

# 细胞内分裂及细胞内复制诱导\*

詹铁生 K. L. Satya-Prakash

(德克萨斯大学医学院遗传系)

## 摘 要

以中国雄仓鼠肺成纤维细胞(Don细胞株)为实验材料,用二乙基己烯雌酚(DES)作诱导物,诱使细胞进行细胞内复制和细胞内分裂。实验采用不同剂量、不同处理时间和恢复时间,取得了良好的结果。在18个试验组中,有50%的试验组获得成功,最高诱导频率达56%,是前人研究结果的2.4倍,同时降低了诱导物质的毒性,加大了有效诱导剂量与毒害剂量间的差距,使有效诱导剂量的变化,高低相差10倍;使发生诱变的细胞大量存活,同时进行分裂活动。

**关键词:** 有丝分裂周期; Don细胞株; 细胞内复制; 细胞内分裂

细胞内分裂(Endomitosis)及细胞内复制(Endoreduplication)常见于哺乳动物及人类的病变组织,它们使细胞内的染色体数目加倍。细胞内分裂与有丝分裂相似,但是局限于核内,没有核分裂与细胞分裂相伴随,细胞内复制最先由Lcyan和Hauschka<sup>[1]</sup>于1953年提出。它是细胞内分裂的一种方式,但是没有与有丝分裂相似的任何表现。细胞内复制由间期染色体复制造成。如果在细胞内复制之后进行有丝分裂,内复制细胞就会在中期,以双染色体,多染色体的形式出现。这些现象虽然被看成一种特殊变化,却广泛发生于生物体内的某些组织<sup>[2]</sup>和某些发育阶段。

本世纪50年代以来,随着体细胞遗传学的发展,人们开始用各种理化因素诱导细胞内分裂<sup>[3,4]</sup>,但是频率不高。本项研究旨在提高诱导频率,探测细胞发育周期的影响因素,加强对细胞分裂的控制能力。这对于开展多倍体育种和细胞生物工程都有着重要作用。

## 1 材料和方法

中国雄仓鼠肺成纤维细胞(Don细胞株)来自T.C.Hsu实验室,化学诱变剂为二乙基己烯雌酚(DES)(Difco公司产品),培养液为含10%小牛血清的F-10培养液,Don细胞在T-25型塑料瓶中培养,一次性使用,每次加培养液15ml,然后接种。

本文于1988年7月22日收到。

\*该研究在美国T.C.Hsu's Laboratory, Department of Genetics, the University of Texas M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute at Houston, Houston Texas进行,承蒙Dr. Hsu指导帮助,特此致谢。

试验前先将低温保存的Don细胞接种到培养瓶,待细胞贴壁长满整个培养瓶底部时收获。用胰蛋白酶处理使细胞脱壁分离,将部分细胞制片镜检,仍保持原细胞株特征( $2n=22$ )的材料用于研究工作。经过繁殖的细胞扩大接种到新的培养瓶,然后用 $CO_2$ 气调整pH值至7.0,拧紧瓶盖,在 $37^\circ C$ 的恒温培养箱中进行培养。经过16小时细胞贴壁生长,再向培养瓶加入DES,进行诱导处理,试验组按照剂量、处理时间与恢复时间分组。经试剂处理后,将细胞培养瓶用Hank's液冲洗三遍,除掉细胞表面残存的诱导物(DES),向培养瓶加入新鲜培养液,让处理过的细胞继续在 $37^\circ C$ 恒温箱中培养一定的时间。收获前一小时向每个培养瓶加秋水仙胺 $0.3ml$ (浓度为 $2\mu g/ml$ )。收获时用胰蛋白酶处理10min,使细胞脱壁,用吸管将细胞悬浮液移入离心管离心,然后用 $0.075M$  KCl溶液低渗处理,卡诺液固定,按常规空气干燥法制片,Giemsa染色,镜检。

## 2 结 果

二乙基己烯雌酚(DES)诱导处理分为5个剂量水平,处理时间从 $4\sim 48h$ ,恢复时间为 $0\sim 30h$ ,前后共试验5次,整个结果如表1所示。从表1看出,对照组经过 $34h$ 的对照培养,

表1 DES对Don细胞的处理诱导结果

组 别	处 理		恢复时间 (h)	受检分裂细胞数	频 率 (%)			$X^2$ 检验 (以对照 组为基础)
	剂 量 (克分子浓度)	时 间 (h)			二倍体	多倍体	内复制	
对 照	0	4	30	212	99.1	0.9	0	
1	$1 \times 10^{-4}$	4	7	182	99.5	0.5	0	
2	$1 \times 10^{-4}$	4	16	201	96.5	3.5	0	
3	$1 \times 10^{-4}$	4	30	234	91.5	3.8	4.7	**
4	$5 \times 10^{-4}$	4	30	233	86.7	7.3	6.0	**
5	$7.5 \times 10^{-5}$	4	30	214	95.8	4.2	0	*
6	$7.5 \times 10^{-5}$	8	22	210	97.0	2.4	0.5	
7	$5 \times 10^{-5}$	8	20	206	95.1	4.9	0	*
8	$1 \times 10^{-4}$	8	13	223	89.7	6.3	4.0	**
9	$1 \times 10^{-4}$	8	16	205	89.7	5.9	4.4	**
10	$1 \times 10^{-5}$	24	0	169	97.6	2.4	0	
11	$7.5 \times 10^{-5}$	14	0	124	57.1	6.5	36.4	**
12	$7.5 \times 10^{-5}$	15	24	206	70.8	29.2	0	**
13	$7.5 \times 10^{-5}$	22	20	240	48.3	16.7	35.0	**
14	$7.5 \times 10^{-5}$	24	0	258	62.0	38.0	0	**
15	$5 \times 10^{-5}$	23	0	206	43.7	54.8	1.5	**
16	$1 \times 10^{-5}$	48	0	很少				**
17	$7.5 \times 10^{-5}$	48	0	无				**
18	$5 \times 10^{-4}$	15	0	无				**

注: \*\*与对照组有质的差异。

99.1%的细胞为二倍体, 很少发生畸变, 是一个稳定的细胞株, 试验材料符合要求。该细胞株经过不同处理, 取得了良好的结果。在18个试验组内, 有9个组出现了细胞内复制或内分裂, 与对照组差异极显著。其中有三个组的诱导频率(多倍体与内复制细胞所占的百分数)超过40%, 最高达56.3%。

### 3 分析与讨论

#### 3.1 二乙基己烯雌酚的剂量效应

由表1可见,  $1 \times 10^{-5}$  克分子浓度为无效诱导剂量, 24h以内的诱导处理不产生诱导作用, 与对照组无差异; 48h处理引起细胞死亡, 看不到分裂活动。这表明DES的诱导作用只能在达到一定的剂量时才能表现。当DES的用量在  $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4}$  克分子浓度范围, Don细胞会出现多倍体与内复制现象, 表明这些剂量为有效诱导剂量。

如果将有效诱导剂量:  $5 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  克分子浓度划分为高剂量,  $7.5 \times 10^{-5}$  为中剂量,  $5 \times 10^{-5}$  为低剂量。比较不同剂量的诱导频率, 就会发现低剂量可产生高诱导频率,  $5 \times 10^{-5}$  克分子浓度的处理, 产生出最高的诱导效果, 诱导频率为56.3%; 而高剂量  $5 \times 10^{-4}$  克分子浓度的处理, 诱导频率只有13.3%, 当处理时间为15h, 被处理的细胞遭到DES的毒害作用, 丧失分裂能力。在有效诱导剂量范围, 处理剂量与诱导效果呈反相关关系。

#### 3.2 处理时间对诱导效果的影响

表1说明, 处理时间对诱导效果有着重要的作用。在有效剂量范围内, 处理时间与诱导频率呈抛物线关系(图1)。处理4h开始产生诱导作用, 以后诱导频率随处理时间而增高, 经过13h(大约为一个分裂周期), 诱导频率陡增, 处理24h, 大约两个细胞分裂周期, 诱导频率达到最高值; 48h处理使细胞破裂死亡, 产生许多微核, 看不到分裂细胞。由于缺少30h处理的试验组, 对整个诱导效应的峰值位置, 以及进一步处理的变化方式还需研究。

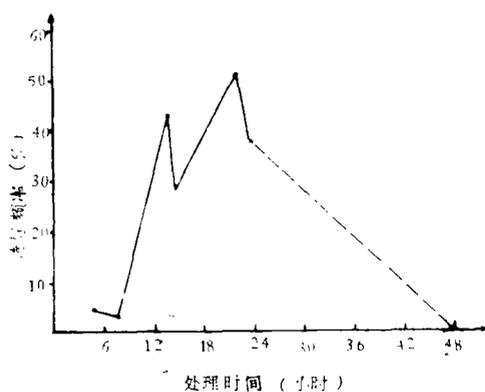


图1 诱导效果的时间曲线  
——实验所得, .....推测  
剂量  $7.5 \times 10^{-5}$  克分子浓度

处理效果的时间曲线受到剂量大小的影响。无效剂量 ( $1 \times 10^{-5}$  克分子浓度) 处理不产生诱导作用, 长期处理 (48h) 使细胞死亡。因而用延长处理时间的方法也不能使无效剂量产生诱导效应。在有效的诱导剂量范围, 提高DES的用量, 出现诱导作用的时间提前。  $5 \times 10^{-4}$  克分子浓度处理4h就出现差异极显著的诱导作用, 而其它剂量组在这一处理时间, 大多数效果不明显。当用  $5 \times 10^{-4}$  克分子浓度对Don细胞处理15h, 细胞的活动受到严重干扰, 全部收缩成球形, 制片检查无中期细胞存在, 从而把高剂量DES的诱导作用限制在狭窄的时间范围, 使DES的诱导作用降低。

### 5.3 恢复时间对诱导效果的作用

Don细胞受到DES的处理,其代谢活动受到干扰,从细胞接受干扰到细胞复制行为的变化需要一定的时间。因而进行短时间处理,还需要一段恢复时间才能将DES的作用表现出来。表1中的4h处理组,由于恢复时间长短的不同,细胞诱导频率也不相同。用 $1 \times 10^{-4}$ 克分子浓度处理4h的组别,从第一组到第三组,随着恢复时间的延长,诱导频率从0.5%增长到8.5%,与对照组的差异从不显著到极显著。此外恢复时间对DES的长期处理也有很大的促进作用。第13,14两组处理剂量相同,处理时间相近,长达22h以上。由于第13组有20h的恢复时间,诱导频率比第14组高13.7%。这说明恢复时间对于提高DES的诱导效果十分重要。

### 3.4 二乙基己烯雌酚的诱导作用

与前人的试验结果<sup>[3]</sup>相比发现,二乙基己烯雌酚是一种优良的细胞内分裂、内复制诱导剂。Jackson<sup>[3]</sup>用 $\beta$ -巯基乙醇及 $\beta$ -巯基丙酮酸进行诱导,最高诱导频率为23%。本试验诱导频率高达56.3%,相当于前者的2.4倍。DES的第二个优点是毒性小。Jackson用 $\beta$ -巯基乙醇作诱导物,当诱导频率超过10%时,总细胞数及分裂细胞数大大减少,在一个试样中可供计数的分裂细胞最少的只有10个。本试验当诱导频率超过56%时,可供计数的细胞与对照组无多大差别。DES的第三个优点是有效剂量的变异范围大。Jackson报道,有效的诱导剂量接近中毒剂量,本次试验DES的有效诱导剂量大小相差10倍,范围宽广。这样可以选用低剂量处理,减小对细胞的毒性,提高诱导频率。

### 3.5 细胞内分裂与细胞内复制在诱导过程中的关系

这两种现象的发生机制完全不同,但是为什么会在诱导过程同时发生?一个可能的解释是:内复制细胞在下一个细胞分裂的晚中期,复制出的两对同源染色体(图2)进一步分开,表现为多倍体。按照这一解释推理,在诱导过程,应该先形成内复制细胞,然后出现多倍体细胞。可是在第1~3试验组,都是用同剂量的DES处理4h,恢复时间短的组只出现多倍体,当恢复时间延长时,出现了内复制细胞。这一结果与上述解释相悖。这说明DES能引起两种不同的细胞周期异常现象。



图2 显示内复制的中期Don细胞

### 参 考 文 献

- 1 Levan A, Hauschka T S. J Nat Cancer Inst 1953; 14 (1) : 43
- 2 Swanson C P, Merz T, Young W J. Endomitosis and polyteny, in: Cytogenetics. 2nd ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc, 1981: 194-199
- 3 Jackson J F. Science 1963; 141: 424-426
- 4 Hereros B, Ciannelli F. Nature 1967; 16: 286-287

# INDUCING OF ENDOMITOSIS AND ENDOREDUPPLICATION OF DON CELLS

Zhan Tiesheng

*(Department of Animal Science, Northwestern Agricultural University)*

K. L. Satya-prakash

*(Department of Genetics, the University of Texas M. D. Anderson Hospital and  
Tumor Institute, at Houston)*

## Abstract

In the research, the Don cells were treated with DES(diethyl stilbestrol) to induce endomitosis and endoreduplication using different dosages of DES and time of treating and recovering. Good result was obtained in the test, that 56.3% of the cells in mitosis was shown as polyploid and endoreduplicating cells in one of the test groups; 36.5% of endoreduplicating cells in another group. The percentage of induced cells was 2.4 times higher than that by Jackson, and it was also found that DES was a good inducing agent to obtain endomitosis and endoreduplication whose toxicity was low to the cells and large in the differences between the effective dosage and poisonous dosage of the chemicals using to induce endomitosis and endoreduplication. In the range of effective dosage the highest was 10 times as high as the lowest.

**Key words:** mitotic cycle, Don cell line, endomitosis, endoreduplication