

装入的细胞悬液体积: 20 mL

细胞初始流速 15 mL/min

淘洗液: Eagle MEM + 10% BcS

收集过程: 骨髓细胞在流速 15 mL/min, 转速 4,032 RPM 条件下装入淘洗室。以后根据上表条件进行收集。

摘 要

离心淘洗的原理是当外向的离心力和内向的流力与浮力之间达到平衡时, 由于不同大小的细胞具有不同的沉降系数, 它们分别停留在一定的位置, 从而可通过淘洗将不同大小的细胞分离开。它的突出优点是速度快(1—1.5小时), 可分离大量活细胞(10^7 — 10^9 细胞); 可以

得到各种不同周期时相的细胞, 以便进行细胞增殖及其调控的研究。目前使用该法已经可以分离血细胞、骨髓细胞、自然杀伤细胞、培养细胞、实体肿瘤细胞及其宿主细胞等等。本文主要介绍我室开展此项工作的初步结果。

参 考 文 献

- [1] P. C. Keng et al., 1981, *Cell Biophysics* 3: 41-56.
- [2] M. L. Meistrich et al., 1977, *Methods in Cell Biology* Vol. 15, 15-51.
- [3] R. J. Sanderson et al., 1977, *Methods in Cell Biology* Vol. 15, 1-14.
- [4] V. Kachel, 1982, *Cell Analysis* Vol. 1, 195-331.
- [5] 薛绍白, 1985, 中国医学百科全书, 生物物理学分册, 83—85.

食管癌旁粘膜细胞的组织块培养法

裴许芳 周佳农 王秀琴 丁志侠 吴 旻

(中国医学科学院肿瘤研究所)

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 具有明显的地区性和家族聚集性^[1,2]。建立起人的食管粘膜上皮培养系统, 在食管癌的病因和发病原理实验研究中具有重要的意义。但是成人的上皮很难长期培养, 食管又是一个开放性器官, 上皮易受细菌或霉菌的污染, 所以更难培养。国内以往所进行的食管癌的癌旁粘膜培养仅能使成纤维细胞获得较长期的生长^[3,4]。本文参考国内外有关食管培养方面的为数不多的文献^[5,6], 结合我们在胎儿肝脏组织培养中的经验^[7], 经过探索, 成功地获得了成人食管粘膜上皮细胞的较长期培养。

材 料 和 方 法

一、标本的来源及处理

以离体 3 小时以内的食管癌病人手术切除的食管标本为材料。肉眼选取距肿瘤边缘 4—5 cm 以外的食

管粘膜, 用加有庆大霉素 80 $\mu\text{g/ml}$ 、青霉素 200 u/ml 、二性霉素 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 L-15 培养液充分洗涤, 再用锋利的眼科剪剪成 2—3 mm 大小的组织块。

二、细胞的组织块培养法

基本方法按裴许芳等^[7]先用新生牛血清将 60 mm 直径的塑料培养皿润湿, 再将剪好的组织块贴置平皿中, 每皿 6—7 块, 粘膜表面均向上。培养液为无钙 199 加氯化钙 $0.6 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 、新生牛血清 1.25%、胰岛素 5 $\mu\text{g/ml}$ 、氢化可的松 $5 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 、表皮生长因子(EGF) 5 ng/ml 、庆大霉素 40 $\mu\text{g/ml}$ 、青霉素 100 u/ml 、二性霉素 0.2—0.4 $\mu\text{g/ml}$ 、微量元素液^[7,8] (为美国 NCI 的 Lechner 博士所赠)、HEPES $15 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 、pH 7.2。贴壁前加入少量的培养液以免组织块漂浮。将培养皿放入可以密封的培养盒内, 充以含 50% O_2 , 5% CO_2 , 45% N_2 的混合气体, 置 37°C 温室中培养。贴壁后, 每皿加 2 ml 培养液, 2—3 天换液一次。组织块周围的上皮细胞晕长到一定大小, 或需要用细胞作实验时, 将组织块迁移到新的平皿继续培养; 也可收集细胞后置留组织块以重新外长出上皮

细胞。

三、分析和观察的方法

在倒置显微镜下观察每块组织的生长晕的情况。部分组织块用10%福尔马林固定、石蜡包埋切片，H. E. 染色以观察培养后的组织的结构和形态。组织块周围长出的上皮细胞则用甲醇固定，Giemsa 染色后镜下观察。以放射自显影法观察细胞DNA的合成：培养液中加入 $^3\text{H-TdR}$ 2 uCi/ml，培养24小时后收集、洗涤组织块，同前法固定、包埋及切片。切片脱蜡后涂以核-4 乳胶，置4℃冰箱内曝光2周后显影、定影。以 Philips EM-410 透射电镜观察其超微结构，其过程为：部分培养皿的细胞用橡皮轻轻刮下，将离心得到的细胞团用含4%甲醛和1%戊二醛的固定液（磷酸缓冲液配制，pH 7.3）固定2小时，再用1%四氧化锇固定2小时，丙酮脱水，Epon 812 包埋，超薄切片经柠檬酸铅及醋酸双氧铀双重固定。细胞分裂相及核型的分析的方法是：先将组织块移去，周围的细胞以秋水仙素 0.05ug/ml 处理4小时，洗涤后继用 0.075 mol/L KCl 低渗处理40分钟，甲醇-冰醋酸(3:1)固定1小时，Giemsa 染色；或将培养皿中经秋水仙素处理后的细胞用胰酶消化下来，同前经过低渗、固定后滴片及G-带染色，进行核型分析。

结 果

所获12例食管癌手术切除的肉眼外观“正常”的癌旁食管粘膜中，有10例共取16块组织于培养前作了石蜡包埋切片H. E. 染色观察。其中2例共3块组织(3/16)显示重度增生，另外8例共13块组织显示接近正常(5/16)或轻度增生(8/16)(图版I图1)。组织块绝大多数于1天后贴壁。3天时，组织块的表皮层开始成片脱落，5天时，几乎所有组织块的表层上皮均脱落殆尽，周围开始有上皮细胞向外生长。一周左右，90%以上的组织块周围可见上皮细胞生长晕(382/420块)。二周后，贴壁的组织块几乎全部长出上皮细胞晕(图版I图2)，用血球计数板计数，每皿约可获50—60万细胞。

组织块周围的上皮细胞多为多角形或圆形，生长旺盛。组织块附近的细胞更是增殖活跃，常密集成簇，大小不甚均一，每视野(10

×10)常可见10多个分裂相(图版I图3、4)。染色体核型分析的结果表明，约1/4的细胞染色体为正常二倍体(图1)，少数细胞的染色体为假二倍体和非整倍体。电镜观察可见大多数细胞的结构良好，生长旺盛，部分细胞核及胞浆空泡退变。细胞核多为圆形或近似圆形，染色质较均匀，核仁明显。胞浆内除有中等数量的线粒体及少量粗面内质网外，大多含有较丰富的张力纤维丝及由其所聚集成束的张力原纤维。细胞表面有许多细长的胞浆突起分布在细胞间隙，细胞间常可见到桥粒结构(图版I图5)。充分证明这些细胞是食管的鳞状上皮细胞。

组织块周围长出的细胞晕直径可达2cm以上，一般成纤维细胞很少，有时可见一些梭形细胞夹杂其中。当上皮细胞晕长得较大，或需要用细胞作实验时，就将组织块迁移接种到新的平皿继续培养。贴壁的组织块大多数于3天后又长出较好的上皮细胞晕。组织块可多次迁移并不断长出新的上皮细胞。其中有些经8次迁移，历时4个月以上，仍见其周围上皮细胞生长良好。组织学检查表明，经培养能长出上皮细胞晕的组织块大多数结构形态完好，具有2—3层生长活跃的上皮细胞。 $^3\text{H-TdR}$ 掺入放射自显影证明这些上皮细胞DNA合成亦比较活跃(图版I图6)。

12例食管粘膜的培养时间一般都在2个月左右，最长的培养时间达4个月以上。移走接种的组织块后，细胞一般可继续培养一个月左右，但大多数处于静止状态，增殖不明显并逐渐退化死亡。部分生长旺盛的细胞可用胰酶消化后代一次。

讨 论

成人食管粘膜的器官培养，国外的报道可达半年之久^[5]，国内可达近2个月，并且也观察到有的组织块向外长出上皮细胞^[6]。但是，利用组织块培养法长期地大量地获得成人食管粘膜上皮细胞尚未见有报道。本文中所用培养方法及条件，主要参照 Lechner 培养成人支气



图1 女59岁,组织块培养2周其周围上皮细胞的染色体核型结果 46

管上皮细胞的经验^[8]。我们曾用类似的方法在人胚肝上皮细胞的培养中获得成功^[7]。表明降低培养液中钙和血清浓度而增加一些激素和生长因子等,可能有助于上皮细胞从组织块中迁移出来。这一培养体系的主要特点是:1. 添加了有助于组织块在体外长期存活的胰岛素和氢化可的松^[9],以及对上皮细胞有生长刺激作用的EGF^[8];2. 培养环境中用了含氧量较高的混合气体;3. 低血清浓度的培养液抑制了成纤维细胞生长;4. 可以获得大量上皮细胞以进行各种实验研究。5. 病人的年龄及术前接受过放射治疗等因素对组织块外长细胞的影响不大,但组织的新鲜程度则比较重要。

摘 要

一、体外培养的成人食管粘膜组织块不但可以长出许多生长旺盛的上皮细胞,还可经多次迁移接种培养,不断提供大量新的上皮细胞。组织块的体外存活时间最长可达4个月以上。

二、低钙、低血清加激素及生长因子等成份的199培养液,可以促进上皮细胞从组织块

迁移出来,并抑制成纤维细胞的生长。

三、本实验体系为进行食管上皮细胞癌变的研究,提供了一个较好的体外实验系统。

图版说明

图1 未经培养的食管癌旁粘膜。上皮细胞轻度增生。

H.E. 染色 ×30

图2 培养17天的组织块及其周围的上皮细胞生长晕。

Giemsa 染色 ×1.2

图3 培养12天的组织块周围生长的上皮细胞大小不太均一,圆形分裂细胞多见。

相差 ×33

图4 培养13天的组织块的周围上皮细胞染色体检查,可见许多细胞的中期染色体。

Giemsa 染色 ×60

图5 培养一个月的组织块经消化收集细胞后12天,其周围重又长出的上皮细胞作电镜观察,表现典型鳞状上皮的特点:胞浆内具有丰富的张力微丝和成束的张力原纤维,细胞间有多个桥粒相连。放大24600倍。

图6 培养84天的组织块³H-TdR掺入放射自显影,可见组织块上皮层的细胞DNA合成活跃。

H.E. 染色 ×60

参 考 文 献

- [1] Wu Min et al., 1985, In *Familial Cancer*, ed by Muller, Weber, pp. 52—54. Ist. Int. Res. Conf. Basal.
- [2] 李光恒等, 1980, 肿瘤防治研究, 2:1—6。
- [3] 王秀琴等, 1980, 中国科学, 1:78—81。
- [4] 高燕宁等, 1986, 中国医学科学院学报, 8:171—174。
- [5] Hillman, E. A. et al., 1980, In *Methods in Cell Biology*, Vol. 21 B, ed. by Harris, C. C. et al., pp. 331—348. Academic Press, INC.
- [6] 鲍乐尧等, 1984, 中华病理学杂志, 13(1): 7—10。
- [7] 裴许芳等, 1985, 中华病理学杂志, 14(3): 169—171。
- [8] Lechner, J. F. et al., 1981, *Cancer Research*, 41: 2294—2304。
- [9] Easty, G. C., 1970, In *Methods in Cancer Research*, ed. by Harris Busch, Vol. V. pp. 1—43. Academic Press, New York, London.

用简化的微量方法分析 EGF 受体基因在培养细胞中的表达

彭素芬 江万里 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

利用放射性同位素标记的基因片段或 cDNA 探针进行核酸分子杂交是分析基因表达的有效手段。将细胞 DNA 或 RNA 样品经琼脂糖凝胶电泳分离后转移到硝酸纤维素膜上, 然后与放射性探针杂交, 即 Southern 印迹法和 Northern 印迹法^[1,2]已被普遍采用, 为了简化操作, 也常使用 (Dot Blot) 点印迹法^[3]。利用上述技术进行基因或基因产物分析时, 首先需要从细胞分离、纯化 RNA 和 DNA^[4,5]。如果需要同时分析多种细胞或细胞在不同条件下的基因表达, 那么, 大量的细胞培养和 RNA、DNA 分离纯化步骤将给工作带来不便。

我们为了分析人表皮生长因子受体 (EGFR) 基因在几株人体肿瘤细胞中的表达, 采用了一个简化的分离细胞 RNA 和 DNA 的微量方法, 结合点印迹杂交, 取得了满意的结果。该方法中每组细胞样品只需培养一个小北京瓶的细胞 ($0.5-1 \times 10^6$ 个细胞), 简化的 RNA、DNA 分离步骤都在 eppendorf 管中进行, 避免了超速离心或多次高速离心所制备样品的纯度达到实验要求, 在杂交实验中获得满意的杂交信号。

材 料 和 方 法

细胞培养:

人肝癌细胞株 7404、人鼻咽癌细胞株 CNE₁ 和人表皮癌细胞株 A₄₃₁ 细胞, 37°C 常规培养于 RPMI-1640 培养基-10% 小牛血清。用作样品制备时, 接种 $1-1.5 \times 10^5$ 个细胞于小北京瓶 ($4 \times 3 \text{ cm}^2$), 培养 3—5 天细胞长到 $0.5-1 \times 10^6$ 个/瓶时, 分离 RNA 或 DNA。

正常人胚肺成纤维细胞 (HLE) 冷冻保存于液氮中, 用作样品制备时, 复苏细胞, 传一代后, 如上接种。

分析高温培养下 EGFR 基因表达时, 如上培养鼻咽癌细胞 (CNE₁), 待细胞长到 $0.5-1 \times 10^6$ 个细胞/瓶时, 浸入 41°C 水浴, 分别培养 0、1、2、6 小时, 分离 RNA, 以分析基因表达的改变。

简化的微量 RNA 抽提:

每个小北京瓶的细胞 ($0.5-1 \times 10^6$ 个细胞) 倒去培养液, 用生理盐水洗三次, 吸尽盐水后立即加入盐酸胍溶液 1 ml (7.6 mol/L 盐酸胍的 0.1 mol/L KAC pH 5.2 缓冲液), 粘稠的细胞裂解液转入 eppendorf 管中, 用带 21 号注射针的 2 ml 注射器吸取细胞裂解液后推出, 重复 10 次, 以切断 DNA, 然后加 0.5 ml 95% 乙

姚曾序教授和朱德厚同志对本工作的支持和帮助、钟逸新同志为本工作摄影, 特此致谢。