DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.015
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)15-1345-04

论著

槲皮素对烫伤大鼠血清刺激的IEC-6细胞环氧合酶活性及代谢产物的影响

孟德胜[1],王凤君[2],汪仕良[2] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所药剂科,重庆 400042;[2]附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察槲皮素(Quercetin, Que)对烫伤大鼠血清刺激的IEC-6细胞释放PGE_2及环氧合酶(Cyclooxygenase, COXs)活性的影响。方法 放免法测定IEC-6细胞培养液PGE_2的含量,底物荧光法检测COXs酶活性的变化。结果 烫伤大鼠血清刺激可使IEC-6细胞PGE_2水平一过性增加,而后显著减低;0.1、1.0 μmol/L的Que可提高刺激后24 h PGE_2水平。烫伤血清刺激后IEC-6细胞COXs酶总活性变化不大,而COX-1/COX-2活性比显著降低,槲皮素对COXs活性的调节呈双向性,提高COX-1/COX-2活性比率。结论 槲皮素可能通过调节IEC-6细胞COXs酶的活性,影响其代谢产物PGE_2的释放。

关键词:槲皮素;烫伤;IEC-6;PGE_2;环氧合酶
中图法分类号:R282.71;R329.2+6;R644 文献标识码:A

Effects of quercetin on metabolism of cyclooxygenase in IEC-6 cells stimulated by the serum of burned rats

MENG De-sheng, WANG Feng-jun, WANG Shi-liang (Department of Pharmacy, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of quercetin on PGE_2 release and cyclooxygenase activity in IEC-6 cells stimulated by the serum of burned rats. **Methods** The PGE_2 levels were measured by radioimmunoassay and the changes of cyclooxygenase activity were determined by substrate fluorescence analysis. **Results** Stimulated by the serum of burned rats, the PGE_2 level increased first and then obviously decreased. Quercetin at 0.1 and 1.0 μmol/L enhanced the PGE_2 level after the stimulation of IEC-6 cells for 24 h. There was no obvious change in total cyclooxygenase activity, but the activity ratio of COX-1 to COX-2 significantly decreased. **Conclusion** Quercetin might influence the release of cyclooxygenase metabolite PGE_2 through the regulation of COXs activity in IEC-6 cells.

Key words: quercetin; burn; IEC-6; PGE_2; cyclooxygenase

胃肠道粘膜损伤是严重烫伤患者的常见并发症,一般认为这是由烫伤个体血清中所含的某些刺激因子,导致肠粘膜代谢紊乱所造成的。前列腺素(Prostaglandings, PGs)是经典的炎症介质,可介导炎症反应造成组织损伤;但某些PGs如PGE_2、PGI_2等是维持肠粘膜的完整性所不可缺少的,因此,PGs在胃肠道粘膜病理生理中的作用较为复杂。槲皮素(Quercetin, Que)属黄酮类化合物,药理作用广泛,有资料表明槲皮素对烫伤造成的肠粘膜损伤具有保护作用[1]。Que一直被认为是脂氧酶(Lipoxygenase)和环氧合酶(Cyclooxygenase)的抑制剂,其肠粘膜保护作用的机制可能与调节PGs等炎症介质的释放有关[2]。黄酮类植物药成分对环氧合酶的作用与其化学结构有关,某些黄酮类化合物表现为双向作用,高浓度时抑制酶活性,低浓度则有促进作用[3]。由于在体研究影响因素较多,我们以肠粘膜分离出的IEC-6细胞为材料,研究槲皮素对烫伤大鼠血清刺激的IEC-6细胞PGE_2代谢的影响,旨在阐明槲皮素的肠粘膜保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Que(上海试剂二厂产品);PGE_2放免分析试剂盒(苏州医学院血栓室产品)、花生四烯酸(AA)(苏州医学院血栓室);荧光物DCFD(Sigma公司产品);酶反应辅基高铁血红素Hematin(Sigma公司产品);COX-2选择性抑制剂尼米舒利(Nimsulide, Nim)(Sigma公司产品);IEC-6细胞株(上海细胞生物研究所)FT-608 ^{125}I放免测定仪(中国),BACKMAN紫外分光光度计(美国),850型荧光分光光度计(日本);CS-1型超声波粉碎机(中国)。

1.2 肠粘膜上皮细胞单层培养

传代稳定的IEC-6细胞株接种于96孔培养板,加入含10%

作者简介:孟德胜(1966—),男,山东省无棣县人,博士,主管药师,主要从事抗炎药理方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68757426
收稿日期:2002-11-10;修回日期:2003-02-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小牛血清的 DMEM, 5%CO_2 37 ℃条件下培养, 至细胞形成单层融合后用于后续试验。

1.3 大鼠烧伤血清的制备

取背部 30%TBSA Ⅲ度烫伤大鼠 6 只, 于烫伤后 24 h 从腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 取血清置 56 ℃水浴中 30 min 灭活补体, -70 ℃保存, 以备后续实验。

1.4 大鼠烫伤血清对 IEC-6 细胞株的刺激实验

取已形成 IEC-6 细胞单层融合的 96 空培养板, 以 PBS 洗涤 3 次, 加入含 20% 大鼠烫伤血清的 DMEM, 进行无小牛血清培养: 0.5、1、3、6、12、24 h, 吸取上清液, -70 ℃保存, 备测; 以 PBS 洗板 3 次, 收集各时相点细胞, 离心后用含 0.002 mol/L Ca^{2+} 的 PBS 调节细胞数为 2×10^6/ml, -70 ℃保存, 备测。对照组以正常大鼠血清代替大鼠烫伤血清, 其余相同方法制备标本。

1.5 药物对烫伤血清刺激的干预

按上法以烫伤大鼠血清刺激 IEC-6 细胞, 同时分别加入不同浓度的 Que 和 Nim, 分别培养 3 h 和 24 h, 按相同的方法收集上清液和细胞, 保存, 备测。

1.6 PGE_2 的测定

参照试剂盒说明书进行。取 1.5 收集的上清液 100 μl 与相同体积的 ^{125}I 示踪剂混匀后加入相应抗体与之反应, 再以聚乙二醇 4 000 吸附抗原抗体复合物, 离心后 γ 计数仪测定放射性, 推算样品中 PGE_2 的含量。

1.7 环氧合酶(Cyclooxygenase, COX)活性的测定[4]

取 1.5 收集的细胞以预冷的含 0.002 mol/L $CaCl_2$ 的 PBS 匀浆, 冰浴下超声处理 15 s×3 次, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液作为备测酶液。分 A、B、C 三管, 分别加入待测酶液 20 μl、1 mol/L Tris-HCl 20 μl、50 μmol/L DCFD 20 μl、20 μmol/L Hematin 20 μl; C 管另加入 2.5 μmol/L Nim 20 μl; 30 ℃温浴 10 min 后, B 管和 C 管各加入 9.0 μmol/L AA 20 μl; 继续 30 ℃温浴 20 min 后, 迅速转移至 2 ml 预冷(0 ℃)PBS 中, 混匀, 2 h 内测荧光强度(激发波长 450 nm, 发射波长 550 nm, 狭缝 5 nm)。COX 活性以每毫升细胞悬液发射荧光强度表示。

$COX_{总活性}$ = B-A, $COX\text{-}1_{活性}$ = C-A, $COX\text{-}2_{活性}$ = B-C。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 软件对实验数据进行统计分析, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 各组间进行均数双尾 t 检验。

2 结果

2.1 烧伤血清对 IEC-6 细胞培养上清液中 PGE_2 水平的影响

IEC-6 细胞培养基中加入烫伤大鼠血清后, 上清液中 PGE_2 的含量迅即升高, 此高水平的 PGE_2 一直维持到 3 h。随后 PGE_2 水平下降, 并在刺激后 24 h 显著低于正常水平, 见表 1。

2.2 Que 对烫伤大鼠血清刺激的 IEC-6 细胞培养上清液 PGE_2 水平升高的干预

IEC-6 细胞加入烫伤大鼠血清和不同浓度的 Que 共同培养 3 h, 各 Que 浓度组对培养上清液中 PGE_2 水平影响不大, 除 100 μmol/L 组明显低于对照组外, 其余各浓度组与对照组相比均无显著性差异; Nim 组和 Nim+ Que 组 PGE_2 水平亦无明显变化。IEC-6 细胞加入烫伤大鼠血清和不同浓度的 Que 共同培养 24 h, Que 0.1、1.0 μmol/L 组培养上清液中 PGE_2 水平明显升高, 与对照组相比存在非常显著性差异; Que 10、100 μmol/L 组培养上清液中 PGE_2 水平升高, 但与对照组无显著性差异; 当以 Nim 抑制 COX-2 活性后, 1.0 μmol/L 的 Que 仍能使 PGE_2 显著升高, 见表 2。

表 1 IEC-6 细胞培养上清液中 PGE_2 水平的变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of the PGE_2 level in IEC-6 cell cultured supernatant($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

PSSH(h)	PGE_2(pg/100 μl)
0	3.126±0.6773
0.5	7.005±0.6336 **
1	7.587±1.070 **
3	7.092±1.633 **
6	4.365±1.190
12	3.565±0.6976
24	1.825±0.4531

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; PSSH: Hours post stimulation

表 2 槲皮素和尼米舒利对 IEC-6 细胞培养上清液中 PGE_2 水平的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of Que and Nim on the PGE_2 level in cultured IEC-6 cell supernatant($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Drug	Concentration(μmol/L)	PGE_2(pg/100 μl)	
		PSSH 3	PSSH 24
Control	0	7.092±1.633	1.825±0.4531
Que	0.1	7.557±1.916	6.200±0.7085 **
Que	1.0	8.251±1.136	5.671±1.657 **
Que	10.0	5.680±1.474	2.523±0.6388
Que	100.0	4.537±1.584 *	2.173±0.239
Nim	2.0	5.683±1.375	2.039±0.386
Que+Nim	1.0+2.0	6.683±1.148	4.465±0.8037 *##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* Nim group; PSSH: Hours post stimulation

2.3 烧伤大鼠血清对 IEC-6 细胞 COXs 活性的影响

加入烫伤大鼠血清后 COX 总活性迅即升高, 至刺激后 1 h 达高峰, 随后缓慢降低。烫伤血清刺激 0.5 h COX-1 活性未见明显变化, 1 h 后则显著低于对照组, 并在低水平维持稳定; COX-2 的变化规律与 COX 相近, 先升高后降低, 除 24 h 组外均显著高于对照组; 刺激 0.5 h COX-1/COX-2 比率即显著低于对照组, 其余各时相点均与对照组有非常显著性差异, 并维持在对照组的 1/3~1/2 水平, 见表 3。

表 3 IEC-6 细胞环氧合酶活性的变化(狭缝: 10 nm, $n=6$)

Tab 3 Changes of COXs activities in cultured IEC-6 cell (slits width: 10 nm, $n=6$)

PSSH (h)	Activities(fluorescence intensity)			
	COX	COX-1	COX-2	COX-1/COX-2
0	10.63±0.939	6.098±0.899	4.532±0.849	1.406±0.445
0.5	12.72±1.823 *	5.486±1.866	7.238±1.533 **	0.811±0.442 *
1	14.05±2.726 **	3.614±0.975 **	10.43±2.244 **	0.355±0.113 **
3	13.74±1.804 *	4.158±0.640 *	9.586±1.547 **	0.440±0.076 **
6	9.740±0.670	3.240±0.797 **	6.500±0.940 *	0.517±0.170 **
12	9.426±0.761	3.596±0.487 **	5.830±0.617 *	0.623±0.109 **
24	8.820±1.275	3.178±0.760 **	5.642±0.656	0.562±0.111 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control (0 h); PSSH: Hours post stimulation

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　Que 对 IEC-6 细胞 COX 活性变化的干预

3 h 培养组, Que 对 IEC-6 细胞 COX 酶系统的作用主要表现为调节 COX-1/COX-2 的比率, 除 0.1 μmol/L 组外, 1.0、10.0、100 μmol/L 3 个剂量浓度均可使比率明显增加。Que 对 COX 总活性作用不强, 仅当浓度增加至 100 μmol/L 时才表现出抑制作用。中等浓度的 Que 对 COX-1 有促进作用, 但不存在剂量依赖关系; 当以 Nim 抑制了 COX-2 活性后, 1.0 μmol/L 的 Que 表现出对 COX-1 具有较强的促进作用。Que 对 COX-2 活性具有抑制作用, 且呈剂量依赖性, 10、100 μmol/L 两个剂量组 COX-2 活性与对照组相比存在非常显著性差异。24 h 培养组, 低剂量的 Que 可促进 IEC-6 细胞 COX 总活性, 但随剂量增加作用减弱, 1.0 μmol/L 组明显高于对照组, 其余各浓度组与对照组水平相当; Que 对 COX-1 的促进作用比较明显, 除 100 μmol/L 组外均与对照组存在显著性差异; 以 Nim 抑制 COX-2 后, 不影响 Que 对 COX-1 活性的促进作用; Que 对 COX-2 抑制作用不强, 仅 10 μmol/L 组具有统计学意义; 各浓度组 COX-1/COX-2 的比值升高, 与对照组相比均有显著性差异, 见表 4。

表 4　槲皮素对烫伤大鼠血清刺激的 IEC-6 细胞上清液中环氧合酶活性的影响(狭缝: 100 nm, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of Que on the COXs activities in the supernatant of IEC−6 cell cultured with burned rat serum (slits width: 10 nm, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

PSSH	Drug	Concentration (μmol/L)	Activity(Fluorescence intensity)			
			COX	COX-1	COX-2	COX-1/COX-2
PSSH 3						
	Control	0	13.74±1.804	4.158±0.640	9.586±1.547	0.440±0.076
	Que	0.1	13.04±0.992	4.224±0.469	8.820±0.831	0.482±0.068
	Que	1.0	13.98±1.264	5.330±0.927	8.650±0.687	0.618±0.104**
	Que	10	12.65±0.963	5.306±0.535*	7.346±1.102*	0.744±0.189*
	Que	100	10.09±1.285*	4.340±0.603	5.746±0.928**	0.766±0.119**
	Nim	2.0	10.74±0.507*	4.774±0.362	5.962±0.442**	0.805±0.094**
	Que+Nim	1+2	12.20±0.791#	6.424±0.444**##	5.778±0.559**	1.119±0.120**##
PSSH 24						
	Control	0	8.820±1.275	3.178±0.760	5.642±0.656	0.562±0.111
	Que	0.1	9.630±0.855	4.678±0.703*	4.952±0.698	0.963±0.219*
	Que	1.0	12.26±1.279**	6.304±0.456**	5.960±1.033	1.080±0.182**
	Que	10	9.190±1.561	5.420±1.286**	3.770±1.072*	1.555±0.609**
	Que	100	8.650±0.666	4.265±1.186	4.385±1.107	1.077±0.541*
	Nim	2.0	8.004±0.655	4.862±0.777**	3.142±0.904**	1.703±0.687*
	Que+Nim	1+2	10.72±0.663*#	6.327±0.853**#	4.389±0.883*	1.536±0.599*

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control with same PSSH; #: $P<0.05$ ##: $P<0.01$ *vs* Nim group; PSSH: Hours post stimulation

3　讨论

烫伤引起肠粘膜损伤的发病机制尚不完全清楚, 多种因素在此过程中起作用, 胃肠粘膜防御能力的改变即是其中较为重要的因素。作为炎症介质 PGE_2 可扩张血管, 增加血管通透性, 加强白细胞趋化, 促进溶酶体酶释放, 从而造成烫伤初期肠粘膜损害; 但适当水平的 PGE_2 对多种刺激因素造成的胃粘膜损伤具有保护作用[5]。本实验结果显示烫伤大鼠血清刺激 IEC-6 细胞的实验结果表明 30 min 内 PGE_2 显著升高, 然后呈下降趋势, 并在刺激后 24 h 显著低于正常水平。Que 对刺激后 3 h 的 PGE_2 含量影响不大, 其主要作用在于调节刺激后 24 h PGE_2 的含量。低浓度的 Que 能使 PGE_2 水平升高, 随浓度升高作用减弱, 使刺激后 24 h PGE_2 水平维持在适当水平, 在以往对 Nim 的研究中曾有相似结果出现[6]。Que 的另一作用特点是当以 Nim 抑制了 COX-2 后, 仍能升高 PGE_2 水平, 说明 Que 的作用点可能在 COX-1, 在本实验对 COXs 活性的检测中也得到了证实。在烫伤血清诱导的 COXs 总活性增加高峰期——IEC-6 细胞加烫伤大鼠血清刺激后 3 h, Que 可呈剂量依赖性地抑制 COX 活性, 其中主要是抑制 COX-2 活性, 而 COX-1 活性略有上升, 但变化不大, COX-1/COX-2 的比值则显著增加。当以 Nim 抑制 COX-2 活性后 1.0 μmol/L 的 Que 可增加 COX-1 的活性, 并增加 COX-1/COX-2 的比值, 说明在一定浓度下 Que 不仅选择性抑制 COX-2, 还可能选择性促进 COX-1, 对此需要更多的实验予以验证。令人感兴趣的是在烫伤刺激作用的延续期——IEC-6 细胞加大鼠烫伤血清刺激后 24 h, Que 表现出明显的双向性作用, 以浓度为 1.0 μmol/L 时 Que 对 COXs 总活性和 COX-1 活性的促进作用最强, COX-2 的活性除 10 μmol/L 组低于对照组外其余均无明显改变。Que 的这种双向性作用在其它实验中也有体现, 如其对猫血小板的抗聚集作用以 1 mg/kg 的剂量作用最强, 而剂量增加或减小均使作用强度减小[7]。当我们以 Nim 抑制了 COX-2 活性后, 更明确地证实 Que 对烫伤刺激延迟期的 COX-1 活性具有促进作用。以上结果说明 Que 对肠粘膜 IEC-6 细胞 COXs 酶活性及其代谢产物均有调节作用, 推测其肠粘膜保护作用可能与此有关。

参考文献:

[1]　孟德胜, 王仕良. 槲皮素等对烫伤小鼠肠黏膜损伤的保护作用[J].

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

中国药理学通报, 2000, 16(6): 673－675.
[2] 孟德胜, 汪仕良. 槲皮素及其苷类研究进展[J]. 中国药房, 2000, 11(5): 232－233.
[3] Kalkbrenner F, Wurm G, Bruchhausen F. *In vitro* inhibition and stimulation of purified prostaglandin endoperoxide synthase by flavonoids: structure-activity relationship[J]. Pharmacology, 1992, 44(1): 1－12
[4] Morita I, Smith W L, DeWitt D L, *et al*. Expression-activity profiles of cells transfected with prostaglandin endoperoxide H synthase measured by quantitative fluorescence microscopy[J]. Biochemistry, 1995, 34(21): 7194－7199.
[5] Geraldo J, Ferraz P, Wallace J L, *et al*. Prostaglandins modulate the responsiveness of the gastric microcirculation of sodium nitroprusside in cirrhotic[J]. Hepatology, 1996, 23(10): 123－129.
[6] Hirata T, Ukawa H, Yamakuni H, *et al*. Cyclo-oxygenase isozymes in mucosal ulcerogenic and functional responses following barrier disruption in rat stomachs[J]. Bri J Pharmacol, 1997, 122(3): 447－454.
[7] Swies J, Robak J, Dabrowski L, *et al*. Antiaggregatory effects of flavonoids *in vivo* and their influence on lipoxygenase and cyclooxygenase *in vitro*[J]. Pol J Pharmacol Pharm, 1984, 36(5): 455－463.

(编辑 张 宁)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)15-1348-02

中国海南黎族永生 B 细胞系的建立与保存

Establishment and preservation of permanent growing B cell line of Li nationality in Hainan province of China

李冬娜[1], 应大君[1], 区采莹[2], 符生苗[3], 褚 嘉[4], 薛雅丽[5], 黄小义[5] ([1] 第三军医大学基础医学部解剖学教研室, 重庆 400038; [2] 海南医学院, 海口 571101; [3] 海南省人民医院遗传研究室, 海口 570311; [4] 中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118; [5] 哈尔滨医科大学遗传学教研室, 哈尔滨 150086)

继人类基因组计划之后, 人类基因组多样性计划(Human Genome Diversity Project, HGDP)已成为世界科学研究的热点之一。从世界各地采集不同人群的标本并建立永生细胞系, 是 HGDP 的重要内容[1~3]。黎族是中华民族的重要成员, 集居海南岛。语言属汉藏语系壮侗语族黎语支。根据方言、文化特征及人种学上的差异, 又分为侎孝黎、杞黎、本地黎、美孚黎和加茂黎五个支系[4]。由海南省特殊地理环境和历史所铸就的黎族基因组, 必将成为我国进行 HGDP 研究, 构造遗传资源中心的重要信息来源。本研究成功地对中国海南省侎孝黎、杞黎、本地黎的部分个体建立了永生 B 细胞系。

1 材料和方法

根据国家建库标准规定: 选择具有代表性的民族聚集区, 采集 3 代无与不同民族通婚史的健康人标本, 建成 30~50 个细胞株, 男女各 1/2, 我们对采样地点和采样对象作了严格选择。

1.1 研究对象

经考察, 分别在侎孝黎、杞黎和本地黎的集居地。海南省乐东黎族自治县千家镇、五指山市毛阳镇、白沙黎族自治县南开乡[5], 对 4 代无与不同民族和不同支系通婚史的自愿献血黎胞进行身体检查, 筛除异常者。采用健康人静脉血 5 ml 建株。

1.2 建立永生细胞株

采用 EB 病毒(Epstein-barr virus, EBV)转化外周血 B 淋巴细胞(B-cell, BLC), 并加入环胞霉素 A 抑制 T 淋巴细胞(T-cell, TLC)建立永生细胞系[6]。取 5 ml 肝素抗凝的外周血, 加洗涤液(含 1%双抗的 RPMI1640)2 ml 混匀后, 缓慢注入淋巴细胞分离液中, 3 000 r/min 离 20 min。移出白细胞层, 加入 10 ml 洗涤液洗 2 次, 离心弃上清。然后依次加入 2 ml RPMI1640 完全培养液(含 20%胎牛血清、80% RPMI1640、1.6% 1 mol/L Heps、1.2%谷氨酰胺、0.5% PHA); 1.2 ml EBV 悬液(取自 B958 细胞系经 1 周培养, 并经反复冻融 3 次的上清液, 经 0.22 μm 滤器过滤), 打匀后加入 0.4 ml 120 μg/ml 环胞霉素, 混匀后分别接种于 10 ml 培养瓶内, 置 37 ℃ CO_2 培养箱培养。静止培养 4 d 后, 开始观察, 视细胞转化和聚集状况及培养液 pH 的改变, 进行半量换液, 并维持环胞霉素的浓度, 待转化的淋巴细胞明显增多、增大, 同时在显微镜下观察可见大量贴壁的呈聚集生长的细胞团, 即可转瓶。转瓶后可观察到胞质突出、形态各异、聚集成团的细胞株。以后 3 d 观察 1 次, 视细胞生长状况和 pH 的改变决定是否换液。一般传代 4~5 次, 待细胞数量达到 3.6×10^6 ml 时, 在完成染色体核性分析后, 大部分细胞可进行第 1 次冻存。细胞株在冻存的前 1 d, 必须进行半量换液或补充新的培养液, 换液 24 h 左右, 将细胞以 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清。根据细胞量加入预冷的冻存液(95%胎牛血清, 5%二甲亚砜), 打匀后分装于 1 ml 冻存管中并立即放入－70 ℃冰箱, 冻存 24 h 后, 放入液氮中保存。

1.3 染色体核性分析

从培养的淋巴细胞株中取 5 ml 细胞培养液, 培养 48 h, 加入秋水仙素(0.4 μg/ml), 继续培养 2 h 后, 按常规方法[7]进行细胞学处理、制片、G 显带及核性分析。

(下转 1351 页)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39960033)
作者简介: 李冬娜(1955－), 女, 吉林省四平市人, 博士研究生, 副教授, 主要从事人类基因组多态性方面的研究。电话: (023)68752225
收稿日期: 2002-07-28; 修回日期: 2002-09-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net