

即以肝癌而言, Grover 等^[4]用二乙基亚硝酸胺(DENA)诱发的大鼠肝癌, 染色体数接近二倍体的(40—43)占67%。Olah 与 Weber 等^[8]在 Morris 移植性肝癌的研究中指出, 生长缓慢的 8999 株大部分为二倍体, 而生长迅速的 3924A 株, 染色体数的分布由 54 至 120, 干系数为 60。强家模^[9,10]用二乙基亚硝酸胺(DENA)诱发的大鼠移植性肝癌 BERH-2, 大部分染色体为亚四倍体, 众数为 72 条。本实验所用的 CBRH-7919 大鼠肝癌细胞系有近半数细胞在四倍体范围内, 与移植性肝癌 BERH-2 的染色体数接近(比其它肝癌高得多), 是否与使用同一化学诱变剂 DENA 有关还不清楚。此外, 正常大鼠肝实质细胞内往往有多倍体核占优势的现象, 其形成机制据认为与异常的有丝分裂有关^[11]。CBRH-7919 细胞来自成年大鼠体内诱发的肿瘤, 在制备染色体标本过程中观察到核内复制现象比较多, CBRH-7919 细胞染色体近半数近四倍体, 是否与上述原因相关还无足够依据。而染色体数目分布的广泛, 众数峰的不明确, 则可能是体外培养过程中核型的不稳定性的增加。至于 CBRH-7919 细胞标记染色体稳定而高频地出现又说明了什么, 是否与该系细胞的恶性特征的稳定有关, 还待进一步说明。

CBRH-7919 细胞系在染色体组型的增减方面与 BERH-2 移植性肝癌也相似^[10]。A 组 C 组染色体增加较少, B 组 D 组染色体增加较多, 因而细胞原有染色体组型之间的平衡被破坏。

在标记染色体方面, CBRH-7919 肝癌细胞与 BERH-2 移植性肝癌有较大的差异, 不但显示了形态的不同, 类别的增加, 而且在组成上主要涉及到 1 号染色体的片段, 差异的原因值得进一步探讨。

综上所述, CBRH-7919 肝癌细胞系染色体畸变与 BERH-2 移植性肝癌相似之处甚多。这可能是实验动物和化学诱变剂相同, 因而得到的肿瘤类型一致的结果^[10]。至于标记染色体的差异能否归诸于体外培养过程中次生性的变化还有待进一步阐明。

参 考 文 献

- [1] 朱德厚、叶秀珍、陈瑞铭, 1980, 实验生物学报, 13(1): 113—117.
- [2] Seabright, M., 1971. *Lancet* 30: 971—972.
- [3] Committee for a standardized karyotype of *Rattus norvegicus* 1973. Standard karyotype of the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 12: 199—205.
- [4] Levan, G., 1974. *Hereditas* 77: 37—52.
- [5] 陈汉源、朱季美、丛笑倩, 1978, 实验生物学报, 11: 171—182.
- [6] Levan, G., 1974. *Hereditas* 78: 273—289.
- [7] Grover, S. and P. Fischer, 1971. *Cancer* 7: 77—82.
- [8] Edith Olah and George Weber, 1979. *Cancer Research* 39: 1708—1717.
- [9] 强家模、季闻行、孙兰英、徐永华, 1978, 实验生物学报 11(1): 78—93.
- [10] 强家模, 1981. 实验生物学报, 14(1): 65—75.
- [11] Carriere, R., 1967. *Exp. Cell Res.* 46: 533—540.

大鼠膈肌去神经后终板形态结构及胆硷酯酶活力 在体与在器官培养下的变化的比较

周振华 于长亮 陈春仙

(中国科学院上海生理研究所)

在体骨骼肌去神经后, 终板形态结构退变, 胆硷酯酶活力迅速下降^[1~3]。而 Miledi

(1962)用器官培养法培养大鼠膈肌5、6天,在测试到肌纤维终板外乙酰胆碱敏感性增加的同时,观察到终板上仍有胆碱酯酶活力^[4]。Peterson和Crain(1972)培养啮齿类动物的成年骨骼肌肌纤维残段2、3月后,也观察到终板上有明显的胆碱酯酶活力^[5]。可是这些资料均未有意识地与在体正常终板酶活力或去神经后的终板酶活力作过比较。我们猜测,去神经骨骼肌的终板形态结构及胆碱酯酶活力的变化,在体与离体培养下可能有所不同。本文将大鼠膈肌去神经后在体的终板形态结构及胆碱酯酶活力的变化与器官培养下的变化作了比较。

材 料 和 方 法

大鼠16只,体重140至150克。8只动物的一侧膈肌去神经,对侧膈肌为对照(正常)。另外8只动物的膈肌供培养用。培养方法采用鲍璋介绍的多杯法器官培养装置^[6]。在无菌条件下,沿着膈肌肌纤维的走向取出扇形肌条,中部宽约5毫米,一端连有肋骨,另一头留有腱膜。小钢钉钉住肋骨外缘的筋膜和另一头的腱膜,使肌条展平于培养器皿内并且力求保持在位时的长度。培养液由75%的Trowell氏T₂综合液和25%的小牛血清组成,pH为7.4。培养装置内通入5%的CO₂和95%的O₂的混合气体。标本在36℃下培养。每周换新鲜培养液两次。动物去膈神经手术与膈肌培养操作同时进行,待3、7、10、14天时,分别按时取出培养的、在体去神经的和正常的三种膈肌材料。同期的材料编为一组,为8个标本(培养的4,在体去神经的2,正常的2)。四组共32个标本。同一组的标本是在相同条件下按照Gerebtzoff改良的乙酰硫代胆碱方法染色^[7]。显微镜下观察终板上的胆碱酯酶活力。终板酶活力的光度法测定,参考范世藩(1963)以及陈汉源、朱季美(1965)报道的装置^[8,9],测相当于标本上直径为6微米的圆面积(后称代表区)的光束的透光率。每组三种膈肌材料随机各选一制片做酶活力的测量。非终板上测8个代表区,作为背景数值,而终板尽可能依次逐个测量:一个终板测一个代表区,每个标本测30个终板以上。透光率换算为光吸收率。酶活力强,光吸收率大;酶活力弱,光吸收率小。终板所见酶活力的强度

减去背景才是实际的终板酶活力。终板的酶活力以同一个标本上各终板(30个终板以上)的平均光吸收率表示,并用去神经终板酶活力与正常终板酶活力的比值作图。

结 果

一、骨骼肌在离体培养下的某些去神经效应

大鼠膈肌在器官培养下存活14天。在此期间内,肌纤维横纹清晰可见(图版图3、4);直接电刺激肌肉,有收缩反应。离体培养的膈肌,取材时已失去神经的连系,肌肉在培养下能产生某些和在体去神经肌肉相似的去神经效应。培养30小时,肌纤维开始发生自发性的颤动。这种纤维性颤动在培养14天的标本上仍能见到。培养6天以上的膈肌细胞,终板外乙酰胆碱敏感性明显增加,结果和Miledi的报道相同。培养3天之内,肌纤维平均直径与正常的一样,没有出现萎缩现象;第7天的肌纤维直径为正常肌纤维的72%,萎缩28%;第10天的萎缩33%;第14天的萎缩39%(表1)。去神经的膈肌在器官培养下趋向萎缩。

二、终板的形态结构

正常终板的形态往往卷曲成团,构成各式各样的圆形或椭圆形以及花纹状的结构(图版图1)。这些花纹状的结构是神经末梢下肌纤维膜的接头褶。在体去神经后3至7天的膈肌,终板褶消失,大多成块状或颗粒状的圆形或椭圆形的结构(图版图2)。培养的终板,接头褶退缩较慢,有的在培养7天时仍然保持着与正常相似的花纹状结构(图版图3);培养10天之后,终板的形态结构与在体去神经7天时的相似(图版图4和2),接头褶消失。

孙以安、蔡体导协助测试乙酰胆碱敏感性,赵世英协助做去膈神经手术,特此一并致谢。

表1 膈肌纤维的直径

去神经天数	3			7			10		14			
标本	正常培养在体			正常培养在体			正常培养在体		正常培养在体			
测量纤维数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
纤维直径(μ)	*18±6	18±6	18±7	18±6	13±3	18±3	18±6	12±3	17±3	18±6	11±3	17±3
去神经/正常(%)	100	100		72	100		67	94		61	94	

* 平均值±标准差。

三、终板胆碱酯酶活力的定性观察

正常终板的胆碱酯酶组织化学染色呈棕色，大多数的酶活力显示在接头褶内，把终板勾划成花纹状的结构(图版图1)。在体膈肌去神经3、7天内，终板胆碱酯酶出现去神经的变化，即酶活力迅速下降，组织化学染色较淡，呈淡黄色(图版图2、6)；7天之后，酶活力的继续变化不够明显，以致不易目测辨别。去神经膈肌培养3天，终板胆碱酯酶活力与正常的相似；第7天的酶活力似乎高于正常(总观标本上的全部终板酶活力)；第10天以后，酶活力很快下降，强度与在体去神经第7天以后的水平不相上下。膈肌去神经后7天之内，器官培养下的终板酶活力与在体终板的酶活力有明显不同；前者活力不下降，后者下降到较低水平(图版图3、5与2、6比较)。试验能重复，观察的结果相当一致，无一例外。

四、终板胆碱酯酶活力的光度法测定

光度法测定终板酶活力的结果显示于图1。在体去神经第3天，终板酶活力降至正常的42%($P<0.001$)；第7天为32%；7天以后，酶活力降得非常缓慢，第10天的与第7天的无明显差别；第14天，为正常的29%。培养3天的膈肌终板酶活力为正常的96%($P>0.05$)，即保持在正常水平；第7天，酶活力为正常的126%($P<0.001$)，与正常的相比活力有明显升高；第10天，酶活力为正常的33%($P<0.001$)，活力迅速下降，与在体膈肌去神经第7、10天的酶活力水平相当；第14天时，培养的与同期在体去神经的终板酶活力也一样，两者无差别($P>0.5$)。光度法测得的结果与定性观察的结果相一致。

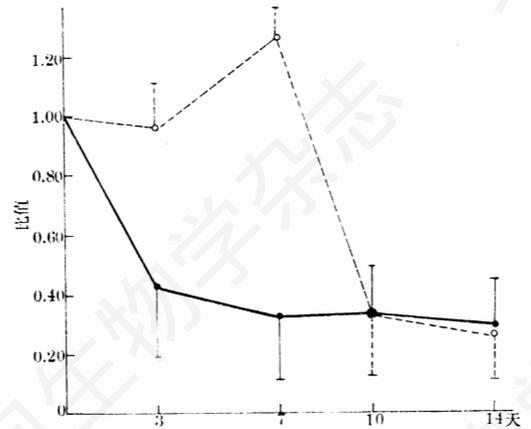


图1 膈肌去神经后终板胆碱酯酶活力的变化
虚线代表培养的；实线为在体的比值；去神经终板酶活力与正常终板酶活力之比值。

讨 论

由于终板在肌纤维表面的位置的差异，切片截取的各个终板的截面积厚度不能完全相同，以及去神经后接头褶退缩的速度不一致，造成各终板以及同一终板上(在位去神经的和培养10天之后的终板)胆碱酯酶染色有些差别，但是在体去神经后的各终板和培养10天后的各终板的酶活力总是低于正常的活力，这是没有例外的。同一组要比较的标本是在相同条件下同时进行染色、制片的。若终板胆碱酯酶着色均匀，代表区随机选择；如果着色深浅不一(同一终板上)，则代表区选择在深着色处，即测以深着色区域中央为圆心的代表区。这种深着色的区域横径一般不超过4微米，实际上测得的是深、浅兼有的代表区。每个标本终板酶活力是以30个以上相继终板酶活力的平均值表示，所以基本上能反映该标本终板的酶活

力强度。光度法测得在体去神经后终板酶活力的下降变化,大体上与先前 Zach W. Hall (1973)用生化方法测得大鼠去神经在体膈肌终板酶活力的结果,以及 Tomaž Kiauta 等 (1977)的报道相符合^[2,3]。

大鼠膈肌器官培养下,终板胆碱酯酶活力在3天内是保持着正常的水平。第7天,酶活力高于正常。这种酶活力的暂时性升高,可能是肌纤维萎缩所造成的。因为从表1和图1可见到培养3天之内的肌纤维不萎缩,酶活力维持正常水平,第7天肌纤维萎缩28%,酶活力升高26%,大体上成比例。由于肌纤维的萎缩,终板相应缩小,使终板代表区每单位面积上的胆碱酯酶增加。去神经膈肌培养7天之后出现去神经效应;终板胆碱酯酶活力下降和肌纤维萎缩。图1是去神经效应综合的结果。如果把萎缩因素影响酶活力的数据加以扣除,则得图2。图2中,培养7天之内的膈肌终板酶活力不变,第7天后出现终板去神经的变化,酶活力下降趋势与在体去神经的相似,下降速度略快于在体去神经的(第14天时,在体与培养的比较, $P < 0.02$)。

大鼠膈肌正常肌纤维的直径范围8至35微米不等,大多数是在10至25微米之间,按组织化学性质可基本上分为粗、细两类不同的肌纤维。在体一侧去神经后,粗的肌纤维萎缩,细的肌纤维因对侧未去神经的膈肌的呼吸活动牵拉而暂时性肥大^[10],所以表1中在体去神经膈肌纤维直径的平均值变化不大,萎缩不明显;培养的膈肌纤维,无牵拉因素的影响,去神经7天后,粗、细肌纤维均逐渐缩小,萎缩明显。膈肌有粗、细两类不等的肌纤维,正在萎缩的粗纤维直径一般仍大于正常膈肌的细纤维,本实验的制片中不能任意取个别肌纤维比较萎缩与否,只能通过一定数量肌纤维的平均值与正常的比较(相继逐根测量纤维的直径),才能得出肌纤维萎缩的情况。

骨骼肌纤维在培养条件下,去神经效应出现的时间比在体条件下迟,这不限于本文所

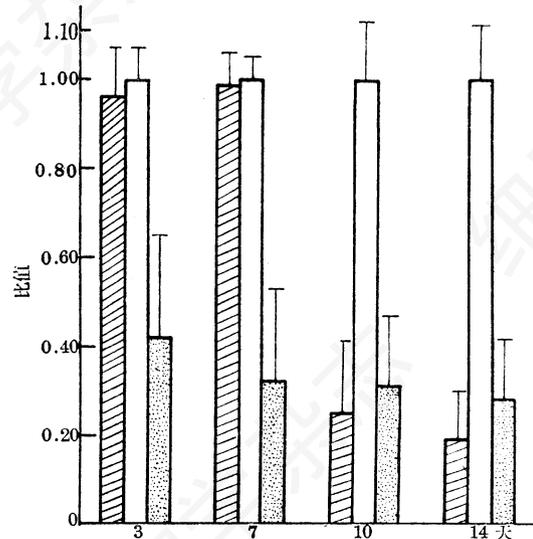


图2 扣除萎缩因素后,去神经后终板酶活力的变化

打斜线的表示培养的,空白的代表正常,打点的表示在体。

比值:去神经的与正常终板酶活力之比值

报告的胆碱酯酶活力的下降和接头褶的消失,乙酰胆碱敏感性的增加亦是如此(Miledi, 1962; Bekoff和Betz, 1977^[11])。离体培养下延缓去神经变化的机理尚不清楚。氯化金组织学染色证明接头前的神经末梢与在体去神经的一样,均在3天内变性,因此末梢变性的迟早不能提供解释的基础。体外培养的动物细胞,一般先有几小时至几天的潜伏期^[12]。去神经大鼠膈肌在器官培养下延缓去神经的变化,可能与潜伏期有关。

参 考 文 献

- [1] Guth, L., R. W. Albers and W. C. Brown, 1964. *Exp. Neurol.*, 10: 236—250.
- [2] Kiauta, T., M. Brzin and W. D. Dettbarn, 1977. *Exp. Neurol.*, 56: 281—288.
- [3] Hall, Z. W., 1973. *J. Neurobiol.*, 4: 343—361.
- [4] Miledi, R., 1962. *Nature*, 194: 981—982.
- [5] Peterson, E. R. and S. M. Crain, 1972. *Exp. Neurol.*, 36: 136—159.
- [6] 鲍璿、陈惠卿、徐维奇, 1980. 生理学报, 32: 245—252.