胺、10 mmol/L Tris · HCl、0.1% BSA 和 Tween-20。洗液 2 为含有 0.1% BSA 和 Tween-20 的 PBS。将细胞重悬于 300 μl 含碘化丙锭（PI）的磷酸缓冲液中，于 4 ℃下放置过夜，上流式细胞仪。为进行数据分析，细胞控制为单一二倍体细胞。端粒平均荧光强度表示为 FITC 标记的 $(C_3TA_2)_3$ PNA 探针杂交细胞的平均荧光强度减去无探针杂交细胞的平均荧光强度。端粒长度与端粒平均荧光强度成正比，因此用端粒平均荧光强度检测端粒长度的变化。

1.4　统计学处理

使用 SPSS 11.0 软件分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较用 t 检验。

2　结果

Flow-Fish 法检测细胞端粒长度变化的原理在于细胞端粒由高度重复序列 C_3TA_2 组成，其长度越长，所含重复序列数目越多，所结合的 FITC-$(C_3TA_2)_3$ PNA 探针就越多，其荧光也就越强。因此对同一种细胞而言，Flow-Fish 法检测的单个细胞端粒平均荧光强度与端粒长度成正比。基于 PI 荧光和前向散射光（FSC）而控制检测细胞在 R1 区（即二倍体细胞区），测定该区细胞端粒特异性的 FITC 荧光。端粒平均荧光为与 FITC-$(C_3TA_2)_3$ PNA 探针杂交的细胞的平均荧光减去阴性对照细胞（即与不含探针杂交液作用的细胞）的平均荧光的差值。在 SD 乳鼠心脏成纤维细胞培养基中加入 10 g/L D-gal，细胞端粒平均荧光强度（1.91 ± 0.06）与不加 D-gal 的细胞的荧光强度（4.77 ± 0.12）相比有明显降低（$P < 0.01$），（$n = 3$）。说明 D-gal 能导致 SD 乳鼠心脏成纤维细胞端粒的缩短。

3　讨论

端粒是真核细胞内染色体末端的 DNA 重复片断，由富含 G 的核酸重复序列和许多蛋白质组成，经常被比做鞋带两端防止磨损的塑料套，是保护染色体末端稳定的结构，在细胞增殖的过程中，发现端粒的长度不断缩短[7]，被看成细胞复制的“计时钟”和细胞寿命的“指示剂”，端粒越短，表明细胞经历的分裂次数越多，其分化复制潜能越差，细胞越老[8]。端粒作为复制性衰老的触发器目前越来越受到重视。

Flow-Fish 的测定原理主要根据端粒由高度重复序列 $(C_3TA_2)_3$ 组成，其长度越长，所含重复碱基数目越多，所结合的 FITC-$(C_3TA_2)_3$ PNA 探针就越多，其荧光也就越强。因此，Flow-Fish 中的荧光强度直接反映了端粒长度的变化。本研究通过 Flow-Fish 法证实了 D-gal 能缩短 SD 乳鼠心脏成纤维细胞端粒的长度。在细胞水平显示了 D-gal 致衰老的作用，为建立动物心脏成纤维细胞衰老模型提供了一个新的方法。

参考文献：

[1] VON-ZGLINICKI T, PILGER R, SITTE N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 28(1): 64－74.

[2] 王　晶，姬志娟，赵志炜，等. APP17 肽对 D-半乳糖性脑老化模型小鼠学习、记忆功能和海马神经元 NT-3、NGF 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志，2000，16(6)：545－548.

[3] 李　亚，王建军，陈启盛. β-淀粉样蛋白对 D-半乳糖致衰大鼠海马线粒体膜流动性的影响[J]. 中国病理生理杂志，2002，18(1)：73－75.

[4] 丁秀云，刘淡烙，王　琳，等. D-半乳糖对幼鼠心脏成纤维细胞拟衰老作用的实验研究[J]. 中国病理生理杂志，2004，20(8)：1505－1506，1526.

[5] BATLIWALLA F M, DAMLE R N, METZ C, *et al*. Simultaneous flow cytometric analysis of cell surface markers and telomere length: analysis of human tonsilar B cells[J]. J Immunol Methods, 2001, 247(1－2): 103－109.

[6] RUFER N, DRAGOWSKA W, THORNBURY G, *et al*. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(8): 743－747.

[7] HARLEY C B, FUTCHER A B, GREIDER C W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts[J]. Nature, 1990, 345(6274): 458－460.

[8] FRENCK R W, Jr., BLACKBURN E H, SHANNON K M. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(10): 5607－5610.

（编辑　栗　嘉）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，“名”可以有 1 个、2 个或 3 个，但“姓”只有 1 个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；“名”可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 PUBLIC J Q。

本刊编辑部