

# 用激光流式细胞计定量分析小鼠肝细胞倍体

肖家诚 王 勇 史桂英

(上海第二医学院)

人们早就发现,哺乳类动物肝细胞核 DNA 含量具有二倍体、四倍体、八倍体以至十六倍体等多倍体表现,并受到体内外多种因素的影响<sup>[1,2,3]</sup>。因此人们试图通过对肝细胞倍体分布的研究以确立各种理化因素(如药物等)对肝脏损伤的程度,估计肝老化及探讨其与体内其它过程(如激素等)的关系<sup>[4,5]</sup>。

激光流式细胞计(简称 FCM)的激发光功率大、稳定性好,因而大大提高了荧光检测的灵敏度。每个细胞光照时间仅几个微秒,有效地克服了荧光猝灭现象,提高了测量精度。由于每个样品中被检测的细胞数可达  $10^5$  个以上,测定结果各亚群占总数的百分比值统计学精确度高。因此,FCM 适合进行细胞群体核 DNA 含量倍体水平分布的研究。

## 材 料 与 方 法

### 1. 动物

成年(3~4个月,体重40—60克)雄性昆明种小白鼠。喂以本院动物房统供给之饲料。为了避免昼夜不同时间对倍体的影响,均于早上8—9点处死动物进行实验研究。

### 2. 肝细胞悬液的制备

按 Digerns<sup>[6]</sup>方法加以改良。用颈椎脱位处死小鼠后,立即剖腹,暴露肝脏和门静脉,经由门静脉灌注含有肝素的生理盐水,接着灌注0.25%的胰蛋白酶溶液。约5分钟后,取下肝脏,剥去肝包膜,把肝切成  $1\text{mm}^3$  左右之小块,洗涤,浸入0.25%的胰蛋白酶溶液,于  $37^\circ\text{C}$  温箱20分钟。取出酶消化液,用八层纱布过滤,以冰冻生理盐水稀释,低速(600转/分)离心5分钟,去上清液,得肝细胞悬液。

### 3. 细胞处理与染色

肝细胞悬液制得后,立即用95%的酒精固定,放

入  $-4^\circ\text{C}$  冰箱中备用。染色前,用冰冻生理盐水冲洗二次,用0.25%胃蛋白酶在室温下消化胞质,5分钟后,洗涤,离心二次,然后按 Vindelov<sup>[7]</sup> 方法进行染色:取  $10^6$  细胞,用0.1% Triton-X-100 溶液4ml作为细胞稀释液,同时加入1% RNA 酶0.2ml(中国科学院上海生化所),200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  吡啶溴红(Ethidium Bromide, EB, BDH)染料0.1ml,室温下10分钟后,即可在流式细胞计上检测分析。

### 4. 淋巴细胞的制备

取同样小鼠脾脏,经过挤压获得脾细胞,然后用0.87%氯化铵溶液溶解其中的红细胞,95%酒精固定。再将脾细胞以1:20之比掺入肝细胞悬液进行染色。

### 5. 激光流式细胞计定量测定分析

采用本室研制的 LXJ 型激光流式细胞计<sup>[8]</sup>,工作时,选用激发波长为  $4880\text{\AA}$  的氩离子激光为激发光源,激光流式细胞计的工作原理图见文献<sup>[8]</sup>,计算机软件程序由本室编制<sup>[9]</sup>。

## 结 果

### 1. 肝细胞的分离与制备

用胰蛋白酶灌注和消化的方法结合低速离心分离制备肝细胞悬液,光学显微镜下看到,所得到的均为肝实质细胞,其中有单个核的,也有双核的。而离心后去除的上清液中,多为较小的非肝细胞。

用95%的酒精固定分离的肝细胞悬液中几乎无细胞团。

### 2. 关于酶消化的时间和染色的特异性

采用胃蛋白酶和 RNA 酶消化后用 EB 染色细胞 DNA 的方法,得到肝细胞倍体分布图如下(图1)

从图中可以看出,4C、8C、16C 的道数之比为1:2:4,这与理论上是吻合的,也说明

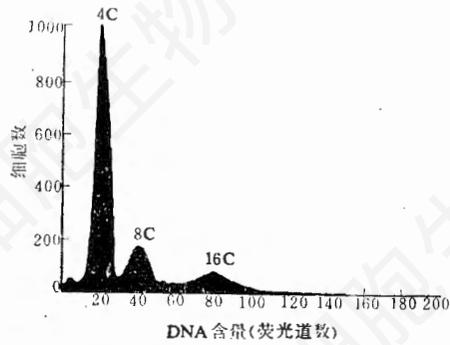


图1 成年鼠肝细胞C值分布

细胞的DNA染色是化学定量的。

细胞染色如前不用胃蛋白酶消化处理,其核内荧光强度显著降低(荧光道数提前),这与文献报道是一致的。但胃蛋白酶消化时间于37℃维持15分钟,则多数细胞成为碎片,无法作进一步分析。

如省略RNA酶处理而进行染色,则各C值与道数之线性关系发生改变(图2)。同时,各正态峰已经变形,各峰之间有较多的重叠。

3. 淋巴细胞作为二倍体标准。

为判明DNA分布图上三群肝细胞的C值水平取同一样品肝细胞悬液,一式二份,一份加淋巴细胞(作为2C标准),一份不加淋巴细胞,分别进行测定。从图3A、B中可以看出,前者表现出四个细胞群,四个峰道数之比为1:2:4:8,而后者仅表现出三个细胞群。把前

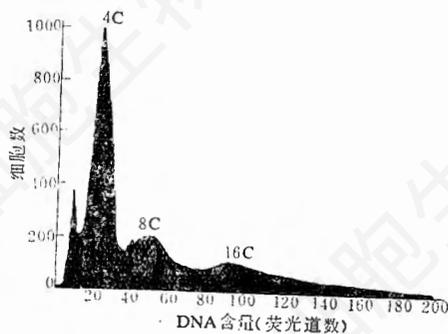


图2 未用胃蛋白酶和RNA酶处理的鼠肝细胞C值分布图

各C值峰难以分开,与道数的线性关系发生改变

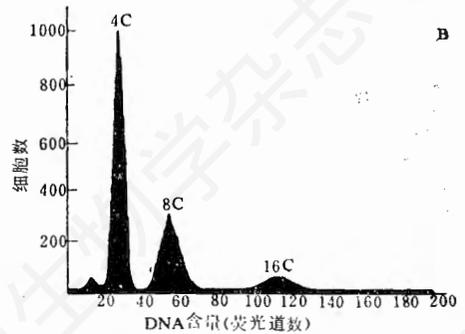
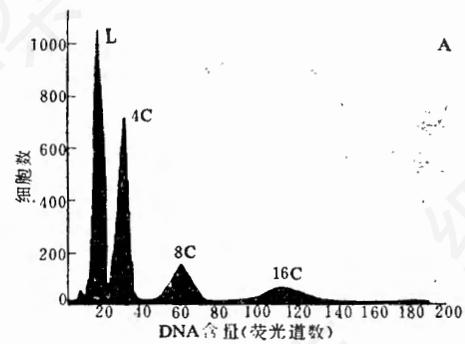


图3 同一样品鼠肝细胞不同处理后的C值分布  
A.加淋巴细胞(L), B.未加淋巴细胞

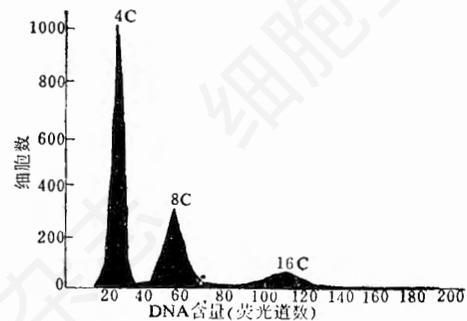


图4 为3A中不显示L的肝C值分布图  
注意其分布与图3B一致

者图中第一峰去除而重新打印后三群细胞,则其图形与后者几乎一致(图4)。比较图4与图3B三群细胞所占的百分比,几乎完全相等。由此可知,成年昆明种小白鼠肝细胞,主要为四、八、十六倍体细胞,而几乎无二倍体细胞。

4. 成年昆明种小白鼠肝细胞倍体分布情况。表1为十二个小鼠肝细胞标本测定的结果。

表1 成年昆明种小鼠肝细胞倍体分布情况

编号	体重(克)	4C <sup>(1)</sup>	8C	16C
1	42	54.89	28.27	16.84
2	60	58.03	24.91	17.06
3	48.1	67.72	19.74	12.54
4	49.2	66.57	18.36	15.07
5	47.5	65.85	21.75	12.40
6	50	57.41	29.66	12.93
7	48.3	66.38	19.79	13.83
8	42	69.87	17.57	12.56
9	49	61.61	19.93	18.46
10	48	52.34	30.22	17.44
11	46	61.89	25.06	13.05
12	44.5	57.06	26.16	16.78
M±SD <sup>(2)</sup>		61.64± 5.67	23.45± 4.50	14.91± 2.27

说明: (1) 4C表示肝细胞4倍体细胞。

(2) M±SD为均数±标准差。

(3) 变异系数CV在8.32%—12.29%之间。

## 讨 论

1. 采用胰蛋白酶消化法制备肝细胞悬液以及胃蛋白酶消化与RNA酶预处理后EB染色的程序,可以得到良好的DNA荧光染色的细胞标本。

2. 采用淋巴细胞作为二倍体参考标准,证实成年小鼠肝细胞主要由四倍体细胞、八倍体

细胞以及十六倍体细胞组成(二倍体细胞比例占1%以下)。它们在总细胞数中分别占61.6±5.67%, 23.45±4.50%, 14.9±2.27%。这与Digerns等<sup>[6]</sup>的报道是接近的。由于小鼠的种系不同,存在一些差异是必然的。Inamdar<sup>[1]</sup>用组织切片法研究成年小鼠肝细胞DNA倍体分布,发现二、四、八倍体的比例分别为15%、63%和20%。我们认为由于细胞在组织块中的位置及切片的取向,有可能将一部分双核细胞切成单核,这可能是二倍体细胞比例增高的原因之一。

3. FCM测量肝细胞DNA含量具有速度快、检测细胞数多,测定结果百分比统计精度高等优点。由于FCM检测中缺乏形态学方面的信息,因此无法区分双核二倍体细胞与单核四倍体细胞等不同情况。故如有条件,FCM应尽可能与细胞分光光度计等技术一起使用。

4. FCM从测定到打印记录结果完全由计算机自动控制,避免了可能的人为因素的干扰,因而测定结果更为客观可靠。

## 参 考 文 献

- [1] Inamdar N B: 1958 *J. Morphol.* 103, 65.
- [2] Alfert M: 1958 *Exp. cell. Res.* 15, 230.
- [3] Epstein C J: 1967 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 327.
- [4] Craddock V M: 1976 in: *Liver Cell Cancer*.
- [5] Severin E: 1978 in: FCM III, P 415.
- [6] Digerns V: 1979 *Archiv. Virch. B.* 32, 1.
- [7] Vindelov L L: 1977 *Archiv. Virch. B.* 24, 227.
- [8] 许松林等. 1981. 应用激光, 1(6):7.
- [9] 杨佑莉. 1984. 中华物理医学杂志, 6(1).