87-92.
- [12] Dean P. N. et al. 1982, *Cytometry*, 3: 188.
- [13] Jastorff B. 1982, *In cell regulation by*

- intracellular signals. Plenum Press New York.
- [14] 王代树等, 1985, 实验生物学报, 18: 171-176.
- [15] 吴曼等, 1976, 中华病理学杂志, 3: 105-112
- [16] Tannock I. F. 1969, *Cancer Res.*, 29: 1527-1534.
- [17] Staroselsky A. et al., 1986, *Cell Biol.*, 10: 121-129.
- [18] Devirgilus L. C. et al., 1980, *Mal. Biol.*, 26: 533-540.

鸡血清极低密度脂蛋白对鸡颗粒细胞孕酮合成的影响

吴翠贞

(南京医学院病理生理教研室)

1981年 Krumins 等^[1]报道了极低密度脂蛋白(VLDL)与低密度脂蛋白(LDL)与鸡的卵母细胞膜的 VLDL 和 LDL 受体有专一的竞争结合。有人指出^[2,3]携带胆固醇和其他脂质的 VLDL 能从鸡的血液直接转移到鸡卵母细胞,并通过免疫化学、电泳和氨基酸的分析,证明鸡血清中的 VLDL 和蛋黄中的 VLDL 是相同的。据此,我们用鸡的滤泡颗粒细胞(granulosa cells, G. C.)加鸡血清 VLDL, 37℃, 振荡保温,然后用放射免疫方法测定孕酮量。发现孕酮生成量非常显著地增多。此项研究国内尚未见报道,故将此实验方法和结果报告如下。

材料和方 法

一、材料

1. 试剂

绵羊促黄体生成素(OLH)与 199 培养液分别由美国 National pituitary agency Grand Island Biological 公司提供。胶原酶、大豆胰蛋白酶抑制剂、肝素和牛血清白蛋白(BSA)从 Sigma 公司购买。测定孕酮药箱是 F. Hertelendy 实验室制备。

2. 实验动物

采用 Leghon 母鸡(8—12个月),在产卵前 1—3 小时,用颈椎脱臼法杀死,剖腹,取卵巢上最大滤泡,立即放入 4℃, 0.01 mol/L, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中备用。

(二、方法

1. 制备鸡的最大滤泡颗粒细胞

基本采用 Hammond 等^[4]方法,将滤泡作一长 1.5 厘米的切口,在 80—90% 蛋黄流出后,取出滤泡膜和颗粒层,用上述磷酸盐缓冲液洗 3 次,去掉滤泡膜,小心分离颗粒层,并将其移到 199 培养液中(pH 7.4, 内含 10 mmol/L HEPES, 0.1% BSA)。用此培养液洗 3 次后,加 2 ml 内含胶原酶 2.7 mg 和少量大豆胰蛋白酶抑制剂的培养液,放入 37℃ 水浴中振荡 7 分钟,则颗粒层分散为 G. C.。此细胞再用 199 培养液洗 3 次,用台盼蓝检测细胞存活率,一般都在 90% 以上。将前述细胞密度稀释至 10⁵ 细胞/ml, 放冰浴中备用。

2. 鸡血清脂蛋白分离按照序列超速离心法^[5]进行。

3. G. C. 保温参照 Sgarlata 等方法进行^[6], G. C. (10⁵/ml)加 VLDL(最终浓度 400 μg/ml), 37℃, 水浴振荡 1 小时,再加不同量的 OLH(浓度范围 1—50 ng/ml), 37℃, 水浴振荡 3 小时,取出立即放入冰浴中,终止反应。离心 1000 g, 10 分钟(4℃),取上清用放射免疫方法测定生成的孕酮量。此为 VLDL 组。

4. 方法同上,但 G. C. 培养液只加 OLH 而不加 VLDL。此为 OLH 组。

5. 方法仍同上,但培养液中不加 VLDL 和 OLH, 作为对照组。

本工作在美国圣路易斯大学医学院 F. Hertelendy 实验室进行,工作中得到 Hertelendy 教授的指导和帮助,特此致谢。