

快速获得大量鱼类肾细胞中期分裂相的 PHA 体内注射法

林 义 浩⁽¹⁾

(山西大学生物系)

提 要

本文报导了 PHA(Phytohemagglutinin 植物血球凝集素)体内注射制备鱼类肾细胞染色体的方法。在北京鳊、广东鲂、鲢鱼、倒刺鲃、胡子鲶、鳊鲃、乌鳢、罗非鱼等分属不同科、目的近 30 种鱼类均获得较高的分裂指数。PHA 体内注射法的平均细胞有丝分裂指数为肾培养的 1.56 倍,血培养的 1.82 倍,常规空气干燥法的 4.51 倍,达到 9.86%。研究结果表明,PHA 在体内同样具有刺激肾细胞有丝分裂的作用。PHA 注射剂量 8—10 $\mu\text{g/g}$ (鱼体重),秋水仙素注射剂量 4—6 $\mu\text{g/g}$ (鱼体重),胸鳍基部各一次注射,效应时间 4—4.5 小时,在 7 小时内便可获得大量中期分裂相。所建立的方法不需进行细胞体外培养,简便快捷,适用于实验室和野外现场制备鱼类染色体。

随着低渗处理、空气干燥和细胞培养技术的兴起与发展,自 1966 年 Ojima 等^[16]采用空气干燥法分析了鲫鱼和金鱼的染色体组型以来,鱼类染色体的研究进展较快。^[4,11,12,20] PHA(Phytohemagglutinin 植物血球凝集素)作为致有丝分裂原在细胞体外短期培养中的广泛应用,使专供鱼类染色体制片的血培养^[18,17]、鳞培养^[18]以及肾细胞培养^[19]等短期培养方法在七十年代初期先后建立,大大推进了鱼类染色体的研究。但是,体外培养需要相当的实验设备和无菌操作,程序繁琐,耗用时间长,在应用上受到限制;常规空气干燥法则获得的分裂相很少,制片效果不理想。我们首次采用 PHA 体内注射刺激肾细胞的有丝分裂,代替体外细胞培养制备鱼类染色体,建立了一种快速简捷的制备方法,在 7 小时内便可获得大量的可供分析的中期分裂相。现予以报导。

材 料 与 方 法

本研究实验用鱼为广东省韶关地区水产研究所、广东省中山市东风鱼苗场和山西省清徐县清泉水库提供的养殖鱼类以及在珠江水系捕获的野生鱼类,共近 30 种。体重自

* 本文大部分实验在广东省韶关地区兽医诊断室、韶关地区水产研究所和中山市东风鱼苗场进行,显微照片在山西农业大学牧医系拍摄,衷心感谢以上单位的大力支持与协助。

(1) 现在广东省韶关地区水产研究所。

10克至1000克不等。实验时间自1981年1月至5月,先后用去各种鱼类500尾以上。PHA体内注射制备鱼类染色体的方法如下:

1. 注射PHA和秋水仙素 自实验鱼胸鳍基部注射PHA溶液(0.9%NaCl配制。PHA为广州市医药工业研究所出品的冻干粉针剂,10mg/安瓿),剂量8—10 μ g/g(鱼体重),一次注射。然后注射秋水仙素溶液,剂量4—6 μ g/g(鱼体重),也为胸鳍基部一次注射。

2. 断尾失血 注射PHA后4—4.5小时,将实验鱼断尾失血30分钟,取出肾脏(头肾部分),用生理盐水反复洗涤。

3. 制备细胞悬液 将肾组织块置于装有少许生理盐水的培养皿中,两手各持一把镊子,反复拉丝、分散肾组织。加入生理盐水,用上海产260目尼龙纱绢过滤。

4. 离心洗涤细胞 将滤液移入15ml离心管,800—1000转/分钟离心3次,每次5—6分钟。

5. 低渗处理 0.075 M KCl处理20—25分钟。

6. 固定 甲醇-冰醋酸(3:1)固定,更换3次,每次20分钟。

7. 滴片 冰片滴片。室外工作时则将玻片置于冰块上进行滴片。空气干燥。Giemsa染液(1:10稀释,pH6.8)染色15—20分钟。

结果与讨论

采用以上方法,我们先后在实验室和生产现场成功制备了北京鳊及其杂种、广东鲂、鲮鱼、倒刺鲃、胡子鲶、鳊鲃、乌鳢、罗非鱼等分属不同科、目的近30种鱼类肾细胞染色体。染色体形态清晰,分散良好(图1)。我们统计了以本文方法制备的20种鱼类染色体制片和以体外短期培养法制备的其中10种鱼类染色体制片的细胞有丝分裂指数,每一标本各随机统计25个视野(300 \times),结果列于表1和表2。由于不同来源的PHA及其效价是影响培养细胞有丝分裂指数的重要因素,为了比较,表2仅列出同一批号PHA的培养结果。依照同一方法,我们还统计了对照实验所得的制片,结果列于表3。表3中实验组一项的肾细胞和肝细胞均取自同一个体。对照实验用鱼均为(团头鲂 \times 北京鳊)(♀)。

关于鱼类体外培养的细胞分裂指数,文献中尚未见过类似的资料。因此,未能与其他研究者的结果加以比较。虽然Yamamoto等^[13]用³H-胸腺嘧啶核苷作放射自显影的研究表明,鲤鱼肾细胞体外培养72小时,合成DNA的细胞数约45%,与人体外周血培养的有关研究相接近^[8],但人体外周血淋巴细胞是较为理想的短期培养物,细胞有丝分裂指数可高达20%以上^[2],鱼类培养细胞的分裂指数却通常较低。如果根据Heckman等^[14]对鱒鱼白细胞培养的研究,未加入纯氧,每一制片的分裂相很少超过10个,供给氧气,每一制片的分裂相也仅在10—1000个,则本文方法的制片效果是颇为理想的。由表1、表2和表3可知,PHA体内注射法的平均细胞分裂指数为肾培养的1.56倍,血培养的1.82倍,常规空气干燥法的4.51倍,达到9.86%。

(1) 见华北七所326.323组, 1974。有关人体淋巴细胞体外培养方法学中的一些问题(铅印本)。

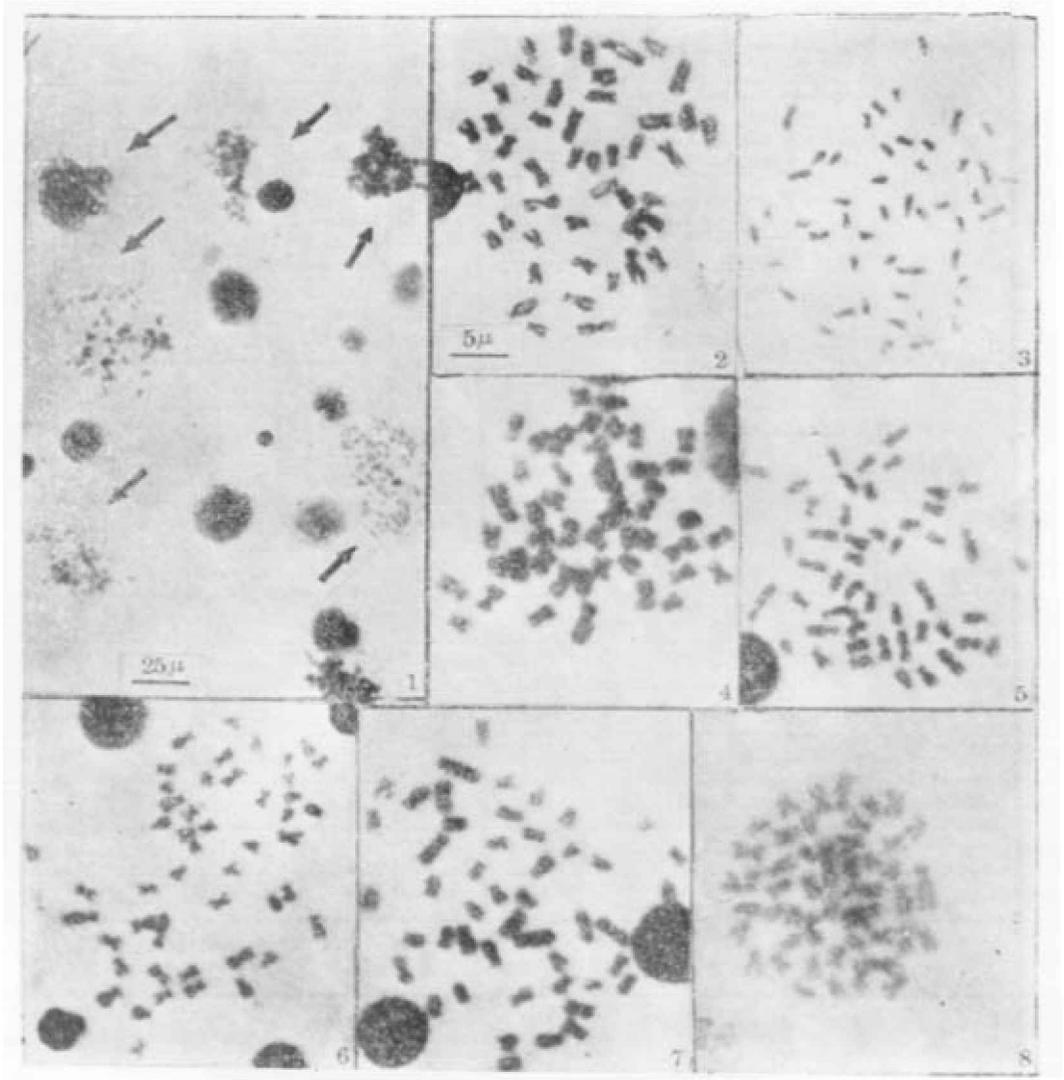


图1 用 PHA 体内注射法展开的肾细胞分裂相

1. 肾细胞中期分裂相(箭头所示);2-8.中期分裂相。其中1和2-3为团头鲂×北京鲮细胞, $2n = 48$;
4-5为团头鲂细胞, $2n = 48$; 6为广东鲂细胞, $2n = 48$; 7-8为北京鲮细胞, $2n = 48$ 。

表1 PHA 体内注射法的细胞有丝分裂指数

科	鱼 别 种	计数的 细胞总数	分裂相 总数	细胞数/视野		有丝分裂指数(%)	
				平均	范围	平均	范围
Cyprinidae	<i>Parabramis pekinensis</i> 北京鲮	3761	303	150.4	92—206	8.06	7.1—11.4
	<i>Megalobrama amblycephala</i> 团头鲂	3029	292	121.2	84—177	9.64	7.7—12.3
	<i>Megclobrama hoffmanni</i> 广东鲂	3422	354	136.9	82—198	10.34	8.6—13.5
	<i>Barbodes (Spi.) denticulatus</i> 倒刺鲃	2976	261	119.0	73—188	8.77	7.0—12.1
	<i>Cirrhinus molitorella</i> 鲮鱼	3642	408	145.7	102—186	11.02	9.4—14.6
	<i>Plagiognathops microlepis</i> 细鳞斜颌鲷	2872	245	114.9	84—168	8.53	6.9—9.8
	<i>Mylopharyngodon piceus</i> 青鱼	3664	362	146.6	104—210	9.88	7.8—11.2
	<i>Ctenopharyngodon idellus</i> 草鱼	3865	426	154.6	113—211	11.02	8.6—13.8
	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> 鲢鱼	3122	377	124.9	86—169	12.08	9.0—14.8
	<i>Aristichthys nobilis</i> 鳊鱼	3421	392	136.8	94—190	11.46	7.6—13.2
	<i>Carassius auratus auratus</i> 鲫鱼	3212	385	128.5	76—201	11.99	9.2—13.8
Cobitidae	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> 泥鳅	3753	336	150.1	110—196	8.95	6.8—10.9
Clariidae	<i>Clarias fuscus</i> 胡子鲇	3425	412	137.0	92—187	12.03	9.6—14.2
Bagridae	<i>Pseudobagrus vachellii</i> 瓦氏黄鲶鱼	2896	331	115.8	78—192	11.43	8.4—12.8
Symbranchidae	<i>Monopterus albus</i> 黄鳝	2912	259	116.5	76—189	8.89	7.2—9.3
Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i> 鳗鲡	3052	197	122.1	76—173	6.45	5.8—8.4
Ophiocephlidae	<i>Ophiocephalus argus</i> 乌鲷	2672	204	106.9	65—157	7.63	6.3—9.8
Anabantidae	<i>Macropodus chinensis</i> 圆尾斗鱼	2564	251	102.6	58—162	9.79	8.6—11.7
Gobiidae	<i>Phinogobius giurinus</i> 吻鰕虎	3246	333	129.8	88—186	10.41	9.4—12.6
Cichlidae	<i>Tilapia mossambica</i> 莫桑比克罗非鱼	3122	272	124.9	81—184	8.71	7.4—10.6

表2 体外短期培养法的细胞有丝分裂指数

鱼 别	培养材料	计数的细胞 总 数	分裂相总数	细胞数/视野		有丝分裂指数(%)	
				平均	范围	平均	范围
团头鲂	肾培养	3545	213	141.3	84—197	6.01	5.5—7.8
广东鲂		3264	246	130.6	72—181	7.54	5.9—8.6
倒刺鲃		3625	216	145.0	76—187	5.96	4.6—7.6
鲮鱼		3024	133	121.0	68—175	4.40	4.0—6.5
鲢鱼		3766	303	150.6	91—204	8.05	6.2—8.9
胡子鲇		3684	293	147.4	76—218	7.95	5.4—8.8

续表

鱼 别	培养材料	计数的细胞 总 数	分裂相总数	细胞数/视野		有丝分裂指数(%)	
				平 均	范 围	平 均	范 围
黄鳝	肾培养	3012	184	120.5	63—171	6.11	5.5—8.2
鳊鲴		2957	162	118.3	65—166	5.48	3.9—6.8
乌鳢		2896	171	115.8	58—180	5.90	3.9—6.4
莫桑比克罗非鱼		3056	182	122.2	74—196	5.96	4.2—6.7
团头鲂	血培养	3262	184	130.5	78—202	5.64	4.6—7.6
广东鲂		3042	183	121.7	82—194	6.02	4.2—8.4
倒刺鲃		3204	181	128.2	74—185	5.65	4.5—6.7
鲮鱼		2896	88	115.8	74—211	2.87	1.9—4.2
鲢鱼		3572	286	142.9	76—189	8.01	7.0—9.3
胡子鲶		3465	209	138.6	82—214	6.03	5.2—7.3
黄鳊		2876	159	115.0	56—198	5.53	4.8—6.2
鳊鲴		2658	131	106.8	48—196	4.93	3.8—6.0
乌鳢		2594	114	103.8	72—177	4.39	3.0—6.8
莫桑比克罗非鱼		2866	146	114.6	76—169	5.09	4.1—6.7

表 3 实验组与对照组细胞有丝分裂指数的比较

组 别	材 料	计数的细胞 总 数	分裂相总数	细胞数/视野		有丝分裂指数(%)	
				平 均	范 围	平 均	范 围
实验组①	肾细胞	8541	273	141.6	84—192	7.71	4.2—8.9
	肝细胞	2412	12	96.5	52—174	0.50	0.0—1.0
对照组②	肾细胞	3984	68	159.4	101—240	1.71	0.4—2.2

① 实验组: 用 PHA 体内注射法制备染色体。

② 对照组: 用常规空气干燥法制备染色体。

我们的实践证明,本文方法虽不能连续检查同一个体的染色体,但不需进行细胞体外培养和无菌操作,不受季节限制,实验设备简单,制片周期短,在 7 小时内便可获得大量的可供分析的中期分裂相,适用于实验室也适用于野外工作,对不易抽血培养的小型鱼类和不耐运输的鱼类更具优越性。并且,直接从活体繁殖的细胞制片,可以排除体外培养时出现有害效应的可能性,可期作为一种监测手段用于水质污染与鱼类染色体损伤相互关系的研究。

众所周知,硬骨鱼类的头肾部分为拟淋巴腺,在机能上与淋巴结相等价,是产生白细胞的主要场所之一^{[6,9](4)}。鱼类的肾细胞——PHA 培养方法^[8,10]正是基于 PHA 在体

(1) 韩先朴,1979。鱼类免疫。鱼病简讯(中国科学院水生生物研究所第三研究室编),5:1—12。

外短期培养中对肾细胞有丝分裂的刺激作用。大量资料表明,鱼类虽然胸腺很原始,也没有真正的骨髓,但能对抗原刺激产生体液免疫反应。已知几种鱼类抗体的合成在胸腺、脾脏和头肾中发生。鱼类也存在细胞免疫,表现出对同种移植的排斥作用和由外来物质引起的炎症反应^[2,9] (1)。鱼类是否具有T细胞和B细胞以及免疫应答是否依赖于这些细胞虽尚未明瞭,但以PHA为致有丝分裂原的鱼类血液、肾细胞体外短期培养可获得大量转化细胞和分裂相表明,鱼类具有能对PHA起反应的T细胞或类似细胞成分。前人的研究证明,PHA具有在体外刺激肾细胞分裂增殖的作用,我们的研究表明,PHA在体内同样能够刺激肾细胞的有丝分裂,对照实验的结果明显指出这一点。

为了探索PHA体内效应的细胞周期,选择适用于染色体制片的注射剂量与效应时间,我们在胡子鲶、黄鳍、罗非鱼、鲫鱼等几种鱼类进行了不同剂量和不同效应时间的PHA皮肤试验,同时抽血检查淋巴细胞的转化情况。结果发现,某些鱼类对大剂量PHA皮试不仅呈迟发型超敏反应,而且更趋于速发型超敏反应。以胡子鲶为例,剂量8—10 $\mu\text{g/g}$ (鱼体重)皮试,注射部位即隆起圆型或椭圆形的乳白色皮斑,并在几分钟内达到最大直径1cm左右,6小时后隆起渐行消退,但24小时后皮斑直径仍未见缩小;淋巴细胞检查表明,注射PHA后0.5小时,1小时,3小时,淋巴细胞总数显著增加,有少量典型的转化细胞出现,但未见分裂相,6小时后淋巴细胞总数变动不明显,也未发现典型的转化细胞。并且,PHA注射剂量超过20 $\mu\text{g/g}$ (鱼体重),有些实验鱼身体僵直而死亡。上述试验指出,就淋巴细胞而言,PHA体内注射的细胞周期与体外短期培养不相平行。这种现象也见之于人体PHA皮试观察与外周血淋巴细胞转化检查。根据唐学序等的报导,健康人体剂量10 μg 的PHA皮内注射30分钟,外周血淋巴细胞转化率为20%左右,甚至出现分裂相⁽²⁾。

免疫学的研究指出,动物诱发T细胞介导反应时,淋巴结的胸腺依赖区出现显著的细胞增殖,且有典型的淋巴母细胞^[4]。PHA皮试不仅反映出T细胞的免疫功能,而且也反映出B细胞的免疫功能。鱼类的细胞免疫过程虽尚属未知,但实验鱼在注射PHA之后淋巴细胞总数与细胞形态的显著改变显然与淋巴组织的活动有关,提示了在体内条件下,作为鱼类拟淋巴腺的头肾组织能够直接或间接地对PHA的刺激作出反应。而鱼类的肾细胞—PHA体外短期培养方法则早已证明,在体外条件下,PHA能够刺激肾细胞的分裂增殖。根据在几种鱼类的初步试验结果,我们采用8—10 $\mu\text{g/g}$ (鱼体重)为PHA体内注射剂量,效应时间4—4.5小时,在分属不同科、目的近30种鱼类均获得满意的结果;实验鱼小自10g的吻鰕虎,大至1000g的鲛鱼,均未在效应时间内出现死亡现象,表明这个剂量是合适的并且是安全的⁽³⁾。鱼类种类繁多,免疫功能有别。因此,本文提出的注射剂量是否在最适剂量范围以及PHA对肾细胞的体内效应,还有待进一步的探讨。

何以同是肾细胞,同是以PHA为致有丝分裂原,体外培养的细胞周期与体内注射迥然不同?众所周知,免疫现象的发生机理涉及到全面而且复杂的过程,PHA的作用关系到诸多方面的因素。体外培养固然是模仿体内条件提供细胞赖以生长繁殖的环境,但毕竟失去了机体作为一个统一整体的各种联系,因而体外环境与体内环境就有着质的差别。

(1) 见205页脚注。

(2) 广州医药工业研究所编,1980。植物血球凝集素(PHA)用于肿瘤、传染病和与免疫功能有关疾病治疗的临床报告及有关研究资料选编,3:173—176。

(3) 此处,安全指在效应时间内存活。

这些差别可以对细胞繁殖的各级调节机制施以不同的影响,从而也就对 PHA 的作用产生影响。前人关于真核细胞繁殖的研究指出,细胞周期的调节主要是通过 G₁ 期的阻留来实现的,非常清楚的一点是,细胞决不会停留在 S 期或 M 期⁽¹⁾上^[6],而 M 期经历的时间很短,通常为 1 小时左右^[7,10,15]。体外培养时,肾细胞可因接种过程中一系列因素的影响导致细胞阻留,尔后再随着培养过程由阻留点进入全周期;而体内注射时,处于各期的肾细胞则可直接完成全周期。PHA 的作用,还可使机体在整体水平上作出积极反应,包括细胞迅速大量繁殖这种方式在内的积极反应。在我们的实验中,采用广州医工所的 PHA 体内注射制备鱼类染色体,均获得较高的细胞有丝分裂指数,而同一批号的 PHA 应用于鱼类细胞体外短期培养却常出现细胞生长不良,制片效果不理想以至失败。如果暂不考虑 PHA 存在效价不稳定这种可能,这也从另一侧面提供了证据,说明体内环境与体外环境的差异导致细胞对 PHA 刺激的应答产生差异,进而导致细胞周期的差异。

参 考 文 献

- [1] 四川医学院微生物学教研组(译),1980. 免疫学纲要,75—80. 人民卫生出版社。
- [2] 四川医学院微生物学教研组(译)同上,101—102。
- [3] 刘凌云,1980. 草鱼染色体组型的研究。动物学报,26(2):126—131。
- [4] 李树深,1981. 鱼类细胞分类学。生物科学动态,(2):8—15。
- [5] 秉志,1960. 鲤鱼解剖,42—48. 科学出版社。
- [6] 张伟成、严文梅、曾令理、陈为藻(译),1980. 真核细胞的繁殖。1—7:151—163. 科学出版社。
- [7] 张伟成、严文梅、曾令理、陈为藻(译),同上,8—39。
- [8] 周焕庚、郑斯英,1978. 人类染色体与辐射诱变,56—59. 原子能出版社。
- [9] 周敏,1980. 鳙鱼染色体组型的研究。淡水渔业,4:3—7。
- [10] 第二军医大学电镜室、复旦大学生物系电镜室,1981. 细胞超微结构及功能,39—40. 上海科学技术出版社。
- [11] 小岛吉雄,1979. 鱼类的细胞遗传学。水产生物の遗传と育種(日本水产学会编),46—63. 恒星社厚生阁。
- [12] Gold, J. R., 1979. Cytogenetics. Hoar, W. S. et al. (ED.) *Fish physiology. Acad. Pr.*, VIII: 353—405.
- [13] Heckman, J. R., and P. E. Brubaker, 1970. Chromosome preparation from fish blood leukocytes. *Prog. Fish Cult.*, 32: 206—208.
- [14] Heckman, J. R., F. W. Allendorf and J. E. Wright, 1971. Trout leukocytes: Growth in oxygenated cultures. *Science*, 173: 246—247.
- [15] Odartchenko, N., H. Cottier; L. E. Feinendeger et al., 1964. Evaluation of mitotic time in vivo, using tritiated thymidine as a cell marker: successive labeling with time of separate mitotic phases. *Exp. Cell Res.*, 35: 402—411.
- [16] Ojima, Y., S. Hitotsumachi and S. Makino, 1966. Cytogenetic studies in lower vertebrates. I. A preliminary report on the chromosomes of the Funa (*Carassius auratus*) and Gold-fish (A revised study). *Proc. Japan Acad.*, 42: 62—66.
- [17] Ojima, Y., S. Hitotsumachi and M. Hayashi, 1970. A blood culture method for fish chromosomes. *Jap. J. Genet.*, 45(2): 161—162.
- [18] Ojima, Y., S. Takayama and K. Yamamoto, 1972. Chromosome preparation from cultured scale epithelium of teleost fish. *ibid.*, 47(6): 445—446.
- [19] Yamamoto, K. and Y. Ojima, 1978. A PHA-culture method for cells from the renal tissue of teleosts. *ibid.*, 48(3): 235—238.
- [20] Васильев, В. П., 1980. Хромосомные фазы рыбобластных и рыб. *Вопр. икhtiологии*, т. 20, вып. 3(122): 387—422.

(1) 原文为 D 期,此处改称 M 期。

A PHA INJECTION METHOD *IN VIVO* FOR THE RAPID OBTAINMENT OF LARGE NUMBERS OF METAPHASE FIGURES FROM KIDNEY CELLS OF TELEOSTS

Lin Yihao*

(Department of Biology, Shanxi University)

Abstract

The method of kidney cell-PHA (phytohemagglutinin) culture *in vitro* for the study of fish chromosomes was reported by Yamamoto, K. and Y. Ojima (1973). In this paper a new method for inducing fish chromosomes divisions is proposed. The PHA administration was by pericardial cavity injection *in vivo*, instead of adding it into the cell culture medium *in vitro*. The injection dose of PHA is 8—10 μ g/g (body weight), the injection position is better located at the base of pectoral fin, the time for response needs about 4—4.5 hours after injection. It needs only 7 hours to obtain a large numbers of mitotic metaphase figures of kidney cell. About 30 species of teleost fishes were examined in the experiments, e. g. *Parabramis pekinensis*, *Megalobrama hoffmanni*, *Barbodes denticulatus*, *Cirrhinus molitorella*, *Clarias fuscus*, *Monopterus albus*, *Anguilla japonica*, *Ophicephalus argus*, *Tilapia mossambica* etc. all giving satisfactory results. The average percentage of mitotic division by PHA injection method is 1.56 times than that of the kidney cell-PHA culture, 1.82 times of the blood-PHA culture and 4.51 times of the usual air-drying, reaching 9.86%. This method has a double advantage being rapid and simple, and also adaptable to the field work.

*The author is in Shaoguan Prefecture Fisheries Research Institute in Guangdong Province at present.