

十例染色体结构畸变携带者的 SCE 分析*

许嘉 夏家辉 李麓芸 戴和平

许发明 何小轩

(湖南医学院医学遗传研究室)

一般认为, SCE 反映 DNA 的损伤, SCE 分析可作为哺乳动物突变形成的重要指标, 也可作为研究染色体稳定性的较好指标。近年来, SCE 分析在检测突变剂、致癌剂对染色体的效应等研究中得到广泛应用, 关于 SCE 的研究已成为细胞遗传学领域中一个十分活跃的方面。但对于染色体结构畸变携带者的 SCE 分析, 文献中尚不多见, 在国内则还未有报道。

本文就我室对十例染色体结构畸变携带者和十名正常对照者的外周血淋巴细胞 SCE 的观察结果报告如下:

材 料 和 方 法

一、取材

染色体结构畸变携带者 10 名, 男 6 名、女 4 名, 年

龄自 1³/₁₂ 岁至 62 岁, 均由我室分析外周血 G 显带染色体确诊(表 1)。其中 6 例平衡易位携带者来自三个家系(图 1、2、3), 4 例臂间倒位携带者来自同一家系(图 4)。10 例中除 1 例(血 665 号)的染色体畸变的来源未能确定外, 其余 9 例的染色体畸变都是上代遗传的。

对照者 10 名, 男 6 名、女 4 名, 年龄自 29 岁至 46 岁, 均为本院职工, 身体健康, 核型正常。

对照者与携带者均无长期及近期化学致变剂、辐射接触史和病毒感染史。

二、细胞培养、制片与染色

外周血 0.3 毫升接种于培养基(含 RPMI1640 4 毫升、小牛血清 1 毫升、PHA400 微克、青霉素 500

* 本文承卢惠霖教授指导, 张革进同志冲洗翻拍照片, 特此致谢。

矛盾, 有的学者在加大反应细胞密度的同时, 用平底容器放在匀速旋转架上培养, 既保证了充分接触, 又使细胞不过分拥挤。培养时间过长效果降低, 也可能与营养条件有关, 有的学者在 MLTC 的第四天更新部分培养液, 据称有一定作用^[13]。

CTL 裂解相应靶细胞的过程可分三个阶段: <1>粘附期, <2>溶解期, <3>不依赖杀伤细胞的溶解期。各期所需时间因靶细胞的种类和反应条件而异, 一般分别为 1 分钟, 5 分钟和 2 小时左右^[14]。本文所定温育 4 小时足够这一过程的完成。最初的两个阶段要求靶细胞有效的相互接触。我们的结果证实, 使用面积较小的 U 型底孔, 温育前靶细胞充分混和及离心处理可以增加靶细胞接触, 裂解率较对照组高而且稳定。靶细胞裂解后, 与细胞内蛋白结合的 ⁵¹Cr 释放到上清液尚需要一定过程, 一

般随时间增加而升高。因此可以在自发释放的允许范围内选择一个尽可能长的温育时间。靶细胞裂解的最适温度为 37—40℃。但有的学者则以 37℃ 温育短时期后再经 45℃ 温育 1 小时, 目的在灭活 CTL 以中止试验, 以及加速裂解靶细胞的 ⁵¹Cr 释放^[15]。

本系统诱导的 CMC 效应细胞为带 θ 抗原的细胞, 对 BW 靶细胞的裂解作用有一定的特异性。因此主要是细胞毒 T 淋巴细胞, 与国外同类系统的结果一致^[9]。小鼠脾淋巴细胞对肿瘤细胞常有 NK 活性, 最近 Cohen 等报告这些细胞经培养后杀伤活性可能增加^[16], 而本文结果表明, 这种杀伤活性在本系统诱导的 CMC 中并不占重要的地位。用常规的体内免疫方法与本系统诱导的 CMC 作比较, 虽所得活性相近似, 但后者条件更易掌握和控制, 因此是一个比较适宜的体外模型。



图 1 示 1/4 染色体易位携带者(血 274 号)的G显带染色体照片和部分核型(左)及家系图(右)

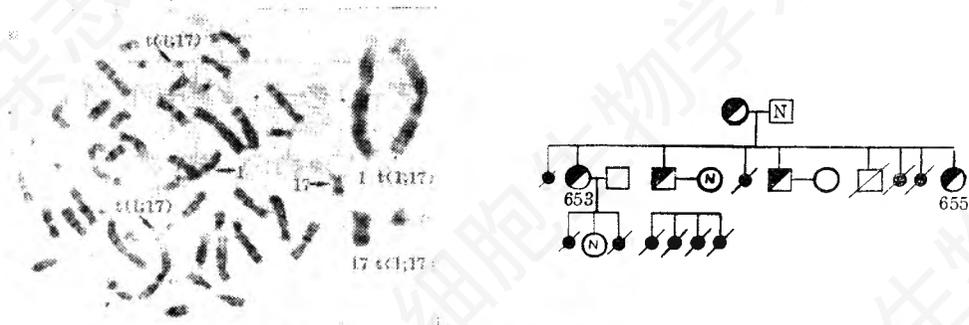


图 2 示 1/17 染色体易位携带者(血 655 号)的G显带染色体照片和部分核型(左)及家系图(右)

参 考 文 献

[1] Häyry, P. et al., 1970, *Science* 168: 133.
 [2] Golub, S. H. et al., 1972, *Int. J. Cancer* 10: 157.
 [3] Wagner, H. et al., 1973, *J. Exp. Med.* 138: 1.
 [4] Nabholz, M. et al., 1981, In G. J. Hammerling (ed) "monoclonal antibodies and T-cell hybridomas" p. 539.
 [5] Gillis, S. et al., 1981 *Immunological Rev.* 54: 81.
 [6] Eberlein, T. J. et al., 1982, *Cancer. Immunol. Immunother.* 13: 5.
 [7] Kedar, E. et al., 1979 *J. Immunol. Methods* 26: 157.
 [8] Kedar, E. et al., 1977, *J. Immunol. Methods* 16: 39.
 [9] Kedar, E. et al., 1976, *J. Immunol. Methods* 13: 1.
 [10] Brunner, K. T. et al., 1976, In B. R. Bloom (ed) "In vitro Methods in Cell Mediated and Tumor Immunity" p. 423.
 [11] Herberman, R. B. et al., 1976, In B. R. Bloom (ed) "In vitro Methods in Cell Mediated and Tumor Immunity." p. 489.
 [12] Ting, C. C. et al., 1979, *J. Immunol.* 122: 1510.
 [13] Sugamura, K. et al., 1980, *J. Immunol.* 124: 1045.
 [14] Martz, E. et al., 1977, In Osias Stutman (ed) "Contemporary topics in Immunology. (T-cells)." 7:301.
 [15] Dunkley, M. et al., 1974, *J. Immunol. Methods.* 6: 39.
 [16] Cohen, S. A. et al., 1982, *J. Immunol. Methods* 48: 359.

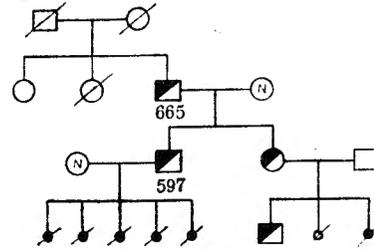
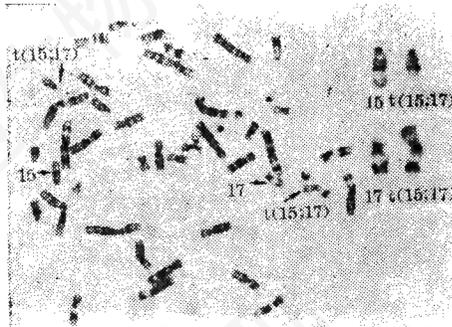


图3 示15/17染色体易位携带者(血665号)的G显带染色体照片和部分核型(左)及家系图(右)

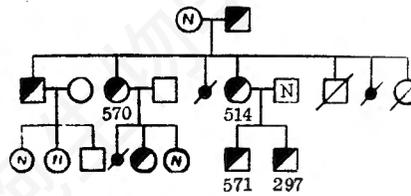


图4 示inv(5)携带者(血297号)的G显带染色体照片和部分核型(左)及家系图(右)

表1 10例染色体结构畸变携带者

标本编号	姓名	性别	年龄	核型
274	曾 × ×	男	29	46,XY,t(1;4)(1pter→1q13::4q25→4qter;4pter→4q25::1q43→1qter)
456	曾 × ×	男	32	46,XY,t(1;4)(1pter→1q43::4q25→4qter;4pter→4q25::1q43→1qter)
653	钟 × ×	女	32	46,XX,t(1;17)(1qter→1p36::17q21→17qter;17pter→17q21::1p36→1pter)
655	钟 × ×	女	15	46,XX,t(1;17)(1qter→1p36::17q21→17qter;17pter→17q21::1p36→1pter)
597	刘 × ×	男	34	46,XY,t(15;17)(15pter→15q22.3::17p13.1→17pter;17qter→17p13.1::15q22.3→15qter)
665	刘 × ×	男	62	46,XY,t(15;17)(15pter→15q22.3::17p13.1→17pter;17qter→17p13.1::15q22.3→15qter)
297	廖 × ×	男	13/12	46,XY,inv(5)(pter→p15::q33→p15::q33→qter)
514	戴 × ×	女	30	46,XX,inv(5)(pter→p15::q33→p15::q33→qter)
570	戴 × ×	女	34	46,XX,inv(5)(pter→p15::q33→p15::q33→qter)
517	廖 × ×	男	5½	46,XY,inv(5)(pter→p15::q33→p15::q33→qter)

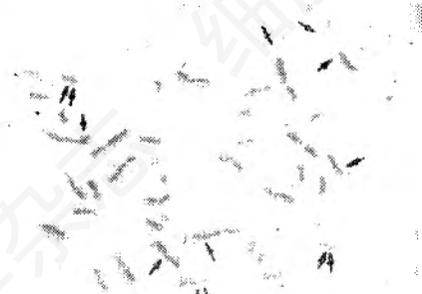


图5 1/4染色体易位携带者(血456号)的SCE照片(箭头示互换点)

单位,链霉素500微克),置37℃培养24小时,加入BrdU(瑞士Fluka产品,最终浓度10微克/毫升),避光继续培养48小时。于终止培养前2—3小时加入秋水仙素(最终浓度0.8微克/毫升),按我室常规收获细胞^[1],0.075 M氯化钾低渗处理25—30分钟,3:1甲醇冰醋酸固定2次,冷载片滴片,烤片(76—80℃)3小时,自然冷却。将标本以2×SSC溶液湿润,于细胞面上覆盖一层擦镜纸,置于含2×SSC溶液的培养皿中,在45—48℃温度下以250瓦太阳灯距离25厘米照射

30分钟,用自来水冲去擦镜纸,以1.5%Giemsa染色5—7分钟,自来水冲洗,室温下干燥。

三、SCE计数

每例观察计数处于第二个细胞周期,染色体数为46、分散良好,色差清晰的30个中期分裂相。染色单体臂上的每一次深浅染色交替记为一次互换,着丝粒处的互换也计在内(需判明不是两单体扭曲所造成的假象)(图5)。

结 果

一、十例携带者和十例正常人SCE/细胞值见表2。携带者SCE/细胞值为 $7.01 \pm 0.40(S \cdot E)$,高于正常对照者的 $5.59 \pm 0.37(S \cdot E)$,经秩和检验, $p < 0.05$,差异有显著性。但携带者SCE/细胞值的范围(5.50—9.27)与对照组的范围(3.13—6.80)有部分重叠。

表2 正常人和染色体结构畸变携带者SCE值比较

组别	性别	年龄	SCE值			
			观察细胞数	SCE总数	SCE数/细胞	
正 常 人	1	男	31	30	94	3.13
	2	男	32	30	155	5.17
	3	男	29	30	186	6.20
	4	男	31	30	125	4.17
	5	男	46	30	169	5.63
	6	男	28	30	204	6.80
	7	女	31	30	176	5.87
	8	女	29	30	175	5.83
	9	女	31	30	200	6.67
	10	女	29	30	194	6.47
			300	1678	$5.59 \pm 0.37(S \cdot E)$	
携 带 者	274	男	29	30	246	8.20
	456	男	32	30	198	6.60
	653	女	32	30	174	5.80
	655	女	15	30	173	5.77
	597	男	34	30	278	9.27
	665	男	62	30	211	7.03
	297	男	$1\frac{3}{12}$	30	195	6.50
	514	女	30	30	165	5.50
	570	女	34	30	206	6.87
	571	男	$5\frac{1}{2}$	30	257	8.57
			300	2103	$7.01 \pm 0.40(S \cdot E)$	

二、携带者与正常人的SCE在丹佛体制各染色体组的分布见表3(由于倒位的5号染色体不易与6号染色体区别,故将6号染色体并入B组计数)。依 χ^2 检验进行统计处理。除t(15;17)携带者和inv(5)男性携带者与正常男性的差异有显著性外,其余各组均无显著差异。而从分布图(图6)上可以看出,在t(15;17)携带者中分布在D、E组的SCE相对值较正常男性低;在inv(5)男性携带者分布在B组的SCE相对值亦较正常男性低。

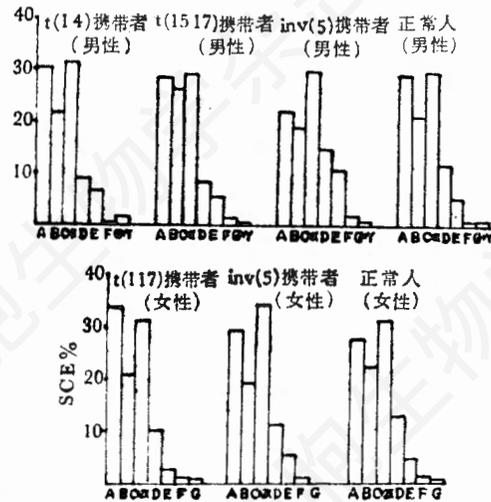


图6 SCE在丹佛体制各染色体组的分布比较

讨 论

一、在一定实验条件下,正常人体细胞的SCE值是在一定范围之内,求得一定条件下恒定的SCE正常值是进行SCE分析的前提。本实验中正常人SCE/细胞值为 5.59 ± 0.37 ,与国内吴旻等所报告的十分接近(表4),说明此值可作为比较的依据。

二、迄今为止,有关染色体结构畸变携带者的SCE分析的研究报告很少,结果也不尽相同。Stoll等^[2]检查了10名染色体平衡易位携带者,1名臂间倒位携带者和5名部分三体型患者的SCE频率,并与4名对照者的SCE频率进行比较,经t检验发现两组的SCE/细胞值无显著差异。Michalovà等^[3]在对5名带有等

表3 SCE在丹佛体制各染色体组的分布比较

组别	A	B	C+X	D	E	F+G+Y	合计
正常男性	275	198	284	112	51	14(7+7)	933
t(1;4)	135	94	138	39	30	8(1+7)	444
携带者	410	292	422	151	81	22(8+14)	1377
$X^2=6.885, n'=5, p>0.1$							
组别	A	B	C+X	D	E	F+G+Y	合计
正常男性	275	198	284	112	51	14(7+7)	933
t(15;17)	141	129	143	40	26	10(6+4)	489
携带者	416	327	427	152	77	24(13+11)	1422
$X^2=12.798, n'=5, 0.025<p<0.05$							
组别	A	B	C+X	D	E	F+G+Y	合计
正常男性	275	198	284	112	51	14(7+7)	933
inv(5)	101	86	138	67	48	12(8+4)	452
携带者(男性)	376	284	422	179	99	26(15+11)	1385
$X^2=22.16, n'=5, p<0.005$							
组别	A	B	C+2X	D	E	F+G	合计
正常女性	206	166	232	95	34	12(7+5)	745
t(1;17)	117	72	109	36	9	5(2+3)	347
携带者	323	238	341	131	43	17(9+8)	1092
$X^2=5.46, n'=5, 0.25<p<0.5$							
组别	A	B	C+2X	D	E	F+G	合计
正常女性	206	166	232	95	34	12(7+5)	745
inv(5)	109	72	127	41	19	3(3+0)	371
携带者(女性)	315	238	359	136	53	15(10+5)	1116
$X^2=3.348, n'=5, 0.5<p<0.75$							

表4 正常人 SCE/Cell 频率比较*

国家与城市	SCE/Cell 数		作者	
	范围	平均值		
中国北京	3.96—7.88	5.74	吴旻等	实验生物学报, 12(1):31—36, 1979
北京	3.45—7.00	4.46	崔梅影等	科学通报, 26(1):50—52, 1981
北京		5.02	吴玉清等	细胞生物学杂志, 2(2):16—19, 1980
昆明	3.74—4.82	4.24	邓承宗等	中华医学杂志, 60(11):676—677, 1980
简阳		5.5	冯宝章等	遗传, 3(3):5—7, 1981
上海	4.14—5.52	4.60**	吕宝忠等	遗传学报, 8(1):132—137, 1981
长沙	3.13—6.80	5.59	许嘉等	本文
广州	5.00—5.83	5.40	邓承宗等	遗传学报, 8(3):212—215, 1981

* 此表根据崔梅影等的资料绘制(国内资料有所增加), 见《遗传学报》8(3):224, 1981。

** 所列 SCE/Cell 值系根据原文中每一染色体的平均 SCE 数计算得出。

臂X染色体i(Xq)的患者进行SCE分析时,发现在i(Xq)染色体上观察到的SCE数目与根据X染色体长臂相对长度(以单倍型染色体的总长度的百分率表示)所预期的SCE值比较稍有增加,但经统计学处理表明两者的差异无显著性。Schober等^[4]对5名属于同一家庭的t(1;19)整臂易位携带者的1号,F组及t(1;19)易位染色体的着丝粒区域进行SCE分析,并与6名对照者的1号和F组染色体着丝粒上的SCE值比较,也未发现两组间有显著性差异。与上述报道相反,Alhadelf和Cohen^[5]曾报告一例t(13;14)罗伯逊易位携带者的SCE/细胞值显著高于正常对照者。本文的10例携带者的SCE/细胞值亦较正常对照者高,经统计学处理差异显著。由于不同作者的研究结果不一致,且本实验中携带者与对照者的SCE/细胞值范围又有部分重叠,因此不能仅仅根据该组携带者SCE频率较高就得出携带者染色体较不稳定的结论,而需要积累更多的材料。

三、丹佛体制中各染色体组的划分是人为

规定的,同组的各号染色体之间并无内在的联系。Galloway和Evans(1975)已报道SCE在人的各号染色体间的分布是随机的。这或许能为本实验中携带者SCE/细胞值较对照者高,而在t(15;17)携带者分布在D、E组的SCE相对值以及在inv(5)男性携带者分布在B组的SCE相对值较对照者低的结果提供一种解释。而对研究某一特定染色体或染色体特定部位上的SCE分布规律来说,用SCE在丹佛体制各染色体组的分布作为指标是没有意义的,只有将显带技术与SCD技术结合起来,才能深入探讨这一问题。

参 考 文 献

- [1] 卢惠霖等. 1979, 遗传, 1(5): 11—14.
- [2] Stoll, C. et al., 1977, *Hum. Genet.* 37: 27—32.
- [3] Michalová, K. et al., 1977, *Hum. Genet.* 39: 87—90
- [4] Schober, A. M. et al., 1979, *Hum. Genet.* 51: 93—97.
- [5] Alhadelf, B. and M. M. Cohen: 1976, *Isr. J. Med. Sci.* 12: 1440—1448.

小麦花粉母细胞间染色质穿壁运动初探*

彭 敏

(中国科学院西北高原生物研究所)

本世纪初在植物细胞中发现染色质穿壁现象以来,虽有不少人作了大量工作,但仍有争议。国内从五十年代起,开始进行这方面的研究。已经证实了体细胞的核穿壁和生殖细胞的染色质穿壁运动是正常的生理现象^[1,2,3,4,9,11]。同时对穿壁运动进行了多方面的研究^[5,6,7,8,10,12,13,14]。根据以往的工作,我们可以看出,植物细胞的染色质穿壁运动不但是正常的生理现象,而且具有一定的生理意义。

我们的工作主要是对小麦不同品种的花粉母细胞间染色质穿壁现象进行了观察,并统计比较了不同杂交组合中杂交种F₁和亲本品种的穿壁频率。

材 料 和 方 法

材料

小麦(*Triticum aestivum* L.)

实验采用甘肃省农科院提供的陇7×地16、甘8×367B、甘8×地16和68—73—20—3×原农74等杂交组合的F₀种子及亲本种子。81年3月播于兰大植物园试验田,常规管理,生长良好。5月初穗期在田间选取健壮穗子,用卡诺液整穗固定。作石蜡切片。切片厚10μm。

* 本实验得到兰州大学生物系聂秀范和浙江农业大学农学系的王以秀二位老师的指导,并得邓毅康同志帮助工作,在此一并致谢。