

HGPRT 缺陷性人结肠癌细胞株的建立

贺 武 宋今丹

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室 沈阳 110001)

随着分子生物学技术的进步,真核细胞基因的结构、功能、表达和调控等方面均获得迅速的发展。培养细胞突变体研究已成为细胞生物学主要的研究手段和内容,它对许多研究技术如细胞融合,单克隆抗体制备等也有很大实用价值。人类细胞中 HGPRT 基因位于 X 染色体 q26-q27 位点,其 cDNA 全序列已被克隆、测序^[1],其编码产物是细胞合成嘌呤核苷酸补救通路的关键酶,次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖酶(HGPRT),此酶氨基酸序列已被确定^[2]。当 HGPRT 基因突变时,此酶活性缺失,表现出对 8-氮鸟嘌呤(8-AG)的抗性(AG^R)。本研究选用乙基甲磺酸(EMS)诱导人结肠癌细胞系 CCL187 细胞突变,然后用 8-AG 筛选药物抵抗型 HGPRT 缺陷细胞株。

材料和 方法

1. 细胞系

人结肠癌细胞系 CCL187 由美国哈佛医学院 Dana-Farber 肿瘤研究所惠赠。常规培养于 DMEM/10% FCS 培养基中。

2. 试剂

EMS、8-AG、Anti-Mouse IgG-FITC(SIGMA),³H-Hypoxanthine(中科院原子能研究所),DEAE-Cellulose(SERVA),DMEM(GIBCO),DTT,PRPP(华美生物制品公司),抗人结肠癌相关抗原 LEA 单克隆抗体 ND-1 由本室研制^[3]。

3. EMS 处理及剂量选择

处于指数生长期的单层 CCL187 细胞(10⁶/瓶),加入 EMS 至终浓度分别为 100,150,200,250 和 300 μg/ml,37℃,5%CO₂ 作用 12 小时后,去除 EMS,经胰酶消化,制成单细胞悬液,台盼蓝染色后计数,计算野生型 CCL187 细胞存活率。经重复试验,确定细胞存活率为 70% 时的 EMS 剂量 200 μg/ml 作为突变剂量^[4]。

4. 突变表型的诱导和筛选

将指数生长期的单层 CCL187 细胞(10⁶/瓶),加入 EMS 至 200 μg/ml,37℃,5%CO₂ 作用 12 小时,去除 EMS,用 PBS 洗两次,经胰酶消化,制成单细胞悬液,按 10³ 细胞/瓶传代,37℃,5%CO₂ 培养 7-10 天,至细胞汇合后,按 10⁵/瓶接种传代。培养 24 小时后,加入 8-AG 至终浓度 20 μg/ml,继续培养,筛选具有 AG^R 表型的 HGPRT 缺陷细胞^[4]。

5. HAT 处理

将细胞按 10⁵/瓶接种于 HAT-DMEM 选择性培养基,37℃,5%CO₂ 培养(H:10⁻⁴mol/L,A:4×10⁻⁷mol/L,T:1.6×10⁻⁵mol/L),观察存活、生长情况。

6. HGPRT 缺陷型细胞的生物学特性

(1) 形态学研究:常规光镜,电镜观察。

(2) 核型分析:常规染色体制片,染色,观察。

(3) 增殖状况:以 10⁵/瓶接种 MCL187 及 CCL187 细胞于 DMEM/5%FCS 中,逐日定时取样计数,将结果按细胞浓度对数绘制生长曲线。

7. HGPRT 酶活性测定

将细胞悬液冻融裂解,以³H-IMP 的形成作为指标作定量测定。取细胞裂解液 30 μl,加反应液 70 μl 混匀(含 Tris-HCl, pH = 8.0, MgCl₂, DTT, PRPP, BSA 及³H-Hypoxanthine 分别 5mmol/L, 9mmol/L, 2mmol/L, 1mmol/L, 0.5g/L, 0.06mmol/L),于 37℃ 反应 15min,加入 150 μl 预冷的 50mmol/L Tris-HCl,置冰浴中终止反应。上 DEAE-Cellulose 柱,以 5ml Tris-HCl 洗涤,最终以 1.5ml HCl(1mol/L)洗脱,进行液闪计数测定^[5]。

8. LEA 抗原在 HGPRT 缺陷细胞表达的 FACS 分析

将对数生长期的细胞经胰酶消化后制成单细胞悬液,用 PBS(含 1%BSA)洗两次,调整密度至 2×10⁷/ml。取细胞悬液 100 μl,加 20 μl ND-1 混匀,置 4℃,45min,PBS 洗 3 次,重悬于 100 μl PBS,加入 5 μl Anti-Mouse IgG-FITC 混匀,置 4℃,45min,PBS 洗 3 次,重悬于 1.0ml PBS,加戊二醛至终浓度 0.05%固定后,上 FACSsort(Becton Dickinson)测定^[6]。阴性对照以 PBS 替代 ND-1 单抗。

结 果

1. HGPRT 缺陷株的建立

经 200 $\mu\text{g/ml}$ EMS 诱变后的细胞 (10^5 /瓶), 加入 8-AG 至终浓度 20 $\mu\text{g/ml}$, 继续培养 24-48 小时后, 野生型细胞逐渐死亡, 具有 AG^R 表型的 HGPRT 缺陷细胞则能够存活。经 8-AG 选择的 HGPRT 缺陷细胞, 继续传代培养于 DMEM/10%FCS (含 8-AG 20 $\mu\text{g/ml}$) 中。经冻存复苏后仍具 AG^R 表型, 命名为 MCL187。

MCL187 细胞在 DMEM 培养基中常规培养时生长良好, 在 HAT-DMEM 选择性培养基中不能存活。野生型 CCL187 细胞在 HAT-DMEM 则能够存活。

2. MCL187 细胞的生物学特性

(1) 形态学观察 MCL187 细胞与野生型 CCL187 细胞相似, 常规培养时在光镜下呈多角形, 贴壁生长, 细胞间界限不清, 相互重叠, 无接触性抑制。TEM 观察可见核大且形态多样, 可呈分叶状或锯齿状, 数个核仁; 溶酶体丰富, 线粒体嵴不明显, 内质网稀少且分布散乱, 不规律, 伪足中有内质网分布 (图版图 1); SEM 下见细胞表面极不光滑, 多见针状, 丝状, 片状伪足 (图版图 2)。

(2) 核型分析 MCL187 细胞染色体众数在 50-59 之间, 属亚三倍体范畴, 与野生型 CCL187 细胞相似。

(3) 生长曲线 (图 1)

3. HGPRT 酶活性测定

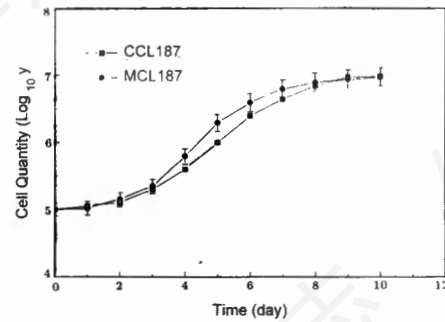


图 1 MCL187, CCL187 细胞生长曲线

将 CCL187 及 MCL187 细胞悬液分别冻融裂解, 以 ³H-IMP 的形成作为指标作定量测定。重复测定结果, MCL187 比 CCL187 细胞 HGPRT 活性低约 80%, 差异有显著性意义 (表 1)。

表 1 HGPRT 活性测定结果 ($\bar{X} \pm \text{SD}$)

细胞株	CCL187	MCL187
本底 cpm	29.0 \pm 4.0	27.0 \pm 3.0
实验 cpm	2435.0 \pm 58.0	482.0 \pm 37.0

$P < 0.01$

4. LEA 抗原在 MCL187 细胞的表达

经 FACS 测定, MCL187 细胞 LEA 抗原表达阳性率为 88.26%, 其阳性峰平均道数为 164.90, 与野生型 CCL187 细胞 (86.35%, 179.83) 无显著性差异 (图 2)。

讨 论

真核细胞在一定条件下可发生突变, 并且可经一定选择后筛选出缺陷型细胞系。突变种或称缺陷株, 应具有以下特征: 表型改变是由于

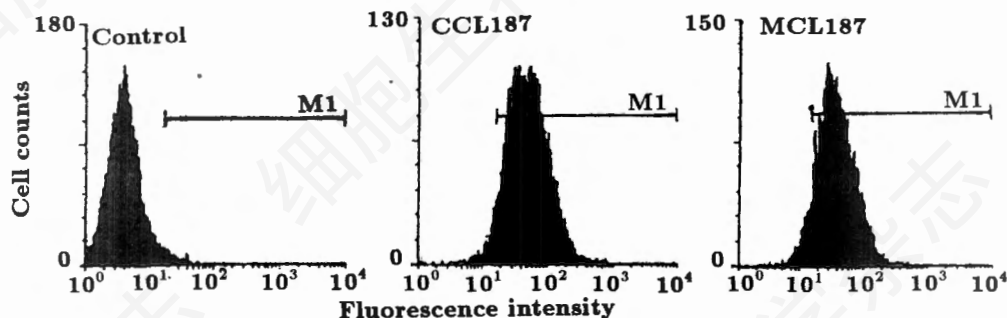


图 2 LEA 抗原在 MCL187 细胞和 CCL187 细胞内表达的流式细胞术检测

基因组的某一特定区域发生突变所致;表型变化可以基因产物,如酶的形式表现;突变表型可稳定遗传给后代;突变频率可由致突变剂的使用而提高。人类细胞 HGPRT 基因位于 X 染色体 q26-27 位点,全长 57kb,由 9 个外显子和 8 个内含子组成,其 mRNA 转录本长 1.6kb,其中蛋白编码区域有 654 个核苷酸^[7],基因产物 HGPRT,由 2-4 个蛋白亚单位组成,是细胞合成嘌呤核苷酸补救通路的关键酶,其特异性不强,能将 8-AG 等嘌呤类似物掺入 DNA 分子而引起细胞死亡。当 HGPRT 基因突变时,此酶活性缺失,表现出对 8-AG 的抵抗性,即 HGPRT 缺陷细胞能够在 8-AG 存在条件下存活,野生型细胞则死亡。突变细胞由于其嘌呤核苷酸合成补救通路丧失,只能依赖于全程途径,当此途径被氨基喋呤(A)抑制时,在有外源性次黄嘌呤(H)存在时,野生型细胞存活,而突变型细胞则死亡。以上特点构成了 HGPRT 缺陷型细胞的筛选及其在杂交细胞制备等研究中的应用的理论基础^[4]。HGPRT 缺陷细胞系如 NS-1 (Milstein, 1976)、Sp2/0 (Shulman, 1978) 等已在单抗制备中被广泛应用。在人类疾病谱中,与此相关的有 HGPRT 活性部分缺失所致的高尿酸血症、痛风和完全缺失所致的 X 染色体连锁的遗传病 Lesch-Nyhan 综合症^[8]。此类疾病中,迄今已发现多种形式的 HGPRT 基因突变,但其与酶分子结构及酶活性改变之间的确切联系尚无定论^[7]。本研究首先应用化学突变剂 EMS 诱发人结肠癌细胞系 CCL187 突变,随后用 8-AG 筛选药物抵抗型突变株,最终经 8-AG、HAT 选择检测和相应酶活性分析,证明已获得 HGPRT 缺陷型人结肠癌细胞株 MCL187。此缺陷株细胞 HGPRT 活性显著低于野生型细胞,具有 AG^R 表型,在 HAT 选择性培养基中不能存活;生物学特性方面与野生型细胞无明显差异,且细胞表面仍表达结肠癌相关抗原 LEA。这为进一步应用此缺陷型细胞

株,将其与其它细胞融合产生新的杂交细胞系,再用此杂交细胞系从事多种研究,如肿瘤细胞逃避免疫监视和机体抗肿瘤免疫机制的研究,肿瘤细胞恶性度分析,基因转移途径的探讨,外来基因的表达、调控等研究提供了一个新的模型。

摘 要

本研究首先用化学突变剂乙基甲磺酸(EMS)处理人结肠癌细胞系 CCL187,然后用嘌呤类似物 8-氮鸟嘌呤(8-AG)筛选次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖酶缺陷细胞(HGPRT⁻),历时半年,成功获得抗 8-AG 毒性突变体,即 HGPRT 缺陷细胞株 MCL187。该缺陷株细胞 HGPRT 酶活性显著低于野生型细胞,在 8-AG 中能够存活,在 HAT 选择性培养基中则死亡,与野生型细胞同样表达结肠癌相关抗原 LEA。此缺陷株的成功建立,为杂交细胞制备及其应用研究奠定了基础。

关键词:人类细胞系 HGPRT 缺陷株 结肠癌
肿瘤相关抗原

参 考 文 献

- [1] Jolly, D J. et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**:477-481.
- [2] Wilson, J M. et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, **257**:10978-10985.
- [3] Song Jindan, et al., 1986, *Cancer*, **57**(3):433-440.
- [4] 鄂征, 1995, 组织培养和分子细胞学技术(第一版), pp190, 北京出版社, 北京.
- [5] Olsen, A S. et al., 1974, *J. Biol. Chem.*, **249**:4030-4038.
- [6] 张腾飞, 陈诗书, 1996, 上海免疫学杂志, **16**(1):1-4.
- [7] Sculley, D G. et al., 1992, Nov., *Human Genetics*, **90**(3):195-207.
- [8] Beverly, L D. et al., 1991, *Am. J. Hum. Genet.*, **48**:951-958.

THE ESTABLISHMENT OF HGPRT MUTANT FROM HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELL LINE(CCL187)

HE Wu SONG Jin Dan

(Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China)

ABSTRACT

The wild type of human colorectal carcinoma CCL187 cells were treated firstly by a chemical carcinogen EMS for the induction of mutagenesis, then the mutant cells were selected in the medium containing 8-AG at the concentration of 20 μ g/ml. After six months' screening, the HGPRT mutant line MCL187 was established. It was found that the mutant cells could grow vigorously in the medium containing 8-AG(20 μ g/ μ l) but not in HAT medium. The HGPRT assay showed a significant quantitative difference between the HGPRT mutant cells and the wild type. Expression of tumor associated antigen LEA on the HGPRT mutant cells was similar to that on the wild type.

Key Words: Human cell line HGPRT mutant Colorectal carcinoma Tumor associated antigen

脉冲电场对真皮成纤维细胞生长和膜流动性的影响

张红锋 陈树德* 王耀发 陈家森*

(华东师范大学生物系*物理系 上海 200062)

低频电磁场的生物效应是一个相当复杂的问题,已有报道表明,电刺激可以影响生物大分子(包括DNA, mRNA和蛋白质)的合成,酶活性, Ca²⁺运输,细胞增殖等^[1]。Cadossi^[2]研究了低频脉冲电场(E=4mV/cm和E=50mV/cm)对人淋巴细胞增殖的影响。Borgens等^[3]发现脉冲电场对神经再生也起着重要作用。低频电磁场对大肠杆菌和肿瘤细胞的增殖也表现出相似的生物效应^[1]。我们曾研究过脉冲电场对表皮细胞增殖能力的影响^[4],本文在真皮成纤维细胞上进一步进行实验,并对两组结果做了比较研究。

脉冲电场引起细胞膜电位的改变,引起细胞膜通透性的变化^[5],生物工程中外源基因的导入和细胞融合都采用脉冲电场。我们以荧光偏振方法,结合上述增殖实验的结果,选择了电场作用5分钟(即显著促进细胞增殖)和45分钟(即显著抑制细胞增殖)这两个条件,研究脉冲电场对细胞膜流动性的影响。生物膜的流动性是膜结构行使功能的基础,它与受体的运动

和信号传递,蛋白质通道的开闭和细胞内外物质运输等代谢活动密切相关。通过这方面的研究,将有助于在细胞水平上揭示低频电磁场的作用机理。

材料和方法

一、真皮成纤维细胞的离体培养

皮肤组织取自包皮环切手术,于D-Hank's液中洗净血迹,剪成2 \times 2mm²的皮肤组织块,真皮面朝下贴于培养瓶底部,37 $^{\circ}$ C静置3-4小时,使组织块紧紧粘于瓶底,加入含20%小牛血清的MEM(GIBCO)培养基5ml/瓶,37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱恒温培养。待组织块周围的细胞生长晕扩展以后,可进行传代培养,获得稳定生长的真皮成纤维细胞。

二、脉冲电场作用实验

实验中所采用的f=50Hz, t=20 μ s, E_{pp}=1V/m的脉冲电场来自我们自己研制的脉冲电场发生器。该脉冲电场加在二圆形平板电极上,实验组样品细胞培养板(或培养瓶)置于二圆形平板电极之间。对实验组细胞进行电场处理时,对照组和实验组细胞同时从培