

## 人工基膜对鼻咽癌上皮细胞株(CNE-2)生长的影响\*

谢作焯 徐浩\*\* 邹巧仙\*\*\* 曾子华 郑佩斌 廖剑辉 钟瑛

(暨南大学医学院病理学教研室 广州 510632)

目前许多研究在体外诱导恶性细胞分化但总是一种暂时现象,一旦移去诱导物分化现象便会丧失,高度恶性的人类上皮瘤细胞在体外培养时恶性状态逐渐消失,最后完全失去恶性状态,但置于体内时又会重新出现恶性表型<sup>[1]</sup>,因此模仿一个与体内环境相似的体外分化培养系统,为进一步研究调控恶性细胞分化的各种因素及其作用机制会有重要意义。鉴于基膜和基膜样的细胞外基质对正常细胞的生长和分化都有重要作用<sup>[2,3]</sup>,本课题采用 I、IV 型胶原、层粘连蛋白,纤维连结蛋白等基膜主要成分仿建一种基膜作为基质进行细胞培养,观察其对癌细胞生长、分化的作用。本文主要报道人工基膜的形态结构及其对 CNE-2 细胞生长的影响。

## 材料和方 法

## 1. 水合性胶原膜(hydrated collagen lattice membrane, HCLM)和人工基膜(artificial basement membrane, ABM)制备

在玻璃培养皿内加入(自制鼠尾)I·型胶原(浓度 4mg/ml),0.1%明胶,10 倍浓的 DMEM (GIBCO 公司)和 0.2 mol/L NaOH-HEPES 液,迅速混匀,静置后凝成约 1mm 厚的 HCLM,PH 7.4 磷酸缓冲液每天换洗一次,洗 3—4 次即可使用。参照 Rizzino 法<sup>[4]</sup>,每 cm<sup>2</sup>的 HCLM 上依次铺放 V 型胶原(IVC, sigma 7521)1.5 μg,纤维连结蛋白(FN)1 μg 和层粘连蛋白(LN)1.8 μg(北医大细胞生化室产品)。铺放 LN 后置于 4℃ 30 分钟后即为可使用的 ABM。

## 2. 比较玻璃皿(G)和 HCLM 吸附蛋白质的作用

5%胎牛血清 1640 生长培养液(FBSGM)(RPMI 1640 GIBCO 公司产品),IVC, FN, LN 分别加在未接种细胞的 G 和 HCLM 中,加 5%FBSGM 的皿在

37℃温育 48 小时,加基膜糖蛋白的皿在 37℃温育 30 分钟后,回收上清液并用 PH 7.4 磷酸缓冲液洗 3 次,刮洗并分别收集刮洗物和 HCLM,按病毒疫苗冷冻曲线进行低温冷冻真空干燥获得冻干粉,用 Lowry 法测定各冻干粉的蛋白量,称取各冻干粉 10 mg 加样品液 1 ml,每管凝胶内加样 30 μl 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,电流 6 mA)分析。

## 3. 癌细胞培养

低分化鼻咽癌上皮细胞株(CNE-2)由中国医科院病毒研究所等建立<sup>[5]</sup>。CNE-2 细胞迅速解冻后在 25 ml 培养瓶中加入 15%FBSGM,37℃,5%CO<sub>2</sub>,饱和湿度培养,每 2 天换液一次,取培养 5 天生长铺满瓶底 70—80%的细胞,0.125%胰酶-EDTA 消化,台盼蓝活细胞计数,按 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>的细胞密度转种于含 15—10—5—2%FBSGM 的 G, HCLM 和 ABM 皿内。

## 4. ABM 和细胞形态观察

为观察 ABM 和在不同血清浓度下生长于不同基质上的细胞形态,除进行活体观察外,对 HCLM 和 ABM 进行考马斯亮蓝染色、石蜡包埋切片的 HE、嗜银网状纤维和 PAS 等染色及扫描电镜观察。

## 5. 细胞生长情况的观察

按下列指标进行细胞生长情况的观察:

生长曲线:每 2 天各组取 3 个皿分别计算活细胞和死细胞的数量、取其均值。

细胞生长效率(growth efficiency, GE)(见表 1 注)。

克隆形成率(plating efficiency, PE):各组细胞连续培养 9 天后,按 20/cm<sup>2</sup>细胞密度接种于 50 mm 直径的玻璃皿内,分别用不同浓度的 FBSGM 连续培养 7 天,不换液不振动,7 天后甲醇固定,0.75% Giemsa 染色,计算克隆数(每一细胞集落达 15 个细

\* 国家自然科学基金资助项目(编号:38970800)

\*\* 核医学教研室

\*\*\* 生化教研室

胞才算一个克隆), 克隆数 = 初种细胞数  $\times$  100 = PE。

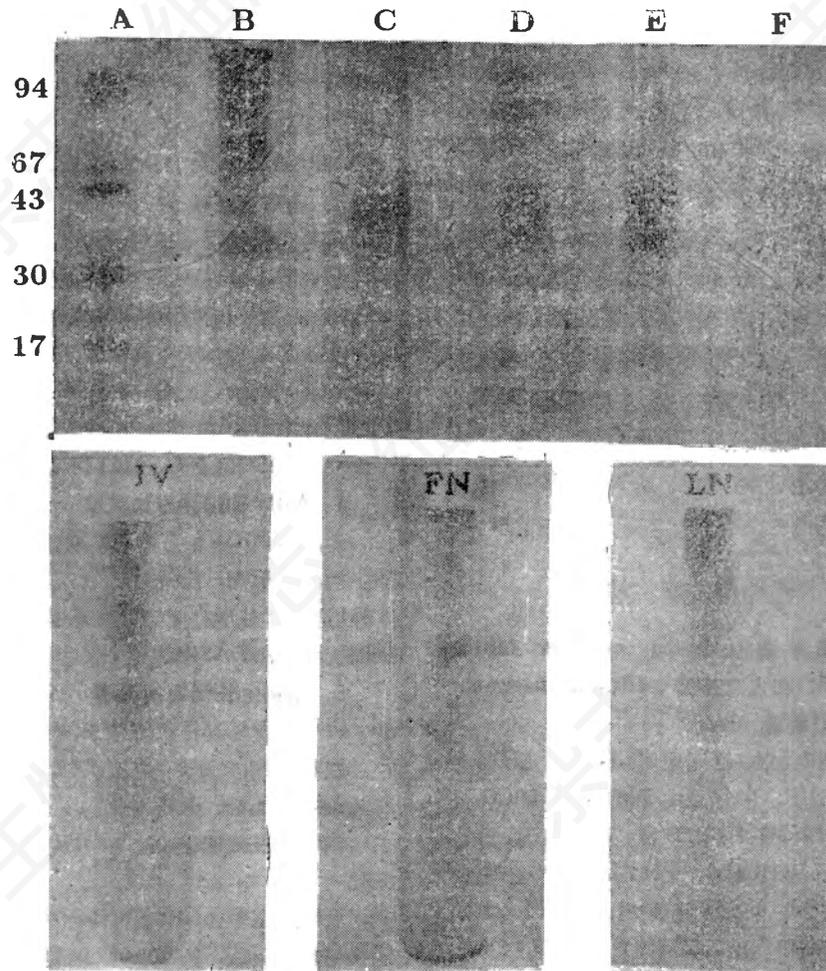
克隆生长率 (rate of clonal growth, R), 按 Lehner 方法<sup>[6]</sup> 计算(见附表)。

<sup>3</sup>H-TdR 掺入: 在 30 mm 直径的 G、HCLM、ABM 培养皿中接种  $10^4$  细胞, 每种皿分成 15% 和 5% FBSGM 二组, 每 2 天各取 3 个皿加入  $1 \mu\text{Ci}$  <sup>3</sup>H-TdR (中国原子能科学研究所产品, 放射性浓度  $1 \text{ mCi/ml}$ ),  $37^\circ\text{C}$  培养 30 分钟后, 收集细胞作液闪测定 (Beckman LS 6000 IC USA)。

## 结 果

### 1. HCLM 对蛋白质的吸附作用

从 SDS-PAGE 图中可见 HCLM 明显吸附培养液中的蛋白, 尤其是分子量 30—43 KD 的蛋白质, G 无此作用, 但 IV C, FN 和 LN 等基膜糖蛋白可快而完全地粘附在 G 的血底上。



SDS-PAGE 图

A. 标准蛋白谱带。B. I 型(鼠尾)胶原蛋白带。C. 5% FBSGM 在无细胞的 HCLM 皿中,  $37^\circ\text{C}$ , 孵育 48 小时后, 回收上清液的蛋白谱带。D. HCLM 在回收上清液后, 再经 PBS(pH 7.4)洗涤三次, 弃去洗涤液, 剩下的 HCLM 的蛋白谱带, 除见 I 型胶原(B)的谱带外, 在 43—30 KD 之间左右, 仍见 5% FBSGM 上清液(C)的蛋白带。E. 5% FBSGM 在无细胞的 G 皿中,  $37^\circ\text{C}$  孵育 48 小时后, 回收上清液的蛋白谱带, 与 C 相比在 43 KD 附近的蛋白带更浓。刮洗皿底回收液 F, 未见蛋白带谱。IV. IV C  $66 \mu\text{l}$  ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )。FN. FN  $34 \mu\text{l}$  ( $1.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )。LN. LN  $49 \mu\text{l}$  ( $1.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 分别铺放在 75 mm 玻璃皿中,  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 分钟后, 从皿底板上刮洗液中的蛋白谱带。其相应的上清液中未见蛋白带。

## 2. HCLM, ABM 和 CNE-2 细胞形态

HCLM 和 ABM 经考马斯亮蓝染色在光镜下的形态两者无异,均似海绵状结构,由无数的水合性胶原丝网构成,扫描电镜观察:CNE-2 细胞的绒毛和丝状伪足与水合性胶原丝网交织在一起,在细胞周围未见胶原网丝断或溶解。生长在 ABM 和 HCLM 上的细胞形态无明显差别,但较生长在 G 上的细胞圆且大,细胞排列较松散,铺开,细胞集落边缘不规则(图版图 1、2、3)。培养 6 天后,在细胞较密集的部位,细胞与 ABM 或 HCLM 的界面上可见嗜银纤维染色和 PAS 染色阳性物质(图版图 4、5)。

## 3. 不同浓度的胎牛血清对在 G、HCLM 和 ABM 上的细胞的生长影响

生长在 HCLM 和 ABM 上的 CNE-2 细胞在相同的血清浓度培养下具有较强的生活力。 $10^4/\text{cm}^2$  的细胞密度接种于 G 上,15%FBSGM 培养,5 天传代,5%FBSGM 培养 7 天传代最佳,超过这个时间细胞老化,颗粒多,漂浮死亡细胞多,传代不能成功。但以同样细胞密度接种于 HCLM 和 ABM 上,用同样血清浓度培养,甚至培养 10 天死细胞仅为 6—7%,传代仍能成活。从图 1 的生长曲线可见,培养至第 14 天,在 ABM 上的活细胞最多,在 HCLM 上的次之,在 G 上的细胞全部为死细胞。

表 1 中的数值表明用 15%FBSGM 培养时,细胞在 G、HCLM 和 ABM 上的 GE、PE 和 R 均无显著差异,但血清减少至 5% 或 2% 时,生长在 HCLM 和 ABM 上的细胞的 GE、PE 和 R 均明显高于生长在 G 上的。

$^3\text{H-TdR}$  掺入:从图 2 可见生长在 HCLM 和 ABM 上的细胞用 5%FBSGM 培养,其  $^3\text{H-TdR}$  掺入明显低于用 15%FBSGM 培养的,但在 HCLM 和 ABM 之间则无明显差异。生长在 G 上的细胞用 15%FBSGM 培养,其  $^3\text{H-TdR}$  掺入比生长在 HCLM 和 ABM 上的细胞的  $^3\text{H-TdR}$  掺入明显较低,但用 5%FBSGM 培养,正好相反。

## 讨 论

### 1. ABM 的海绵状结构和对蛋白质的吸附作用有利于细胞生长

在体内多种细胞外基质对细胞的作用,不仅是在互相拮抗或协同中求得动态平衡,而且细胞外基质的构型也起重要作用。生长在 HCLM 和 ABM 上的细胞排列较松散,细胞较大、较圆、细胞绒毛多、丝状伪足与水合性胶原丝网交织在一起等表明 HCLM 和 ABM 有利于细胞铺展,锚着,增加了细胞与周围微环境接触面积,从而获得更丰富的营养。其次这种海绵状结构不仅可储存外源性营养物质和吸附一些血清中的细胞毒性物质还可能为细胞自身合成或分泌的一些生长因子(自泌生长因子)提供一个吸附、保存、调节缓冲作用的细胞周围微环境。这些均有利于细胞健康生长,使细胞生活力较强,其 GE、PE、R 等均高于在 G 上生长的细胞。一般认为 GE、PE、R 等指标是细胞

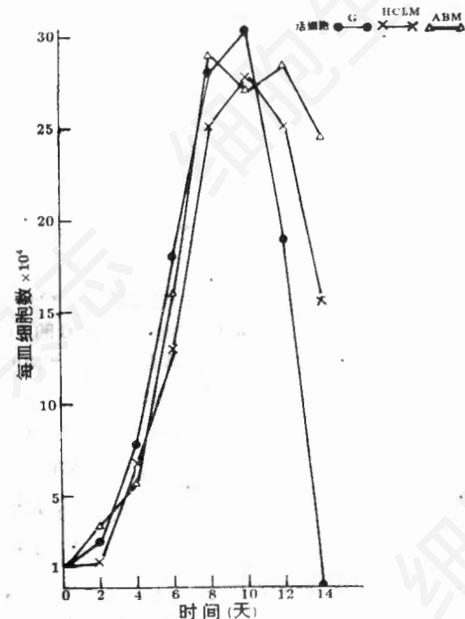


图 1 生长在不同基质上(G、HCLM、ABM)的 CNE-2 细胞,在 15%FBSGM 培养液培养下的生长曲线

(图中各坐标点代表两次实验的平均每皿的细胞数,标准差 < 20%,每次实验各组取三个皿计数。)

表 1 不同胎牛血清浓度 1640 培养液对生长在不同支持物上的 CNE-2 细胞的影响

小牛血清浓度	支持物	初种细胞数 $\times 10^5$	9 天细胞数 $\times 10^5$	GE	PE	R
15%	G	1.4	48.72 $\pm$ 1.20	34.8	66.33	0.820
	HCLM	1.4	44.00 $\pm$ 4.76	31.4	65.18	0.796
	ABM	1.4	43.00 $\pm$ 8.50	31.2	63.66	0.814
5%	G	4.0	80.00 $\pm$ 1.76	20.0	20.17	0.709
	HCLM	4.0	110.00 $\pm$ 9.50	27.0	22.10	0.793
	ABM	4.0	145.00 $\pm$ 10.90	36.3	42.67	0.846
2%	G	2.0	0	0	0	0
	HCLM	2.0	1.30 $\pm$ 0.12	0.65	2.42	0.625
	ABM	2.0	5.30 $\pm$ 0.25	2.65	4.92	0.789

注：表中数字为三次实验的平均数，标准差  $< 20\%$ ，每次实验各组均为 3 个皿。GE(细胞生长效率) = 培养 9 天的细胞数  $\div$  初种细胞数。PE(克隆形成率)。R(克隆生长率也即是每天细胞群体倍增，每皿随机计算 6 个克隆的细胞数，三个皿共计 18 个克隆的细胞数，再取其平均每个克隆细胞数的  $\text{Log}_2$  除以培养天数<sup>[6]</sup>。

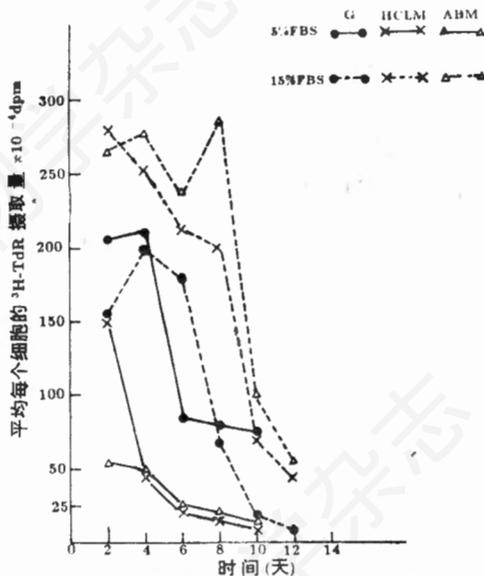


图 2 生长在不同基质上(G、HCLM、ABM)的 CNE-2 细胞，用不同浓度胎牛血清的 1640 培养液培养， $^3\text{H-TdR}$  摄取量 ( $\times 10^{-4} \text{dpm/cell}$ )。(图中各坐标点代表两次实验的平均数，标准差  $< 50\%$ ，每次各组取三个皿测定。)

生活力或生命力的反映，这可能与细胞膜的健康程度及其对外界生长因子的反应性有关，细胞外基质有稳定细胞膜，提高膜的反应性的作用<sup>[8,10]</sup>。而  $^3\text{H-TdR}$  摄取与核酸代谢有关，是细胞增殖力的反映。在低血清浓度下，培养在 HCLM 和 ABM 中的细胞，其  $^3\text{H-TdR}$  摄取虽受到抑制但细胞膜的反应性得到了提高，在 ABM 中细胞膜的反应性更佳。

## 2. 体外研究细胞外基质对肿瘤细胞的影响使用低浓度血清培养液

许多研究表明只有在无血清或低血清浓度培养下才表现出 I 型胶原对正常细胞增生的抑制作用<sup>[2-4,7]</sup>，用 10—15% 的血清，任何细胞外基质或支持物，恶性或转化细胞均具有相同的生长率，本文结果同样提示只有在低血清浓度下，I 型胶原和其它基膜糖蛋白对 CNE-2 细胞的生物学作用才能显现出来。根据我们多次实验体会到用 5% FBSGM 对 CNE-2 细胞是合适的，既可保护细胞在传代过程中不受残存胰酶的损伤又不影响或很少影响基膜成分对细胞的固有作用。

## 3. ABM 是体外诱导癌细胞分化较理想的基质

基于基膜对正常上皮细胞的生长和分化起着重要作用的认识，曾有许多学者用基膜成分促进细胞生长和分化。Rizzino 等<sup>[4]</sup>把 IV C、FN 和 LN 先依次铺放在培养皿底上，再进行细胞培养，Fridman 等<sup>[3,8]</sup>先将胎牛角膜上皮细胞进行培养，这些细胞长满皿底后会分泌许多 FN、LN 和 IV C，然后用去胆酸钠液溶解所有细胞，缓冲液洗去胞质胞核成分，皿底粘附着 FN、LN 和 IV C 成分，再进行细胞培养，这些方法在不同程度上提高了细胞生活力，减少了血清浓度， $^3\text{H-TdR}$  摄入或 DNA 合成受

到抑制。Watanabe等<sup>[9]</sup>把胰腺腺泡细胞癌培养在鼠的输精管的基膜上,这种基膜纯属天然,可进行组织切片做各种染色,观察细胞形态和细胞与基膜的关系,但这种基膜的制备过程要把输精管上皮细胞完全去除,操作麻烦,且容易损伤丢失基膜成分,不能按需要调整各基膜成分的剂量。本研究仿制的ABM与体内实际基膜仍有差异,但其主要成分基本相仿,而且可根据需要添加其他基膜成分或调整各基膜成分的比例。在结构上ABM有一个连续和完全的膜屏障,而且由I型胶原和IV胶原组成的开放式网状结构赋予其一定张力,便于液体的通透及提供弹性,因此ABM可供石蜡包埋切片进行各种染色,观察细胞与基膜的关系,此外还可用作生物膜进行电生理学以及肿瘤侵袭模型的研究。从ABM对CNE-2细胞生长的影响来看,有减少其对血清的依赖,尽可能地减少了血清中去分化物质或其他不明成分的影响。综上所述,要建立一个与体内微环境相似的体外分化培养系统,进一步研究调控癌细胞分化的各种因素,ABM是一种较理想的基质。

### 摘 要

人工基膜(ABM)主要以I型胶原的水溶性胶原丝网为网架,铺上纤维连结蛋白,IV型胶原和层粘连蛋白等主要基膜糖蛋白制备而成,具海绵状的形态结构。ABM可减少胎牛血清用量10%,提高细胞生活力和延长细胞传代周期。在2—5%血清浓度的情况下,ABM可提高CNE-2细胞的生长效率,克隆形成率和克隆生长率而抑制细胞的<sup>3</sup>H-TdR掺入。提示在体外研究细胞外基质对细胞的影响时应使用低血清培养液。ABM是体外诱导癌细胞分化较理想的基质。

**关键词:** 人工基膜 CNE-2细胞株 生长与分化

### 图 版 说 明

#### ABM对CNE-2细胞株生长的影响

1. 在HCLM上生长4天的CNE-2细胞,胶原网丝呈海绵状,细胞排列较松散,集落边缘较不规则。考马斯亮蓝染色×400
2. 在G上生长4天的CNE-2细胞,细胞排列较紧密,集落边缘较整齐。×330
3. 在HCLM上生长4天的CNE-2细胞的扫描电镜照片,细胞丝状伪足与胶原网丝交织在一起。×3500
4. 在HCLM上生长6天的CNE-2细胞,细胞与胶原膜的界面上有一层嗜银纤维染色阳性物质。石蜡包埋切片, Gomoris法×800
5. 在HCLM上生长6天的CNE-2细胞,细胞下的胶原上有一层PAS阳性物质(↑)。石蜡包埋切片, PAS染色×400

### 参 考 文 献

- [1] Ossowski, L. et al., 1983, *Cell*, 33: 323—325.
- [2] Vlodavsky, I. et al., 1982, *Developmental Biology*, 93: 285—300.
- [3] Fridman, R. et al., 1985, *Expt. Cell Res.*, 157: 181—194.
- [4] Rizzino, A. et al., 1980, *J. Supramolecular structure*, 13: 243—253.
- [5] 谷淑燕等, 1983, 《癌症》, 2: 70—72.
- [6] Lehner, JF. et al., 1981, *Cancer Res.*, 41: 2294—2304.
- [7] Schor, AM. et al., 1983, *J. Cell Sci.*, 62: 267—285.
- [8] Gospodarowicz, D. et al., 1980, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 4094—4098.
- [9] Watanabe, THK. et al., 1984, *Cancer Res.*, 44: 5361—5368.
- [10] Leiv, I. et al., 1982, *Expt. Cell Res.*, 137: 15—23.

欢迎订阅《实验生物学报》(邮发代号4—156)、《Cell Research》

(科学出版社办理订阅)。