

人体肝癌细胞系体外恶性浸润行为的研究*

陆荣华 陈尊器** 陈瑞铭

(中国科学院上海细胞生物研究所)

恶性浸润和无限增殖是恶性肿瘤细胞生物学行为的两大特征,常被作为区别肿瘤良、恶性的重要标志,多年来已受到细胞生物学家和临床学家所重视。近年,国外运用组织培养术对人体和动物某些肿瘤的体外浸润曾做了一些工作,虽然有个别观察结肠癌肝转移标本的体外浸润^[1-5],但是,对于人体肝癌的类似研究,迄今文献上尚未见报道。现就我们对人体肝癌细胞系与鸡胚中肾器官联合培养的实验结果报道于下。

材料及方法

一、实验组 采用人体肝癌 BEL-7402^[6]及 BEL-7404 细胞系^[7],在含有 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中单层培养 72 小时,经胰酶液消化,收集细胞。

靶器官用鸡胚龄为 $8\frac{1}{2}$ 天的中肾组织,在解剖显微镜下切成约 1mm^3 的小块。

以 3% 琼脂 2 份, 双倍浓度 RPMI-1640 培养液 2 份, 小牛血清 1 份, 10 天鸡胚抽提液(1:1 浓度) 1 份的比例, 混合制成半固体培养基, pH7.4, 铺于胚胎培养皿^[8], 凝固后, 在培养基表面制作好 3—4 个等距离的小坑(如图 1), 将中肾小块接种于坑内, 然后分别滴加 1 滴浓缩细胞, 静置片刻, 待其自然沉积于中肾小块的表面和四周围。培养皿加盖密封, 置 37℃ 恒温箱中进行联合培养, 培养第 1、3、5、7 天间隔取样, 标本以 Bouin 氏液固定, 琼脂-石蜡双重包埋, 连续切片。片厚 6μ , H.E. 染色, 封片后作光学显微镜检查。

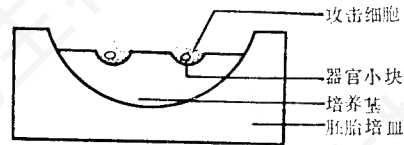


图 1 联合培养示意图

* 戴信兰同志参加部分技术工作。

** 河南省肿瘤研究所。

小 结

BEC-B7 是体外培养的畸胎瘤细胞株, 引自小鼠自发睾丸畸胎瘤经体内移植的腹水型畸胎瘤细胞 BEC 株。尽管 EC 细胞群落中的一些细胞染色体出现异常现象, 但仍然保留着多潜能的分化性质。BEC-B7 细胞在体外彼此粘附性较强, 常聚集成团, 可进一步形成拟胚体或不同类型的分化细胞, 因此需每隔 2—3 天更换培养液和传代; 体内皮下接种同系宿主后, BEC-B7 细胞可导致其死亡, 瘤组织中除未分化的 EC 细胞外常包括多种类型的体组织。

参 考 资 料

[1] Stevens, L. C., 1967 *Advances in morphogenesis*. ed. Abercrombie, M. and

Brachet, J., pp 1—28. Academic press Inc.

[2] Solter, D., and Damjanov, I., 1979 *Methods in cancer research* vol XVIII, 277—332

[3] Martin, G. R., and Evans, M. J., 1975 *Cell*, 6: 467—474

[4] 丛笑倩等。1982, 肿瘤, 2(1); 40—41

图 版 说 明

图 1—2 BEC-B7 体外培养细胞。箭头示拟胚体。×600

图 3 BEC-B7 培养细胞的电镜照片, 右下角为一分化细胞。细胞核(N), 溶酶体(L), 线粒体(M)。×10,000

图 4—7 BEC-B7 培养细胞接种于同系小鼠, 在长出瘤块中的分化组织有神经管(图 4, ×180)、软骨(图 5, ×360)、肾小管(图 6, ×180)和腺管上皮(图 7, ×600)

二、对照组 采用正常人胚肺 SL7 细胞系^[9], 在含有 10% 小牛血清的 Eagle's 培养液中培养 36 小时, 经胰酶液消化, 收集细胞。

以 3% 琼脂 2 份, 双倍浓度 Eagle's 培养液 2 份, 小牛血清 1 份, 10 天鸡胚抽提液(1:1 浓度) 1 份的比例, 混合制成半固体培养基, pH7.3, 铺于胚胎培养皿。对照组所用的靶器官、接种方法、培养条件、取样时间和制片等, 均同实验组。

此外, 又用实验组及对照组的半固体培养基, 分别单独接种鸡胚中肾组织而不加浓缩癌细胞作为空白对照, 其他处理条件均与对照组相同。

结 果

不加浓缩癌细胞的鸡胚中肾组织, 在 RPMI-1640 或 Eagle's 培养基中, 经历 1—7 天的单独培养, 都能健康存活。

一、实验组 1—7 天联合培养的标本, 在显微镜下见鸡胚中肾组织由多个肾小管和少量的间质细胞所构成。肾小管上皮呈单层立方或高柱状, 细胞界限清晰, 排列整齐, 胞质较稀疏, 核圆形, 大小比较一致, 位于细胞的中央或偏底部。间质细胞呈短梭形, 体积较中肾管上皮细胞为小, 核质较浓集, 这些细胞散在于中肾小管之间, 无一定排列位置。

肝癌细胞为圆或椭圆形, 核呈明显异型性, 核膜较厚, 核质粗细不均, 核仁较大, 多为一个以上。肝癌细胞的形态, 一般不难与鸡胚中肾上皮细胞和间质细胞相区别。

切片可见两系肝癌细胞都能紧密粘着于中肾组织的周围, 有的单个、有的成索状或成群穿入组织, 呈灶性或弥散性浸润于中肾组织之间和小管内。在第 1—2 天的培养物中, 癌细胞多为单个或 2—3 个穿入于组织的较浅层, 散在地浸润于组织之间(图版 I, 图 2)。第 3—7 天的培养物中, 则以小群或索状的浸润更多见, 且可达组织之深层(图版 I, 图 1)。被浸润较广泛的组织, 还可见到部分中肾小管上皮脱落, 有的可为侵入的癌细胞所取代, 组织结构紊乱等受破坏现象(图版 I, 图 3)。偶而还可见到个别癌细胞呈顶尖底宽的长锥形, 似

阿米巴样运动穿入组织。

二、对照组 在联合培养的标本中, 鸡胚中肾组织结构形态特点如实验组所描述。

正常人胚肺 SL7 细胞多呈长梭形, 大小比较一致, 常聚集成簇或旋涡样。核多为椭圆形, 位于细胞中部。经过联合培养结果可见, SL7 细胞也粘着于中肾器官的周围, 但在 1—7 天的培养物中, 均未见到有像肝癌细胞那样明显的穿入、浸润或破坏中肾组织等现象(图版 I, 图 4)。

讨 论

自从 Fischer 1925 年首先报道了体外恶变细胞的浸润之后^[10], 许多学者试图模拟体内浸润来研究肿瘤细胞的生物学特性^[11-16]。然而要在体外研究肿瘤的浸润行为, 尽管可以采取不同的方法和实验设计, 但均应力求接近于体内情况。基于这种观点, 用三维体(Tri-dimensional)联合培养要比二维体或单层培养更为优越和合理。事实表明, 某些采用二维体或单层培养未能证实恶变细胞浸润能力的实验, 在三维体培养中就可获得阳性的结果^[11,17]。我们将中肾组织小块接种于经在培养基表面制作好的小坑中, 是为使攻击细胞能聚集和沉积于靶器官的表面和四周围, 创造一种有利于靶器官在体外受到攻击细胞多面包围的环境, 因此也获得比较满意的结果。

人体和动物的恶性细胞对同种或异种靶器官的体外浸润的证据, 国外文献上已有过一些报道^[18-20]。人们观察到恶性细胞粘着于培养物的周围, 穿入、浸润或破坏组织, 其浸润或破坏的程度不尽相同, 但来自良性肿瘤或正常的细胞则无浸润破坏的现象, 因此表明良性和恶性细胞在体外的生物学行为是有明显差别的。然而所见到的这些实验, 除曾有过个别对结肠癌的肝转移标本的观察外, 对于人体肝癌体外浸润的有关研究, 迄今尚未见到报道。我们采用人体肝癌 BEL-7402 及 BEL-7404 细胞系与鸡胚中肾器官联合培养, 观察到有粘

着、穿入、浸润和破坏靶器官的现象,表明人体肝癌细胞系在体外仍然保持着恶性生物学行为的特性。这些结果,与文献上对其他恶性细胞所见的基本一致。同时,我们也曾观察到个别的癌细胞呈顶尖底宽的长锥形,这种细胞形状似可视为穿入组织、像阿米巴样运动的活跃趋势的一种表现。至于其出现频率的多寡或靶器官被破坏的范围,是否可作为估计肿瘤的恶性程度,尚有待进一步研究阐明。此外,我们又曾用大鼠诱发肝癌 CBRH-7919 细胞系^[21]做过类似实验,也见到有明显的粘附、侵入和浸润中肾组织的现象^[22],说明其他哺乳动物的肝癌细胞,在体外也有浸润的恶性行为。

恶性细胞与靶器官体外联合培养的方法,可望用于研究恶性肿瘤浸润的机制。有人认为浸润的机制与某些酶^[23]、特别是恶性细胞分泌溶菌酶^[24]、或影响细胞的微管结构^[25]、或与高频率出现标记染色体^[26]等有关。关于肝癌细胞的浸润机制的问题,值得今后进一步探讨研究。

结 语

用鸡胚中肾组织与人体肝癌细胞系行联合培养,在1—7天的培养标本中,观察到两系癌细胞在体外能粘着、穿入、浸润及破坏靶器官,表明人体肝癌 BEL-7402 及 BEL-7404 细胞系在体外仍然保持着恶性生物学行为的特性,而正常人胚肺 SL7 细胞系则无浸润破坏中肾组织的现象。体外器官与细胞联合培养的方法,可望用于对恶性肿瘤浸润机制的理论研究,能否也可发展成为临床诊断肿瘤和估计预后提供一个有效的体外指标,很值得进一步研究解决。

参 考 文 献

- [1] Mareel, M. et al., 1975. *J. Natl. Canc. Inst.*, 54: 923—929.
[2] Nogucki, P. D. et al., 1978. *Science*,

- 199: 980—983.
[3] Roos, E. et al., 1978. *Brit. J. Canc.* 38: 88—99.
[4] Leighton, J. et al., 1967. *Science*, 155: 1259—1261.
[5] Wolff, E. et al., 1963. *Sciences*, 256: 1173—1174.
[6] 陈瑞铭等。1978. *实验生物学报*, 11: 37—44。
[7] 陈瑞铭等。1979. *中国科学*, 12: 1225—1233。
[8] 陆荣华等。1978. *实验生物学报*, 11: 137—139。
[9] 宋家骊等。1980. *实验生物学报*, 13: 444—445。
[10] Fischer, A., 1925. *Roux Archiv* 104: 210—261.
[11] Wolff, E. T. et al., 1975. *Human tumor cells in vitro*, Fogh, J., ed. p207—240, Plenum Press, New York and London.
[12] Hart, I. R. et al., 1978. *Cancer Res.*, 38: 3218—3224.
[13] Kalus, M. et al., 1968. *Cancer*, 22: 507—516.
[14] Leighton, J., 1954. *J. Natl. Canc. Inst.* 15: 275—294.
[15] Leighton, J., 1951. *J. Natl. Canc. Inst.* 12: 545—561.
[16] Easty, G. C. et al., 1963. *Nature*, 199: 1104—1105.
[17] Mareel, M. et al., 1979. *Virchows Arch. B Cell Paty.*, 30: 95—111.
[18] Mareel, M. et al., 1977. *Oncology*, 34: 6—9.
[19] Easty, D. M. et al., 1973. *Brit. J. Canc.*, 29: 36—49.
[20] Schleich, A. B. et al., 1976. *J. Natl. Canc. Inst.*, 56: 221—237.
[21] 朱德厚等。1980. *实验生物学报*, 13: 111—112。
[22] 陈尊器等。1981. 未发表资料。
[23] Yarnell, M. M. et al., 1969. *Europ. J. Canc.*, 5: 265—269.
[24] Latner, A. L. et al., 1973. *Brit. J. Canc.*, 27: 460—464.
[25] Mareel, M. K. et al., 1978. *J. Natl. Canc. Inst.*, 61: 787—792.
[26] Lubs, J. A. et al., 1967. *Ann. Intl. Med.*, 67: 328—336.

(下转第36页)

胞茂密生长繁殖, 并进行直接分裂及有丝分裂, 活细胞率在90%以上, 且有进行亮氨酸掺入的功能。同时, 可节省培养液消耗量2.5—3.0倍。测定培养细胞总蛋白量及同位素掺入量, 可作为判定细胞实际产量和功能状态的指标。

微载体悬浮培养法为细胞生物学研究和病毒及其他生物制品的生产提供了大量的细胞, 且可为某些不能在悬浮培养情况下生长的细胞, 如原代细胞、双倍体细胞的转向悬浮培养及大量繁殖提供有效的手段。

参 考 文 献

- [1] Van Wezel A. L., 1973, *Tissue Culture- Methods and Applications* ed. by Paul F. Kruce, Academic Press, p. 372—377.
 [2] Levien, D. W. et al., 1977, *Cell Culture and its Application*, ed by Action, R. t. et al., Academic Press, New York, p. 191—216.
 [3] 陈瑞铭等, 1978. *实验生物学报*, 11: 157—165.
 [4] Weiss, R. E. et al., 1968, *Biotech. Bioeng.*, 10: 601—615.
 [5] House, W. et al., 1972, *Exp. Cell Res.*, 71: 293—296.
 [6] Knazer, R. A. et al., 1972. *Science*,

178: 65—67.

- [7] Van Wezel A. L., 1967. *Nature*, 216: 64—65.
 [8] Schleicher, J. B. et al., 1968, *Biotech. Bioeng.*, 10: 617—624.
 [9] Chi-Byi Horng et al., 1975. *Biotech. Bioeng.*, 17: 713—732.
 [10] Knight, E., 1977, *App. Envir. Microbiol.*, 33: 666—669.
 [11] Giard, D. J. et al., 1977, *App. Envir. Microbiol.*, 34: 668—672.
 [12] Levine D. W. et al., 1977, *Somatic cell Genetics*, 3: 149—155.
 [13] Van Wezel A. L. et al., 1978, *Process Bioch.*, 13: 6—8.
 [14] Microcarrier Cell Culture technical notes. Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

图 版 说 明

图 1 HeLa 细胞, Cytodex-1 悬浮培养 5 天, 细胞生长繁殖旺盛, 相差 $\times 350$ 。

图 2 CBRH-7919 细胞, Cytodex-1 悬浮培养 3 天, 相差 $\times 700$ 。

图 3 BEL-7402 细胞, DEAE-Sephadex-A50 悬浮培养 3 天, 相差 $\times 350$ 。

图 4 HeLa 细胞, Cytodex-1 悬浮培养 36 小时, 箭头示有丝分裂, 相差定格摄影 $\times 700$ 。

陆荣华等图版说明

图 版 说 明

图 1 人体肝癌细胞 BEL-7402 系与鸡胚中肾联合培养 84 小时, 癌细胞(Ca)紧密粘着于中肾器官(M)周围, 成索状(箭头)浸润于组织深层。H.E.染色 $\times 108$

图 2 人体肝癌细胞 BEL-7404 系与鸡胚中肾联合培养 24 小时, 癌细胞(Ca)紧密粘着于中肾器官

(M)周围, 四个癌细胞(箭头)侵入于组织的浅层。H.E.染色 $\times 360$ 。

图 3 人体肝癌细胞 BEL-7402 系与鸡胚中肾联合培养 84 小时, 肾小管(M)有部分上皮脱落, 为浸润的癌细胞所取代(箭头), H.E.染色 $\times 360$ 。

图 4 正常人胚肺 SL7 细胞(C)系与鸡胚中肾联合培养 48 小时, 细胞成簇聚集, 紧密粘着于器官(M), 但不浸润组织(箭头), H.E.染色 $\times 215$ 。