

人鼻咽癌克隆株体外传代过程的群体变化

罗经文* 孙宁 沈淑静

(广东医学院病理学教研室 湛江 524023)

大多数肿瘤起源于单个细胞^[1], 最终演变为异质性细胞群体, 且常通过变异和选择变得更为恶性。探讨这一过程变化规律, 具理论及实践意义。本研究通过动态地测量人鼻咽癌单克隆细胞连续传代过程中细胞形态参数, DNA含量及体外增殖能力的变化, 探讨肿瘤细胞群体的演进过程。

材料与 方法

一、克隆株的选择、培养和涂片

从本室克隆的 20 多个 CNE-2 Z 克隆株^[2]中, 选择电泳率中等(1.39+0.18)的 CNE-2 Z-5-2-B₇(以下简称 B₇)为研究对象。该克隆从单个细胞到体外扩增传 5 代后冻存, 复苏后再传 3 代定为本实验的第 1 代。细胞复苏后置 50 ml 培养瓶中于 37℃ 恒温箱中培养。培养液为 RPMI 1640(含小牛血清, 青、链霉素), 每隔 2—3 天视细胞长满瓶后用 0.5% 胰酶+0.2% EDTA(1:3)于 37℃ 消化 10 分钟后吹打, 各瓶留取 1/3 的细胞连续培养传代。每隔 10 代视细胞刚长满瓶(指数增生期)时, 取部分细胞冻存, 部分作涂片、固定后作 HE 染色或 Feulgen 染色, 余 1/3 细胞继续培养传代。

二、检测指标

每 20 代检测下列指标:

1. 瘤细胞形态定量参数: 用半自动数字图象分析仪(日本产), 在显微镜下(10×40)从涂片四周及中间 5 个区域, 随机地对 100 个瘤细胞以体视学软件(美国)测量核面积、胞面积, 按公式: 核浆比=核面积/(胞面积-核面积)用 IBM 微机求出核浆比。

2. 瘤细胞 DNA 含量: Feulgen 染色的细胞涂片用西德产 Leits-MPVIII 型显微分光光度计, 连接 HP-85 微机, 波长 560λ, 栓式细胞扫描法测定细胞核 DNA 含量, 以任意单位(Au)表示, 在高倍镜下(10×40)随机测定 100 个瘤细胞, 并以 40 个正常人外

周血淋巴细胞核 DNA 含量的均数为二倍体细胞 DNA 含量的标准(2C), 计算各代 DNA 含量(C), 绘出 DNA 含量直方图。

3. 瘤细胞体外增殖能力:

(1) 克隆形成率: 采用改良双层琼脂法^[3]计算出 3 个平皿克隆形成率(克隆数/接种细胞数)的均数。

(2) MTT(溴化二甲噻唑二苯四氮唑)试验测定增殖的活细胞数^[4], 以 OD 比值反映增殖能力的大小。

三、统计处理

本文数据资料用 Mean±SD 表示, 采用医用统计程序作方差分析和 T 检验, 方差不齐时用 T' 检验, 克隆形成率比较用 U 检验。

结 果

一、B₇ 克隆株连续传代过程瘤细胞形态定量及 DNA 含量变化

1. 形态定量参数

各代细胞面积, 核面积, 核浆比随传代过程而变化, 以 41 代和 81 代最为明显: 41 代细胞面积和核面积均数增大, 核浆比变小; 81 代胞面积、核面积均数变小, 核浆比增大。第 1、41、81 代比较差异非常显著(表 1)。各代不同胞面积, 核面积及核浆比的瘤细亚群细胞数(图 1)显示, 41 代以大细胞(>200 μm²), 81 代以小细胞(<100 μm²)为多, 分别占 61% 和 60%。核浆比≤1.0 的瘤细胞 41 代为 47%, 81 代为 10%, 而>2.0 者 41 代为 7%, 81 代为 30%, 差异非常显著(p<0.0001)。

2. DNA 含量

B₇ 克隆株不同代数细胞核 DNA 倍体分布和直方图的分散度(图 2)显示: 41 代与 81 代≤7c 细胞较多, 但 41 代较分散, 81 代右移

* 现在深圳南山人民医院外科。

表 1 CNE-2 Z-5-2-B, 克隆株连续传代过程中细胞形态定量的比较

代数	核面积 (μm^2)	胞面积 (μm^2)	核浆比
1	95.51 \pm 30.21	167.75 \pm 39.73	1.49 \pm 0.90
21	95.71 \pm 41.68	152.46 \pm 59.96	1.96 \pm 1.22
41	115.33 \pm 32.92	226.82 \pm 60.75	1.19 \pm 0.59
61	92.38 \pm 30.35	153.50 \pm 42.27	1.64 \pm 0.68
81	65.68 \pm 20.84	101.83 \pm 27.71	2.06 \pm 0.98

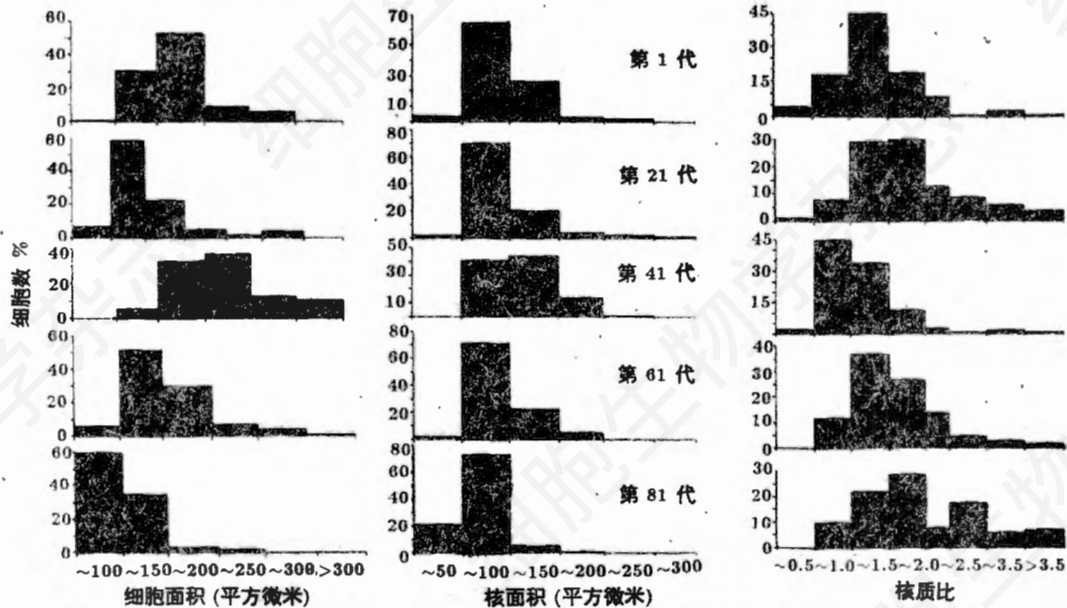


图 1 CNE-2 Z-5-2-B, 克隆株连续传代过程细胞面积、核面积和核质比细胞群体数变化

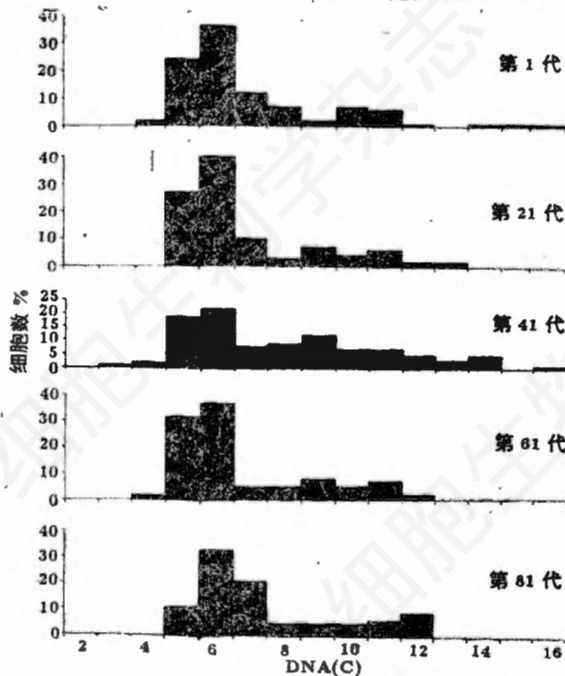


图 2 CNE-2 Z-5-2-B, 克隆株体外传代过程中核 DNA 含量的变化

且集中。结合瘤细胞核平均面积的差异, 则 81 代细胞核平均 DNA 含量较 1、41 代明显为高。

二、B₇ 克隆株体外传代过程体外增殖能力的变化

各代克隆形成率及 OD 值不相平行(表 2), 但 81 代两者均较第 1 代明显增高。表明其干细胞多, 增殖速度快。

讨 论

在肿瘤生长过程中, 其生物学行为显示进行性恶化并更具侵蚀性, 此种现象称为肿瘤的演进^[5]。本研究通过瘤细胞克隆株在体外传代过程的演进, 试图尽可能排除环境因素的影响, 探讨瘤细胞自身的变化。结果表明: (1) 第 1 代的细胞形态参数、DNA 含量已经出现异质性, 为多种瘤细胞亚群所构成, 且随传代过程而变化、消长。(2) 41 代以细胞面积大、核大、核浆比小、DNA 含量高、异质性明显的

表2 CNE-2 Z-5-2-B, 克隆株不同代数的细胞体外增殖力的比较

代数	克隆形成试验			MTT 试验
	接种细胞数	克隆数	克隆形成率(%)	OD 比值
1	502	248	49.4	2.17±0.24
21	521	285	54.7	3.35±0.36
51*	431	197	45.8	2.39±0.88
61	485	216	44.5	3.79±1.64
81	474	292	61.6	3.09±0.54

* 41代复苏失败,以51代代替

大细胞群体占优势。其形态特征与鼻咽低分化鳞癌的大核型相似^[6]。(3) 81代主要为胞、核面积小,核浆比大,DNA含量高的小细胞群体,其体外增殖能力较第1代明显为高,形态及生长特征与鼻咽未分化癌相似^[7]。作者认为这种变化的发生,主要在于瘤细胞亚群间的相互作用,由于瘤细胞的遗传不稳定性,导致群体的多态性,出现群体间的竞争和选择,在某一时期出现占优势的细胞群体^[8]。而不断的变异和选择,最终使瘤细胞群体向恶性程度高、增殖力强的方向演进。

瘤细胞在体内生长,受整体及局部微环境的影响,其细胞群体变化,比体外传代培养复杂,难于进行研究。本研究结果提示,在排除体内因素影响下,由于瘤细胞自身的相互作用,瘤细胞即可出现分化与失分化的变化,为诱导瘤细胞的分化提供了瘤细胞内在可能性,也提示随着肿瘤的演进,如不给予影响(治疗),瘤细胞有恶性发展的内在倾向。

摘 要

将人低分化鼻咽癌克隆株 CNE-2 Z-5-2-B,在体外连续传代培养,从群体的角度观察了不同代数的细胞形态定量、DNA含量和体外增殖能力的变化。结果:(1)各细胞形态参数、DNA含量出现异质性,为多种瘤细胞亚

群所构成,而且随传代过程变化、消长。(2) 41代以细胞面积大、核大、核浆比小、DNA含量高、异质性明显的大细胞群体占优势。其形态特征与鼻咽低分化鳞癌的大核型相似。(3) 81代主要为胞、核面积小、核浆比大、DNA含量高的小细胞群体,其体外增殖能力较第1代明显为高,形态及生长特征与鼻咽未分化癌相似。提示随着肿瘤的演进,如不给予影响(治疗),瘤细胞有恶性发展的内在倾向。

关键词: 鼻咽癌 克隆细胞 体外培养
群体 肿瘤演进

参 考 文 献

- [1] Hart IR and Fidler IJ, 1981, *Biochem Bioph Acta.*, 651: 37.
- [2] 胡新荣, 1993, 湛江医学院学报, 11(1-2): 22.
- [3] 邓惠华, 1991, 湛江医学院学报, 9(1): 24.
- [4] 黄瑾, 1992, 白求恩医科大学学报, 18(4): 395.
- [5] Foulds L., 1957, *Cancer Res.*, 17: 355.
- [6] 沈忠英等, 1986, 中华肿瘤杂志, 8(6): 434-437.
- [7] 宗永生等, 1990, 中华肿瘤杂志, 12(2): 88.
- [8] Heppner GH, 1989, *J. Natl cancer Inst.*, 81(9): 648.

THE POPULATION VARIANCE OF HUMAN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA CLONAL STRAIN (CNE-2 Z-5-2-B 7) DURING PASSAGES IN VITRO

Luo Jingwen et al

(Department of Pathology, Guangdong Medical College 524023)

ABSTRACT

The clonal strain (CNE-2 Z-5-2-B 7) which derived from human poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE-2 Z was serial cultured from primary to the 81th passage in vitro. The cell morphometric, nuclear DNA content and the proliferation in vitro of different passages were investigated. The results indicated (1) During culture passaged in vitro, the cell morphometric and nuclear DNA content showed their heterogeneity and construction by different subpopulations that would appeared or disappeared. (2) The subpopulation with large cellular and nuclear area but low N/C ratio, high DNA content reached the top on the 41th passage, which were similar to characteristics of the large nucleus type of poorly differentiated squamous carcinoma. (3) The cell population became mainly small cellular and nuclear area, high N/C and DNA content with higher proliferation on the 81th passage than that on primary clonal strain, which were as undifferentiated carcinoma.

Key words: nasopharyngeal neoplasm clonal cell culture in vitro population tumor progression

卡托普利对血管平滑肌细胞内皮素基因表达的影响

齐建华、陆 敏 王 军** 王新明 韩志朝

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031

**上海第二医科大学药理教研室 200025)

自从 Yanagisawa 等报道血管内皮细胞产生的内皮素(endothelin, ET)是体内最强的缩血管多肽以来^[1], ET的生物学意义及其表达调控机制日益引起人们的重视。已有文献报道,血管平滑肌细胞也可衍生 ET 并通过自身分泌作用参与高血压和动脉粥样硬化的发病过程^[2-5]。

卡托普利(captopril, Cap)为临床上有效的降压药,其作用机制主要是抑制转化酶,减少血管紧张素 II (Ang-II)的形成。然而这并不能充分解释 Cap 的某些作用如长期给药产生持续降压和阻止血管肥厚^[6,7]以及改善血管平

滑肌细胞的异常超微结构征象^[8]。近年来,国外研究者已注意到转化酶抑制剂与 ET 调节存在直接作用关系^[9]。但有关转化酶抑制剂对 ET 基因表达影响的研究尚未见有报道。故我们观察了转化酶抑制剂 Cap 对 Ang-II 诱导家兔血管平滑肌细胞 ET-1 基因表达的影响。

材料与 方法

1. 药品与试剂

Ang-II 购自 Sigma 公司。Cap 由中美施贵宝制药有限公司提供。反转录酶(AMV)购自 Promega。Taq DNA 聚合酶,限制性内切酶,oligo-dT, dNTP