

# 猪淋巴细胞周期的研究

柳万生 刘娥娥  
(西北农业大学畜牧系)

## 摘 要

本文以 BrdU-Giemsa 法分析了猪的外周血淋巴细胞周期。结果表明, 猪淋巴细胞周期时长为 15.7 小时, 其中 S 期为 7.6 小时, M 期为 0.6 小时, G<sub>1</sub> 期为 0.5 小时, G<sub>2</sub> 期为 7.0 小时; 猪的淋巴细胞随着在体外培养时间加长, 其分裂周期有缩短的趋势; 被转化的猪淋巴细胞在体外的存活时间大约为 3~4 天。

**关键词** 猪, 淋巴细胞, 细胞周期, BrdU-Giemsa 法

细胞周期研究始于本世纪 50 年代初期。40 年来, 从事该项研究的学者们已对数种哺乳动物, 尤其是人类和鼠类不同类型细胞的细胞周期进行了测定<sup>[1]</sup>, 但尚未见有关家畜各类细胞的细胞周期的报道。

目前, 测定细胞周期的方法有两种: 一种是由 Taylor 等人<sup>[2]</sup>建立的 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷 (<sup>3</sup>H-TdR) 掺入细胞 DNA 的放射自显影方法, 因该法仅能观察到一个周期的 DNA 复制, 且技术操作较难, 在常规应用方面受到一定限制<sup>[3]</sup>。另一种方法是由 Latt 首创的 BrdU-Hoechst 技术, 后经 Korenberg 等<sup>[4]</sup>改进形成的 BrdU-Giemsa 法, 此法简便易行。利用这一方法, Crossen 等<sup>[5]</sup>、田竟生等<sup>[6]</sup>测定了人类淋巴细胞周期, Zahed 等<sup>[7]</sup>分析了人类绒毛细胞周期。

作者在进行猪染色体畸变和 SCE 分析过程中, 因缺少淋巴细胞周期的有关资料, 无法获得足够的、典型的第一、第二次分裂中期的细胞, 给研究工作造成很大困难。为此, 采用 BrdU-Giemsa 法对猪外周血淋巴细胞周期作了测定。

## 材 料 与 方 法

一、实验材料 西北农业大学种猪场长白猪 9 头, 其中 1 月龄小猪 2 头 (♂1, ♀1), 后备猪 5 头 (♂2, ♀3), 成年猪 2 头 (♂1, ♀1)。由前腔静脉或耳静脉采集血样。

二、淋巴细胞培养和染色体标本的制备 按常规外周血淋巴细胞培养法, 于 38.5°C 下全血培养 24 小时后 (现发现人的淋巴细胞在开始培养的 24 小时内不进行 DNA 合成<sup>[8]</sup>, 所以需要预备培养时间), 加入 BrdU, 使培养物的最终浓度为 10 μg/ml, 避免继续培养 16、18、20、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、48、52、56 或 60 小时, 然后分批终止培养, 收获细胞。终止培养前 3 小时, 加入秋水仙素, 使最终浓度为 0.04 μg/ml。常规气干法制片。

\* 刘娥娥现在的工作单位是北京市莲花池养鸭场。

\*\* 本文于 1991 年 5 月 18 日收到。

三、姐妹染色单体色差法 (SCD) 参照王子淑报道的 SCD 处理法<sup>[3]</sup>, 稍加修改。

四、细胞周期分析 经 SCD 处理的标本置光镜下, 每个个体观察约100个细胞, 根据两条染色单体全深染、两条染色单体只有一条深染 (全数染色单体的 1/2 深染)、全数染色单体的 1/4、1/8或 1/16 深染来判断细胞群中某一细胞依次是处于第一、第二、第三、第四或第五次有丝分裂时期, 统计不同培养时期各次分裂中期细胞的百分数, 进而推算出细胞周期及不同时期相的时长。

此外, 不同培养时期的制片, 每个个体至少观察1000个细胞, 统计分裂相数, 计算有丝分裂指数。

## 结果与分析

### 一、猪淋巴细胞周期的时长 (T<sub>c</sub>)

不同培养时期各次分裂中期细胞的百分数及分裂指数列于表1。将其中第二次分裂的百分数绘制成曲线如图1所示。图中 T<sub>c</sub> 正好为一个完整的细胞周期, 其时长为15.7 (43.2~

表1 不同培养时期各次分裂中期细胞百分数和分裂指数  
Table 1 Percentage of 1st, 2nd, 3rd and 4th division metaphases and mitotic index in different culture time

加入 BrdU 后 培养时间 Culture time after treatment with BrdU (h)	试验猪 头数 No. of animals	观察的细胞数 No. of cells observed	各次分裂中期细胞的百分数 Percentage of metaphases in cycles				分裂指数 Mitotic index ( $\bar{x} \pm s$ )
			第一次 1st	第二次 2nd	第三次 3rd	第四次 4th	
18	7	704	99.6	0.4			3.63±0.78
20	7	688	98.8	1.2			3.72±1.21
22	9	1042	84.3	19.3			3.68±0.94
24	7	668	80.7	19.7			3.25±0.71
26	7	712	62.8	37.2			3.03±1.14
28	7	701	41.7	58.3			2.79±0.95
30	7	733	31.7	65.1	3.2		3.12±0.84
32	9	874	15.5	79.1	5.3		3.91±2.51
34	9	898	20.3	70.0	9.7		2.47±0.86
36	9	1011	27.5	44.4	28.1		1.93±0.32
38	9	942	14.3	38.5	47.2		1.99±0.34
40	9	900	9.3	35.0	55.7		2.10±0.31
42	9	918	2.5	40.4	56.4	0.7	2.07±0.45
44	9	887	1.1	56.6	40.4	1.9	2.21±0.48
48	9	764	3.7	51.2	37.0	8.1	3.75±1.71
52	9	864	5.0	41.8	46.0	7.2	2.43±0.30
56	9	781	8.2	52.3	31.7	7.8	1.98±0.56
60	9	857	10.3	31.0	38.0	20.7	1.66±0.38

27.5) 小时。

按同样方法, 将第三次分裂百分数曲线绘图分析, 测得细胞周期时长约为13小时, 与图1中  $T_c'$  的时长 ( $55.3 - 43.2 = 12.1$  h) 相近。说明猪淋巴细胞随着在体外培养时间的加长, 其分裂周期有缩短的趋势。

## 二、猪淋巴细胞周期中各时相的时长

细胞周期可以划分成四个时相, 即  $G_1$  期、S期、 $G_2$  期和M期。因为图1曲线与放射自显影术所获得的标记分裂指数曲线相似, 所以, 作者按放射自显影术计算各时相的方法对表1和图1资料进行了分析。

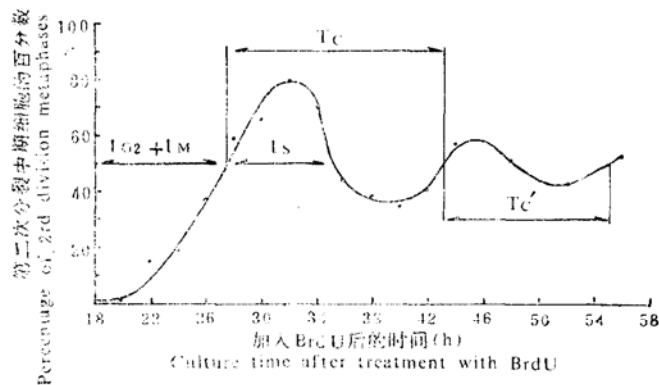


图1 第二次分裂中期细胞的百分数曲线

Fig. 1 The curve of cell cycle of porcine lymphocyte

1. S期时长 ( $t_s$ ):  $t_s$  为第二次分裂细胞百分数曲线开始上升到50%和下降到50%之间的一段时间, 由图1测得  $t_s$  约为7.6 (35.1~27.5) 小时。

2. M期时长 ( $t_M$ ):  $t_M$  可由下述公式<sup>[1]</sup>求得:

$$t_M = \frac{T_c \cdot MI}{\ln 2} \quad (\text{式中: } MI \text{ 为分裂指数})$$

猪淋巴细胞的  $T_c$  为15.7小时, 平均分裂指数  $MI$  (取加入 BrdU 后44小时以前亦即整个细胞周期中各次测定之均值) 为2.85%, 代入上式求得  $t_M$  约为0.6小时。

3.  $G_2$  期时长 ( $t_{G_2}$ ): 从第二次分裂中期细胞出现到其百分数上升达50%之间的间隔, 代表了  $G_2 + M$  期的平均时长。由图1可见, 在加入 BrdU 18小时后, 已有极少数细胞进入二次分裂, 20小时以后, 多数细胞才处于二次分裂的指数生长期。因此, 可由20小时算起到27.6小时为止, 这段时间即为  $t_{G_2} + t_M$ , 大约为7.6小时。减去  $t_M$ ,  $t_{G_2}$  约为7小时。

4.  $G_1$  期时长 ( $t_{G_1}$ ):  $t_{G_1}$  可由下式求出:

$$t_{G_1} = T_c - (t_{G_2} + t_M + t_s)$$

代入上述测定的各项数据, 求得  $t_{G_1}$  为0.5小时。

## 三、被转化的猪淋巴细胞在体外的存活时间

在进行各次分裂中期细胞百分数及分裂指数统计过程中发现, 在分裂指数没有明显下降的情况下 (表1), 第五次分裂的细胞没有出现。而按上述实验结果推算, 第五次分裂的细胞

应该在加入 BrdU 后60小时以前出现。此现象说明,被转化了的猪淋巴细胞在体外培养约 87 ( $24 + 15.7 \times 4$ ) 小时后便会死亡,即被转化的淋巴细胞在体外的存活时间大约为 3~4 天。但我们不能完全排除 BrdU 对细胞寿命有某种影响的可能性。

#### 四、各次分裂中期细胞百分数与分裂指数的关系

由表 1 可见,分裂指数是随着培养时间的加长和第一次分裂中期细胞百分数的下降而下降,这可由细胞的衰老、转化所得淋巴母细胞数的减少以及培养条件和 BrdU 等因素的影响加以解释。但值得注意的是,分裂指数在逐渐下降的过程中,于 32 和 48 小时出现两个高峰,正好与图 1 中第二次分裂细胞百分数出现的两个高峰期相吻合,表明二者之间有某种内在联系。

## 讨 论 与 结 论

一、在体外培养条件下,猪外周血淋巴细胞周期及各时相的时长为:  $T_c = 15.7$  小时,  $t_s = 7.6$  小时,  $t_M = 0.6$  小时,  $t_{c_1} = 0.5$  小时和  $t_{c_2} = 7.0$  小时。据此结果,在猪 SCE 分析中,作者将细胞收获时间由原来加入 BrdU 后的 48 小时改为 33 小时,使得第二次分裂中期细胞的百分数由原来的 31% (6 头平均) 提高到 67.6% (10 头平均),大大地提高了猪 SCE 的分析效率。

二、在前人的研究中<sup>[4-8]</sup>,利用第二次分裂中期细胞出现的时间和其百分数的高峰期来判断、推算细胞的周期,结果只能粗略给出细胞周期的总时长,无法确定各时相时长。本文在原有方法的基础上,引入了放射自显影术的基本原理和思想方法,增加了细胞收获次数,从而得到了如图 1 所示的曲线。从理论上讲,该曲线等同于由  $^3\text{H-TdR}$  标记所得的标记分裂指数曲线,因而可借用放射自显影术的半高度法估计各时相的时长。

三、实验结果表明,在第二次分裂中期细胞出现的高峰期,分裂指数亦高。这与 Crossen 等人<sup>[6]</sup>发现的人类淋巴细胞第二次分裂中期细胞数与分裂指数呈正相关的结论相同。作者认为,出现这种现象的主要原因是由于淋巴细胞对 PHA 刺激的反应程度不同所致。我们知道,外周血中的淋巴细胞几乎都处在  $G_1$  或  $G_0$  期,一般情况下是不再分裂的。当这些细胞受到 PHA 刺激时就会转化为淋巴母细胞,从而具有分裂能力。但处于  $G_1$  或  $G_0$  期的淋巴细胞,由于其衰老的程度不同,对 PHA 的反应力亦不同。当受到 PHA 刺激时,那些比较敏感的细胞先被转化,这个过程起到某种程度的同步化作用,最先转化的这一群淋巴母细胞按其固有的周期(约 16 小时)不断分裂,从而形成了以细胞周期为间隔的分裂指数高峰。而那些对 PHA 不太敏感的细胞,则需要长时间的刺激方可转化,这就是为什么培养到 60 小时时仍有相当数量细胞处于第一次分裂中期的主要原因之一。上述这种现象,从一个侧面也证明了本文中猪淋巴细胞周期测定结果(15.7 小时)的可靠性。

## 参 考 文 献

- [1] 邵伟. 细胞周期浅说. 细胞生物学杂志, 1982, 4(3): 44~49.
- [2] Taylor, J. H. et al. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. Proc. Nat. Acad. Sci., 1957, 43: 122~127.
- [3] 王子淑编著. 人体及动物细胞遗传学实验技术. 成都, 四川大学出版社. 1987, 155~167; 249~251.
- [4] Korenberg, J. R. and Elizabeth, F. F. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. Chromosoma (Berl), 1974, 48(4): 355~360.
- [5] Crossen, P. E. and Morgan, W. F. Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. Exp. Cell Res., 1977, 104: 453~457.
- [6] 田竟生等. BrdU-Giemsa 显示姐妹染色单体分化染色法对人类淋巴细胞周期的初步分析. 生物化学及生物物理进展, 1978, (2): 18~20.
- [7] Zahed, L., Murer-Orlando, M. and Bobrow, M. Cell cycle studies in chorionic villi. Hum. Genet., 1988, 80: 127~134.
- [8] Craig-Holmes, A. P. and Shaw, M. W. Cell cycle analysis using the BUdR-Hoechst technique. Exp. Cell Res. 1976, 99: 79~87.

## STUDIES ON PORCINE LYMPHOCYTE CELL CYCLE

Liu Wansheng, Liu Ee

(Department of Animal Science, Northwestern  
Agricultural University)

## Abstract

Porcine lymphocyte cell cycle was analysed with the BrdU-Giemsa method for demonstrating sister chromatid differential staining. The results showed that the lymphocyte cell cycle time was 15.7 hr., the length of the S, M, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> phases were 7.6, 0.6, 0.5 and 7.0 hr. respectively; There was a shortening trend for the duration of the cell cycle along with the prolonging of the lymphocyte culture time *in vitro*; The living time of the transformed porcine lymphocyte *in vitro* was about 3 to 4 days.

**Key words** Swine, Peripheral blood lymphocyte, Cell cycle, BrdU-Giemsa method