

在经 LPS 诱导的单核细胞中 hG-CSFmRNA 的含量并不很多,检测它比较困难。但将 hG-CSFmRNA 经 RT-PCR 方法转变为 hG-CSFcDNA 并扩增后,它的量增加了百万倍,因此可用普通电泳法检测,无需用同位素标记的探针进行杂交。我们用该方法对 LPS 诱导 4 小时和 12 小时的单核细胞内 hG-CSFmRNA 进行逆转录并扩增,均可得到特异性扩增条带,即 hG-CSFcDNA。用光敏生物素标记的特异性探针与这扩增条带杂交呈阳性反应。说明 LPS 体外诱导人单核细胞的确可产生 hG-CSFmRNA,但 hG-CSFmRNA 产生的量与诱导时间有关。

摘 要

用聚蔗糖-泛影葡胺分离液从正常人新鲜抗凝的外周血中分离出单核细胞。在组织培养条件下以大肠杆菌脂多糖(LPS)诱导单核细胞,使其产生人粒细胞集落刺激因子(hG-CSF)mRNA 和 hG-CSF。不同时间取出经诱导的细胞和培养上清液,分别用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法和双单克隆抗体 ELISA 夹心法检测细胞的转录产物和表达产物。结果表明:加入 LPS 后的第 4 到第 12 小时单核细胞内有显著量 hG-CSFmRNA,24 小时后测不出

该 mRNA。培养液中从第 12 小时开始出现 hG-CSF,第 24 小时达到高峰,并持续到 48 小时仍有明显活性。这说明 LPS 可在体外诱导人单核细胞产生 hG-CSF 及其 mRNA。

参 考 文 献

- [1] Metcalf, D. 1986, *Blood*, 67: 257.
- [2] Metcalf, D., 1985, *Science*, 229: 16.
- [3] Welte, K. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 1526.
- [4] Okabe, T. et al., 1982, *J. Cell. Physiol.*, 110: 43.
- [5] Nagata, S. et al., 1986, *EMBO. J.*, 5: 575.
- [6] Souza, L M. et al., 1986, *Science*, 232: 61.
- [7] Ishizaka, Y. et al., 1986, *Exp. Hematol.*, 14: 1.
- [8] Lionel, P. et al., 1983, *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 72: 336.
- [9] Chomczynski, P. et al., 1987, *Anal. Biochem.*, 162: 156.
- [10] 朱圣庚, 1992, PCR 基因扩增实验操作手册(朱平主编), p 41, 中国科学技术出版社, 北京.
- [11] 李太生等, 1992, 中华医学杂志, 72: 224.
- [12] Vellenga, E. et al., 1988, *Blood*, 71: 1529.
- [13] Seelentay, W. et al., 1989, *Eur. J. Immunol.* 19: 209.

MNNG 诱导转化的人胎儿皮肤成纤维细胞系的建立

张文庚 徐刚 王艳萍 陈晓未

(华西医科大学肿瘤研究所 成都 610041)

人体细胞体外转化在检测可疑致癌物、研究人类肿瘤的发生与发展机制等方面具有重要意义。然而,由于人体细胞能快速而有效地修复 DNA 损伤,因此其转化较啮齿动物细胞困难^[1,2]。苏兆众等^[3]用紫外线和乙基亚硝基脲先后处理离体培养的正常人胎儿胃成纤维细胞(Fibroblasts, FB),建立了能长久传代的 GST 8502 细胞系。但单独用化学致癌剂处理正常

人 FB, 成功诱导转化并建立细胞系,国内尚未见报道,国外仅见 Namba^[4]和其同事 Bai^[5]的报道。本实验用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基脲(MNNG)成功地诱导了人胎儿皮肤 FB 的转化,并建立了可长期传代的细胞系——HFT 89。

材 料 和 方 法

一、细胞培养

取健康产妇产前引产4月龄胎儿皮肤, 无菌条件下用Hank's液洗净, 剪成约 1 mm^3 小块, 贴于25 ml培养瓶底, 置 37°C 培养箱2小时后加入DMEM/F12(Sigma)完全培养液(含15%小牛血清, 100 u/ml和100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的青、链霉素)。待细胞长满瓶底, 用等量的0.25%胰蛋白酶(Difco)和0.02%EDTA(分析纯, 成都化学试剂厂)液消化传代。

二、致癌剂处理

取第3代细胞计数后, 每瓶接种 2×10^5 细胞, 共3瓶, 加入无精氨酸、谷氨酰胺的MEM(日本制药株式会社)培养液培养24小时, 使细胞生长阻断在G1期。然后换入新鲜的DMEM/F12完全培养液, 使细胞同步进入S期^[2]。8小时后加入MNNG(Fluka, 纯度97%以上), 以后重复处理时未再作同步化。前2次剂量为 $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$, 后2次 $6\ \mu\text{g}/\text{ml}$, 每次处理3天, 间隔4—6天。处理过程中和结束后的第1次以1:3传代, 以后待细胞近长满时, 均以1:10传代。对照细胞除不加致癌剂外, 余作相同处理。

三、生物学特性检测

1. 生长曲线 每瓶接种 1×10^5 细胞, 次日, 隔天取2瓶细胞计数, 以其均值绘制生长曲线。

2. 平板克隆试验 每组6个60 mm平皿, 每平皿接种 1×10^3 细胞, 14天后镜下通过测微尺计数直径 $100\ \mu\text{m}$ 以上的克隆数, 以其均值除以每平皿接种细胞数计算克隆形成率。

3. 双层半固体琼脂试验 每组4个平皿。Bacto琼脂, 底层为0.6%, 表层为0.3%, 每平皿为 5×10^4 细胞。 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养3周, 计数直径 $100\ \mu\text{m}$ 以上的克隆数和计算克隆形成率, 方法同2。

4. 细胞骨架 参照Pena的方法^[6]。接种细胞于小玻片上, 24小时后以Triton X-100处理, 0.1%考马斯亮蓝R 250染色1小时。

5. 染色体检查 细胞传代后48小时, 加入 $0.4\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 秋水仙胺作用4小时后低渗处理, 常规制备染色体标本。

6. 异种移植 接种 1×10^7 细胞于BALB/C-nu/nu无胸腺裸小鼠左腋下, 7天后取出肿块作病理切片。

7. 透射电镜观察 取传代后48小时细胞, 消化、低速离心成团, 常规固定、脱水、包埋、切片、染色后, 日立H-600电镜观察。

结 果

实验结果表明, 对照组人胎儿成纤维细胞(FB)呈梭形、核较小、排列规则、单层生长(图版图1), 传至16代左右衰老死亡。MNNG处理细胞经反复传代后呈恶性表型, 现已传代125次仍活跃生长, 表明已建成连续细胞系^[7]。该细胞系(HFT 89)具有以下特征(见表): 冻存后复苏率高(90%以上); 细胞呈梭形、核大而深染、排列紊乱, 密集时可重叠生长(图版图2)。生长曲线(见图)显示, HFT 89与对照细胞在第1—5天生长速度差异不大, 7天后后者达到饱和, 而HFT 89细胞继续增殖。第11天后其生长速度明显高于对照细胞, 表明HFT 89细胞已失去生长的接触抑制; HFT 89细胞在培养瓶内(图版图3)和软琼脂内(图版图4)能形成直径 $100\ \mu\text{m}$ 以上的克隆, 其克隆形成率分别为7.8%和0.1225%, 而对照细胞则不能。染色体分析显示, 对照细胞染色体数目变化在35到86条之间, $2n=46$ 的占86%, 而HFT 89细胞的非整倍体性明显, 染色体数目分布范围从27条到125条, $2n=46$ 的仅占12%, 主流数为47到60条, 占40%。HFT 89细胞接种裸小鼠7天后形成大小约 $8 \times 6\ \text{mm}$ 肿块, 与周围组织无粘连, 病理诊断为纤维肉瘤(图版图5), 同期对照细胞注射局部仅有一薄片状结节, 活检为坏死物。对照细胞内微丝束十分明显, 分散平行或规则交叉排列, 贯穿整

表 HFT 89细胞与对照细胞生物学特性比较

细胞	可长期传代性	饱和密度 ($\times 10^6/\text{瓶}$)	平板克隆形成率 (%)	软琼脂内克隆形成率 (%)	染色体异倍体率 (%)	成瘤性
对照	-	2.45	0	0	14	-
HFT 89	+	4.19	7.8	0.1225	88	+

个细胞,直达细胞膜(图版图6),而HFT 89细胞内微丝束明显减少,呈网状或稀疏散在(图版图7)。透射电镜显示,HFT 89细胞核形态多样、核质比大、核膜凹陷明显,呈恶性细胞特征(图版图8)。

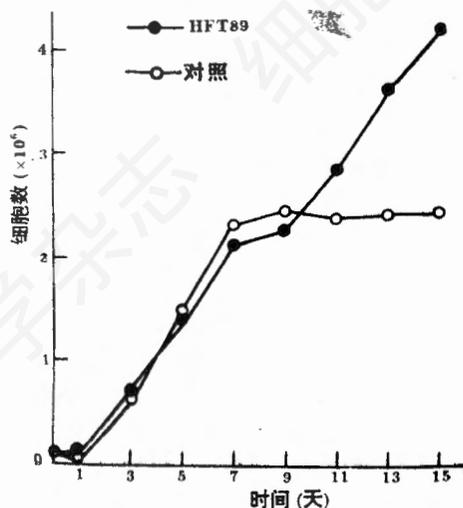


图 HFT 89 和对照细胞的生长曲线

讨 论

上述实验说明本文应用体外转化技术成功地诱导了人胎儿皮肤FB的肿瘤性转化。在成功地转化正常人FB的少数报道中,所用方法主要可分为两类:一是使细胞同步化后在S期加入致癌剂^[2];二是用致癌剂多次处理^[6]或多种致癌剂处理^[3],以造成尽量多的细胞DNA损伤,并使其不能有效修复或易发生错误修复。本实验综合应用同步化和多次处理的方法,成功地转化了人胎儿皮肤FB,为人体细胞转化提供了又一可行的方法。

培养的正常人体细胞其核型是基本稳定的,染色体的结构畸变和异倍体率增高与细胞恶性程度有基本平行的关系^[1];人体细胞在转化的较早阶段即可获得在软琼脂内形成克隆的能力,它与成瘤性无明显相关性^[8];细胞内微丝束的减少或紊乱与细胞转化的形态学改变和软琼脂内形成克隆能力密切相关;可长期传代

性是人体细胞恶性转化的先决条件,如近期两例成功诱导正常人FB恶性转化的报道,均是在先用致癌剂处理(⁶⁰Co或v-myc)使细胞具有可长期传代性的基础上而获得成功的^[9,10]。本实验的HFT 89细胞具有以上各种特性,表明其确属转化细胞,而在裸小鼠体内可形成肿瘤,则进一步表明其已发生了肿瘤性转化。

总之,本实验为诱导正常人FB的转化提供了新方法;HFT 89肿瘤性转化细胞系的建立,为研究其它致癌物或癌基因的进一步致转化或协同作用提供了有用的实验材料。

摘 要

用甲基硝基亚硝基胍处理正常人胎儿皮肤成纤维细胞4次(剂量前2次为4 μ g/ml,后2次6 μ g/ml,每次处理3天,间隔4—6天),建立了可长期传代的HFT 89细胞系。该细胞具有以下转化细胞特性:细胞呈梭形、排列紊乱、密集时可重叠生长,核畸形明显、核质比大;饱和密度增高;在软琼脂内形成克隆;微丝束减少、紊乱;染色体异倍化;裸小鼠接种形成肿瘤。

化学致癌剂诱导正常人成纤维细胞的转化比较困难,综合应用同步化、多次处理等方法可能是提高转化率的有效手段。

参 考 文 献

- [1] Namba, M. et al., 1988, *Mutat. Res.*, 199: 415—425.
- [2] Milo, G. E. and R. W. Trewyn, 1982, In *Banbury Report, Nitrosamines and Human Cancer 12*, ed. by Magee, P. et al., pp. 3—13. Cold Spring Harbor, New York.
- [3] 苏兆众等, 1987, *中国科学B辑*, (3): 733—740.
- [4] Namba, M. et al., 1988, *Anticancer Res.*, 8: 947—958.
- [5] Bai, L. et al., 1993, *Int. J. Cancer*, 53: 451—456.
- [6] Pena, S. D. J., 1980, *Cell Biol. Inter. Rep.*, 4: 149—153.

- [7] Schaeffer, W. I., 1990, *In Vitro*, 26: 97-101.
- [8] Stanbridge, E. J., 1989, *In Cell Transformation and Radiation-induced Cancer*, ed. by Chadwick, K. H. et al., pp. 1-

- 9, IOP Publishing Ltd, Adam Hilger.
- [9] Mihara, K. et al., 1992, *Int. J. Cancer*, 50: 639-643.
- [10] Yang, D. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 2237-2241.

人成纤维细胞系 HF-91 的建立及生物学特性

郑景熙 冯桂湘 王素华 郭琳琅 李长菊

(第一军医大学珠江医院 广州 510282)

目前已有多种动物和人成纤维细胞的建系报道^[1], 这些细胞系的生长均无需在培养液中添加成纤维细胞生长因子(FGF₁)。但迄今未见有关生长因子依赖型成纤维细胞的报道。因此 FGF 依赖型人成纤维细胞 HF-91 的建系及生物学特性的研究无疑将有助于提高相关生长因子活性检测的特异性及有可能作为人工真皮细胞理想的成分。

材料与方 法

一、材料来源

1. 在本院妇产科就诊的健康孕妇, 经水囊引产5个月胎儿胰腺组织。
2. bFGF (碱性成纤维细胞生长因子)系基因重组产品, 由暨南大学生物工程系提供。
3. RPMI 1640 培养基系 GibCO 产品。新生牛血清系广州奶牛场产品, 经去除支原体处理。

二、成纤维细胞培养

弃去胰腺组织包膜及血管, 用 Hank's 液洗涤3次, 剪成 1 mm³ 小块, 置于培养瓶中, 培养液由 RPMI 1640、20% 新生牛血清、谷氨酰胺 2 mmol, 青链霉素各 100 单位/ml, bFGF 50 ng/ml 等组成。每瓶加培养液 10 ml, 在 37℃ 和 5% CO₂ 培养箱内培养 7 天可见少许贴壁的梭形细胞团。弃去胰腺组织及培养液, 用 Hank's 液洗涤 3 次, 再加入新鲜培养液继续培养。然后每 3 天传代 1 次, 传代时用 0.25% 胰酶消化。

三、细胞生长曲线及密度依赖性抑制试验

取第 30 代培养的细胞, 经 0.25% 胰酶消化后制

成悬液, 置培养瓶中, 加入不同浓度的 bFGF 继续培养。每天检测每一实验组中 9 瓶培养细胞数目, 取平均值绘制生长曲线, 求出细胞倍增时间。

四、细胞分裂指数的测定

采用培养瓶加盖片培养的方法。每天从瓶中取出盖片进行细胞固定、染色, 计数 1000 个细胞中细胞分裂相数。

五、细胞形态学及超微结构观察

取原代及传代(第 3、10、20、30 代)培养的细胞, 进行一般形态学及超微结构观察。

六、乳酸脱氢酶同工酶谱的分析

取原代和第 10、20、30、40 代培养的细胞, 采用聚丙烯酰胺电泳法, 经硝基四氮唑染色, 然后用紫外线扫描记录酶谱。

七、第Ⅶ因子相关抗原试验

原代及传代培养细胞加入 0.3 ml Ⅶ 因子兔抗血清, 37℃ 温育 30 min, 洗涤, 加 0.2 ml 羊抗兔 IgG 荧光抗体, 温育 30 min, 洗涤, 用 PBS 封固后置荧光显微镜下鉴别成纤维细胞和内皮细胞。

八、培养细胞遗传学检查

取原代及第 30 代培养的细胞进行细胞遗传学观察, 染色体标本制备按常规方法进行。

九、培养细胞生瘤性试验

C₅₇BL/J 小鼠接受 ⁶⁰Co-γ 线 5.0 Gy 照射一周后, 皮下注射第 30 代细胞 5 × 10⁶/只, 观察生瘤情况, 期限 3 个月。以上检测方法详见参考文献^[2,3]。

结 果

一、细胞形态学及超微结构

人成纤维细胞(HF-91)贴壁生长呈梭形。