

胞内 Ca^{2+} 升高而收缩系膜细胞, 各种 IP 的循环也促进合成 DAG, 从而活化 PKC, 使 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交换激活, 细胞内 pH 升高, PKC 的活化也促进其他 DNA 合成的调节基因/调节蛋白的活化, 从而促进系膜细胞的 DNA 合成及增殖。

摘 要

本实验应用 [^3H]TdR 掺入法测定 LTD_4 对大鼠系膜细胞的促增殖作用, 测定系膜细胞合成的 DAG 及 IP_1 、 IP_2 、 IP_3 量, 用 PKC 抑制剂 Calphostin C 预处理系膜细胞, 观察其对 LTD_4 促增殖作用的影响。结果表明, LTD_4 促进系膜细胞的增殖及 DAG 合成、IP 合成。以 $0.01 \mu\text{mol/L}$ 的 LTD_4 作用最强。Calphostin C 可抑制 LTD_4 的促增殖作用, 证实 LTD_4

使 PLC 活化, 促进 IP 及 DAG 的生成, 从而活化 PKC, 促进系膜细胞的 DNA 合成及增殖。

参 考 文 献

- [1] Badr. K. F., 1992, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 3: 907—915.
- [2] Badr, K. F. et al., 1989, *Am. J. Physiol.*, 257: F 280—F 287.
- [3] Bruns, R. F. et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176: 288—293.
- [4] Bligh, E. G. et al., 1959, *Can. J. Biochem.*, 37: 911—917.
- [5] Wright, T. M. et al., 1988, *J. Biol. Chem.*, 263: 9374—9380.
- [6] Simonson, M. S. et al., 1986, *Kidney Int.*, 30: 524—531.
- [7] Simonson, M. S. et al., 1988, *Am. J. Physiol.*, 255: C 771—C 780.

HeLa 细胞和 BHK 细胞实验交叉污染消涨规律的探讨

张荣兴 林晓旭 朱德厚

(中国科学院细胞库 上海 200031)

细胞系(株)间的交叉污染, 严重地威胁着细胞系(株)的质量控制。特别是 HeLa 细胞的污染是世界性的棘手问题。美国模式培养物保存中心(ATCC)用 A 型 G 6 PD 同功酶法, 染色体 G 带分析和 Y 染色体的奎纳克林荧光技术证明, 许多人细胞系已被 HeLa 细胞污染。如口腔表皮样癌细胞(KB)、人胚肺细胞(L-132)、张氏肝细胞系(Chang Liver)、人胚小肠细胞系(Intestin 407)和 3 个人羊膜细胞系(W:sh FL和AV₃)等 15 个细胞系均带有两个或更多的 HeLa 细胞标志染色体、A 型 G 6 PD 同功酶和无 Y 染色体。强烈证明这些细胞已被 HeLa 细胞所污染^[1-3]。Nelson-Rees 等也用类似的方法证明: 胚肾细胞系(HEK)、乳房癌细胞系(HBT-3)和转化的前列腺瘤(MA 160)等细胞

系事实上是宫颈癌来源的 HeLa 细胞^[4]。众所周知, 被广泛应用的 HeLa 细胞具有很高的生长速率, 这或许是它们淘汰被污染细胞的主要原因。但是, 是否还有其他因素促进此现象的发生? 为此, 我们通过抗中间丝蛋白荧光染色和观察条件培养液下的生长状况, 对 HeLa 细胞和 BHK-21 细胞的实验交叉污染规律进行了初步探讨。

材 料 和 方 法

一、细胞

HeLa 细胞和 BHK-21 细胞来自本细胞库。培养液为含 20% 小牛血清的 RPIM-1640。

二、抗中间丝蛋白免疫荧光染色方法见张荣兴等^[5]

兔抗角蛋白抗体的制备法见张荣兴等^[5]。兔抗结

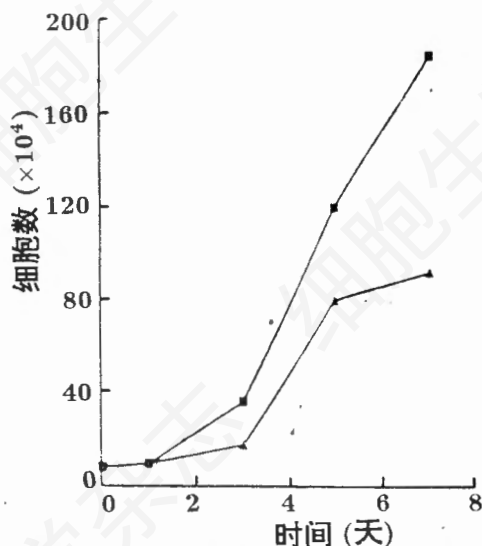


图1 HeLa细胞与BHK-21细胞的生长曲线。

■ HeLa细胞
▲ BHK-21细胞

蛋白抗体购自Sigma公司。FITC-羊抗兔第二抗体由本库制备。每次荧光染色后在荧光镜下计数30个视野以上,细胞数在1000个左右。

三、生长曲线测定

初始细胞数为 7.5×10^4 /瓶。接种后在1、3、5和7天分别计数细胞,期间每隔2天换一次新鲜培养液。

四、条件培养

初始细胞数为 5×10^5 /瓶,培养3天后基本长成单层,吸取培养液,1500 rpm离心10分钟,其上清液即为条件培养液。在测定条件培养液下的生长曲线时,我们在上述条件培养液中加入等量新鲜培养液。

五、条件培养液的蛋白含量测定

双缩脲法。作标准曲线的材料为牛血清白蛋白。

结果和讨论

一、HeLa细胞和BHK细胞生长曲线的测定

细胞的生长速率与细胞系(株)间交叉污染后两种细胞的消涨情况密切相关。为此,我们首先在相同条件下分别测定了HeLa细胞和BHK-21细胞的生长曲线。结果见图1。从图1可知,HeLa细胞的生长速率(7天,24.6倍)远比BHK-21细胞(7天,12.4倍)要快。

二、抗中间丝蛋白抗体的特异性观察

中间丝蛋白具有明显的组织和细胞类型的特异性。中间丝蛋白的这个特异性已被广泛用于临床肿瘤诊断^[6,7]和产前诊断^[8]。同时也被应用于异种组织来源的细胞系(株)的交叉污染的检测,其检测灵敏度一般可达 10^{-4} — 10^{-5} (内部资料)。来自人宫颈腺癌的HeLa细胞具有丰富的上皮细胞特有的角蛋白纤维,同时也表达波形纤维^[9,10]。而BHK-21细胞具有肌肉细胞所特有的结蛋白纤维,同时也表达波形纤维,也有人提出,BHK-21细胞的中间丝由波形纤维蛋白——结蛋白杂种分子(Vimentin-Desmin hybrid)组成^[11]。当用抗角蛋白抗体对HeLa细胞和BHK-21细胞共培养物进行免疫荧光染色时,HeLa细胞呈阳性染色,而BHK-21细胞为阴性(图版I图1)。相反,用抗结蛋白抗体染色时,BHK-21细胞呈阳性,而HeLa细胞为阴性(图版I图2)。这两种抗体染色是我们区分上述两种细胞的主要手段。

三、实验交叉污染系统在传代过程中HeLa细胞和BHK-21细胞的消涨情况

我们设置了2个比例的HeLa细胞和BHK-21细胞的交叉污染系统。HeLa/BHK-21的初始细胞数比例分别约为1:10(组I)和10:1(组II)。每传五代测定一次两种细胞的比例,结果见表1。表1结果表明:不论HeLa细胞的初始细胞数是否占优势,均表现出淘汰BHK-21细胞的趋势。

四、条件培养液中HeLa细胞和BHK-21细胞的生长状况

HeLa细胞的生长速率远比BHK-21细胞高,这可能是实验交叉污染系统中HeLa细胞淘汰BHK-21细胞的主要原因。但是一种细胞是否能分泌某种因子来促进或抑制另一种细胞的生长?故我们测定了HeLa细胞和BHK-21细胞在不同条件培养液中的生长曲线。

1. HeLa细胞在两种条件培养液中的生长状况

结果见图2。从图2可知,BHK-21细胞

表 1 实验交叉污染系统在传代过程中两种细胞比例的变化

代数	组 I			组 II		
	HeLa	BHK-21	HeLa/BHK-21	HeLa	BHK-21	HeLa/BHK-21
原代	133	1129	1:8.498	1826	189	1:0.1035
5	378	1113	1:2.944	*		
10	460	466	1:1.013	859	27	1:0.0314
16	915	61	1:0.067	692	5	1:0.0027

* 细胞贴壁不良, 未计数。

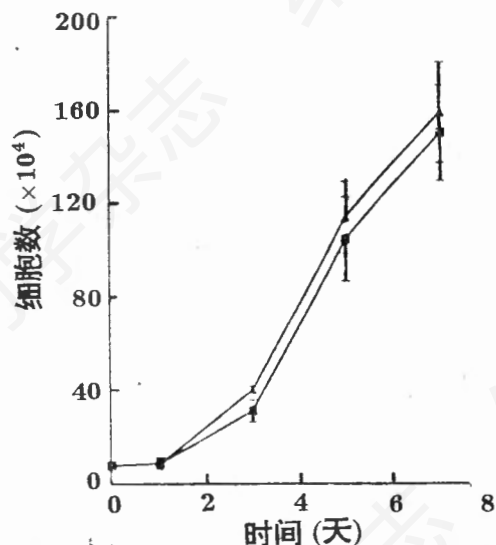


图 2 条件培养液中 HeLa 细胞的生长曲线

▲ BHK-21 细胞的条件培养液
■ HeLa 细胞的条件培养液

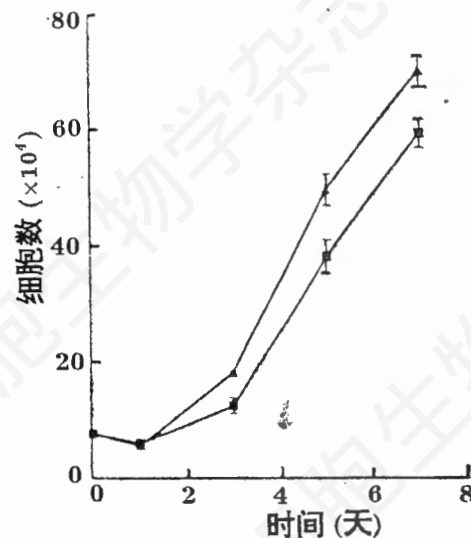


图 3 条件培养液中 BHK-21 细胞的生长曲线

▲ BHK-21 细胞的条件培养液
■ HeLa 细胞的条件培养液

的条件培养液对 HeLa 细胞的生长无明显的促进或抑制作用(5天时, $P > 0.4$, 7天时, $P > 0.5$)。

2. BHK-21 细胞在两种条件培养液中的生长状况。

结果见图 3。从图 3 可知, HeLa 细胞的条件培养液对 BHK-21 细胞的生长有明显的抑制作用(5天和 7 天, $P < 0.001$)。

五、两种条件培养液的蛋白含量测定结果

为了知道条件培养液的剩余营养, 我们用双缩脲法粗略地测定了条件培养液中作为细胞生长主要氮源的蛋白质的含量。含 20% 小牛血清的新鲜培养液的蛋白含量一般在 8 mg/ml 左右, 而 HeLa 细胞和 BHK-21 细胞的条件培养液的蛋

白含量分别为 1.87 mg/ml 和 1.7.5 mg/ml。可见, HeLa 细胞的条件培养液的蛋白含量略高于 BHK-21 细胞。

从我们的实验结果看, 当 BHK-21 细胞实验污染 HeLa 细胞后, 其消涨的趋势是 BHK-21 细胞不断被 HeLa 细胞所淘汰。其主要原因是 HeLa 细胞的生长速率明显比 BHK-21 细胞高, 其次是 HeLa 细胞可能分泌某种因子, 它对 BHK-21 细胞的生长有明显的抑制作用, 而两种细胞的营养竞争可能对 BHK-21 细胞的被淘汰不是主要原因。

有文献报道, 一些肿瘤细胞能分泌 TGFs^[12,13], 而 TGF- β 能抑制包括成纤维细胞在内的多种类型细胞的生长^[14,15]。我们

曾将 HeLa 细胞的条件 50 倍浓缩,并用 ELISA 方法测定 TGF- β , 结果为阴性。因此, HeLa 细胞分泌的某种抑制 BHK-21 细胞生长的因子的性质目前尚不清楚。

摘 要

本文用抗中间丝蛋白的免疫荧光染色和细胞在不同条件下的生长曲线测定,对 HeLa 细胞和 BHK-21 细胞实验交叉污染系统中两种细胞的消涨规律进行了初步探讨。结果表明:当 BHK-21 细胞实验污染 HeLa 细胞后,其消涨趋势总是 BHK-21 细胞不断被 HeLa 细胞所淘汰。其主要原因是 HeLa 细胞的生长速率明显比 BHK-21 细胞高,其次是 HeLa 细胞可能分泌某种抑制 BHK-21 细胞生长的因子,而两种细胞的营养竞争可能对 BHK-21 细胞的被淘汰不是主要原因。

参 考 文 献

- [1] Gartler, S. M. et al., 1968, *Nature* (London), 217: 750—751.
[2] Lavappa, K. S. et al., 1976, *Nature*

(London), 259: 211—213.

- [3] Lavappa, K. S., 1978, *In Vitro*, 14: 469—475.
[4] Nelson-Rees W. A. et al., 1974, *Science* (Washington, DC), 184: 1093—1097.
[5] 张荣兴, 潘玉芝, 1988, *实验生物学报*, 21(4): 493—503.
[6] Ramaekers, F. C. S. et al., 1982, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 46: 331—339.
[7] Ramaekers, F. C. S. et al., 1983, *Histochemical Journal*, 15: 691—713.
[8] Cremer, M. et al., 1981, *Hum. Genet.*, 56: 365—370.
[9] Franke, W. W. et al., 1979, *Exp. Cell Res.*, 118: 95—109.
[10] Osborn, M. et al., 1980, *Exp. Cell Res.*, 125: 37—46.
[11] Quinlan, R. A. et al., 1985, *Annals New York Academy of Sciences*, 455: 282—306.
[12] Todaro, G. J. et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 5258—5262.
[13] Coffey, R. J. et al., 1986, *Cancer Res.*, 46: 1164—1169.
[14] Roberts, A. B. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82: 119—123.
[15] Sporn, M. B. et al., 1985, *Nature*, 313: 745—747.

世界上第一株体外培养的肝癌细胞系的建立及其应用

——纪念著名细胞生物学家陈瑞铭教授

朱 德 厚

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

在爱国科学家的眼里,祖国是神圣的。早年留学于英国剑桥大学并获得博士学位的陈瑞铭教授,辞去了英国剑桥大学的研究职务,还毅然拒绝新加坡大学的高薪聘请,怀着报效祖国的一片热情,于 1954 年 7 月回到了祖国的怀抱,担任中国科学院实验生物研究所细胞生理室主任,并在国内创建组织培养实验室,开展细胞生理学基础研究。他是我国组织培养技术的创始人之一。1958 年,他放弃了在国外多年从事器官培养的基础研究,积极投身于攻克肿瘤的研究工作。面对着改行后的许多困难,陈教授从不气馁。根据当时的研究计划,决定在最短时间内建立一株人体肝癌细胞系。一系列的失败没有使陈瑞铭教授灰心,通过讨论,不断总结失败的经验教训,不