

仍然存在着各种受体,对 β -肾上腺素能激动剂和拮抗剂,以及中草药提取物均有反应。另外也表明体外培养的心肌细胞是一种可以应用于生理、病理及药理研究的较好的实验细胞模型,值得进一步推广。

结 语

本文报告体外原代培养 Wistar 种乳鼠心肌单层细胞,在适宜条件下可长期维持搏动达 106 天。长期培养的心肌细胞在功能及形态上有某些老化的表明,但仍保存对 β -受体激动剂、拮抗剂及中草药提取物的反应性,并能反映出不同药物的相互影响,说明体外培养的心肌细胞是一种较好的实验材料,可广泛用于细胞或分子水平的生理学、病理学、药理学及生

物学研究。

参 考 文 献

- [1] 李连达等 1980, 中华心血管病杂志 2: 141.
- [2] 李连达等 1980, 中医杂志 6:68.
- [3] Okarma, T. B., et al. 1971, *Exp Cell Res.* 69:128.
- [4] Kasten, F. H.: *Cell Impairment in Aging and Development* (VJ Cristofalo et al eds) 389, Plenum Press, New York 1975.
- [5] Harary, I. et al., 1960, *Science* 131: 1674.
- [6] Harary, I. et al., 1963, *Exp Cell Res.* 29: 451.
- [7] Acosta, D. et al., 1977, *In Vitro* 13:818.

快速制备小鼠外周血细胞染色体*

杨丽君 王天宇 陶毓顺 周素华

(南京医学院)

在实验研究中,选择和建立适当的动物模型是一项很重要的工作。我们在急性辐射损伤的有关实验中,从细胞染色体观察的需要出发,常选用小白鼠。由于应用外周血细胞体外培养一般费时较长(需3—5天)^[1,2],加上培养条件要求较高,因此带有一定局限性。同时,由于人为培养条件常引起一些不应有的染色体变化,如间隙、断裂和其他结构异常等;或由于培养过程中细胞死亡,和随后生长过程中自然修复,而使某些染色体畸变丢失,会影响一些研究的真实性。我们参考部分资料^[1,2,3],并结合实验室中具体条件,在操作上作了一些改进,仅需7—8小时,即可从小鼠外周血细胞中制备细胞染色体;并同时制取骨髓细胞染色体以作平行比较。本文着重介绍快速制备小鼠外周血细胞染色体方法以及讨论与分析实验中观察到的有关问题。

材 料 与 方 法

一、实验小鼠的选择

从南京生物制品厂引入的繁殖鼠,体重为17.5克至25克。挑选毛色光泽,表现灵活,体表健康,无瘤结节的正常小鼠(♂10只,♀18只)。

二、染色体制备方法

每只小白鼠按每克体重腹腔注射5微克国产秋水仙素(配制浓度为0.6毫克/毫升)。在注射秋水仙素5小时后,行眼球摘除术,从眼窝内吸取0.5毫升全血(加肝素抗凝)。然后加入经37℃预温的0.05—0.06M KCl溶液至8毫升。混合后,置于37℃水浴中低渗处理20分钟左右,即可加入1毫升新鲜配制的甲醇冰醋酸固定液,待充分混匀后低速离心(转速为700—800rpm)5分钟,弃去上清液,留沉淀约0.5毫升。此时滴加3:1的甲醇冰醋酸固定液4.5毫升,固定30分钟。

* 文中照片承本院摄影室朱玉喜同志拍制,在此表示感谢。

以1200—1500rpm离心10分钟,弃去上清液,留沉淀0.5毫升。重复固定一次,时间约20分钟,经离心后留存0.2毫升沉淀物。反复轻吸混匀后,制成细胞悬液,滴在经冰湿的载玻片上,并在空气中自然干燥制得细胞染色体标本。Giemsa染色后,油镜镜检。

结 果

一、实验小鼠按顺序观察和计数1万个淋巴细胞,28只小鼠共计数284050 (2.8×10^5)个淋巴细胞,其均值为:10144.61。

二、在上述计数淋巴细胞中共查见979个中期分裂相细胞,其出现率占计数淋巴细胞的 $0.343 \pm 0.044\%$ 。每只小鼠观察到的中期分裂相细胞为计数淋巴细胞的 $0.020 \pm 0.014\%$ 至 $1.019 \pm 0.101\%$ (百分率±泊松标准误——以

下同)。

三、在计数中期分裂相细胞中,其中分散较好并可供分析的染色体细胞数为381个,占计数淋巴细胞的 $0.134 \pm 0.023\%$ 。每只小鼠所观察到的可分析的中期分裂相细胞占所计数淋巴细胞的百分率(±泊松标准误)为0至 $0.490 \pm 0.070\%$ 。

四、可分析的中期分裂相细胞占计数的细胞染色体的 $34.77 \pm 3.35\%$,其范围为:0至 $60.46 \pm 11.86\%$ 。

五、28只实验小鼠中,每只鼠查见可供分析的染色体细胞占染色体细胞总数的百分率在25以上的有23只实验小鼠,为28只实验小鼠的 $82.14 \pm 17.13\%$ 。

六、几项主要指标的比较见表1。

表1 几项主要指标的比较

应用小鼠种系 (生长阶段) 只数	Clement B. S. et al 1976		本 实 验 室 1979
	C ₅₇ BL/6) (20—50天龄) 30只	Albino mice (成年) 15只	昆明种杂交小白鼠 (17.5—25克) 28只
中期分裂相% (占淋巴细胞计数) 均 值 范 围	0.67 0.02—4.57	0.07 0.007—0.221	0.343 0.020—1.019

讨 论

Prasad等曾从小鼠外周血细胞中直接制备细胞染色体^[4]。随后,又有Bryan等应用体外刺激法,从外周血细胞与淋巴结中的淋巴细胞制备细胞染色体的报道。到1976年,Clement等提出了小鼠外周血快速制备细胞染色体方法^[3],使原来制备外周血细胞染色体一般需要4—5天缩短到24—26小时左右。但所需实验条件要求较高,并带有某些局限性,而且,其中需要的活性稳定的透明质酸酶不是一般实验室所常用的。加之,在具体操作过程中,有一些步骤需要在冷环境(如冰箱中放置,以及放置过夜)中进行。因此,给这种方法的实际应用带来一定的困难。

我们采用了实验室常规制备细胞染色体的方法^[5],不用透明质酸酶,并把Clement法中0.7%柠檬酸钠液改用0.05—0.06M KCl溶液使外周血细胞低渗膨胀;然后,在相同条件下,作两次固定后即可制片,这样不仅大大缩短了时间(整个操作过程仅需7—8小时);所需要设备、条件也较简单,制片过程可在室温中进行。同时,统计分析结果表明,应用这个改进的方法,重复性较好,能获得一定数量的中期分裂相(图1)。

我们将实验结果与Clement法作了比较(见表1),结果表明,本法所得到的外周血中期染色体细胞数较多。在大多数对秋水仙素反应敏感的小鼠中,其中期分裂相多少并不一样,在计数中发现少则一只小鼠为几十个,多则可

达 3160 多个。一般情况下，每只小鼠可观察到 300—600 个。

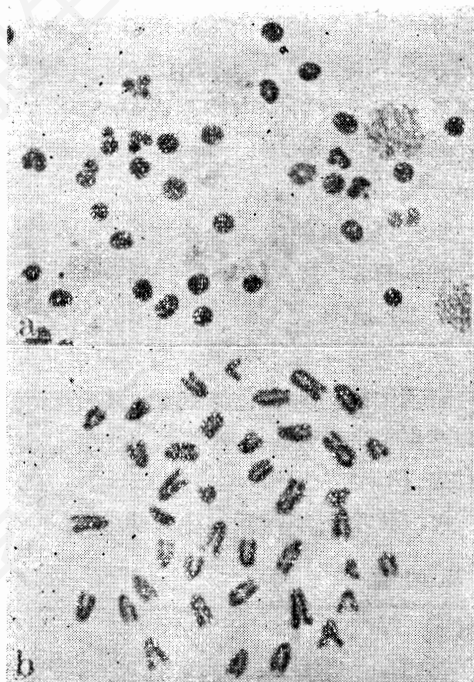


图 1 以本文方法制备的小鼠外周血细胞染色体

(a) 高倍镜下所见。×1,920

(b) 油镜下所见。×12,000

在实验中，我们还做了骨髓细胞染色体片作平行观察比较，以反映小鼠对秋水仙素的反应状况。在 36 只小鼠中，发现以小鼠每克体重给予 5 微克秋水仙素腹腔注射，其中，就有 6 只小鼠对这样浓度的秋水仙素不敏感。另 2 只小鼠因制片丢失未能观察到。从其余 28 只小鼠的统计分析表明，以此浓度的秋水仙素腹腔注射，5 小时后采血制片，只要操作得当，一般都能得到较为满意的实验结果。

在制备外周血细胞染色体标本中，低渗膨胀是一重要环节。由于直接从外周血细胞制备染色体，因此，受着需要快速以及严格的时相限制；另外，小鼠只给予一定浓度的秋水仙素，在血液中积聚分裂相细胞，又受到数量有限的骨髓干细胞量的限制。有关动物的研究资料表明，正常小鼠骨髓细胞中大约含有 0.5—1.0% 的多向性造血干细胞^[6]，并以相应的百分率进到外周血；因而，实验中必须尽可能地

不丢失存在于外周血中可能制得的染色体标本。一是应用硅油处理实验研究的器皿，使其尽可能多地保存中期分裂相细胞，减少其丢失；二是应用适当的低渗条件，使染色体充分地膨胀，用以提高可分析具中期分裂相细胞的比例。在本实验中所应用的低渗条件所得到的染色体分裂相，其中可计数分析的可占相当的比例。

顺序计数淋巴细胞及具中期染色体细胞过程中，如何判定淋巴细胞是一个值得引起注意和重视的问题。在一般血细胞涂片中，由于细胞形态正常，比较容易鉴别。而处于低渗膨胀条件下的外周血细胞形态都发生了相应的变化。特别是制得较好的染色体标本，常要求细胞膨胀得更大一些，这样就给计数淋巴细胞带来以下几个实际问题：

(1) 膨胀的淋巴细胞形态，要有一个预试验的实际观察和比较。

(2) 中性分叶核粒细胞中有少数分叶甚多的中性粒细胞，在低渗膨胀时，细胞膜破裂后，会有近圆形或圆形染色质游离出来，这就容易和膨胀度较小的淋巴细胞混淆，把它误记为淋巴细胞，应严格地加以鉴别。

(3) 极少数膨胀特别大的圆形细胞核，是否均应归入淋巴细胞统计。为了有一个比较明确的标准，我们在实验统计时规定，圆形或近圆形，在适宜视野(入射光度偏暗)状况下可见细胞核外有一环状物的，细胞核中染色质均匀的细胞归入淋巴细胞。但是，在实际观察中还难免会出现误差。为此，在计数中我们加大了统计样本的数量，这样便可相对地使误差范围缩小。

从我们的实验资料看，随着操作技术的改进，染色体标本的量和质都会相应地提高，说明本方法还需不断完善，使可分析的中期分裂相细胞的比例能更多地增高。在实验鼠中，我们对雌、雄以及 0.05、0.06 克分子量的氯化钾溶液使用作了统计分析，在性别之间和不同克分子浓度的低渗液之间无显著性差异。