

- [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)。但迄今未见到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

采用培养瓶上加盖片培养的方法。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 mlⅦ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。

开始培养时细胞聚集成团,然后逐渐展开连接成片,呈辐射状排列。电镜下观察,胞核呈卵圆形,核仁1个,近似圆形,核膜清晰。游离核糖体多,呈散在分布。粗面内质网数量大,分布均匀或扩张成池。滑面内质网较难见到,线粒体数量不多,分布不均,体积较小。原代及传代细胞形态学及超微结构无明显差别。

二、细胞对 bFGF 的依赖性生长

取第30代细胞进行细胞生长——bFGF浓度效应曲线的绘制。结果提示,细胞生长与bFGF浓度密切相关。当bFGF浓度为零时,培养的第1天细胞生长停滞,失去贴壁能力,第2天以后细胞逐渐萎缩、解体。当bFGF浓度处在10 ng—100 ng/ml区段时细胞生长与bFGF浓度呈正相关(相关系数 $r=0.758$, $t_r=3.352$, $p<0.01$)。若浓度到达500 ng/ml时,细胞生长出现下降趋势(图1)。

取第30代细胞,加入bFGF 50 ng/ml,观察细胞生长。结果提示,HF-91细胞表现有限细胞系生长过程。生长曲线具有潜伏期,指数增生期和平顶期的时相性特征。细胞群体倍增时间为 23.8 ± 5.3 h,约84 h增殖达到高峰。培养48 h—72 h细胞有丝分裂指数高达 $49.3\%\pm 4.1\%$ (图2)。细胞接种密度在 $4\times 10^3/\text{cm}^2$ 以下生长欠佳, $16\times 10^3/\text{cm}^2$ — $24\times 10^3/\text{cm}^2$ 生长良好,超过 $40\times 10^3/\text{cm}^2$ 出现密度依赖抑制现象(见表1)。

表1 人成纤维细胞 HF-91 接种密度与增殖的关系

细胞接种数目 $\times 10^3/\text{cm}^2$	接种3天后培养细胞的数目 $\times 10^3/\text{cm}^2(\bar{X}\pm\text{SD})$
4	12.3 ± 0.9
8	41.1 ± 5.3
16	320.0 ± 41.5
24	432.0 ± 50.3
32	330.5 ± 46.5
40	120.9 ± 10.9

三、乳酸脱氢酶同工酶

每一种细胞都具有某种特征性的同工酶谱,借以表达自己的生化标志。表2提示,

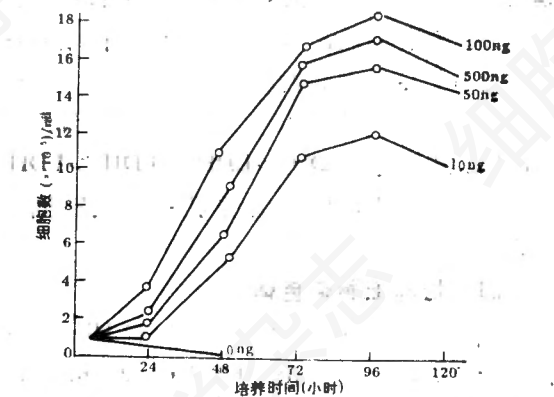


图1 F-91成纤维细胞生长与bFGF浓度的关系

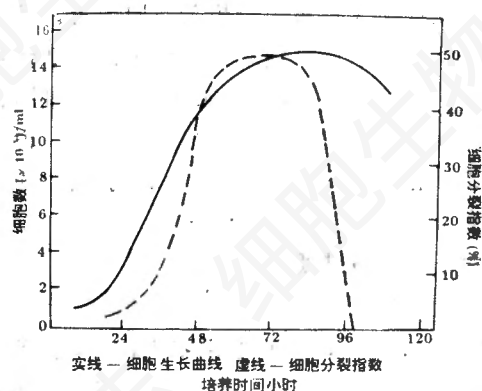


图2 F-91成纤维细胞生长曲线及细胞分裂指数

表2 人成纤维细胞系 HF-91 乳酸脱氢酶同工酶(%)

细胞	同工酶				
代龄	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
原代	0	5.2	21.2	39.2	34.4
10	0	5.0	18.4	39.7	36.9
20	0	4.1	18.2	41.2	36.5
30	0	5.4	19.0	35.0	40.6
40	0	3.7	16.7	36.5	43.1

HF-91细胞系从原代至第20代培养的细胞酶谱为 $\text{LDH}_4>\text{LDH}_5>\text{LDH}_3>\text{LDH}_2>\text{LDH}_1$ 。从第30代开始细胞酶谱转变为 $\text{LDH}_5>\text{LDH}_4>\text{LDH}_3>\text{LDH}_2>\text{LDH}_1$ 。此种随着培养时间的

延长出现同工酶谱的改变可能与培养过程中细胞成分的变化有关,即在第20代以前培养细胞中含有一定比例的内皮细胞,干扰了同工酶的测定结果。而从第30代以后属于成纤维细胞,因此 $LDH_5 > LDH_4 > LDH_3 > LDH_2 > LDH_1$ 才是真正代表 HF-91 细胞系乳酸脱氢酶同工酶谱。

四、培养细胞染色体

分别计数100个原代及第30代 HF-91 细胞系染色体,分别为38—62条和42—62条,众数 $2n=46$,占检测细胞的91.0%及87.5%,多倍体占7.0%及6.8%。分带技术未显示染色体异常。

五、第Ⅷ因子相关抗原试验

内皮细胞含有Ⅷ因子相关抗原,常以此试验与成纤维细胞相鉴别。实验结果,第2代培养细胞中阳性细胞占5%,第10代阳性细胞占0.1%,传至第20代阳性细胞完全消失。说明从第20代开始培养的细胞绝大部分属于成纤维细胞。

六、生瘤性试验

C₅₇BL/J 小鼠皮下接种第30代成纤维细胞 HF-91 细胞系,在观察期限内,未见皮下结节生长及腹水的产生。经甲基坦蒽处理的 HF-91 细胞可在小鼠皮下形成瘤结节,阳性率为63.5%。

讨 论

本研究从人胎胰结缔组织中分离、培养并建立了人成纤维细胞系 HF-91。通过形态学观察及生物学特性的检测,证明了该类细胞具有成纤维细胞生物学特征,经传40代未发现恶性转化的证据。细胞基本符合1982年中国细胞生物学会提出的正常细胞系(株)的条件^[4]。

据有关资料报道,目前已拥有的动物和人成纤维细胞系,其生长和增殖均属 FGFs 不依赖性^[1]。因此,选用它们作为相关细胞生长因子活性检测的靶细胞,存在着特异性差、敏感

性低和干扰因素多等缺点。而本文报告的人成纤维细胞系 HF-91 的生长,对于 bFGF 的存在具有高度依赖性。实验结果表明,缺乏 bFGF 人成纤维细胞 HF-91 不能存活。当 bFGF 浓度为10 ng/ml 时,细胞生长良好,随着 bFGF 浓度的增高细胞增殖率迅速提高。在10 ng—100 ng/ml 范围内细胞生长与 bFGF 浓度成正相关。因此将人成纤维细胞系 HF-91 作为检测成纤维细胞生长因子活性的靶细胞,可能将有助于提高检测的特异性及敏感性。

有关研究表明,成纤维细胞已成为“人工复合皮”的主要细胞成分之一^[5]。由此引出一个引人注目的问题:目前已拥有的成纤维细胞系(株)均属于 bFGF 非依赖型,如果将它们作为复合皮的细胞成分,由于细胞增殖难以控制,有可能因细胞增殖过度而造成组织增生异常。而本文报告的人成纤维细胞 HF-91 属于 bFGF 依赖型,因此可以通过 bFGF 浓度的调节来控制细胞增殖率,避免组织增生过度。因此有理由认为人成纤维细胞 HF-91 可能成为制备“人工真皮”比较理想的生物材料。

摘 要

人胚胎胰腺结缔组织经分离培养成人成纤维细胞系 HF-91,传40代。该细胞贴壁生长,具有密度依赖性抑制性质。它的生长依赖于成纤维细胞生长因子的存在,在10 ng—100 ng/ml 浓度范围内,细胞生长与 bFGF 的浓度成正相关。细胞群体倍增时间 23.8 ± 5.3 h。有丝分裂指数 $49.3\% \pm 4.1\%$ 。染色体众数 $2n=46$,占87.5%—91.0%,乳酸脱氢酶同工酶 $LDH_5 > LDH_4 > LDH_3 > LDH_2 > LDH_1$ 。动物接种无生瘤性。文中对实验结果应用于检测成纤维细胞生物活性及作为人工真皮细胞成分的前景作了讨论。

参 考 文 献

- [1] 北京生物制品研究所,1976,医学生物资料选编,1—2:16。
- [2] 鄂 征,1988,组织培养技术,第二版,人

- 民卫生出版社, pp 149.
- [3] 何申等译, 1985, 培养中的肿瘤与正常细胞, 第一版, 人民卫生出版社, pp 164.
- [4] 刘鼎新, 1990, 细胞生物学研究方法与技
- 术, 第一版, 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, pp 156.
- [5] Brunt, J. V., 1991, *Biotechnology*, 9(2): 136.

中华大蟾蜍人工诱发冬眠后组织内 LDH 同工酶的变化

郝泗城 彭永康

(天津师范大学生物系 300074)

蟾蜍冬眠期与活动期组织内 LDH 同工酶的较研究已有过报道^[1],但仅限于血清方面,并且所检测材料系自然条件下的冬眠蟾蜍,对于人工诱发冬眠蟾蜍多种组织内 LDH 同工酶的变化迄今未见正式报道。本文以人工诱发的冬眠蟾蜍(4±1℃)为材料,对7种主要组织内 LDH 同工酶变化作了比较研究,试图为动物冬眠机理的探讨提供一些基础资料。

材料与方 法

一、材料及处理

实验材料为中华大蟾蜍(6月份从天津市郊采集),用自来水洗净后置室内养殖1周,然后将蟾蜍置低温(4±1℃)下人工诱发冬眠。取诱眠6周后的蟾蜍和室温下养殖的非冬眠蟾蜍为材料,分析 LDH 同工酶。

二、同工酶样品制备

取上述两种蟾蜍的心肌、脾脏、骨骼肌、肺、肝、胃、脂肪等组织各0.1g,加1ml预冷至4℃的0.1mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0),在冰浴中经匀浆后在冷冻离心机上15000×g离心10分钟,上清液作电泳分析样品。

三、电泳条件及染色

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[6],电泳点样量为100微升,电压控制在120V,电泳在冰箱内进行,时间约3.5小时。LDH 同工酶的染色参考金昊等^[2]介绍的方法,用CS-930岛津薄层扫描仪扫描记录实验结果。

结 果 与 讨 论

一、活动期蟾蜍 LDH 同工酶谱型特征

已知 LDH 是一种催化乳酸和丙酮酸相互

转化伴同发生 NAD 的氧化和还原的酶,这种酶由 A、B 两种亚基构成,为5种不同分子形式的四聚体(LDH₁=B₄, LDH₂=AB₃, LDH₃=A₂B₂, LDH₄=A₃B, LDH₅=A₄),由 Ldh-A, Ldh-B 两个基因编码。在活动期蟾蜍7种组织的提取物中,至少可以分离出3-5种具有不同活力的 LDH 同工酶谱带(表1)。在这检测的7种组织中, Ldh-A, Ldh-B 基因的表达有一定的组织特异性,从总的酶谱特征看,明显可以分为2种主要类型,即心肌型和骨骼肌型。如心肌中共检测出4种 LDH 同工酶(LDH₁—LDH₄),呈现出以 Ldh-B 基因表达的产物为主,其 A、B 亚基的比率是6:10。与这种谱型相似的组织还有脾脏。主行糖酵解反应活跃的骨骼肌中,可以明显看出是以 Ldh-A 基因表达的同工酶为主的,在这个组织中共检测到3种 LDH 同工酶(LDH₂, LDH₄, LDH₅)其 A、B 亚基的比率为8:4。与这种组织相似的有肝脏、胃和脂肪。上述3种组织均由4条 LDH 同工酶(LDH₂—LDH₅),其 A、B 亚基比率为10:6。肺中由3条谱带(LDH₂、LDH₄、LDH₅)组成, A、B 亚基比率为8:4。Ldh-A, B 基因在不同组织中表达能力上的差异可能与各类组织的生理机能和代谢类型有关。如在心肌中呈现出的以 Ldh-B 基因表达为主可认为心肌中存在充足的氧气,因为已经发现供氧充足的组织中 Ldh-B 基因的表达占优势,而在缺氧的组织中则 Ldh-A 基因的表达占优势^[3]。骨骼