

研究工作

应用液闪计数法测定 CHO 细胞周期时间

吴 同 乐

(中国科学院生物物理所, 北京)

张鸿卿 宋平根 袁传照 张 成

(北京师范大学生物系) (中国科学院遗传所, 北京)

Howard 和 Pele 首先提出细胞周期的概念^[1]。Ouastler 和 Sherman 利用 ^3H -TdR 标记有丝分裂百分比的方法 (PLM 或 FLM) 研究了细胞周期各时相^[2], 为细胞动力学的研究提供了重要手段。

迄今为至, PLM 法仍是测定细胞动力学的重要手段。但此法有其局限性, 如放射自显影曝光时间较长, 计算标记有丝分裂细胞的工作量大, 并受人为主观因素的影响。

本文采用液闪计数法研究 CHO 细胞周期时相, 方法简单、准确、快速。

一、材料和方法

1. 细胞株及培养条件

选用 CHO-K1 细胞株, 培养在含有 10% 小牛血清、30% 的 0.5 水解乳蛋白和 60% 的 Eagle 培养液中, 每次接种约 3×10^7 细胞/60 毫升培养液。

2. 脉冲标记

在严格无菌操作下, 将细胞接种在含有 60 毫升 Eagle 培养液的大方瓶中, 37°C 下培养 28 小时。细胞进入对数增殖期, 成单层贴壁生长, 此时, 加入最终浓度为 1 微居里/毫升 ^3H -TdR 进行脉冲标记 10 分钟, 然后倾出培养液, 加入 7.5 毫克分子量的 TdR (36.2 毫克 TdR/20 毫升) 20 毫升洗一次 (约 1 分钟), 立即加入 37°C 新鲜 Eagle 培养液 40 毫升, 在 37°C 下培养。

3. 细胞的收集

培养一小时后取出, 水平放在康氏震荡器上, 按每分钟 240 次震荡 15 秒后, 弃去原培养液, 改换温浴的新鲜培养液继续在 37°C 下培养, 目的是除去飘浮和游离的间期细胞和死亡细胞。培养 15 分钟后取出, 震荡 15 秒, 即可收集 M 期同步细胞。如此每间隔两小时收集一次, 共收集约 25 次 (均是无菌操作)。将收集的细胞悬液以 1000 转/分离心 10 分钟; 弃去上清液, 用少量生理盐水轻轻吹打沉淀细胞, 并集中到一个离心管中。如此重复一次, 再一次离心除去上清液。沉淀加入一毫升新鲜生理盐水, 轻轻打匀; 取出一滴在光学显微镜下进行细胞计数, 其余部分则用生理盐水稀释到 10 万细胞/毫升, 分别用于细胞学检查、PLM 和液闪计数测定。

4. 液闪计数法

吸取 10^5 细胞/毫升的细胞悬液加入到含有 5 毫升 PPO-POPOP-二氧六环的闪烁液测量瓶中, 用 LKB 液闪计数器测量。根据每分钟细胞的放射性计数 (经有丝分裂指数的修正) 和相对脉冲标记间隔的时间作图。

5. 细胞学检查及标记有丝分裂方法 (PLM)

将剩余的细胞悬液离心去上清。沉淀用甲醇和冰醋酸混合 (3:1) 溶液固定。

1) 细胞学检查: 取一滴固定后的细胞悬液滴片, 空干, Giemsa 染色; 在显微镜下进行

有丝分裂指数 (MI) 的检查。

2) 标记有丝分裂细胞指数 (PLM), 将固定的细胞悬液滴片, 空干, 涂以核 4 乳胶(中国科学院原子能研究所生产), 在 4℃ 下曝光六天, 显影、定影后, Giemsa 染色, 进行镜检, 计算标记有丝分裂细胞的百分数, 并针对各间隔时间作图。

6. 曲线拟合

从实验结果看, 如果只用液闪所测的每分钟放射性计数或标记有丝分裂细胞指数作图, 一般得不出典型的双峰值图形, 为此, 我们对曲线做必要的拟合。

拟合的方法是采用高桥模型^[3], 将整个周期分成 G_1 、 S 、 G_2 和 M 四个时相, 每个时相又可分成若干小室, 细胞通过每个小室都看成是一个 Poisson 过程。设整个周期的小室数是 K , 每个小室内的细胞数是 $C_i(t)$, 当 $i = 1, \dots$, 时, 可得到下述微分方程组:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} C_1(t) &= 2\lambda_K C_K(t) - \lambda_1 C_1(t) \\ \frac{d}{dt} C_2(t) &= \lambda_1 C_1(t) - \lambda_2 C_2(t) \\ &\dots\dots\dots \\ \frac{d}{dt} C_K(t) &= \lambda_{K-1} C_{K-1}(t) - \lambda_K C_K(t) \end{aligned}$$

这里的 λ_i 是细胞从第 i 个小室进入下一个小室的转移常数, 对此方程组, 给定初条件, 用 Runge-Kutta 方法即可进行数值解, 从而得出一条曲线; 比较此曲线与实测数据, 用 Neuton-Ruphson 方法最优法, 使方差最小, 即可算出最后的结果。

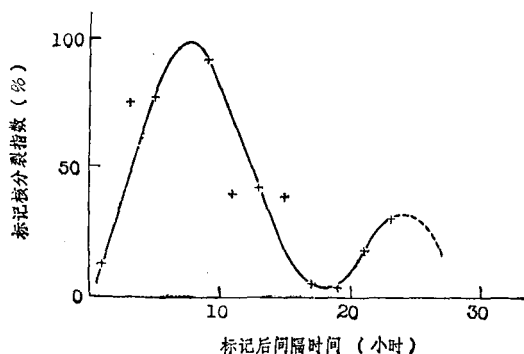


图 1 标记有丝分裂法

同时我们还采用了 Mendelsohn 和高桥提出的另一方法^[4]作为辅助手段, 简化某些计算过程。

二、结果和讨论

1. 实验数据经过曲线拟合后得出图 1 及 2。经过计算结果如下:

	T_C	T_{G1}	T_S	T_{G2}	$*T_M$
液闪法	29.3	17.0	9.0	2.5	0.8
PLM 法	29.7	17.7	9.0	2.0	1

单位: 小时 * 估计值

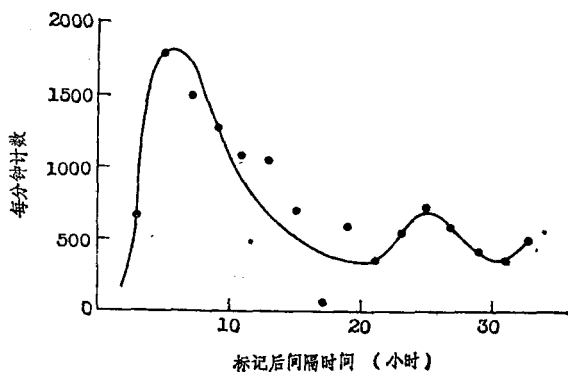


图 2 液闪计数法

从以上两组实验数据看, 结果比较一致。与 Barranco (1977)^[5] 的报道 ($T_C = 14.7$, $T_S = 8.0$, $T_M = 0.5$, $T_G = 2.0$, $T_{G1} = 4.2$) 比较, 除了 T_C 和 T_G 有差别外, T_M 、 T_{G2} 、 T_S 都近似。

据报道^[6], 在一个细胞群体中 T_C 时间的变动, 主要是由于各个细胞中 T_{G1} 长度较大幅度变化引起的。至于一个均一的细胞群体中各个细胞 G_1 期变化不定的原因, 目前尚不太了解; 还不能确定这种变化是否反映了细胞整体或部分 G_1 期速度的变化, 或者由于持续的变化在 G_1 期的某个点上暂时被阻断。根据 Pardee 等人报道^[7], 在 G_1 期确实存在一个阻抑点即“R”点; G_1 期长度的易变性即反映了持续变化的细胞倾向于暂时停留在此点, 在这个点上周期变化受到阻断。而根据 Smith 和

Hartin^[8] 的观点, 应将整个细胞周期分为“A态”和“B态”两个不同部分。“A态”包括了G₁期的大部分, 在这一部分, 细胞可以随机停顿, 一旦有机遇即可过渡到“B态”而“B态”包括 $T_s + T_{G_2} + T_M$ 以及 T_{G_1} 的剩余部分, 其不同于A态之点是B态一旦起始即不可避免地、完成周期的运转。这说明一个细胞群体周期的变化主要是由 T_{G_1} 的易变性决定的; 正因为 T_{G_1} 的改变, 影响了 T_c 的长短。

我们的实验结果是 T_c 和 T_{G_1} 延长, 这一方面可能因培养条件和细胞本身某些程度的变化, 另一方面可能因实验中培养液的不断更新, 细胞经多次震荡和低温条件影响, 这些因素都可能影响细胞动力学的进程, 累及由“A态”向“B态”运转的速度。

2. 在理想条件下, 利用液闪法或标记有丝分裂指数法 (PLM) 可以从曲线上直接计算出周期各时相的持续时间。但实际上, 在一个细胞群体中, 细胞分布是非均一的, 由此用液闪计数或 PLM 得出的曲线不是典型的双峰值图形, 因此必须进行曲线的拟合。

曲线拟合法有很多种; Stell 将其归为八大类^[9]。而应用较多也较成功的是 Barrett-Steel-Hans 法和高桥-Mendelsohn 方法。前一类方法是将周期分为三个时相, 可是, 当第二个峰值不足 50% 时, 应用就受到限制。后一类方法采取一定补救措施后, 能解决这个困难, 但计算量较大。我们采用高桥等人的方法, 从以上两组曲线拟合所得数据看, 结果比较一致, 这是此法的优点。因此, 影响参数的与其说是个别的点, 不如说是第一个峰下的面积, 因为面积的稳定性, 所以最后的结果也比较稳定。

为了验证方法的可靠性, 我们曾用 PLM 方法测定 CHO-K1 细胞的周期。结果所得周期的参数与液闪法相似 ($T_c = 26$ 小时, $T_{G_1} = 12.7$ 小时, $T_s = 8.2$ 小时, $T_{G_2} = 3.9$ 小时, $T_M = 1.2$ 小时)。从而进一步肯定了此法的可靠性。

3. 尽管液闪法如同 PLM 法一样存在上述的一些问题, 但液闪法仍不失为一种简单、快速和准确的方法。用液闪法在实验结束后一小时内即可得出有关参数, 而 PLM 法则需数星期。

4. 用有丝分裂选择法收集的有丝分裂期细胞, 其分裂指数在 90% 以上, 但为了获得更为精确的结果, 对脉冲标记后不同时间内收集的细胞的放射性, 进行有丝分裂指数修正是有意义的。

参 考 文 献

- [1] Howard, A. et al.: *Heredity*, Suppl. 6, 261, 1953.
- [2] Quastler, H. et al.: *Exp. Cell Res.*, 17, 420, 1959.
- [3] Takahashi, M. et al.: *Cell tissue kinetic*, 4, 505, 1971.
- [4] Mendelsohn, M. L. et al.: *The Cell Cycle and Cancer* (ed by R. Baserga), Chap III, Dekker, New York, 1971.
- [5] Barranco, S. C. et al.: *Cell tissue kinetic*, 10, 335, 1977.
- [6] Prescott, D. M.: *Reproduction of Eukaryotic cell*, Chap IV, Academic press, 1976.
- [7] Pardee, A. R.: *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 71, 1286, 1974.
- [8] Smith, J. A. et al.: *The cell cycle* (Society for Experimental Biology Series 10, Edited by P. C. L. John), 38, 1981.
- [9] Steel, G. G.: *Growth Kinetics of tumours*, Clarendon Press, Oxford, 1977.

[本文于 1984 年 8 月 13 日]

(上接第 10 页)

- [11] Moore, L. E. et al.: *J. Memb. Biol.*, 54, 157, 1980.
- [12] 蔡体导: 生物化学与生物物理进展, 4, 9, 1984.
- [13] Colquhoun, D. et al.: *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 199, 231, 1977.
- [14] Sakmann, B. et al.: In *'Advances in pharmacology*

and therapeutics V. 1. Receptors' (Ed. J. Jacob), Pergamon Press, Oxford and New York, 81, 1978.

- [15] Anderson, C. R. et al.: *J. Physiol.*, 235, 655, 1973.

[本文于 1984 年 12 月 5 日收到]