

两个癌基因转化细胞系的建立

甄 珠* 郭 征

(北京市肿瘤防治研究所遗传室)

ras 和 **myc** 是人类肿瘤中发现最多的两种癌基因。为了探讨这两种癌基因在细胞恶变中的作用机制,我们用从人胃癌细胞系 **BGC-823** 中分离克隆得到的 **BGC-ras^{H(1,2)}** 和 **pSV v-myc** 对第四代 **Fisher** 大鼠胚胎细胞(简称 **REF**) 和 **NIH 3 T 3** 小鼠成纤维细胞系进行了体外转化,获得了两个恶性转化细胞系 **REF₄₋₃** 和 **BGC 3 T 3**。转化细胞可以稳定传代,接种于裸小鼠显示具高度成瘤性。

材 料 和 方 法

1. **癌基因** **pGC 6.6** 是从人胃癌细胞系 **BGC 823** 中克隆出的癌基因 **Ha-ras(6.6 kb)** 的次级克隆,其中 **ras** 癌基因称 **BGC-ras^H**。由北京肿瘤研究所生化室提供。**pSVv-myc** 是带有 **v-myc** 癌基因的重组质粒,由美国 **Weinberg** 实验室提供。

2. **受体细胞及其培养** **REF** 第二代全胚细胞和 **NIH 3 T 3** 均由美国 **Weinberg** 实验室引入。用含 10% 胎牛或小牛血清的 **DMEM** 培养液培养,辅加终浓度为 $0.125 \mu\text{mol/L}$ 的地塞米松。

3. **DNA 转染及转化细胞的培养** 采用 **Graham^[3]** 和 **Shih^[4]** 的 **DNA-CaHPO₄** 共沉淀法并稍加改进。用 $2 \mu\text{g}$ **pGC 6.6** 质粒 DNA 加 $30 \mu\text{g}$ 小牛胸腺 DNA (作载体),转染 5×10^5 **NIH 3 T 3** 细胞。后以 1:10 传代。用 **pGC 6.6** 和 **pSVv-myc** 各 $2 \mu\text{g}$ 加 $20 \mu\text{g}$ 小牛胸腺 DNA 转染 5×10^5 第四代 **REF** 细胞。转染 5 小时后用含 15% 甘油转染缓冲液处理细胞 3 分钟,24 小时后 1:4 传代。待细胞长至铺满瓶底约 80% 时降低血清至 5%。然后每三天更换培养液,长期不传代培养。于第 2~5 周观察并挑选转化灶。挑出的转化灶细胞扩大培养,备做下列各项检测。

4. **动物致瘤实验** 用 4 周龄 **BALB/C nu/nu** 裸小鼠(由北京医科大学购入)进行动物致瘤实验。消化收集生长旺盛的转化及对照细胞,用无血清培养液洗

三遍,制成 $1 \times 10^6/0.1 \text{ ml}$ 的细胞悬液,以 $3 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞/只的不同数量接种于裸鼠背部皮下。随时观察接种动物肿瘤生长情况。

5. **Southern 印迹试验** 参照 **Shih^[4]** 的方法提取转化及对照细胞 DNA,用 **BamHI** 限制性内切酶酶解,进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,参照 **Maniatis** 方法^[5] 吸印转移,用缺口翻译法以 $(\alpha\text{-}^{32}\text{p})\text{dCTP}$ (比度 $3000 \text{ Ci/mmol}\cdot\text{L}$) 标记制备 6.6 kb 的 **Ha-ras** 基因探针,进行分子杂交和放射自显影。

6. **染色体分析** 用常规培养细胞的染色体制作方法^[6],制成细胞染色体标本。观察计数 50 个以上的中期分裂相。

7. **转化细胞的电镜观察** 收集 5×10^5 个转化细胞, 1000 r/m 离心 10 分钟,1% 戊二醛固定 30 分钟,1% 锇酸固定 2 小时。酒精逐级脱水, **Epon 812** 包埋。超薄切片,透射电镜观察并照像。

结 果

REF 细胞用 **BGC-ras^H** 和 **v-myc** 癌基因转染后第 4~5 周在单层成纤维细胞背景上长出上皮样细胞的转化灶(图版图 1)。转化灶迅速增大,细胞由原转化前长梭形或不规则形变为圆形和纺锤形(图版图 2、3)。细胞胞质少,折光性明显增强,核大,核仁清晰可见。与转染细胞同样,对照组细胞也长期不传代,低血清培养,则逐渐衰老死亡。而实验组的转化细胞被挑出后,在 10% 和 5% 血清的培养中均可生长良好,并能长期稳定传代,称为 **REF₄₋₃** 细胞系。

NIH 3 T 3 细胞在转染后第 3 周出现转化灶。转化细胞失去接触抑制而密集重叠生长。细胞呈长梭形,折光性增强,生长方向紊乱,

*现在中国医科院肿瘤研究所

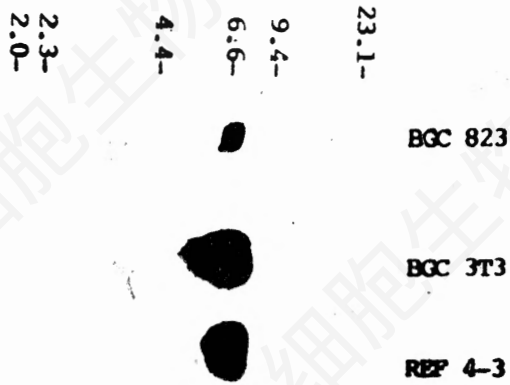


图 转化细胞(REF₄₋₃, BGC 3 T 3)DNA 的 Southern 杂交, (6.6 kb 的 Ha-ras 为探针).

称为 BGC 3 T 3 细胞系。

两个转化细胞系染色体数目的检查结果显

示, REF₄₋₃染色体呈高度异倍体。计数 69 个中期分裂相, 染色体数目分散于 37~126 之间, 众数 40~45(占 40%)。BGC 3 T 3 细胞的染色体在数目上无明显改变, 仍为转染前的亚三倍体。

DNA 分子杂交结果显示, 转化细胞的 DNA 与 6.6 Kb 的 Ha-ras 杂交带位置与 BGC 823 细胞 DNA 的杂交带位置相同(图)。说明 REF₄₋₃和 BGC 3 T 3 细胞的 DNA 中都有人细胞来源的 ras 基因整合。

在动物致瘤试验中, REF₄₋₃最少可用 3×10^5 个细胞接种裸小鼠就生长进行性增大的皮下肿瘤(图版图 4)。BGC 3 T 3 以 5×10^5 个细胞接种也可成瘤, 而对照组用 3×10^6 个未转染过的 REF 和 NIH 3 T 3 细胞接种, 均无肿瘤生长, 其结果见下表。

接种转化及对照细胞于裸小鼠的致瘤试验结果

接种细胞	接种数量(细胞数/只)	致瘤动物数/ 接种动物数	肿瘤生长情况
BGC 3 T 3	$5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$	3/3	两周见迅速生长的皮下肿瘤, 其中一只肿瘤的浸润和扩散。
REF ₄₋₃	$3 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$	3/3	两周生长进行性增大的皮下肿瘤, 镜下见浸润。
NIH 3 T 3	3×10^6	0/1	饲养两月无肿瘤生长。
REF(第六代)	3×10^6	0/1	饲养两月无肿瘤生长。

两种动物肿瘤可在 BALB/C 裸小鼠移植, 已传至 5 代, 仍保持原有瘤细胞的特征。在 10 只 4~6 周龄裸鼠的移植成活率为 100%。

电镜观察, 见这两种转化细胞表面微绒毛长而密, 核大, 核形不规则, 核仁 2~3 个。其中 REF₄₋₃胞质甚少, 核和核仁异常的大而清楚(图版图 5)。

讨 论

用 BGC-ras^H 和 pSVv-myc 癌基因共转染 REF 及 BGC-ras^H 单独转染 NIH 3 T 3 都获得了相应的恶性转化细胞。与 NIH 3 T 3 细胞不同, REF 细胞是没有获得体外无限分裂增殖能力的早期传代细胞, 我们曾单独用 BGC-ras 或 v-myc 转染, 但都不能对其进行转化, 而在以这两个癌基因共转染时, 则使细胞形态和

染色体数目都发生明显的改变, 并对裸鼠有较高的致瘤性, 建成用癌基因转化的恶性细胞系。NIH 3 T 3 在转染前就是获得无限分裂增殖能力的永生细胞系, 但细胞仍具接触性生长抑制, 动物接种一般不长肿瘤。用 BGC-ras^H 转染使这一细胞失去接触抑制, 并获得致瘤性。

实验组的 Southern 印迹的结果和对照组以及单独 BGC-ras^H 或 v-myc 转染的结果表明, REF₄₋₃ 的恶性表型是由于 BGC-ras^H 和 v-myc 癌基因的转入而引起的, 说明了 ras 和 myc 在 REF 细胞恶性转化中的协同作用。这一转化细胞系的建立为研究细胞的恶变与去恶变和细胞恶性度与癌基因的表达状态的关系等提供了有用的细胞体系。

摘 要

用 BGC-ras^H 和 v-myc 共转染第四代大鼠

全胚细胞 (REF), BGC-ras^H 单独转染 NIH 3T3 小鼠成纤维细胞分别获得两个恶性转化细胞系 REF₄₋₃ 和 BGC 3T3。其中 REF₄₋₃ 由一早代成纤维样细胞转化成为上皮样的、染色体高度异倍体化并可稳定传代的细胞。两种转化细胞均可接种裸鼠致瘤, 成为二个用癌基因转化建立的细胞系。

图版说明

图1 BGC-ras^H 和 pSV-myc 共转染 REF 的转化灶。图为转化灶和未转化背景细胞的交界处。负相差 100×。

图2 转染前的 REF 细胞。负相差 200×。

图3 转化后 REF₄₋₃ 细胞。负相差 200×。

图4 REF₄₋₃ 转化细胞接种裸小鼠。八周时生长的皮下肿瘤直径约达 4 cm。

图5 转化细胞 REF₄₋₃ 透射电镜图像, 10000×。图中可见细胞核大, 形状不规则, 核仁大而清晰, 胞质少。箭头所示为细胞界限。

参 考 文 献

- [1] 吕有勇等。1986年, 中华肿瘤杂志, 8: 241。
- [2] 邓国仁等。1987年, 中国科学B辑, (1): 69。
- [3] Graham FL, Van der EB., 1973, *virology*, 52: 546。
- [4] Shih C, Weinberg RA., 1982, *Cell*, 29: 161。
- [5] Maniatis T, et al. 1983, *Molecular Cloning*, 6th ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, CSH, pp. 109。
- [6] 鄂征等。1988年, 《组织培养技术》, 人民卫生出版社, pp. 236。

铈在磷酸酶电镜细胞化学中的应用

汤雪明

(上海第二医科大学)

酶的电镜细胞化学常用的方法是, 在一定条件下使细胞内的酶作用于酶的底物, 再将酶反应的产物作为反应物质, 在酶的作用部位进行捕捉, 使其在电镜下具有可见性。因此, 酶的电镜细胞化学包括两个反应: 第一个是酶作用于底物的反应, 称酶反应, 形成的产物为初级反应产物; 第二个是捕捉剂与初级反应产物的作用, 称捕捉反应, 形成最终反应产物。在磷酸酶细胞化学反应中, 酶作用于底物所产生的初级反应产物为磷酸, 常用铅作为捕捉剂, 与磷酸反应形成高电子密度的磷酸铅沉淀, 在电镜下具有可见性。

由于铅捕捉剂对酶有一定抑制作用, 而且容易产生非特异性反应, 常常给细胞化学实验带来一定困难。近年来, 人们开始寻找新的捕捉剂, 其中铈(cerium)是较理想的一种^[1]。我

们采用这种新捕捉剂铈开展了胞嘧啶核苷酸酶(CMP酶)和葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P酶)的细胞化学反应, 实验结果表明, 与铅捕捉剂相比, 铈具有很多优点, 细胞化学反应效果较好。

材 料 和 方 法

实验动物为雄性大鼠, 用血管灌注方法固定肝、肾和睾丸等组织, 然后进行细胞化学反应, 具体步骤如下:

1. 用 1.5% 戊二醛固定液 (pH 7.4) 灌注固定大鼠的各种组织, 然后取下组织, 切成长条状组织块, 再在同样固定液中浸泡固定 15 分钟;
2. 用 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 充分漂洗组织, 并置于冰箱 (4℃) 过夜;
3. 将长条形组织块埋在 7% 琼脂中, 用 Sorvall TC-2 组织切片机把组织切成 40 微米厚的组织片, 继