

# 恶性转化增加细胞对细小病毒的敏感性\*

郭兰萍 苏兆众 罗祖玉 陈涛生 栾颖 蒲小红  
(复旦大学 生物学系)

哺乳类细小病毒(parvoviruses)是一类直径为20—25 nm的无包膜病毒,其复制周期的完成需要宿主细胞的S期功能。它们简单的基因组只载有几个结构蛋白的遗传信息,所以病毒自身复制几乎完全依靠宿主酶系功能。在多数情况下,若细胞能支持细小病毒完成其复制周期就意味着细胞自身裂解<sup>[1]</sup>。

细小病毒具有明显的抗肿瘤效应<sup>[2]</sup>。其一,人和动物的流行病学调查结果表明,感染了细小病毒者某些肿瘤发生率较低;其二,向实验动物传布细小病毒,则被理化致癌因子或肿瘤病毒诱发的肿瘤发生率明显下降。虽然细小病毒的这种作用的机制不详,但在离体培养细胞的实验系统中已发现细小病毒H-1<sup>[1]</sup>能直接杀伤或抑制多种人肿瘤细胞<sup>[3]</sup>,细小病毒MVM<sup>[1]</sup>能有效地通过杀伤转化细胞而抑制肿瘤病毒SV<sub>40</sub>对小鼠细胞3T3的转化<sup>[4]</sup>,这些说明细小病毒的体内抗肿瘤作用至少应包括它们直接杀伤或抑制肿瘤细胞这一途径。

为了进一步证实细小病毒杀伤肿瘤细胞的专一性效应,我们比较了正常人胎肾和胃细胞及其被理化致癌剂处理后得到的恶性转化细胞HER 8502和GTS 8502<sup>[5]</sup>对H-1的敏感性,发现H-1能显著地抑制肿瘤细胞,而对正常细胞的生长无明显的抑制作用。小鼠成纤维细胞C<sub>3</sub>H 10 T1/2对H-1敏感,它被<sup>3</sup>H-TdR转化后得到的恶性转化细胞株<sup>[6]</sup>对H-1的敏感性进一步提高。H-1对两种分化程度不同的胃癌细胞的生长都有抑制作用,但低分化型的MKN 45比分化型的MKN 28<sup>[7]</sup>对H-1更敏感。实验结果表明,恶性转化提高了细胞对细小病毒的敏感性,且这种敏感性可能与细胞的恶性转化程度有关。此结果进一步证实了细小

病毒能专一性地抑制恶变的假说,为细小病毒作为肿瘤防治的可能性提供新的实验依据。

## 材 料 和 方 法

### 1. 细胞及其培养条件

正常人胎肾和胃细胞来自五月龄胎儿的组织块<sup>[3]</sup>,经细胞形态、核型、生化及生长特征分析,这些细胞属正常二倍体细胞,经体外转化处理分别得到细胞株HER 8502和GTS 8502<sup>[5]</sup>。MKN 45和MKN 28分属低、中分化型人胃癌细胞株<sup>[7]</sup>。小鼠成纤维细胞系C<sub>3</sub>H 10 T1/2和被<sup>3</sup>H-TdR转化的C<sub>3</sub>H 10 T1/2<sup>[6]</sup>,被SV<sub>40</sub>转化的新生儿肾细胞NB-E<sup>[8]</sup>均贴壁生长于含5—10%小牛血清的培养液中,培养皿置于含5% CO<sub>2</sub>和饱和水蒸汽的37℃培养箱内。

### 2. 病毒的制备与纯化

细小病毒H-1增殖于NB-E细胞内。待细胞裂解后,收集细胞碎片及上清液。病毒提纯基本根据Tattersall等描述的CsCl密度梯度超离心法<sup>[9]</sup>。

### 3. 病毒感染

吸去单层细胞的培养液,换加一定量病毒悬液(0.4 ml/φ 6 cm培养皿),于37℃培养一小时,其间每隔10分钟轻摇培养皿一次,以使所有细胞均能接触病毒。病毒感染后,重新加入培养液。

### 4. 病毒定量分析

基本按Ledinko<sup>[10]</sup>描述的病毒空斑分析法。简言之,将4×10<sup>5</sup>个NB-E细胞接种于直径为6 cm的塑料培养皿(Nunc),次日感染病毒,其后即用含0.54%琼脂的完全培养基覆盖。培养6—7天后,经中性红染色后肉眼计数病毒空斑。用空斑形成单位(PFU)表示病毒滴度,病毒PFU数/细胞数(MOI)表示感染病毒的剂量。

### 5. 细胞克隆形成率

以细胞克隆形成率表示细胞存活率。细胞以不同数量(100—500个)接种于直径6 cm的塑料培养皿,培

\* 上海市科委基金资助的课题。

养8—9天后经Carnoy液固定和10%Giemsa液染色,然后计数由单个细胞长成的克隆(大于50个细胞)。

#### 6. 用 $^3\text{H}$ -TdR掺入率检测细胞DNA合成

用病毒感染处于对数生长期的细胞,感染后不同时间用含 $^3\text{H}$ -TdR的培养液( $0.5\mu\text{Ci}/\text{ml}$ )脉冲标记1小时,然后吸去带标记液,用不含同位素的培养液继续培养1小时,经0.25%胰蛋白酶消化后再用4℃的10%三氯乙酸将细胞转移到玻璃纤维滤纸上,干燥后加入闪烁液,即可用液闪仪测cpm值。

### 实验结果

#### 1. 细小病毒H-1对正常人胎肾和胃细胞及其被转化的细胞株HER 8502和GTS 8502的影响

(1) 对细胞生长的影响 如图1所示,H-1的感染(MOI高达5)对正常人细胞的生长无抑制作用,但能有效地抑制恶变细胞的生长。

(2) 对HER 8502和GTS 8502细胞克隆形成的影响 如图2所示,随MOI的增加,HER 8502和GTS 8502(都属第18代)的克隆形成率下降,但在感染等量病毒的情况下,其克隆形成率则高于NB-E细胞。显见,HER 8502和GTS 8502细胞对H-1的敏感性低于NB-E细胞。

(3) 对细胞DNA合成的影响 脉冲标记结果表明HER 8502的DNA合成受H-1感染的抑制。感染4小时后,DNA合成尚未明显受抑,自8小时起 $^3\text{H}$ -TdR掺入量剧减,直到20小时,抑制作用均未减弱。正常人胎肾细胞的DNA合成不受H-1感染的影响(图3)。另外,用流式细胞仪分析表明,被H-1感染后,HER 8502细胞的周期被阻于S期(待发表结果),说明细胞DNA合成受抑。

#### 2. 细小病毒H-1对 $\text{C}_3\text{H}10\text{T}1/2$ 和被 $^3\text{H}$ -TdR转化的 $\text{C}_3\text{H}10\text{T}1/2$ 的影响:

如表1所示, $^3\text{H}$ -TdR的转化可使H-1(MOI 0.5)对 $\text{C}_3\text{H}10\text{T}1/2$ 的克隆形成的抑制率从10%提高到22%。图4表示MOI对细胞存活的影响。

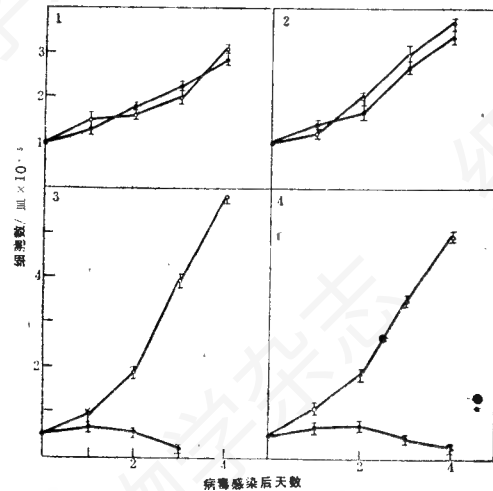


图1 H-1对正常人胎肾、胃细胞和它们的转化细胞的生长的抑制

在培养皿中接种 $10^5$ 个人胎肾(1)或胃(2)细胞(第5代),或它们的转化细胞HER 8502(3)、GTS 8502(4)(第15代, $5 \times 10^4$ 个/皿),6小时后感染H-1(MOI 5),次日起连续4天计数细胞。图中数据是4个培养皿内细胞的平均数,垂直短线示标准误。 $\Delta$ 和 $\square$ 分别表示未感染和感染病毒的细胞。

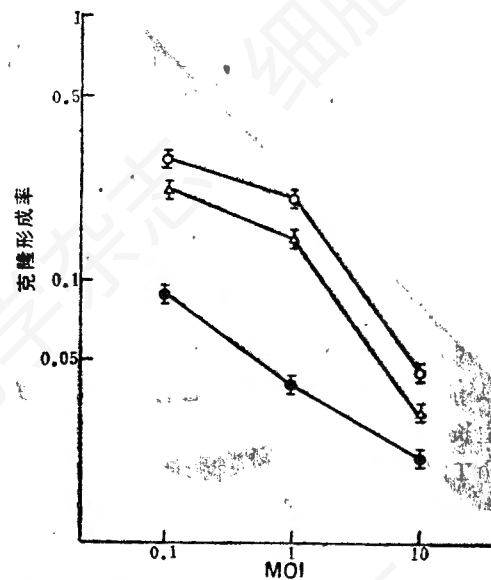


图2 H-1对HER 8502、GTS 8502和NB-E细胞克隆形成的影响

第18代HER 8502( $\circ$ )、GTS 8502( $\Delta$ )以及NB-E( $\bullet$ )细胞感染了H-1后用克隆形成法计量细胞的存活率。图中数值是三次独立实验的平均值,垂直短线示标准误。

表 1  $C_3H 10 T 1/2$  和被  $^3H$ -TdR 转化的  $C_3H 10 T 1/2$  对 H-1 敏感性的比较

| 细 胞 系     |                | $C_3H 10 T 1/2$ |                | 被 $^3H$ -TdR 转化的 $C_3H 10 T 1/2$ |                |
|-----------|----------------|-----------------|----------------|----------------------------------|----------------|
| 每皿接种细胞数   |                | 250             | 125            | 250                              | 125            |
| 克 隆 形     | 未感染病毒          | $24.8 \pm 0.8$  | $25.6 \pm 0.8$ | $50.0 \pm 1.2$                   | $63.2 \pm 4.6$ |
| 成 率 (%)   | 感染病毒 (MOI 0.5) | $22.0 \pm 6.8$  | $23.4 \pm 3.3$ | $38.4 \pm 1.6$                   | $50.4 \pm 2.3$ |
| 相对抑制率 (%) |                | 11.3            | 8.6            | 23.2                             | 20.3           |

表 2 两种不同分化程度的胃癌细胞对细小病毒 H-1 的敏感性的比较

| 细 胞 株     |              | MKN 45 (低分化型)  |                | MKN 28 (分化型)   |                |
|-----------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 每皿接种细胞数   |              | 500            | 250            | 500            | 250            |
| 克 隆 形     | 未感染病毒        | $39.9 \pm 6.6$ | $43.8 \pm 5.2$ | $28.4 \pm 4.0$ | $30.8 \pm 2.0$ |
| 成 率 (%)   | 感染病毒 (MOI 2) | $16.0 \pm 5.1$ | $16.8 \pm 2.6$ | $18.2 \pm 3.4$ | $18.5 \pm 1.0$ |
| 相对抑制率 (%) |              | 60.0           | 61.6           | 36.1           | 40.0           |

$$\text{相对抑制率} = 1 - \frac{\text{感染细胞克隆形成率}}{\text{未感染细胞克隆形成率}}$$

表中数据至少是 5 个培养皿中克隆形成率的平均值, 士号后的数值示标准误。

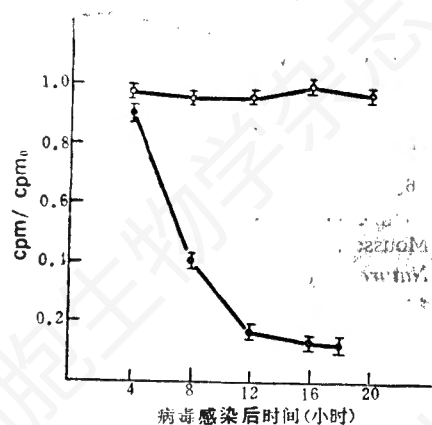


图 3 H-1 感染对正常人胎肾细胞 (第 5 代) (○) 和 HER8502 细胞 (第 8 代) (●) DNA 合成的影响

cpm 和  $cpm_0$  分别表示感染和未感染病毒后不同时间所测得的 cpm 值。MOI 为 10。图中数值是三次独立实验的平均值。垂直短线示标准误。一小时脉冲标记所测得的 cpm 值在 500—5000。

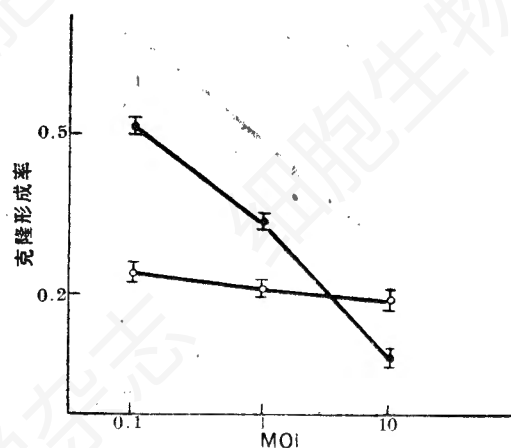


图 4 H-1 感染对  $C_3H 10 T 1/2$  (○) 和转化的  $C_3H 10 T 1/2$  (●) 细胞克隆形成率的影响

图中数值是两个相互独立实验的平均值, 垂直短线示标准误。

### 3. H-1 对不同分化程度的人胃癌细胞系的影响:

如表 2 所示, H-1 (MOI 2) 对低分化型胃癌细胞 MKN 45 的克隆形成率的相对抑制率为

60%，而对分化型的 MKN 28 则为 38%。

## 讨 论

细小病毒的体内抗肿瘤效应可能通过不同途径实现。其一，由于细小病毒具有抗原性，它的感染可使机体处于高度免疫反应状态，从而提高机体对肿瘤细胞的识别和杀伤作用<sup>[2,11]</sup>；其二，细小病毒直接抑制或杀伤肿瘤细胞。由于体外实验系统排除了免疫作用，本实验结果反映，细小病毒的体内抗肿瘤效应至少应包括它们直接抑制恶变细胞这一作用。多数细小病毒(包括 H-1 和 MVM)的感染不能使成年机体致病<sup>[12]</sup>，说明尽管细小病毒的增殖需细胞 S 期功能，且正常成年机体内亦不乏分裂细胞，但细小病毒却不能影响这些细胞而使成年动物致病。只有处于异常分化状态的分裂旺盛的恶变细胞才对细小病毒敏感。正常人胎肾和胃细胞及它们的恶性转化细胞对 H-1 敏感性的差异为这一假设提供明确的证据。长期离体培养的小鼠成纤维细胞系 C<sub>3</sub>H 10 T1/2 已部分获得某些转化特性，故对 H-1 表现一定的敏感性，但一旦它们转化成明确的恶变细胞，这种敏感性显著提高。

为什么恶变细胞会成为细小病毒的理想宿主？现有报道表明，正常细胞虽然能支持 H-1 完成其复制周期中 DNA 复制前的各步骤，如病毒吸附、胞吞、向核迁移及核内脱壳等，但不能支持 H-1 完成 DNA 复制<sup>[4,5]</sup>。恶变细胞产生了支持 H-1 完成 DNA 复制的蛋白因子，其结果是细小病毒完成其复制周期和癌细胞的自身裂解。

体外进行的畸胎瘤实验表明恶性细胞对细小病毒的敏感性与它们的分化状态密切相关<sup>[14]</sup>。若将由理化因子转化的人胎肾细胞 HER 8502 与被肿瘤病毒 SV<sub>40</sub> 转化的新生儿肾细胞 NB-E 比较，从形态学观察、核型分析、生长特性(如软琼脂中克隆形成率、转化灶形成率及分类等)及异种接种诸方面而言，NB-E 的恶性表型均高于 HER 8502，从而对 H-1

的杀伤作用也更敏感。同样，低分化型胃癌细胞 MKN 45 的恶性程度高于分化型的 MKN 28<sup>[7]</sup>，与之相关的则是它们对 H-1 的敏感程度不同。这种相关性的机制仍待进一步阐明。

在实际应用上，本实验结果提示：(1) 细小病毒可能用于区分某些恶变细胞的分化程度；(2) 细小病毒可能作为肿瘤防治的新手段。

## 摘 要

在离体培养人细胞中，细小病毒对恶性转化的细胞有明显的抑制作用。正常人胎肾和胃细胞对细小病毒 H-1 呈抗性，但它们被理化致癌因子转化后，对细小病毒敏感。小鼠成纤维细胞 C<sub>3</sub>H 10 T 1/2 被 <sup>3</sup>H-TdR 转化后对细小病毒 H-1 的敏感性进一步提高。另外，细小病毒对肿瘤细胞的抑制作用还与细胞的分化状态有关，低分化型胃癌细胞 MKN 45 比分化型胃癌细胞 MKN 28 对 H-1 的杀伤作用更敏感。

## 参 考 文 献

- [1] Hauswirth, W. W., 1984, in "The Parvoviruses", K. I. Bernsed, Plenum Press, New York & London, pp 129-152.
- [2] 苏兆众等, 1986, 国外医学肿瘤分册 (1) 16.
- [3] 苏兆众等, 1987, 中国科学 B 辑 (4) 403.
- [4] Mousset, S. & Ronfelaere, J., 1982, *Nature*, 300: 537.
- [5] 苏兆众等, 1987, 中国科学 B 辑 (7) 733.
- [6] 朴长青等, 1985, 实验生物学报 18(4): 463.
- [7] Hojo, H., 1977, *Niigata Igakukai Zasshi*, 91: 737.
- [8] Shein, J. M. & Enders, J. F., 1962, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 109: 495.
- [9] Tattersall, P. & Ward, D. C., 1976, *Nature*, 236: 106.
- [10] Ledinko, N. & Toolan, H. W., 1967, *Nature*, 214: 1346.
- [11] Toolan, H. W. et al. 1982, *Cancer Res.*, 42: 2552.
- [12] Siegl, G., 1984, in "The Parvoviruses",

K. I. Berns ed. Plenum Press, New York & London, pp. 297—362.

[13] Chen, Y. Q., et al. 1986. *Cancer Res.* 46: 3574.

[14] Tattersall, P.. 1978. in "Replication of Mammalian Parvoviruses", D. C. Ward & P. Tattersall eds., CSH Lab., CSH pp. 3—12.

## 用整体解离法制备两栖类蝌蚪细胞染色体

王 纆 琦

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

两栖类是实验胚胎学研究中最常用的实验动物之一。随着研究的不断深入,两栖动物发育过程中基因表达调控、核质关系和细胞分化等发育生物学问题已受到广泛的重视。为了深入探讨两栖类的发育过程,有必要研究两栖动物发育中染色体的变化<sup>[1,2]</sup>。目前,两栖动物原肠期胚胎细胞和成体细胞的染色体制备方法已经建立<sup>[3,4]</sup>,但蝌蚪细胞染色体的制备却缺乏简便而又可靠的方法。为此,将作者近年工作中总结出来的整体解离法介绍如下:

### 材 料 与 方 法

实验动物取自本实验室饲养的非洲爪蟾(*Xenopus Laevis*),经人工催产后,把受精卵置于 Holtfreter 溶液中培养,随时观察其发育情况。

1. 当胚胎发育至 37 期—47 期时(按 Nieuwkoop 的发育分期<sup>[5]</sup>),吸取 3—5 只蝌蚪,置于无  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  的 Steinberg 分离液中,针刺头部处死。

2. 加入秋水仙素溶液,使最终浓度为 20 微克/毫升,室温下培养 14 小时。

3. 将蝌蚪吸入 Down 氏玻璃组织匀浆器(松型)中,加入 4 毫升培养液,缓慢地上下抽动匀浆器 2—3 次,制成细胞悬液。

4. 把细胞悬液收集于离心管内,弃去不能悬浮的组织块,然后迅速离心(1000 r/min, 8 分钟)。弃去上清液,加入 4 毫升 0.4% 氯化钾,用滴管把细胞团打散,室温下低渗处理 7 分钟。

5. 加入等量新鲜固定液(甲醇:冰醋酸 = 3:1)进行预固定,2 分钟后离心(1000 r/min, 8 分钟),弃去上清液,再加入 8 毫升新配固定液,再悬浮,20 分钟

后,离心(1000 r/min, 8 分钟),换入新鲜固定液,再悬浮后,盖上管口,置 4℃ 冰箱过夜。

6. 次晨,取出固定细胞,离心后弃上清液,加入 1 毫升新鲜固定液,制成细胞悬液,按常规空气干燥法制片,1/10 Giemsa 染液(pH 6.8)染色 30 分钟。

### 结 果 和 讨 论

用上述方法制得非洲爪蟾蝌蚪细胞的中期分裂相染色体,并排出了染色体组型(见图 1)。从图中可见,染色体结构清晰,分散良好。非洲爪蟾染色体数为  $2n = 36$ 。根据着丝点位置,可将全部染色体分为 3 组,其第 1—7 对染色体为中部着丝点染色体(m);第 8—14 对为亚中部着丝点染色体(sm),第 15—18 对为亚端部着丝点染色体(st)。

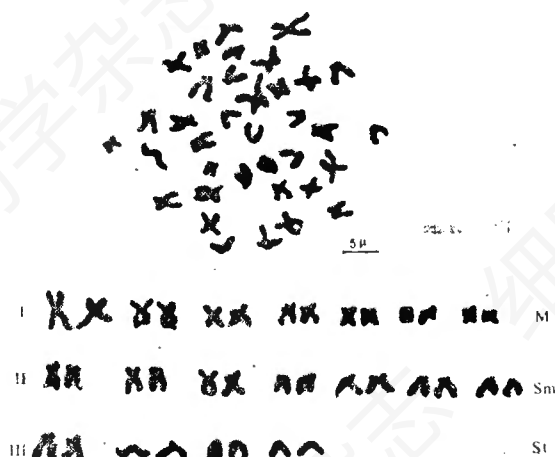


图 1 非洲爪蟾蝌蚪细胞的染色体及其染色体组型