

# 体外小鼠胚胎性癌细胞 BEC-B7 建株和特性

施渭康 丛笑倩

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

恶性畸胎瘤干细胞又叫做胚胎性癌细胞(简称 EC 细胞),是一种来自生殖细胞或早期胚胎细胞的恶性癌细胞,不仅具有类似于早期胚胎细胞分化多能性,而且能在一定条件下失去恶性生长性质,分化为各个胚层的正常组织<sup>[1-3]</sup>。EC 细胞是开展哺乳类胚胎早期发育遗传以及癌变和癌细胞分化研究较好的实验材料。EC 细胞在体外可以大量培养生长,较之正常胚胎细胞更容易获取。我们在建立体内腹水型 EC 细胞株(BEC 株)<sup>[4]</sup>的基础上,建立了具有多分化潜能的体外小鼠 EC 细胞株,至今已传 90 余代,定名为 BEC-B7。现将建株方法及其一些特性简要报道如下。

## 材料和方法

### 一、癌细胞来源及培养液

1. 129/SV 纯系小鼠自发睾丸畸胎瘤,经同系小鼠腹腔传至第七代的血性腹水畸胎瘤干细胞<sup>[4]</sup>。

2. 含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,并于 1000 毫升培养液中加入 5 克葡萄糖和 300 毫克 L-谷氨酰胺,再按常规加入抗菌素。

3. 0.2% 胰酶(内含 0.1% EDTA)处理细胞,得单个细胞悬液。

### 二、培养方法

无菌条件下取出含癌细胞的血性腹水,置于消毒的锥形离心管中,加入培养液并搅匀后置室温自然沉降,反复 3 次,每次 15 分钟,以去除血细胞。沉降后离心管底部的细胞大多数是 EC 细胞和拟胚体。用 0.2% 胰酶消化 5 分钟,得单个细胞悬液。再加 Hank's 液稀释,终止消化,500 转/分离心 5 分钟,弃上清液。经培养液洗 3 次后再悬浮在培养液中,于小北京瓶内 37℃ 静置培养。第二天显微镜下观察,大多数为贴壁细胞,其余为飘浮的细胞及团块。细胞生长旺盛,培养液的 pH 明显变酸。第三天保留 1/3 旧培养液,加 2/3 新培养液。第五天传代,以后每隔 2—3 天传代

一次。传代时接种细胞数一般为每毫升 5 万。目前生长稳定,历时 9 个多月。

在建株过程的前 10 代,我们用 0.2% 胰酶消化细胞,此后只用缺钙和镁离子的 Hank's 液冲散,500 转/分离心 5 分钟,沉淀的细胞再加入适量新鲜培养液,冲匀后于 37℃ 培养箱内培养即可。

### 三、EC 细胞形态与分化潜能分析

传代培养三天的 EC 细胞,作相差显微镜观察。另一部分细胞在离心后用 Hank's 液洗涤两次,细胞团块经 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定, Epon 812 包埋作电镜观察。

不同代的培养细胞,用 PBS 洗两次后,注射  $5 \times 10^5$  细胞到同系成年小鼠前腋下,约三星期长出大约 1 立方厘米的瘤块。瘤块用 Bouin 氏液固定,常规石蜡切片,HE 染色后镜检。

### 四、染色体制备

取不同代的培养细胞,加秋水仙素,最终浓度为 0.1 微克/毫升。4 小时后取出细胞,用 Hank's 液洗两次,然后于 37℃ 中用 0.56% KCl 低渗处理 5—7 分钟,再用甲醇和冰醋酸(3:1)混合液固定 20 分钟。重复 3 次,滴片,空气干燥,姬姆萨液染色。

## 结果和讨论

### 一、细胞形态和超显微结构

在相差显微镜下观察,细胞大小不一,直径范围多数为 12—16 微米;细胞为圆形,有拟胚体,也有少量上皮样分化细胞(图版图 1, 2)。电镜观察结果表明胚胎性癌细胞的核呈圆形或不规则分叶,有分散的常染色质,并有 1—2 个大核仁。细胞质结构简单,含有大量游离的核糖体和少量线粒体,偶见高尔基氏体复合物,但很少有光滑的内质网系(图版,图 3)。

本文承姚鑫教授指导;包林平,季闻行和李秀兰参加实验工作;钟逸新协助照相制作,特此致谢。

## 二、细胞生长特性

细胞在培养瓶内以半悬浮状态生长：多数细胞贴壁，另一部分悬浮于培养液中，若再将贴壁型和悬浮型细胞分别单独培养，仍可得到上述两类细胞。细胞接种数影响细胞生长速率。一般细胞在第二天后开始迅速生长。细胞最适接种数为  $5 \times 10^4$ /毫升，至第六天细胞数达到  $75 \times 10^4$ /毫升时即达到生长饱和密度(图1)，这时细胞的最大增长数为15倍。细胞接种数  $10 \times 10^4$ /毫升时，虽也在第6天达到生长饱和

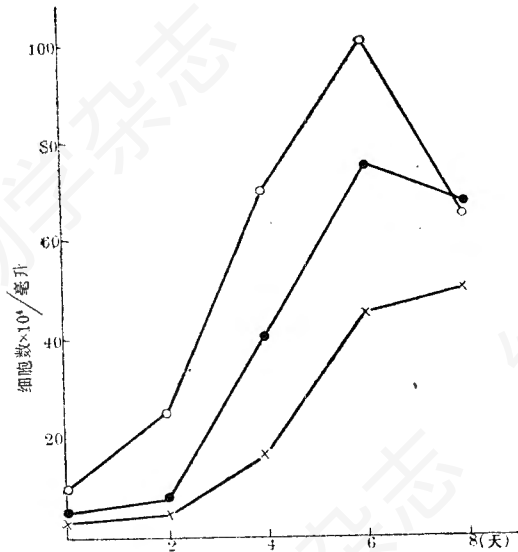


图1 BEC-B7细胞增长曲线

○—○细胞接种数  $10 \times 10^4$ /毫升  
●—●细胞接种数  $5 \times 10^4$ /毫升  
×—×细胞接种数  $3 \times 10^4$ /毫升

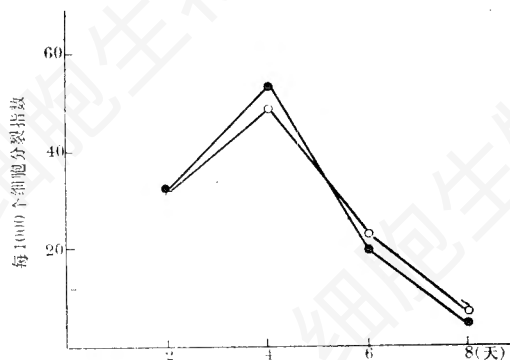


图2 BEC-B7细胞株分裂指数

●—●细胞接种数 10万/毫升  
○—○细胞接种数 5万/毫升

密度，但细胞增长数为10倍，而且上皮样细胞增多，也出现较多的细胞自溶现象。

## 三、细胞分裂指数

在计算细胞生长率的同时，随机取一些细胞用甲醇和冰醋酸(3:1)混合液固定。涂片，姬姆萨液染色。每次计数2,000个细胞，观察分裂相，比较  $5 \times 10^4$ /毫升和  $10 \times 10^4$ /毫升两种不同细胞浓度的细胞，分裂指数分别为4.9%和5.3%，没有显著差异(图2)。

## 四、染色体计数分析

随着培养代数的增加，染色体为40的众数略有变化(表1)。虽然因传代数增加染色体为40细胞的百分率增加或下降的规律还不明确，但是异倍体有增加倾向，少数细胞的染色体数可达到70个以上。染色体本身结构常出现中部着丝点，也有标记染色体，染色体易位，微体形成等异常现象。这表明BEC-B7细胞染色体具一般肿瘤细胞染色体的某些属性。

表1 培养过程中BEC-B7细胞染色体众数变化

培养代数	2	6	15	36	50	60	75
染色体40主流数(%)	29	26.8	35.9	36	44	40	47

## 五、细胞分化潜能

把不同培养代数的BEC-B7细胞，接种到同系宿主皮下，均能长出瘤块，最终使宿主死亡。肿瘤组织经切片观察，表明BEC-B7细胞具有多潜能发育分化的性质。在同一个肿块中除EC细胞癌灶以外，常可观察到三个胚层的分化结构。主要有神经管、软骨、血管和腺管等组织，也有类似肾脏的结构(图版，图4-7)，未发现分化组织的类型随着细胞传代的增加而有所改变。在个别瘤块的连续切片中，仅发现神经管或神经细胞。造成EC细胞分化上这种差别的原因还不清楚，可能是接种时的EC细胞本身分化状态或宿主环境不同所致。通过BEC-B7细胞株的单克隆途径以提供更多的证据才有可能阐明EC细胞差异的原因。