

照射单细胞的电子显微镜技术。在光学显微镜下,预选择的单细胞受激光照射后,单层细胞经过固定、包埋、切片等一系列过程,仍然能在电镜下重新找到所选择的单细胞。Y-HpD加激光照射后的Hela单细胞电镜研究表明:光剂量为1.88毫焦/微米²照射核仁时,不仅受照射部位出现透亮区,而且未受照射的胞质内的线粒体等也发生异常病变。当光剂量增加到4.5毫焦/微米²照射胞质时,其损伤不仅在受照射部位明显可见,并且,另一部分未受照射的细胞质也发生裂解,而细胞核无显著变化。研究结果表明,胞质与核相比,胞质更易受到损伤,而细胞质内的线粒体对HpD加激光有较大的敏感性。

图版说明

图版 I

1. 正常培养的人宫颈癌Hela细胞。细胞的核(N)较大,核仁(Nu)数目不定,大小不等。核膜清晰,核质中常染色质多,异染色质少。胞质内有丝粒体(M)、溶酶体、核糖体等。×4600
2. 示Hela细胞的胞质内有丰富的微丝(MF)。×43000
3. 经Y-HpD加激光照射的Hela细胞的超显微变化。核仁的纤维中心增大,核仁丝结构模糊不清。胞质内的线粒体等其他细胞器也发生异常。左上图为细胞的光学照片,箭头所示位于被照射的核仁部位。×6000

4. 示细胞胞质内线粒体(M)的嵴遭致破坏,出现不均一的灶性空化等。×55000

图版 II

5. 经Y-HpD加激光照射细胞中的胞质,受照射部位(箭头所示)与未照射部位均发裂解,而核(N)没有显著变化。左上图为细胞的光学照片,箭头所示位于被照射的胞质部位。×3300
6. 显示出胞质内线粒体(M)的灶性空化与嵴残缺不全。SLY为次级溶酶体。PLY为初级溶酶体。×37000

参考文献

- [1] Dougherty, T. J., 1978, *Cancer Res.*, 38, 2628-2636.
- [2] 哈献文等, 1983, 中华医学杂志, 63(6): 322-325.
- [3] 梁宏等, 1986, 中华肿瘤杂志, 8(1): 29-31.
- [4] 梁宏等, 1986, 科学通报, 13: 1019-1021.
- [5] A. Coppola, MD, E. Viggiani, MD, L. Salzarulo, PhD, and G. Rasiie, MD. 1980, *Am. J. Pathol.*, 99: 175-192.
- [6] 卢志达等, 1983, 中华医学杂志, 63(6): 336-338.
- [7] 司静懿等, 1985, 中国医学科学院学报, 7(4): 244-246.
- [8] 安钢等, 1986, 实验生物学报, 19(2): 173-181.
- [9] Lih-Huei L. Liaw and Michael W. Berns., 1981, *Journal of Ultrastructure Research*, 75, 187-194.
- [10] 梁宏等, 1984, 应用激光, 4(5): 231-234.

小鼠乳腺癌细胞淘式离心后 G₁ 相部分的生物学特征及放射敏感性

程文英 周锦锋 徐 萍 罗伟华 丁志圣

(上海医科大学放射医学研究所)

从肿瘤生长动力学观点,实体肿瘤不是均一的群体,而是由以下三部分所组成,即快速增长进入细胞周期的部分、处细胞周期之外相对静止的部分和无增殖能力及濒临死亡的部分⁽¹⁾。在离体培养条件下,接种2—3天呈指

数型生长的细胞群P中有相当比例的增殖期细胞,以后5—10天进入坪区的细胞群Q中大部分为相对静止期细胞。P细胞和Q细胞的生

本工作在美国Utah大学医学中心L. A. Dethlefsen教授协助下进行,特此致谢。

物特征不同,就是在Q细胞中,其相对静止部分并非固定不变,在一定的条件下可重新进入细胞周期,促使肿瘤增生^(2,8)。本文以小鼠乳腺癌细胞66为模式,采用淘式离心方法,探讨同一肿瘤细胞系在不同生长状态下G₁相部分的特征。

材料和方法

1. 细胞单层培养

66细胞培养在15%血清(3%胎牛血清、6%小牛血清、6%马血清)的GIBCO Waymouth's完全培养液中⁽²⁾,内含100单位/毫升青霉素和100微克/毫升链霉素,按 2×10^4 /毫升接种细胞。应用Hoechst 33258方法每月做一次支原体污染检查。细胞培养第2天取样的称P细胞,不换培养液连续培养7天收获的为Q细胞。

2. 淘式离心

按Sweigert法⁽⁴⁾,采用Beckman JE-6 B淘洗转子,流速30毫升/分,在P和Q细胞中分别收集含G₁相的细胞,经Ortho, Westwood MA的FCM分析DNA相对量进行鉴定,由P细胞分离的为P-G₁部分;Q细胞分离而得的为Q-G₁。

3. 细胞体积分布

由Coulter ZBI型主机连接P 64细胞体积分析器测得。

4. 细胞集落形成

将细胞分置于常规完全培养液的6 cm²培养皿内,在37℃、5%CO₂培养箱中孵育10天,由结晶紫染色,解剖镜计数,凡50个细胞以上的为一集落,实验所得均值为重复3—4次结果。

细胞存活率 = $\frac{\text{计算的集落数}}{\text{细胞种植数} \times \text{集落形成单位(PE/100)}}$

5. FCM测定

方法参照Ridinger资料⁽⁶⁾,即 1×10^5 /毫升细胞在1.0毫克/毫升RNA酶作用后,经碘化丙啶PI染色,由FCM分析,通过计算机程序求得DNA相对分布值。

6. 连续H³-TdR标记

以1微居里/毫升浓度的H³-TdR加入66单层培养中,36小时后制片,用70%乙醇固定,浸NT B3核乳胶,避光保存于4℃冰箱10—14天,至少计数500个细胞,本底为5颗粒/细胞核。

7. 照射条件

用Phillips X线机进行照射,250 KVP, 15 mA, 3 mmAl, 剂量率1.95 格瑞(Gy)/分。

结果和讨论

图1为66细胞在T₂₅(25 cm²)培养瓶中的生长曲线,接种 1×10^5 细胞,2—5天呈指数式生长,倍增时间16—18小时,第5天细胞数达 11.4×10^6 /T₂₅;然后出现坪区生长阶段,细胞的增殖和死亡数目达到平衡,在此期间,如原位更换完全培养液刺激Q细胞生长,4小时即见细胞增加,6小时达新的坪段。

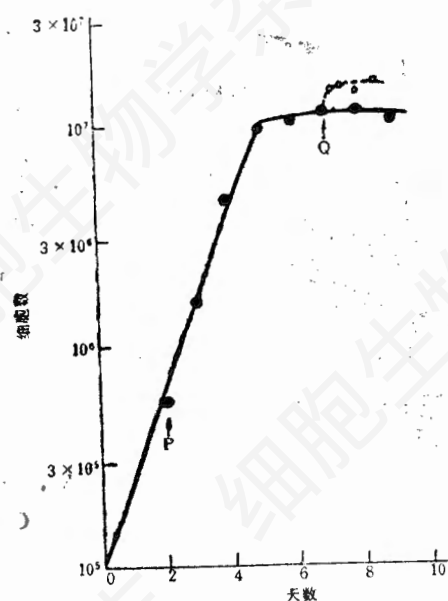


图1 小鼠乳腺癌细胞66的生长曲线

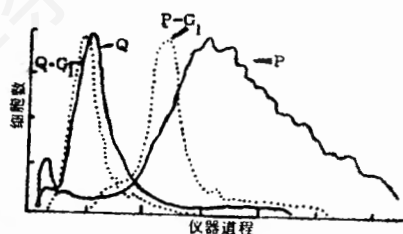


图2 淘式分离前后小鼠乳腺癌细胞的Coulter体积分布

——未经分离的P及Q细胞
.....分离后P-G₁和Q-G₁(G₀/G₁)部分

图2为淘式离心前后小鼠乳腺癌细胞各组分

表 1 淘式离心前后小鼠乳腺癌细胞的生长特征(均值±标准误)

	离心前 P	离心后 P-G ₁	离心前 Q	离心后 Q-G ₁
细胞直径(微米)	13.6±0.9	11.9±0.6	10.3±1.0	8.3±0.8
H ³ 标记指数(%)	98.3±2.0	97.1±1.0	7.6±1.2	1.7±0.5
细胞周期分布(%)				
G ₁	38.9±3.5	91.2±4.1	85.5±5.0	94.3±3.3
S	47.7±2.7	7.1±1.2	8.3±4.1	4.3±1.0
G ₂ +M	13.0±1.5	0.8±0.02	6.0±1.1	0.7±0.08

的 Coulter 细胞体积分布图, 结合表 1 的细胞直径测定资料, 分离前的 P 细胞明显大于 Q 细胞, 分离后的 P-G₁ 和 Q-G₁ 细胞的体积均比相应的原始群体 P 和 Q 小, 有显著的统计学意义。

从表 1 中可见连续 H³-TdR 标记指数(LI) 结果, 实验证明 P 细胞呈快速增殖状态, 在标记二个倍增期之后, 98% 以上的细胞受放射性胸腺嘧啶核苷掺入; 平台式生长的 Q 细胞则长势缓慢, 标记指数为 7.6%。淘式离心后, P-G₁ 组分的 LI 甚高, 与原来的 P 细胞持相同水平, 反映增殖活跃; 而分离后的 Q-G₁ 组分其 LI 比原先未分离的 Q 细胞还低, 仅 1.7%, 基本处静止状态。

结合表 1 的细胞周期分布结果分析, 淘式离心分离所得的 P-G₁ 和 Q-G₁ 确实是含 G₁ 相 DNA 含量的细胞, 虽然 P 细胞中 S 和 G₂+M 相高达 60%, 但离心后这部分细胞的比例可降至 7.9%; 同样, 在相对静止的 Q 细胞中, Q-G₁ 组分可浓集 94% 以上的 G₁ 相细胞, 说明淘式离心分离效果是满意的; 同时, 实验也反映出分离与不分离的各组间其 DNA 相对含量分布的差异。

图 3 是淘式离心后 P-G₁ 和 Q-G₁ 细胞的放射存活曲线, 由图可见, 与之相比较的 Q 细胞的放射反应比 P 细胞灵敏, P 细胞的 D₀ 1.14 Gy, D_q 3.23 Gy; 而 Q 细胞的 D₀ 0.90 Gy, D_q 1.61 Gy。淘式离心后的 Q-G₁ 细胞比原来的 Q 细胞对放射更敏感, D₀ 0.90 Gy, D_q 1.26 Gy; 但 P-G₁ 细胞的放射反应基本与 P 细胞类同, D₀ 1.09 Gy, D_q 3.36 Gy。在前

文我们曾做过实验, 在 Q 细胞原位更换完全培养液刺激其生长, 4 小时后再接受照射, 发现放射敏感性迅即比 Q 细胞有所降低, D₀ 1.06, D_q 2.72⁽⁶⁾, 说明当细胞由相对静止进入细胞周期后, 放射反应会有变化, 这和细胞内产生生物物理和生物化学的改变有关, Wallen 等证实 66 P 细胞向 Q 方向过渡时, RNA 含量可降低 60%⁽⁷⁾。本实验结果进一步证明, 即使都具有相同 DNA 含量的 G₁ 相细胞, 由于原来所处的生长状态不同(P-G₁ 来自 P 细胞, Q-G₁ 来自 Q 细胞), 其细胞体积、增殖能力和放射敏感性都表现出固有的异质特性, 提示研究 G₁ 相 DNA 细胞的生物学特征及放射敏感性, 在肿瘤生长动力学及抗癌治疗中有其独特的意义。

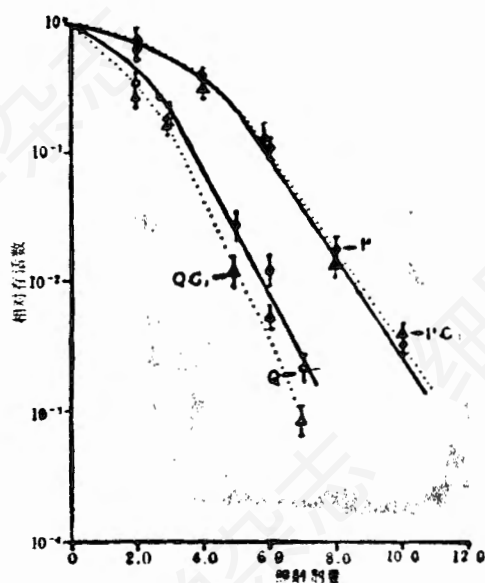


图 3 小鼠乳腺癌细胞的放射存活曲线

摘 要

采用浓集 G_1 相细胞的淘式离心方法分离小鼠乳癌细胞 66, 即从培养第 2 天的 P 细胞中分得 $P-G_1$ 部分, 由培养第 7 天的 Q 细胞中分得 $Q-G_1(G_0/G_1)$ 部分。

淘式离心后的 $P-G_1$ 和 $Q-G_1$ 细胞, 其体积相应比分离前的 P 和 Q 减小; 通过 FCM 检测, 分离后两亚群中 90% 以上的细胞属 G_1 相; 但连续 H^3 标记结果显示, $P-G_1$ 的标记指数和 P 细胞接近高达 97.1%, $Q-G_1$ 的标记指数比 Q 细胞低仅 1.7%; 放射存活曲线表明, 分离前的 Q 细胞比 P 细胞放射敏感性高, 分离后 $P-G_1$ 的放射反应基本与 P 细胞相同, 而 $Q-G_1$ 的放射敏感性高于 Q 细胞。实验证明, 在具有同样 DNA 含量的 G_1 相细胞, 由于原来

所处的生长状态不同($P-G_1$ 来自 P 细胞, $Q-G_1$ 来自 Q 细胞), 其细胞体积、增殖能力和放射敏感性均现出其固有的异质特性。

参 考 文 献

- [1] Bauer, K. D. et al., 1981, *J. Cell Physiol.*, 108:99-112.
- [2] Dexter D. L. et al., 1978, *Cancer Res.*, 38:3174-3181.
- [3] Potmesil, M. and Goldfeder, A., 1980, *Cell Tissue Kinet.*, 15:563-570.
- [4] Sweigert, S. E. et al., 1988, *Radiation Res.*, 116:228-244.
- [5] Ridinger, D. N. et al., 1986, *Radiation Res.*, 108:127-138.
- [6] Cheng, W. Y. et al., 1989, *Int. J. Radiat. Biol.*, 56:463-483.
- [7] Wallen, C. A. et al., 1984, *Cell Tissue Kinet.*, 17:65-77.

实验技术

新生大鼠顶盖脑组织提取液的生化分析

—Phast System 电脑快速电泳

周明华 林斯骏 赵丽萍 吴奎印

(香港大学医学院解剖学系)

任 麟 孙

(香港中文大学医学院解剖学系)

电泳(聚丙烯酰胺凝胶电泳, PAGE 或 SDS-PAGE 及等电聚焦凝胶电泳, IEF)对蛋白质的精确分离性能是其他任何方法都难于得到的, 目前在生命科学中已经成为许多分科研究的有效工具。一般电泳用大块凝胶, 在缓冲槽中垂直向地进行, 或在平面上作等电聚焦凝胶电泳(样品的分离距离超过 10 厘米), 而且样品量用得也多。近年来由于电泳引用电脑等技术, 在许多方面都有相应的改进。如超薄凝胶片由于使用共价键凝胶改进了玻璃板或聚酯膜^[1], 并在凝胶片裱以塑料背衬, 防止在染色或干燥时的变形; 在冷却上由于超薄凝胶片的

小切面可减低热量、缩短热输送、增大了电场强度(field strength), 并缩短了聚焦时间和分离距离(3.8 厘米); 使用微量样品能够在较短的时间里使蛋白质获得良好的分离^[2-4]; 使用缓冲条(琼脂糖加缓冲液)代替了缓冲液和缓冲槽^[5]。所以 Görg 等(1982)认为这是理想的平面电泳设备。本文用 Phast System 分离了顶盖脑组织提取液, 并用其染色槽连续地进行电脑操作染色。

材 料 与 方 法

1. 顶盖提取液的制备^[6] 4 只 Sprague Dawl-