

人黑色素瘤细胞系(HMM-239)的建立及其生物学特性

黄靖香 陆应麟 陈乐真 李向红 张曙光

(解放军总医院病理科 北京 100853)

人黑色素瘤细胞系在国外虽已建立近200个^[1],但在国内尚未见报道。我们于1987年首次将一活检病理诊断为左足趾黑色素瘤的患者,无菌取其截肢甲床下的一块肿瘤组织做细胞培养,先后传代80余次,其间经15次冻存,21次复苏,6次接种裸鼠皮下。细胞生长稳定,无支原体污染,现定名为HMM-239细胞系。

材料和 方法

一、材料来源和培养方法

患者李×,男,62岁,因左足拇趾甲床下包块1年余,来我院就诊后活检(病理号168290),诊断为恶性黑色素瘤(MM)而入院手术。

培养方法 无菌取甲床下黑色素病变组织,用Hank's液冲洗3次,剪成1立方毫米大小的组织块,均匀贴在30ml方瓶的内壁上,加pH 7.2 RPMI-1640培养液(含15%小牛血清),置37℃贴壁2小时后,将组织块轻翻至培养液中,密闭静止培养,33天后第一次传代,以后3天传代1次,多次冻存复苏,细胞生长良好。

二、形态学检查

1. 光镜检查 活检组织经10%福尔马林固定,石蜡切片,脱蜡至水。10代培养细胞先传到窄玻片上生长2天。然后取出经Hank's液洗涤,AF液固定30分钟,和上述切片做HE染色,光镜下观察。培养在方瓶中的贴壁细胞,用Olympus倒置显微镜观察。

2. 裸鼠接种 用3、13、15、20代培养2天的细胞,每只接种细胞 4×10^6 于B/C裸鼠的右后外侧皮下。共接种20只,鼠龄4—6周,体重16—20克。以后每周测肿瘤大小一次,裸鼠带瘤生长23—80天,于不同时间处死,取脑、肺、肝、脾、肾、肿瘤和颈、腋、腹股沟、肠系膜淋巴结做肉眼和光镜观察。取肿瘤组织做电镜,组织化学及免疫组化检查。

3. 组织化学染色 活检组织和裸鼠的移植瘤组织及培养细胞三种标本一起用Masson-Fontana银氨

液浸染法染色,以显示黑色素^[2]。另外用裸鼠移植瘤组织冰冻切片和培养在窄玻片上1—5天的活细胞一起进行Dopa氧化酶(又称酪氨酸酶)染色。以显示Dopa氧化酶的活性部位^[2]。

4. 免疫组化染色 用兔抗人S-100单克隆抗体(美国Dako公司产)。将上述三种标本用ABC法做免疫组化染色。

5. 透射电镜观察 分别用活检标本和裸鼠的移植瘤组织及5代培养细胞离心成团,常规双固定,逐级脱水,EPON 812树脂包埋、LKB-III型超薄机切片。醋酸铀及硝酸铅染色,在H-7000电镜下观察。

6. 扫描电镜(SEM)观察 传在窄玻片上生长3天的15代细胞,经Hank's液洗后,置2%戊二醛和1%锇酸固定后逐级脱水,临界点干燥,真空喷镀,在S-800(SEM)镜下观察。

7. 支原体检测 用接种在窄玻片上生长2天的35代细胞,做Hoechst 33258 DNA荧光染色^[3],在Olympus荧光显微镜下观察。

三、染色体分析

用5和42代第2天的培养细胞,常规滴片,空气干燥,置60℃温箱内12小时后用0.25%的胰酶在37℃水浴中消化40秒,Giemsa染色分带。将染色片置IBAS-2000-Opton(原西德产)图象分析仪上,分别各数100个分裂细胞的染色体数,并组型分析染色体众数和畸变状况。

四、细胞增殖潜能

1. 生长速度 用15和40代细胞每瓶分别接种 9×10^4 和 8×10^4 ,各接种30瓶,置37℃培养,隔日换液1次,每天计数2—3瓶,连续计数9天,求该细胞系的倍增时间。

2. 分裂指数 在做生长曲线的同时,将同样的细胞数接种到窄玻片上,各接种16瓶,每天取2瓶做H.E染色,每张片数1000个细胞的核分裂相,求平均值。

3. 集落生成率 用45代生长2天的细胞,稀释成每瓶200个细胞,接种10瓶,置37℃培养20天,见集落长出后在瓶中原位固定,Giemsa染色,数每

瓶集落数。另用5代细胞稀释到每ml 100个细胞,通过4号半针头滴到45孔塑料板中,每孔1滴。在倒置显微镜下检查确认是一个细胞的孔后即加培养液置5%CO₂温箱中培养20天,在倒置镜下检查克隆集落数。

结果与讨论

活检组织中见皮肤组织表皮下浸润的瘤细胞形态多样,核大深染,常集聚成群(图版图1)。培养细胞在形态、大小上差异明显,有小圆细胞,梭形细胞,巨细胞(图版图2)。用培养细胞接种裸鼠20只,全部成瘤(图版图4)。光镜下所见分裂象较活检组织多,其中4只在腋下淋巴结和两只肺有转移。倒置显微镜下观察生长1—2天的细胞以圆形为主,3天后的部分细胞由圆变梭形,胞体变大,突起增多。伴随形态变化,黑色素及Dopa氧化酶染色也有不同。在窄玻片生长1天的细胞呈阴性或弱阳性。而生长3天以后的培养细胞及活检组织则呈阳性反应。这可能是随着培养时间的延长,细胞逐渐成熟与酪氨酸酶的活性和黑色素的含量逐渐增加有关^[4]。我们认为HMM-239细胞在裸鼠的移植瘤组织和培养1天的活细胞以圆形为主,较幼稚,所以Dopa氧化酶呈阴性或弱阳性,而培养3天以后的活细胞因细胞逐渐成熟,故呈阳性反应。

用单抗S-100蛋白对活检和裸鼠移植瘤组织及1—5天的培养细胞,免疫组化染色均呈强阳性,这与组织化学染色有所不同,因为S-100蛋白是一种与神经元相关的抗体,而黑色素细胞在胚胎发育过程中起源于神经嵄的神经上皮,而活检和裸鼠移植瘤组织及1—5天的培养细胞对单抗S-100蛋白染色均为阳性,也证明该细胞系来源于神经嵄上皮组织。有人报道^[5],S-100蛋白无论对有色素和无色素黑色素瘤均呈阳性反应,故有诊断价值。我们的观察也获得同样的结果。

在透射电镜下,活检组织和5代前的培养细胞,黑色素小体易见(图版图3)。当培养到20代后的细胞和裸鼠的移植瘤组织,未见到

黑色素小体,见线粒体和溶酶体丰富,高尔基氏器较发达。这可能与培养代数的增多细胞分化低有关。

扫描电镜下见细胞表面微绒毛丰富,有突起和丝状突起。15代细胞在扫描电镜下及45代细胞用Hoechst 33258 DNA荧光染色,均未见有支原体污染。

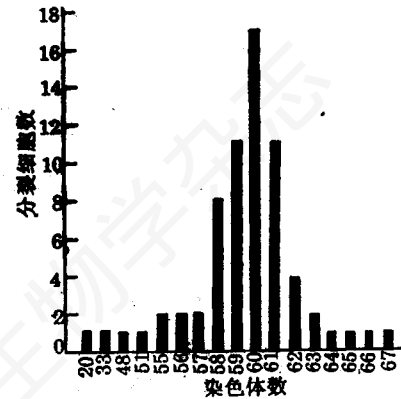


图1 HMM-239染色体众数分析

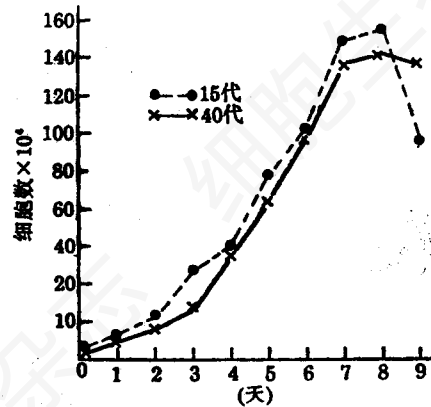


图2 HMM-239生长曲线

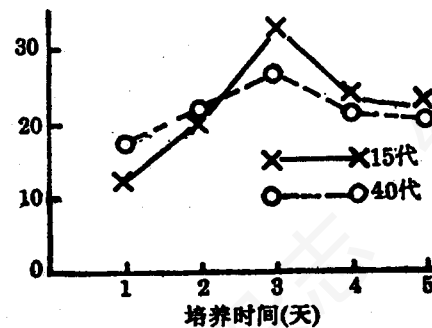


图3 HMM-239分裂指数

染色体分析为多倍体, 众数在59—61之间, 其中一个细胞中有60条染色体出现的频率最高, 占17%(图1)。染色体组型: 80%的分裂细胞中有A1号大染色体, F组和G组数目增多, 还有异位、双着丝点及短臂缺失现象(图5)。

培养细胞的增殖速度: 在第8天生长达高峰, 为接种数的52.5倍(图2)。根据倍增时间 = $0.301 T + (\log N_2 - \log N_1)$ 的公式推算^[6], 第15代细胞的倍增时间是28.1小时, 40代是33.7小时。两代细胞平均倍增时间为30.9小时。15代细胞和40代细胞的分裂指数分别为20%和27.5%。(图3)。集落形成率: 45代细胞为25%, 5代细胞的克隆生长数为21%。

上述观察和检测结果, 证明HMM-239细胞系具有恶性黑色素瘤的病理特征和生物学特性。该细胞系的建立, 为研究黑色素瘤的生物学特性, 化疗药物的筛选、肿瘤的转移途径, 以及研制黑色素瘤单抗等提供一个很有价值的实验模型, 同时也填补了国内建立人黑色素瘤细胞系的空白。

摘 要

本文报告了建立人黑色素细胞系的经过及生物学特性的研究。该系在形态上呈多形性, 核大蓝染, 分裂象甚多。组织化学和免疫组化染色(黑色素和S-100蛋白)均为阳性。活检组

织和初代培养细胞电镜下易找到黑色素小体。染色体为多倍体, 倍增时间平均30.9小时。裸鼠接种100%成瘤, 部分有肺及淋巴结转移。该细胞系的建立对研究人黑色素瘤的生物学特性和抗肿瘤药物的筛选、细胞分化等提供了一个很有价值的实验模型, 并填补了国内空白。

图 版 说 明

1. 活检肿瘤组织的光镜形态(HE×100)。
2. 10代第2天的培养细胞(HE×250)。
3. 活检组织中的黑色素小体(↑所示, TEM×13000)。
4. 大体解剖见裸鼠肿瘤及腋下淋巴结肿大(↑所示)。
5. A1号大染色体为该细胞系的标记染色体。

参 考 文 献

- [1] Ed Bagnara, J. T., 1988, *Advances in Pigment Cell Research*. p 369 Alan R Liss, Inc, New York.
- [2] 凌启波, 《实用病理特殊染色和组织化学染色技术》, 1988, p 238—239 和 297—298, 广东高等教育出版社, 广州。
- [3] 张鸿卿等主编, 《细胞生物学实验方法与技术》, 1992, p 64, p 98. 北京师范大学出版社, 北京。
- [4] Houghton, AN. et al., 1982, *J Exp Med.*, 156: 1755—1766.
- [5] 徐元鼎等, 1987, 中国第二届免疫缺陷动物实验研究技术交流会资料汇编. 5: p 37.
- [6] Jakoby, W. B. ed al., 1979, *Methods in Enzymology*, III: 141, Cell Culture Academic Press Inc, London.

(上接126页)

7. 高等哺乳动物和大肠杆菌的基因中使用相同的终止密码子_____和_____。人类线粒体基因使用的终止密码子为_____, _____, _____和_____。

8. Burkitt淋巴瘤产生的一种原因是因为染色体异位后, c-myc基因受_____后, 大量表达引起。

9. 超螺旋是有_____性的; 有_____超螺旋和_____超螺旋两种。

10. RNA聚合酶III是由_____种, _____个亚基构成的, 分子量为_____kDa的非对称复集体, 其中→5'外切酶活性是_____亚基的功能, 由_____基因编码。

11. 调控蛋白包括_____因子和_____因子, 通常对特异的DNA序列具有结合能力。调控蛋白质的结构可分为_____, _____和_____三类。

12. 在基因表达正控制系统中, 加入调节蛋白后, 基因表达活性被_____, 这种调节蛋白被称为_____。在负控制系统中加入调节蛋白质后, 基因表达活性被_____, 此调节蛋白称为_____。

13. 交互重组指DNA同源重组后, 一条_____双螺旋分子和另一条_____分子共价相连, 中间有一段_____。

(未完下期续)