

人肝癌细胞株 H9101 的建立及其细胞生物学特性研究

杨善民 颜江华 陈瑞川 郑 耘 林炳珍 陈 福 王天叫

(厦门大学生命科学学院抗癌研究中心 厦门 361005)

自 1960 年国内首例人肝癌细胞系 BEL-16 建系后^[1],已建立了 7 株人肝癌细胞系^[2]。厦门市同安地区 1987 年-1989 年肝癌病人死亡率高达 44.75/10 万人,这在全国仅次于广西扶绥^[3]。为研究本地区肝癌高发的病因,1991 年我们从该地区肝癌病人手术的肝癌组织成功地建立一株人肝癌细胞系,命名 H9101,现将其细胞生物学特征报告如下。

患者××男 14 岁,入院时血清学检查 HBsAg 阳性,甲胎蛋白(AFP) >400ng/ml,后行肝右叶大部切除术切除肝癌。原发灶经病理诊断为原发性肝细胞癌Ⅲ级。常规切取癌组织,剪碎消化,经塑料滤器(φ25mm)改制的三级过滤系统^[4]滤得单个肿瘤细胞悬液,癌细胞经 RPMI 1640 培养液 3 次洗涤、离心后,以 1×10^5 /ml 细胞量接种于 96 孔板,于含抗菌素的 15% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液置 5% CO₂ 培养箱培养。培养 27 天后,在 96 孔板中有两孔细胞形成克隆、贴壁生长。取一孔细胞继续培养传代,细胞生长良好,随后转换成 8% 新生小牛血清(NCS)培养液培养,连续传代至今已 300 多代。

用 43 代细胞作常规形态学检查;细胞生长曲线和群体倍增时间采用溴化四唑氮蓝(MTT)法^[5]测 OD 值进行计算;作常规染色体核型分析;软琼脂克隆形成率按 Buick 等^[6]的方法进行。

裸小鼠异种移植取 60 代细胞常规进行移植;刀豆球蛋白 A(ConA)受体检测参照 San 等^[7]的方法进行;取 60 代细胞或药物处理的细胞(经 1% DMSO 和 1.5×10^{-5} mol/L 地塞米松的 10% NCS RPMI 1640 培养液培养 10 天)的上清液作 AFP 和 HBsAg 检测。收集 300 代细胞匀浆后的上清按 Lowry's 法测定蛋白浓度, γ -谷氨酰转氨酶(γ -GT)活性参照文献^[8]方法,用 γ -GT 检测试剂盒(上海联阳生物技术公司产品)检测;酪氨酸- α -酮戊二酸转氨酶(TAT)活性参照文献^[9]方法检测。

HBV-DNA PCR 检测按常规蛋白酶 K 方法提取第 60 代癌细胞 DNA,HBV-DNA 引物设计为 5' GGG

TGG AGC CCTCAG GCT CAG GGC A 3' 和 5' GAA GAT GAG GCA TAG CAG CAG GAT 3'(北京医科大学病理教研室提供);H9101 细胞的端粒酶活性参照 Kim^[10]设计的引物和方法进行检测。

1. 形态学特征

8% CNS RPMI 1640 培养液培养下,H9101 细胞伸出伪足贴于瓶底生长,细胞核大,胞质少(版图 1),常见细胞分裂相。扫描电镜下癌细胞表面有丰富细长的微绒毛。透射电镜下的癌细胞核大,不规则,核仁以丝状核仁为主,胞质内细胞器较少,表面微绒毛细长且多(版图 2)。癌细胞间偶有分化不良的毛细胆管(版图 3)。

2. 生长曲线和群体倍增时间

H9101 细胞在仅 1% NCS RPMI 1640 培养液内亦能生长,在 8% NCS RPMI 1640 培养条件下,细胞群体倍增时间平均约 38 小时,细胞生长曲线见图 1。

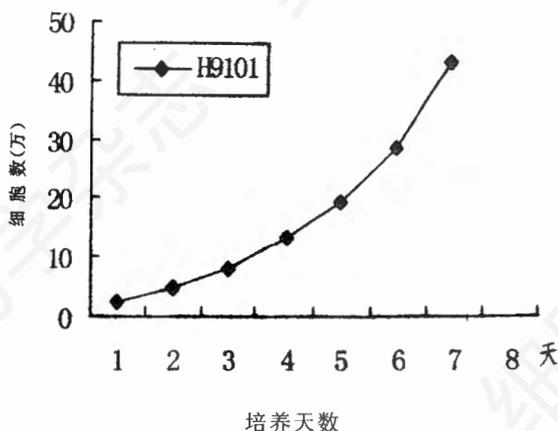


图 1 第 43 代 H9101 细胞 8% NCS RPMI 1640 培养液培养 7 天的生长曲线

3. 染色体核型

本文 1998 年 11 月 18 日收到,2000 年 2 月 2 日接受。

分别计数150个分裂中期细胞染色体,染色体数为非整倍体染色体(版图4),染色体数众数分布在52-82条,占分裂中期染色体细胞总数的86%(图2)。

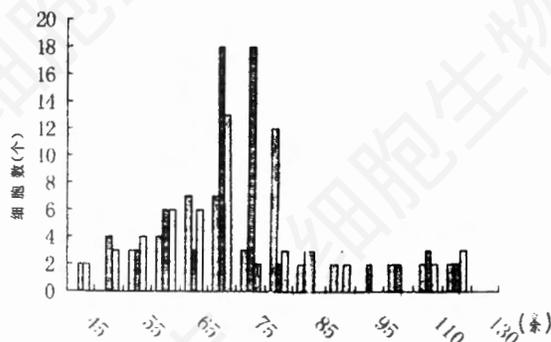


图2 第56代H9101细胞染色体数众数分布图

4. 软琼脂克隆形成率

H9101细胞具有在软琼脂0.8%甲基纤维素上形成克隆的能力,克隆形成率为1/200细胞。

5. 异种移植

H9101细胞每次在皮下异种移植均能在BALB/C裸小鼠(SPF级)形成瘤块,肿瘤生长迅速(版图5),局部侵袭肌层和造成局部淋巴结转移。病理切片下,移植瘤细胞呈条索状或单个散在分布,后者与培养的瘤细胞形态大体相似;与原发瘤相比,原发瘤细胞呈粗梁状或实心团块生长,血窦较少(资料未显示),其显示乳酸脱氢酶(LDH)与小鼠肝脏者不同,提示移植瘤为非鼠源性肿瘤(资料未显示)。

细胞癌变后最基本的生物学特征是恶性增殖、分化不良、侵袭和转移。从H9101细胞对小牛血清的依赖性较低(1%)、快速生长,具软琼脂克隆形成率高和100%裸小鼠异种移植成功率显示了恶性肿瘤细胞的基本特点。

6. ConA受体检测

H9101细胞在ConA处理下显示较强凝集性,并随浓度升高而增高。ConA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,细胞凝集率分别是61%和92%。

7. AFP和HBsAg检测

培养汇合后H9101细胞上清液的AFP含量极微(1.45 $\text{ng}/\text{ml}/1 \times 10^5$ 细胞/24小时),

HBsAg检测阴性。瘤细胞经过1% DMSO和 $1.5 \times 10^{-5} \text{mol}/\text{L}$ 地塞米松处理10天后,AFP含量大幅提高,达140 $\text{ng}/\text{ml}/1 \times 10^5$ 细胞/24小时,增加了96倍(t检验, $P < 0.001$)。用ELISA方法检测培养液上清,HBsAg转呈阳性。幼稚、增生的再生肝细胞或肝癌细胞常分泌AFP,常规培养时,H9101肝癌细胞分泌微量AFP,但HBsAg阴性,一旦经地塞米松诱导后,AFP和HBsAg蛋白分泌量显著增加,可能与瘤细胞的AFP和HBsAg的调控基因的去甲基化有关^[11,12]。人肝癌细胞系HuH-1在地塞米松诱导后HBsAg的产量增加10倍^[13],我们的研究与他们相符。

8. γ -GGT活性检测

H901移植瘤细胞 γ -GGT活性达 $5.42 \text{U} \pm 0.11 \text{U}/\text{mg}$ 蛋白,与成人肝脏($0.78 \text{U} \pm 0.02 \text{U}/\text{mg}$ 蛋白)相比差异显著(t检验, $P < 0.001$)。

9. TAT活性检测

H9101移植瘤细胞TAT活性达 $14.24 \text{U} \pm 1.50 \text{U}/\text{mg}$ 蛋白,与成人肝脏($48.82 \text{U} \pm 1.62 \text{U}/\text{mg}$ 蛋白)相比差异显著(t检验, $P < 0.01$)。 γ -GT活性上升和TAT活性下降分别是肝癌细胞与正常肝细胞者相区别的特征之一^[13],它们之间的区别越大($P < 0.01 - 0.001$),提示H9101细胞系恶性度较高。

10. HBV DNA聚合酶链式反应

通过PCR扩增,HBV DNA阳性标本扩增的DNA和H9101细胞提取DNA所扩增的DNA在琼脂糖电泳中泳动距离相同,阴性对照未见扩增产物(版图6)。H9101细胞基因组具整合HBV DNA基因的特点,与患者血清HBsAg抗体阳性相符;亦与该患者肝癌组织在裸鼠同时所建立人肝癌裸鼠移植瘤株(HHC4)分泌AFP和HBsAg的生物学特性基本相符^[14],反映了HBV-DNA整合在肝细胞癌变过程中的重要作用。该移植瘤p53基因第7外显子的测序显示第250密码子C \rightarrow A的突变^[15],推测H9101细胞系细胞亦可能存在p53基因的突变,相关证据有待进一步证实。

培养至第 300 代 H9101 细胞经端粒酶 (telomerase) 活性检测显示典型的端粒酶产物一相间 6 个碱基的 DNA 梯带 (图版图 7)。模板经 RNA 酶处理后, 无反应产物出现。人体内一些组织不断增殖的母细胞或癌细胞需要端粒酶的活化, 反转录合成、延长由细胞分裂造成缩短的端粒。端粒酶是人体内增殖母细胞或绝大多数肿瘤细胞永生化原因^[16], 也是 H9101 肝癌细胞株能在体外连续传代建株和恶性增殖的必需条件之一。

H9101 细胞在体外培养传代已有 9 年多, 虽经液氮冷冻保存和多次复苏, 细胞生长良好, 复苏成活成功率达 100%, 接种率 (Plating efficiency) 达 87% (资料未显示)。上述资料表明 H9101 肝癌细胞株是一株能在体外恶性增殖、整合 HBV-DNA、表达端粒酶和具肝细胞癌生物学基本特征的肝癌细胞株, 可为肝癌分子生物学研究和抗癌药物体外筛选提供有价值的实验研究材料。我们从本地肝癌高发区病人所建立的人肝癌细胞系更能反映该地区肝细胞癌的病理和细胞生物学特点, 研究它有助于阐明本地区人原发性肝细胞癌发生和高发的原因。

摘 要

从厦门市肝癌高发的同安地区肝癌病人肝癌组织建立了人原发性肝细胞癌细胞系 H9101。它生长迅速, 群体倍增时间平均为 38 小时, 对小牛血清的依赖性较低 (1%)。体外培养的 H9101 细胞贴壁生长, 扫描和透射电镜下见细胞有丰富细长微绒毛。H9101 细胞具有较高的软琼脂克隆形成率 (1/200 细胞) 和裸鼠异种移植成瘤能力 (100%)。瘤细胞在 ConA 处理后呈较强的凝集性, 在 ConA 50 μ g/ml 和 100 μ g/ml 时细胞凝集率分别为 61% 和 92%。瘤细胞分泌微量的 AFP, 用 1% DMSO 和 1.5 $\times 10^{-5}$ mol/L 地塞米松处理 10 天后上升到 (140ng/ml/1 $\times 10^5$ 细胞/24 小时), 且 HBsAg 转呈阳性。H9101 细胞 γ -谷氨酰转肽酶活性达 5.42U \pm 0.11U/mg, 酪氨酸 α 酮戊二酸转肽

酶活性达 14.24U \pm 1.50U/mg, 与正常人肝细胞者相比差异显著 (分别为 P < 0.001 和 P < 0.01)。H9101 细胞染色体数为非整倍体, 众数分布在 52 条 - 82 条, 具人类细胞染色体特征, 其 DNA 经 PCR 扩增显示 HBV DNA 特异性条带。H9101 细胞具端粒酶活性, 是细胞连续传代和建系的保证; 它恶性程度高、整合 HBV DNA 和具人肝细胞癌生物学基本特征, 可为肝癌分子生物学研究提供有价值的实验材料。

关键词: 人肝细胞癌 细胞系 HBV DNA 整合 分泌 AFP 和 HBsAg 端粒酶

参 考 文 献

- [1] 陈瑞铭等, 1960, 上海市科学技术论文选集, 上海科学技术出版社, 上海。
- [2] 江希明等主编, 1990, 肿瘤生物学, 浙江科学技术出版社出版, 浙江, 307 - 310。
- [3] 林浪等, 1992, 福建医学院学报, 26: 77 - 79。
- [4] 杨善民等, 1993, 中华肿瘤杂志, 15: 195 - 197。
- [5] Plumb J. A. et al., 1989, *Cancer Res*, 49: 4435 - 4437。
- [6] Buick R. N. et al., 1979, *Cancer Res*, 39: 5051 - 5056。
- [7] San R. H. C., et al., 1979, *Cancer Res*, 39: 1026 - 1032。
- [8] 上海医学化验所, 1979, 临床生化检验, 上海科学技术出版社, 329 - 331。
- [9] 韩锐, 1991, 肿瘤化学预防及药物治疗, 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 北京, 241 - 248。
- [10] Kim N. W., et al., 1994, *Science*, 266: 2011 - 2015。
- [11] Higgins P. J., et al., 1983, *Br J Cancer*, 48: 485 - 493。
- [12] Peng S. Y. et al., 1993, *Hepato* 17: 35 - 41。
- [13] 杨榕等译, 1990, 肝脏肿瘤, 上海科学技术出版社, 上海, 46 - 56。
- [14] 杨善民等, 1992, 北京实验动物科学, 19: 24 - 28。
- [15] 杨善民等, 1998, 福建医科大学学报, 32: 6 - 9。
- [16] Counter C. W. 1996, *Ann Rev. Biochem*, 65: 337 - 365。

THE CHARACTERISTICS OF CELL BIOLOGY IN ESTABLISHED HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL LINE H9101

YANG Shan Min YAN Jian Hua CHEN Rui Chuan ZHENG Yun LIN Bing Zhen CHEN Fu WANG Tian Jiao
(Cancer Research Center, School of Life Science Xiamen University Xiamen Fujian China, 361005)

ABSTRACT

A hepatocellular carcinoma(HCC)cell line(H9101)has been set up from a patient with HCC from Ton An district, Xiamen, in which there is a high mortality rate of HCC. H9101 cells can grow fast and well in RPMI 1640 medium with at least 1% fetal calf serum. Its population doubling time is about 38 hours. In vitro, most of the tumor cells attach to the glass bottom. Under TEM and SEM, H9101 cells show abundant microvilli. H9101 cells are able to colonize highly in the soft agar(1/200 cells)and can be successfully heterotransplanted into nude mice(100%). With Con A at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, H9101 cells possess high ability of aggregation at the rate of 61 or 92 percent respectively. Secreting AFP in H9101 cells is limited but is enhanced up to 140 $\text{g}/\text{ml}/1 \times 10^5 \text{ cells}/24$ hours after the cells being treated with 1% DMSO and dexamethasone ($1.5 \times 10^{-5} \text{ mol}/\text{L}$)for 10 days. Treated as mentioned above, H9101 cells turn to be positive in HBsAg. The activity of γ -glutamyl transpeptidase and tyrosine α -ketoglutaric transaminase is $5.42 \text{ U} \pm 0.11 \text{ U}/\text{mg}$ protein and $14.24 \text{ U} + 1.50 \text{ U}/\text{mg}$ protein respectively in H9101 cells, which is significantly different from that of normal adult hepatocytes($P < 0.001$ and $P < 0.01$ respectively). The characteristic of human chromosomes is shown in H9101 cells in which the mode of mass heteroploid chromosomes distributes between 52 - 82 pairs. The specific fragment of HBV is amplified from the DNA of the cells. H9101 cells express telomerase activity which is essential for continuous passage of cells and the establishment of cell line. H9101 cells with characteristics of cell biology in hepatoma, malignancy, integration of HBV DNA and expression of telomerase activity can be provided as useful material for the experimental research in molecular biology of hepatocellular carcinoma.

Key words: Human hepatocellular carcinoma Cell line HBV-DNA integration Secreting AFP and HBsAg Telomerase

经验交流

胚胎操作和显微操作的几点改进*

王敏康**、*** 刘冀珑** 张田*** 廉莉** 陈大元**

(中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室** 北京 100080)

(云南师范大学生命科学系*** 昆明 650092)

一、胚胎吸管

胚胎吸管是从事哺乳类胚胎工作的人员必备的用具,分口吸管及手吸管两种。口吸管具有操作准确、容易控制的优点,为大多数工作者所采用。我们在实践中发现将传统的巴氏管改为外径为 2.5mm 的单根玻璃细管,将使有关操作更为简便有效和经济实用。我们改进的胚胎吸管包括玻璃管和连接支持管两大部分。玻璃管规格为:外径 $\varphi = 2.5 \text{ mm}$,长 100mm,厚

0.2mm。最好要求厂家清洁好或买来后自己再做进一步的清洁处理。使用前用一般的酒精灯直接拉制,将一端加热至变红发软时,用镊子夹住末端稍离火焰同时迅速一次性拉长成 50 - 70mm、外径约为 150 μm 的细端。稍等冷却后,在距颈部约 30mm 的部位用砂轮轻划一下,用右手掰断使断端成平口。将断口拂过火焰使其

本文 1999 年 11 月 3 收到,2000 年 5 月 22 日接受。

* 国家自然科学基金(39360028)资助项目。