

### 三系人肝癌细胞体外长期培养后仍保持人肝癌的相关特性

陈瑞铭 沈鼎武

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

长期以来,哺乳类细胞经体外长期培养后是否仍保持其原有的生物学特性<sup>[1]</sup>?是否会与其它细胞发生交叉污染<sup>[2]</sup>?历来是细胞培养工作者所关注的问题。因之,对于一些已建立的细胞株、系,经较长时间培养或冷冻保存后常有必要作进一步的分析。本实验室于1974年间自三例人原发性肝细胞癌手术标本中分离培养成功了三系细胞,分别定名为:BEL-7402; BEL-7404和BEL-7405<sup>[3]</sup>,并已有专论作了详细介绍<sup>[4]</sup>,不另赘述。晚近,一些实验室曾应用这三系人肝癌细胞分别作了有关癌基因ras,肝癌单抗及细胞骨架构型等方面之研究。进一步证明,这三系人肝癌细胞经体外长期培养并在液氮冻存达10余年之久后仍保留肝癌细胞的有关特征。本文仅作一扼要介绍。

癌基因是80年代在肿瘤分子生物学研究中最富有成果的领域之一。据估计,已探查到的癌基因多达30—40种<sup>[5,6]</sup>。在巴建成的癌细胞株、系中是否仍保留与相应的临床肿瘤同样的癌基因,令人颇感兴趣。顾健人等<sup>[7]</sup>从人肝癌BEL-7402系细胞中制备高分子量基因组DNA,再转染小鼠NIH3T3细胞获得转化细胞株。应用多种癌基因片段作探针,并以临床肝癌的DNA为对照分析。结果指出,BEL-7402系细胞与人肝癌DNA分别转染3T3细胞后所获得的转化细胞株中,均存在着相同的人N-ras基因顺序。藉Northern印迹法与分子杂交术,在9例临床肝癌中有6例显示N-ras的过度表达,在BEL-7402系细胞及其NIH3T3转化株细胞中,均可探查得到ras基因的产物p21。上述资料提示,N-ras基因为我国常见的原发性肝癌的转化基因,并表明

BEL-7402系细胞虽经体外培养80—100代、冷冻保存约8年之久,仍显示出与其相应的临床肝癌相同的N-ras基因,且在转录与表达水平上是活跃的。

已有证据表明人肝癌细胞表面膜抗原的成分与正常肝细胞有差异<sup>[8,9]</sup>。<sup>125</sup>I-UDR释放试验也证明肝癌患者的周围血淋巴细胞对人肝癌细胞(BEL-7402)有细胞毒作用。提示患者的免疫系统有可能识别这些膜抗原的差异性<sup>[10]</sup>。谢弘等<sup>[11]</sup>进一步应用人肝癌BEL-7402系细胞为免疫原,获得了两个分泌抗人肝癌单克隆抗体的小鼠杂交瘤株Hepama-1和Hepama-2。藉间接免疫荧光法进行抗体专一性的分析。实验结果表明,两株单克隆抗体对三系人肝癌细胞BEL-7402, BEL-7404及BEL-7405以及其它二系肝癌细胞均呈明确的阳性反应,并在6例肝癌手术材料中有5例获相似结果,而对正常肝、人胚胎肝以及2个正常人肝细胞系则呈阴性反应。作者并比较观察了大量的成年人组织(13种)、胎儿组织(19种)乃至人体的其它各种肿瘤细胞系(计15种,包括人宫颈癌细胞HeLa),细胞膜荧光均为阴性反应。上述结果有力地证实,以人肝癌细胞(BEL-7402系)制备的单抗具有对人体肝癌细胞专一性的识别功能,所显示的专一性提示它们所针对的可能是人体肝癌某种相关抗原的决定簇。

中等纤维蛋白作为细胞骨架组成之一常因其在不同细胞种类中的构型及分布各异而被考虑作为判别细胞间特别是与HeLa细胞交叉污染的一项指标<sup>[12,13]</sup>。新近,张荣兴与潘玉芝<sup>[14]</sup>应用抗角蛋白抗体和抗波形纤维蛋白抗体的间接免疫荧光法,对人肝癌BEL-7402和

BEL-7404 系细胞与 HeLa 细胞的中等纤维蛋白之分布和构型进行了比较观察, 并藉 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了这两类细胞的中等纤维提取物的多肽组成。结果指出, 源自同一实验室保种的人肝癌细胞与 HeLa 细胞, 两者无论在荧光抗体染色式样乃至多肽组成上均存在着显著的差异, 其中最明显的区别是 HeLa 细胞具有较为发达的桥粒——张力纤维复合物和分子量为 40 kDa 的角蛋白多肽; 而在人肝癌细胞中则为乏如。

近已证明, 细胞内源性抗药程度显示出组织、器官之特异性。Fojo 等<sup>[15]</sup>曾应用人抗药基因片段作探针, 分析了大量的人肿瘤与正常组织, 发现除肾上腺、肾等一些材料外, 肝、肝癌细胞呈现高水平的抗药基因表达, 而其他的一些正常组织或肿瘤组织则表达很低或不表达。根据作者等<sup>[16]</sup>进行的初步分析结果指出, 人肝癌 BEL-7402 系细胞对秋水仙素的耐受程度比 KB 3-1(HeLa 细胞之亚系)为高。这亦提示人肝癌细胞 BEL-7402 仍保留了肝癌的内源抗药性, 也为区别于 HeLa 的参数之一。

综上所述, 就上列癌基因、肝癌单抗、中等纤维构型乃至抗药性等方面之证据而言, 本实验室于 1974 年间建成的三系人肝癌细胞, 虽经体外长期培养(80—120 代), 液氮冻存(8—12 年), 仍然保留着人肝癌的相关特性, 并排除了这三系细胞与 HeLa 细胞发生交叉污染之可能性。

## 摘 要

本文就癌基因、特异性的单克隆抗体、细胞骨架的中等纤维之构型以及内源抗药性等诸方面, 论证了本所于 1974 年间建立的三系人肝癌细胞在体外长期培养和冻存后, 仍然具有人肝癌细胞之特征。

## 参 考 文 献

- [1] Freshney R. E. 1986. Ed. "Animal Cell Culture" Alan R. Liss. Inc., New York.
- [2] Nelson-Rees W. A. et al., 1974. *Science* 184: 1093-1096.
- [3] Chen R. et al., 1980. *Scientia Sinica* 23: 236-251.
- [4] Shen D-W & Chen R., 1985. in Tang Z. ed. "Subclinical Hepatocellular Carcinoma. pp. 336-349.
- [5] Fishinger P. J., 1987. *Intern. Cancer News*. 5: 4-12.
- [6] Barbacid M., 1986. *Carcinogenesis* 7: 1037-1042.
- [7] 顾健人等, 1985, 肿瘤, 5: 52-55.
- [8] 刘 黎等, 1979, 动物学报, 25: 1-7.
- [9] 丛笑倩等, 1980, 实验生物学报, 13: 317-329.
- [10] 张宗梁等, 1978, 科学通报, 23: 185-188.
- [11] 谢 弘等, 1985, 实验生物学报, 18: 265-273.
- [12] O'Guin W. M. et al., 1985. *Tissue Culture Methods* 9: 123-128.
- [13] Moll R. et al., 1982. *Cell* 31: 11-24.
- [14] 张荣兴、潘玉芝, 1988, 实验生物学报(付印中)。
- [15] Fojo A. T. et al., 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 84: 265-269.
- [16] 沈鼎武等, 未发表资料。

## 人类特定染色体 DNA 文库的建立和利用(续)

### 四、克隆

1. DNA 分离和克隆: 分选出的染色体 ( $0.2-1.0 \times 10^6$ ) 是克隆的原材料, 在低浓度时还要离心浓缩。(Los Alamos 实验室用多胺法分离染色体, 浓缩容易丢失 DNA, 因此不进行这一步, 而是在分选缓

冲液中加 SDS 和蛋白酶 K 直接处理染色体)。下一步骤是抽提、纯化、消化并把染色体 DNA 接到载体臂上, 然后用  $\lambda$  噬菌体外壳蛋白包装重组 DNA, 最后一步将重组的噬菌体放在含有大肠杆菌 LE 392 株的琼脂平板上生长扩增, 并洗涤平板裂解液。用离心法