

## 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  $\mu\text{g/ml}$  or 100 $\mu\text{g/ml}$ , 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  $\text{g/ml}/1 \times 10^5 \text{cells}/24$  hours after the cells being treated with 1% DMSO and dexamethasone ( $1.5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ )for 10 days. Treated as mentioned above, H9101 cells turn to be positive in HBsAg. The activity of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and tyrosine  $\alpha$ -ketoglutaric transaminase is  $5.42 \text{U} \pm 0.11 \text{U/mg}$  protein and  $14.24 \text{U} + 1.50 \text{U/mg}$  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 $\mu\text{m}$ 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。

受热变光滑。若用作去透明带或卵丘细胞操作时,则可保持端口边缘锐利。细端直径大小可根据实际需要通过对加热和拉制两个环节来控制。细端拉好后注意把与胶管连接的另一端也烧圆滑。这样就不会损伤与之相连的硅胶管。连接支持管由硅胶管和连接过滤器等构成。该吸管一般使用时只是细端部分接触培养液,第二次使用前只需将粘有培养液等的部分用砂轮片切断,然后再进行拉制。一根玻璃管可使用10次以上<sup>[1]</sup>。

## 二、显微操作仪

**配置** 显微操作仪是显微操作必不可少的仪器,目前国内尚无厂家生产。进口的操作仪价格昂贵,但通过配置上的优化组合是完全可以节省三分之二的费用而又不影响操作性能。从我们的实践上看,装置一套采用国产倒置显微镜并配备进口三维液压操作手柄的显微操作仪,价格完全可控制在10万元以内。习惯上,显微操作仪左手侧进行固定,置固定针;右手侧进行操作,置操作针。厂商推荐的配置除三维粗调外两侧都采用三维精细操作手柄。这是一笔很高的费用,而实际上仅用简单的三维控制支架(粗调)或用显微镜改装成三维控制支架直接调节控制固定针即可完全满足需要。右侧(注射针)的粗调支架也可按左侧的配置,然后再在其上安装与进口操作手柄(日本成茂公司)相连接的液压精细三维移动持针器或整个右侧采用德国 Leica 公司的操作仪。

**固定针与注射针的连接** 进行显微操作时通常以右手动作为主,即通过右手操纵手柄完成绝大部分精细操作。而左手则控制与固定针和注射针相连接的注射器。一般的放置方式是左右各置一个注射器,其不便之处是右侧的注射器也需由左手控制,这样左手在操作过程中必需经常左右移动。我们将这一传统方式作了改变。即把连接固定针和注射针的两个注射器都安置于左手一侧。这样左手不必左右移动,就可轻松控制固定针和注射针。此外,我们

将液压系统改为空气压力系统,即在左右连接管内不冲灌石蜡油或者填冲液,而只有空气填充,通过吸入固定针和注射针尖端的微量石蜡油显示清楚的培养液——石蜡油界面并控制注射的速度。该空气系统的最大优点就是固定针和注射针可在清洗后反复使用,大大节省制备固定针和注射针所消耗的繁杂的劳动,从而节省时间和材料。由于空气具有可压缩性,因此,良好的密封性是空气系统正常工作的前提。与固定针相连的注射器可选用0.5-1ml旋转可调注射器,如美国 Hamilton 公司的注射器,而与注射针相连的注射器则可选用一般的10ml的一次性注射器与之连接,该注射器可直接手控或固定在一直线进退的机座上进行控制。操作结束后,显微玻璃针可用10%的NaOH和10%HCl依次清洗。也可用洗液清洗。然后再用加热的三蒸水清洗。使用前紫外灯照射15-30分钟消毒。我们已在近年来的工作中采用上述方式装备的操作仪进行过小鼠<sup>[2]</sup>、牛<sup>[3]</sup>、大熊猫<sup>[4]</sup>等的克隆研究和基因注射,均收到满意的效果。

## 三、显微操作小室

一般将60mm塑料碟作为显微操作小室,其缺点是操作中易在塑料碟底面产生划痕,降低清晰度,此外也浪费石蜡油。我们对此作了改进。现将改进的显微操作小室的制作与使用介绍如下:显微操作小室由普通1mm厚载玻片(石英玻璃更好)和有机玻璃构成。将与载玻片相同大小、厚3mm的有机玻璃中间开一左右两边为斜面的长方形孔(下底为20×24mm,上底为20×30mm)。用玻璃胶将有机玻璃粘接到载玻片上就构成一个玻璃操作小室。由于底面为玻璃,因此具有很好的透光性,特别是其硬度大大提高了。玻璃操作小室在进行显微操作时不易产生划痕,可反复使用。该小室为长方形,适合载物台及显微操作器的运动方式。因此,能够提供最大的可使用面积。有机玻璃的使用可减轻重量并能有效防止碰撞。显微操作小室

左右两边的斜面设计减少了显微操作针与小室边缘碰撞的机会,增加了操作针的活动范围,并便于清洗。进行显微操作时先注入约1mm的液体石蜡油,然后用胚胎吸管吸取操作液,并在操作小室底部制作2-5 $\mu$ l的操作小滴。

**清洗** 使用结束后,先倾去液体石蜡,然后使用小瓶刷或海绵以及一般洗涤剂洗刷干净,依次用自来水,去离子水和三蒸水各冲洗5-10次,晾干或50℃以下烘干。使用前用紫外灯照射约15分钟即可。

#### 四、电融合槽

**材料** 电融合槽的制作材料同样选用3mm厚的有机玻璃和载玻片制成,有机玻璃上开一个和操作小室大小一样的方孔。电极丝有铂丝和不锈钢丝两种,铂丝导电性好,但强度较差,容易变形。综合比较我们认为选择不锈钢丝更为理想。电极直径以0.25-0.5mm为宜,不要超过1mm,直径加大后,在进行电融合操作时,胚胎有时会被拨到电极弧形与底部的夹角中去,造成卵和胚胎的损坏和丢失。

**制作** 市场上所购的不锈钢丝一般是盘绕形式的,制作电极前应将其拉直。可用尖嘴钳等拉紧两端,在酒精灯上加热同时用力绷紧,过火后迅速用水使之冷却,这样就可得到拉直的不锈钢丝。将两根平行不锈钢丝紧贴载玻片固定好,即可用玻璃胶将两电极外侧粘按在玻璃载玻片上。两电极距离约0.5-1mm为宜。也

可先用玻璃刀在载玻片上划上两道平行浅槽,再放上电极丝用胶固定,注意在一端留出接线部分,有机玻璃框可在固定电极丝时同时压上固定,待胶干后再将电极丝留出的一端做成接线柱或用直径约1mm的铜丝固定于有机玻璃片的一端制成接线柱。融合小室的清洗及消毒同显微操作小室。

#### 摘 要

改进的胚胎吸管包括外径为2.5mm的单根玻璃细管和连接支持管两大部分。与传统的巴氏管比较,具有容易制作,可使有关操作更为简便有效和经济适用的优点。通过配置上的优化,并利用国产倒置显微镜所装配的显微操作仪,与全套进口的显微操作仪相比,可节约三分之二以上的费用,实践证明这样的配置的显微操作仪完全可以满足有关显微操作的需要。同时,引入了一种新的操作系统——空气系统。本文还介绍了改进的显微操作小室和电融合槽的制作方法。

**关键词:** 2.5mm 胚胎吸管 显微操作系统 显微操作小室 电融合槽

#### 参 考 文 献

- [1] 王敏康等,1999,动物学杂志,34(6):34-35.
- [2] 王敏康等,1999,云南教育学院学报,15(2):45-47.
- [3] 刘冀珑等,1999,科学通报,44(12):1284-1287.
- [4] 陈大元等,1999,中国科学(C辑),29(3):324-303.

#### 名词讨论

### 关于修订《细胞生物学名词》的几点建议

韩贻仁

(山东大学生命科学学院 济南 250100)

由“全国名词审定委员会”1992年公布的《细胞生物学名词》(已成书出版,以下简称为《名词》)迄今已实施八年了。在此期间由于有了统一规范的名词术语,大大

有利于全国科技交流和科学知识的传播。特别是对于

王亚辉、周郑两位教授生前曾过目此稿,并提出宝贵意见。特在此向两位老友再次表示深切悼念。