

人卵巢癌细胞亚系 M951 的建立和生物学特性初步观察

程 湘 程天氏

(第三军医大学预防医学系防原医学教研室 重庆 400038)

对癌转移机理的研究首先需要具有不同转移潜能的细胞亚系或株,我们从人卵巢癌细胞系 3AO 中分离出能侵袭穿透人工基底膜的细胞亚系,并观察细胞亚系的体内外生长能力和裸鼠腹腔内播散能力,为深入研究卵巢癌的发病机理和治疗提供研究模型和材料。

材 料 和 方 法

一、实验材料

1. 细胞系 3AO 细胞来源于人卵巢上皮性癌,由第二军医大学李进博士惠赠。
2. Millicell Chamber 为一杯状结构,杯底为多碳素滤膜(Polycarbonate filter)封闭,膜孔直径 12 μ m。购自 Sigma 公司。
3. Matrigel 为大鼠 ESH 肉瘤细胞外基质提取物,购自北京医科大学病理教研室。
4. 其他试剂 RPMI1640 细胞培养基购自 Sigma 公司;小牛血清、胰蛋白酶、二甲基亚砷、EDTA 等,均为国产。

二、分离癌细胞亚系的方法^[1,2]

1. NIH3T3 细胞条件培养液的制备 当培养细胞铺满达 90%时加 1640 液 1.5ml,24 小时后收集培养液,500—1000 转/秒离心 5—10 分钟,收集上清,置-20℃冰箱备用。
2. 侵袭膜制备 Matrigel 用 1640 液稀释后,按每个 Millicell Chamber 100 μ g 加于膜上过夜。使用前加 1640 液,使其水化并成胶。
3. 侵袭小室构建 取 NIH3T3 细胞条件培养液 0.6ml 加入 24 孔板内,将构建好的侵袭膜轻轻放入 24 孔板内,排尽膜下的气泡。取待分离的肿瘤细胞悬液,每孔膜上加 0.2ml(约 10⁵ 个细胞),加盖后置 CO₂ 孵箱内,常规培养。
4. 细胞亚系建立培养数小时后,见 24 孔板底有少数细胞落下时,将 Millicell Chamber 取出,吸尽孔内的条件培养液,加含 10%小牛血清的 1640 培养液约 1ml。置 CO₂ 孵箱内,常规培养、扩增并传代。

根据亚系是为研究转移特性而建立和建系时间是 1995 年 1 月,将亚系命名为 M951。

三、3AO 细胞和 M951 细胞的生长特性

1. 体外生长曲线及群体倍增时间 将癌细胞制成 1.25 \times 10⁴/ml 的细胞悬液接种,每瓶 4ml,隔 3 天换液 1 次。于第 2、4、6 天,每天取 3 瓶计数,计算群体倍增时间。
2. 细胞周期测定 癌细胞加 70%乙醇固定,碘化丙啶染色,FACS400 型流式细胞仪上测定细胞周期。
3. 皮下瘤生长曲线 将 2 种癌细胞(密度均为 2 \times 10⁶)分别接种于 4 只裸鼠的前后肢皮下,每周测量肿瘤的长径 a 和短径 b,按公式计算肿瘤体积:肿瘤体积=ab²/2。
4. 肿瘤腹腔播散率 每只裸鼠取 0.2ml(约 10⁷ 个)癌细胞悬液,从裸鼠左侧腹前壁注射入腹腔,2 月后观察肿瘤在腹腔内的播散情况。

四、统计学处理

采用 SPLM 医学统计软件进行统计处理,作 t 检验。

结 果

一、细胞亚系的建立

3AO 细胞加入侵袭小室内,培养约 8 小时后,仅有约 10 个细胞穿过 Matrigel 并贴附于 24 孔板上。细胞增殖缓慢,1 个月后才基本长满 24 孔板底,进行第一次传代。一周后进行第二次传代,以后每 2—3 天传代一次。经 15 次以上传代,细胞形态和增殖特性无明显变化,细胞生长稳定,表明亚系已建成。M951 细胞亦呈单层铺路石状排列,但在铺满培养时,M951 细胞较 3AO 细胞更易从培养瓶壁上脱落。液氮冻存复苏后,细胞生长良好。

本文 1998 年 12 月 24 日收到,1999 年 11 月 1 日接受。

二、M951 细胞的生长特性

M951 细胞与 3AO 细胞的体外生长速度相似,见表 1。肿瘤细胞倍增时间相近,3AO 细胞为 36.19 小时,M951 细胞为 36.90 小时。流式细胞仪检测结果,M951 细胞的 G_2+M 期细胞为 26.1%,高于 3AO 细胞的 16.3%。接种裸鼠皮下后,M951 细胞的皮下瘤生长速度与 3AO 细胞的相差不大。

表 1 体外培养不同时间的癌细胞数($\times 10^4/ml$)

细胞系名称	第 2 天	第 4 天	第 6 天
3AO 细胞	10.76 \pm 0.462	25.33 \pm 0.577	67.50 \pm 1.32
M951 细胞	8.83 \pm 0.153	25.16 \pm 0.289	53.33 \pm 1.15

三、裸鼠卵巢癌腹腔播散模型

M951 细胞接种裸鼠腹腔后 2 个月末,腹腔播散发生率为 8/8。肿瘤在腹腔内分布广泛,包括盆腔、肠系膜、脾肾周围、膈下、肝周等。而 3AO 细胞的腹腔播散发生率为 3/6,肿瘤在腹腔内分布情况同 M951 细胞,无腹腔播散的 3 例中有 2 例未见肿瘤,1 例可在左侧腹腔内壁见到肿瘤形成。

讨 论

一、具有较高粘附能力的卵巢癌细胞亚系的建立

多因素分析显示腹腔播散是影响卵巢癌预后的最主要因素,而发生腹腔播散的主要条件是癌细胞或细胞团对腹膜的粘附,因此建立较高粘附能力的卵巢癌细胞亚系是必要的、重要的。建立来自同一肿瘤或同一癌细胞系而转移性有明显差别的细胞克隆或亚系,文献已有对淋巴瘤、黑色素瘤、肺癌、肝癌、鼻咽癌等的研究,但未见关于卵巢癌的报道^[3,4]。

我们采用体外侵袭模型分离卵巢癌亚系,依据如下原理:(1)以 NIH3T3 细胞条件培养液作为趋化因子,使肿瘤细胞向 24 孔板方向移动;(2)以 Matrigel 模拟基底膜,因 Matrigel 中含有丰富的 IV 型胶原,组成成分与基底膜十分相似,在 37℃ 条件下呈胶冻状,细胞不能

自由通过。肿瘤细胞必须具备水解基底膜的能力,才能穿透 Matrigel;(3) Millicell Chamber 上的多碳素滤膜膜孔直径为 12 μ m,比肿瘤细胞直径稍小,肿瘤细胞通过变形运动可以通过膜孔。用这种模型分离出的肿瘤细胞已经具有较强的蛋白水解能力,因而具备了较强的转移潜能。我们采用体外侵袭的方法分离卵巢癌亚系,国内外均未见报道。

卵巢癌的腹腔播散包括癌细胞从原发灶脱落、粘附和浸润腹膜、增生形成种植灶,因此癌细胞的粘附和浸润能力是播散发生的必备条件,且二者有较好的相关性。有人观察到,异型细胞间粘附力高者,其浸润力亦高^[5];干扰癌细胞的粘附性,其浸润力则明显下降。我们观察到 M951 细胞的粘附能力较母系 3AO 细胞明显增强,因而可用此来深入研究卵巢癌腹腔播散过程中的粘附机理。

二、裸鼠卵巢癌腹腔播散模型的建立

建立裸鼠卵巢癌腹腔播散模型,是深入研究卵巢癌的发生机理和治疗方法的基础性工作。以往的文献报道^[6,7],直接向腹腔注射体外培养的卵巢癌细胞不易成活,肿瘤腹腔播散发生率不高,且个体差异较大。近年来有学者致力于人卵巢癌在裸鼠卵巢内原位异种移植的研究,由于裸鼠卵巢较小,无论是接种细胞还是组织块均很困难,成功率不高^[8]。国内有人^[9]将皮下移植瘤制成匀浆后注入腹腔。Hamilton 等^[10]进一步将形成的腹水再注入到其他裸鼠的腹腔,建立了腹水瘤模型,这种方法操作较复杂,所需时间也较长。最近有作者报告^[11],采用手术方法将皮下瘤移植于裸鼠网膜,使其在网膜局部生长,结果成瘤率高(10/10),瘤块仅在网膜内生长,便于观察和手术分离。但临床常见到有网膜播散时,往往伴随着腹腔脏器和腹膜面的广泛种植。我们采用体外侵袭的方法分离出 M951 亚系,其腹腔播散发生率非常高,肿瘤在腹腔和盆腔内有广泛分布,且操作方便,是一个较理想的卵巢癌腹腔播散模型,适用于卵巢癌腹腔播散的实验研究。

摘要

采用体外侵袭小室的方法,以 Matrigel 模拟基底膜,NIH3T3 细胞条件培养液作为趋化因子进行卵巢癌细胞亚系的分离,建立了亚系 M951,其体外和皮下生长速度与母系相似,但腹腔播散率高于母系,表明 M951 细胞具有较高的恶性潜能。

关键词: 卵巢癌 细胞系 播散

参考文献

[1] Kleinman HK, et al. 1986, *Biochemistry*, 25:

312.

[2] Nabeshima K, et al. 1993, *Int J Cancer*, 55:947.

[3] Zhang L, et al. 1995, *Cancer Res*, 55:428.

[4] Danen EH, et al. 1993, *Int J Cancer*, 54:315.

[5] 李学农等, 1991, *癌症*, 10:299.

[6] Bullert RE, et al. 1995, *Gynecol Oncol*, 56:39.

[7] Fuchtnner C, et al. 1993, *Gynecol Oncol*, 48:203.

[8] Fu X, et al. 1993, *Anticancer Res*, 13:283.

[9] 李文锦等, 1993, *中华妇产科杂志*, 28:38.

[10] Hamiton TC, et al. 1983, *Cancer Res*, 43:5379.

[11] 徐丛剑等, 1997, *现代妇产科进展*, 6:111.

ESTABLISHMENT OF HUMAN OVARIAN CARCINOMA SUBLINE M951 AND ITS PRIMARY BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

CHENG Xiang CHENG Tian Min

(Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University. 400038)

ABSTRACT

An ovarian carcinoma subline M951 was successfully established from cell line 3AO in vitro by Matrigel mimicing basement membrane and NIH3T3 cell culture fluid being inclining factor. In vitro growth curve exhibited the similar growth ability. When inoculated into nude mice subcutaneously, the tumor-forming latency and growth speed of the two lines was similar. After inoculated into abdominal cavity of nude mice, the ratio of abdominal dissemination was 8/8 in M951 cells and 3/6 in 3AO cells. This means that M951 cell is more malignant.

Key words: Ovarian carcinoma Cell line Dissemination

体外培养恶性滋养细胞 P53 蛋白表达 与细胞生物学特性的研究*

郑伟 石一复 谢幸 徐建云

(浙江大学医学院附属妇产科医院 杭州 310006)

滋养细胞是参与胚胎发育过程中的营养、代谢、内分泌和免疫等功能的重要细胞,滋养细胞肿瘤则是一组具有高度侵袭和转移特性的恶性疾病,癌基因和抑癌基因不仅与滋养细胞肿

瘤的发生、发展和转归有关,而且与早期滋养细胞增殖有关^[1,2]。我们观察了恶性滋养细胞肿瘤

本文 1999 年 8 月 27 日收到,11 月 1 日接受。

* 国家自然科学基金资助项目(39470723)。