



图1 逆转病毒基因组形式的相互转变

(a) 亲代病毒RNA反转录成DNA产生一系列未整合的DNA, 其中之一发生整合形成前病毒, 如(b)所描绘。前病毒反过来又作为合成子代RNA的模板, 如(c)所示。如图所示, 反转录和基因组的重排在最初存在于病毒RNA的左(5'端)和右(3'端)末端的顺序产生冗余拷贝。(b)中小箭头指示前病毒假定的转录启动子部位。

易位导致在病毒基因组末端基因顺序中的冗余顺序。重要的是当RNA和DNA基因组并列时(如图所示), 显然DNA前病毒在两端都超出RNA。这样, 子代病毒RNA(向前的)转录是开始于离最近细胞顺序几百个核苷酸的病毒顺序区域内。同样, 转录也在病毒顺序区域内终止。

从这个系统中得出的结论是启动病毒转录的启动子很可能是由病毒基因编码的, 这种启动子的功能很可能受到反式作用因子的影响, 正如在MMTV诱导过程中所涉及的那样。

除了邻近的细胞顺序外, 一个潜在的顺式作用控制的重要位点可能在病毒顺序组中(图1小箭头所示), 其中或许含有影响转录启动作用效率的顺序。一些内源性前病毒在这种顺序中也许存在缺陷, 而其

余的前病毒功能顺序都已表达。这样的缺陷可能产生于最初形成前病毒时逆转录的错误。如果细胞因子得以解除由于这一缺陷所造成转录上的阻断, 那么所产生的RNA转录物将不会受到这种缺陷的影响, 从而可能导致释放能诱导高度生产性感染的病毒颗粒。因此, 在病毒这一有限顺序部分的这些顺式作用的缺陷就不会通过遗传传递给子代病毒。

人们可能要问及有关把调节的信息传递给前病毒的信号性质。尽管用DNA酶I敏感性测定已经显示特异的染色质结构和转录活性有关, 但是这种染色质的构型似乎是控制转录活性基本分子机制的结果。正如转染实验所示, 这种机理和纯化的DNA有关。

纯化的DNA可能凭借病毒或细胞顺序中的核苷酸顺序的信息, 调节转染病毒的活力。然而, 这种DNA的一种附加的和重要的成份存在于和一些胞嘧啶残基连接的甲基基团中, 这些基团可能决定了体内或体外转染的前病毒的转录活性。这一假设是从Eisenman及其同事们最近的工作, 以及该实验室应用甲基化拮抗剂5-氮胞苷能诱导内源性前病毒的表达而提出来的。假定这种甲基基团调节是有潜在的重要性的, 改变这些DNA的甲基化酶的调节机制仍得不到解释。

采用现代的分克隆技术, 将有助于快速鉴定这些对于控制过程重要的细胞和病毒顺序, 而这种信息又将在控制所有细胞基因表达的性方面会有重要的启示。

中国科学院上海细胞生物学研究所

章海婴译 姚曾序 校审

[J.gen. Virol. 1981, 54:1-8]



## 乳鼠原代心肌细胞培养物的初步观察\*

王鸿秀 龚建林  
(浙江中医学院)

1960年Harary用胰蛋白酶分离出新生大鼠的单个心肌细胞, 作了单层培养, 维持自发性搏动达40天<sup>[1]</sup>。此后, 其他学者培养成功了大鼠胎鼠及人胚的心肌细胞。我国于1978年首由北京中医研究院西苑医院开展了心肌细胞培养工作, 作了中医中药的实验性研究。我们于

1982年开展大鼠乳鼠心肌细胞的原代培养, 并作了初步观察。

\* 扫描电镜部分由浙江省科委电镜室蔡继炯同志协助观察与拍摄, 特此致谢。

## 材料及方法

心肌细胞分离及单层培养方法基本按照西苑医院<sup>[2]</sup>，用新生2~4天的杂种大鼠，性别不拘，无菌剪取心室肌肉，用Hanks氏液洗去血块，去外膜，剪碎后加入0.06%胰蛋白酶(新疆伊犁肉联厂生化制药厂产)，置37℃水浴，以100次/分速率磁力搅拌10分钟后，弃去上层液，然后再用胰蛋白酶以上法连续分次消化3~4次，收集第1次以外的各次的上层液，离心，弃去上清液。沉淀物经Hanks氏液洗涤后，用含有小牛血清、青链霉素及pH 7.2的Eagle MEM培养液稀释成 $8 \times 10^5$ /ml的细胞悬液，分装入25 ml容积的培养瓶，每瓶3ml，置37℃培养箱中密闭培养。

## 结果

### 1. 细胞形态

用倒置相差显微镜观察。培养2—3小时细胞开始贴壁，24小时心肌细胞贴壁牢固，大部为单细胞，有少量小细胞簇(可能为未分散的细胞团)，细胞呈圆形，胞浆少、透亮，核圆含核仁1—2个，至48小时胞浆呈伪足状突起。第3天起细胞生长旺盛，细胞簇数量增多面积增大，细胞形状多样化有圆形、梭形及锥形，胞浆突起呈芽枝状，自细胞簇周围呈放射状生长(图1)，以后突起逐渐伸长变粗，胞浆丰富有饱满感，有折光，有颗粒(图2)，至第5天长成单层。10天左右胞浆突起呈树枝状伸长增粗似肌纤维样，各细胞簇借此相互连结成网。20天左右各细胞簇逐渐汇合成肌纤维束，以后肌纤维束集中增粗成粗大的肌纤维(图3)。30天以后胞浆内出现空泡，肌纤维中心区出现黑斑状退化性病灶，该处细胞结构及搏动功能均消失，随着退化灶扩大，肌纤维搏动减弱，40余天时纤维变细断裂而解体，个别标本至60余天全部解体。

与心肌细胞生长的同时，有非心肌细胞生长，大部为多角形，梭形，少数为细长梭形；前者胞浆稀薄半透明，无折光无颗粒，核大椭圆形，核仁2—3个，后者细长梭形细胞胞浆折光强含少量颗粒，核小呈圆形或扁椭圆形。

Kasten<sup>[3]</sup>认为乳鼠心肌细胞培养物中主要含心肌细胞及内皮样细胞。由于活细胞观察难以辨别细胞类型，我们用培养四天的心肌细胞培养物作H.E及P.A.S染色，提示前者为多角形或短梭形的内皮样细胞，胞浆淡染无枝状突出，平坦铺开成片，胞核大椭圆形，核质疏松，嗜碱性弱。后者细长梭形细胞很少，单个散在分布，胞浆内有丰富糖元颗粒，胞核致密嗜碱性较强，是否为心脏传导系细胞，尚待深究。在染色标本中未见典型的成纤维细胞。在培养第5至第7天内皮样细胞明显增多，在形成的肌纤维束周围有大量内皮样细胞聚集(图3)。

### 2. 细胞表面超微结构

用扫描电镜观察培养4天及8天的心肌细胞表面结构。培养4天的心肌细胞表面有众多皱褶，并有细长突起插入邻近细胞，使二细胞相连(图4)。培养8天的心肌细胞表面皱褶增多，排列似鱼鳞状，胞浆突起增多变粗，延长成肌纤维互相连结，连结处有不整齐的微绒毛，参阅文献<sup>[4]</sup>可能为闰盘样结构(图5、6)。邻近的内皮样细胞表面光滑无皱褶半透明，平坦铺开连合成片，无胞浆突起(图6)。

### 3. 搏动功能与药物试验

观察在室温下(22—27℃)进行。培养24小时单个细胞有抽搐性搏动，每分钟14—17次；48小时起搏动细胞增多，同一视野中各细胞的搏动节律与速率不同；第4天起出现整个细胞簇的同步化搏动，搏动有力，节律性加强，搏动速率增加，自8—101次/分，最高达173次，搏动方式为向心性同步化收缩；10天后藉枝状突起相连结的各细胞簇呈同步化搏动，搏动方式改为沿心肌长轴进行的收缩性搏动，搏动率为12—88次/分，最高达172次；30天后肌纤维出现退化性病灶，搏动力减弱，搏动范围缩小，由整根肌纤维收缩变为分段性搏动，节律不齐频率减少，个别标本如此搏动维持至第61天。在细胞簇的同步化搏动中，搏动常先起动于一处，由该处牵动邻近细胞。

用硫酸异丙肾上腺素及心得安注射液(北

京制药厂生产)于室温 27°C 检测培养八天的心肌细胞  $\beta$  受体功能。选择搏动有力节律整齐的细胞簇,先加入等量培养液,计数搏动率,无明显改变,再加入异丙肾上腺素(最终浓度

3.3  $\mu\text{g/ml}$ ),观察 10 分钟后,在肾上腺素作用基础上加入心得安(最终浓度 13.3  $\mu\text{g/ml}$ ),结果见表 1。

以下结果经 t 测验,有显著差异 ( $p <$

表 1 异丙肾上腺素及心得安注射液对心肌细胞搏动率的影响

标本号	加药前次/分	异丙肾上腺素 3.3 $\mu\text{g/ml}$		异丙肾上腺素作用后次/分	心得安 13.3 $\mu\text{g/ml}$	
		加入后 5' 次/分	10' 次/分		加入后 5' 次/分	10' 次/分
1	31	64	72	72	47	41
2	52	92	100	100	42	48
3a	18	95	99	99	83	81
3b	56	108	98	98	81	85
4	38	62	68	68	40	5

0.01),说明培养的心肌细胞对  $\beta$  受体激动剂与抑制剂可发生反应。

### 讨 论

乳鼠健康情况可影响心肌细胞的体外生长,瘦弱而反应迟钝者,其心肌细胞在体外生长慢,搏动出现迟,而强壮活泼者,其心肌细胞在体外生长快,搏动出现早。培养第 3 天时细胞簇数目增加且面积增大,搏动的心肌细胞也增多;但至第 5 天不再增多,提示培养第 3—4 天可能为心肌细胞对数生长期,此时可见到长梭形的心肌细胞分裂像。Mark<sup>[5]</sup>用定时电影摄影见到心肌细胞分裂时,不发生细胞变圆,至分裂末期子细胞仍彼此紧密相连。

心肌细胞搏动率与细胞形状无关,各单个细胞及细胞簇的搏动率有较大差异;同步化搏动先起于某局部细胞,继而扩及邻近相连的细胞。Harary 证明细胞间物理性接触在搏动传导中起决定作用,搏动通过胞浆传递,每个心肌细胞有其潜在的固有的搏动率,但细胞簇的搏动率是由快搏动细胞所左右。Mark 观察到当快搏动细胞与慢搏动细胞接触,实现同步化后,搏动率增快。De Haan 认为心肌细胞培养物中有两类细胞,一类为可发出冲动的起搏细胞,一类为静息细胞,只当起搏细胞冲动传来时才搏动;他还观察到单个心肌细胞一旦相互接触,

快者在数分钟内就完成同步化搏动,在膜连接处有低电阻裂隙连接,动作电流可从一个细胞传到另一细胞。按以上见解,各细胞及细胞簇搏动率的差异及同步化可能与快搏动细胞的生长及其与慢搏动细胞的接触情况有关<sup>[5,6,7]</sup>。

我们观察了硫酸异丙肾上腺素及心得安对不同培养时间的心肌细胞簇搏动率的影响,见到随着培养时间增长,对搏动率影响日趋明显与稳定,故认为培养的心肌细胞搏动功能对  $\beta$  受体药物反应的强弱可能与细胞膜  $\beta$  受体的生长及功能情况有关。

根据以上观察,认为培养的心肌细胞可作为研究与其有关的中医中药的有利工具。

### 参 考 文 献

- [1] Harary, I., et al., 1960, *Science* 131: 1674-1675.
- [2] 中医研究院西苑医院基础研究室等: 1981, *中华心血管杂志* 9: 216-218.
- [3] Kasten, F. H., 1973, *Tissue Culture. Method and Application.* edited by Krause, P. F. et al., Academic Press. p 77.
- [4] Vahouny, G. E. et al., 1979, *J. Mole. Cell Cardiol.* 11: 339-357.
- [5] Mark, G. E. et al., 1966, *Exper. Cell Res.*, 44: 217-233.
- [6] Harary, I., et al., 1963, *Exper. Cell Res.*, 29: 451-465.
- [7] De Haan, 1972, *Exper. Cell Res.*, 70: 214-220.