



红细胞血影介导的大分子微量注入肝癌细胞**

叶秀珍 朱德厚 陈尊器* 陈瑞铭

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

引言

真核细胞的基因表达受多种因子或环境信号的调节,其中,外源蛋白质或核酸分子对细胞基因表达的影响日益受到重视。近年来,在细胞融合基础上建立的红细胞介导大分子进入哺乳类细胞的微量注射技术^[1-7],为研究外源大分子物质在细胞内的功能及其对细胞基因表达的调控提供了有效的手段。它使一些已经在非细胞系统(如分离的染色质系统)得到证实的结果,如非组蛋白染色体蛋白质在动物细胞分化的正调节作用等研究,有可能从非细胞系统转至一个活细胞内进行^[8]。由于活细胞内有天然的转录模板和翻译系统,是研究基因表达调节机制的理想模型,而且红细胞血影介导的微量注射方法能在短时间内把大分子迅速地引入多量的活细胞内(10^7 左右)^[6],这对于细胞表型的生化分析和进行细胞水平上的分子生物学研究都是十分有利的。

我们为开展肝癌细胞专一蛋白的基因表达和调控研究,用红细胞血影介导三种体积不同的大分子或颗粒微量注射到肝癌细胞内获得成功。本文总结制备兔红细胞装载血清白蛋白、血清白蛋白的抗体和印度墨汁颗粒的血影,并通过聚乙二醇(PEG)融合剂微量注入人和大鼠肝癌细胞的实验结果。这为进一步研究肝癌细胞的基因表达和调控提供一个重要手段。

材料与 方法

一、培养细胞、红细胞、大分子和颗粒

人肝癌细胞系(BEL-7402)和大鼠肝癌细胞系(CBRH-7919)细胞单层培养于含有20%小牛血清的RPMI-1640培养液,传代后3天,用作大分子微量注射的受体细胞。

红细胞取自成年兔(约3公斤)耳血,用 K^+ 和 Na^+ 含量倒置的缺 Ca^{++} 、 Mg^{++} 的Hanks'盐溶液(K^+ -DHK)或其他生理盐溶液(PBS pH6.8; RPMI-1640液;保存人红细胞用的ACD液;Hanks'液或 K^+ 、 Na^+ 含量倒置的Hanks'液)洗涤,1500转/分离心10分钟,去上清液,反复洗涤3次,除去白细胞。所得红细胞压积计数为 $2 \times 10^9/0.1$ 毫升,最后保存于等渗生理盐溶液,置4℃冰箱备用。

大分子和颗粒:¹²⁵I-牛血清白蛋白(¹²⁵I-BSA, 0.85微居里/微克,50微克/毫升),异硫氰酸盐荧光素标记抗大鼠白蛋白抗体(FITC-A1b抗体,8.7毫克/毫升)和印度墨汁(Indian ink)颗粒。

二、红细胞血影的制备及大分子或颗粒的装载

制备单纯的红细胞血影(不装载大分子)和装载有大分子或颗粒的血影,基本上都是用重蒸水使红细胞低渗然后完成。由于大分子和颗粒的体积大小不同,所用重蒸水的比例各异。具体步骤是:取0.1毫升红细胞压积,加入同体积等渗液或是含有大分子或颗粒的等渗液稀释,随后加入等量重蒸水迅速混匀使红细胞预胀,并继续增加重蒸水(1—2或6倍)造成红细胞低渗溶血并同时把大分子摄入,置冰浴5分钟后,再加入0.14%体积的10倍浓度的 K^+ -DHK高渗液,在37℃水浴20分钟,然后保存于 K^+ -DHK或经3000转/分离心5分钟,反复洗涤多次,去除未被摄入的大分子或颗粒,最后收集血影。

三、细胞融合和样品制备

装载大分子或颗粒的血影与肝癌细胞融合是在PEG介导下采用悬浮融合法完成的。首先把装载大分子或颗粒的血影和肝癌细胞(500—1000:1)混和,3000转/分离心5分钟。收集血影和肝癌细胞后,以每毫升1000万肝癌细胞的密度加入50%的PEG(溶于RPMI-1640液),室温作用90秒,随即加入10倍量的0.2mM $MnCl_2$ -Tris生理盐溶液(20mM Tris+0.15M NaCl pH7.4)稀释PEG,在37℃继续作用

* 河南肿瘤研究所。

** 李明等同志提供FITC-A1b抗体,许海滨同志协助拍照片,特此致谢。

5分钟后,以冷 RPMI-1640 液反复洗涤5—6次(离心速度为 1500 转/分, 5分钟),除去 PEG 和未融合的血影。细胞样品滴在载片上,加盖片后在位相差显微镜或荧光镜下观察。部分实验在无菌条件下完成融合,经洗涤 5—6 次后加入新鲜培养液接种于长条盖片再培养,观察 20 小时后的细胞贴壁生长情况。装载 ^{125}I -BSA 的血影和与之融合后的肝癌细胞分别以 3000 转/分或 1500 转/分离心,用 K^+ -DHK 洗涤 6 次,除去未进入细胞内的同位素,悬浮为 1 毫升,各制备 3 个样品(每个样品 0.2 毫升),作细胞的脉冲数测定。

对照组:各用含有同样数量大分子或颗粒的 K^+ DHK 液代替重蒸水处理红细胞,然后与肝癌细胞融合,各步骤的要求和条件与实验组相同。FITC-A1b 抗体微量注射实验的对照,另加一组肝癌细胞在含有同数量 FITC-A1b 抗体的溶液内融合。此外,墨汁颗粒微量注射组,还在培液内加入墨汁颗粒培养肝癌细胞 20 小时作对照。

结 果

一、兔红细胞的保存以及制备血影和装载大分子的合适条件

兔红细胞不易保存,常在洗涤过程中变形。我们曾试用多种等渗液,只有 K^+ -DHK 液在 PH7.8 条件下,能保存完好的红细胞形态,而其他等渗液皆未能得到理想的结果。在保存液中的红细胞,经 1500 转/分离心 10 分钟反复洗涤 3 次,去除白细胞后,置 4°C 备用。

红细胞的单纯血影是在保存有红细胞的等渗液内加入等量重蒸水预胀后继续给予 1 倍重蒸水低渗得到。经 3000 转/分离心 5 分钟收集的血影纯度高达 95% 以上。若要制备装载大分子或颗粒的血影,红细胞的低渗程度必须增强。我们采用不同比例的重蒸水预胀和低渗,与装载的分子体积大小有关。在现有实验条件下,分子量较小的血清白蛋白(最终浓度为 8.3 微克/毫升)和血清白蛋白抗体(最终浓度为 2.32 毫克/毫升)的装载,需要加入一倍重蒸水预胀再加 1—2 倍重蒸水低渗来完成。但对于体积较大的印度墨汁颗粒则需用 2 倍重蒸水预胀 6 倍重蒸水低渗。经 5 分钟冰浴后,立即

加入 0.14% 体积的 10 倍浓度 K^+ -DHK 的高渗液,置 37°C 水浴保温 20 分钟。提高溶液的盐浓度有稳定红细胞膜的作用。待血影回复到等渗溶液后,需提高离心速度至 3000 转/分 5 分钟才能收集得到。在低渗不足或处理不均匀余留有一定数量红细胞的样品中,离心管底常积聚深红色的一层红细胞。

二、兔血影的形状、保存及与肝癌细胞的融合

上述低渗条件处理后的红细胞样品,在位相差显微镜下大多数为暗灰色的血影(图版图 2),它们的折光率比正常红细胞(图版图 1)明显减弱,而且体积一般稍大于正常红细胞。血影的形状绝大多数为圆形,在 K^+ -DHK 溶液中存放于 4°C 冰箱内 5 天,尚可保存其形态特点。

血影与肝癌细胞按 500:1 比例融合后,可见有肝癌细胞的同核体、血影的自身融合以及血影与肝癌细胞融合但尚未完成的图象(图版图 3)。

三、装载 ^{125}I -BSA 的血影及对肝癌细胞的微量注射

红细胞低渗处理装载 ^{125}I -BSA 的实验组和对照组细胞,经反复洗涤制备样品并测定脉冲数。3 次实验结果表明,实验组的脉冲数高于对照组 15.7 倍(表 1),提示实验组血影内装载有 ^{125}I -BSA。

装载 ^{125}I -BSA 血影和对照组细胞分别与人肝癌细胞 BEL-7402 在 50% PEG 介导下进行悬浮法融合之后,按上述程序反复洗涤多次,去除未与癌细胞融合的血影或红细胞,制备样品,检测肝癌细胞的脉冲数。结果实验组比对照组高 3.2 倍(表 1)。对照组是肝癌细胞在含有 ^{125}I -BSA 等渗液中与未经重蒸水低渗的红细胞融合后得到的样品。两组的肝癌细胞数相同。检测结果说明实验组的肝癌细胞内接受了血影携带的 ^{125}I -BSA 的注入。

四、装载 FITC-A1b 抗体的血影和对肝癌细胞的微量注射

装载 FITC-A1b 抗体的血影,经上述步

表 1 ^{125}I -BSA 的装载及微量注入人肝癌细胞的脉冲值

组 别	融 合 前 (平均 cpm*/10 秒)	融合后的肝癌细胞 (平均 cpm**/10 秒)
对 照 组 (RBC + ^{125}I -BSA + K^+ -DHK)	783	742
实 验 组 (RBC + ^{125}I -BSA + H_2O)	12,286	2,386

注: * 2×10^9 RBC 经处理后悬浮为 1 毫升, 取 0.2 毫升检测脉冲数。表内数字为 3 次实验的平均值。

** 2×10^9 肝癌细胞融合后, 洗去多余血影或 RBC, 悬浮为 1 毫升, 取 0.2 毫升检测脉冲数。表内数字为 3 次实验的平均值。

骤处理并洗去多余的荧光标记物制得的血影样品, 在荧光镜下观察, 可见绝大部分血影内有均质的荧光(图版图 4)。对照组红细胞内荧光反应阴性。装载 FITC-A1b 抗体的血影, 分别与人肝癌细胞 BEL-7402 和大鼠肝癌细胞 CBRH-7919 融合后, 经洗涤多次去除未融合的血影, 在荧光镜下可见两类肝癌细胞质内皆显现均质荧光, 但胞质荧光的强度两者有别。CBRH-7919 细胞明显地比 REL-7402 细胞为强(图版图 5、6)。两者的细胞核内荧光反应都呈阴性。对照组的肝癌细胞胞质荧光反应阴性, 胞膜外周也未见有荧光标记物。

五、装载印度墨汁颗粒的血影及对肝癌细胞的微量注射

印度墨汁颗粒的微量注射需要加强低渗程度才能取得成功。在先以 2 倍重蒸水预胀后再用 3 倍重蒸水低渗条件下, 血影内偶见墨汁颗粒, 较多的颗粒位于血影膜上。增加 6 倍重蒸水量进行低渗, 多数血影内显现颗粒, 但颗粒细小而均一, 血影膜上的颗粒一般较粗大, 表明在此低渗条件下只有较细小的颗粒能进入血影(图版图 7)。经洗涤 6 次除去未进入血影内的多余墨汁后, 离心沉集的血影与肝癌细胞融合, 随即在位相差显微镜观察, 可见部分肝癌细胞胞质内有明显的墨汁颗粒(图版图 8)。把这些肝癌细胞接种到长条盖玻片上再培养 20 小时, 部分细胞胞质内尚有清晰的细墨汁颗粒可见(图版图 9)。正常红细胞在有墨汁颗粒的等渗液中处理的对照组, 洗涤多次后, 细胞内没有墨汁颗粒, 与肝癌细胞融合后立即观察,

癌细胞内亦无颗粒存在。但在培液中加墨汁颗粒培养 20 小时的肝癌细胞, 全部细胞胞质内均含有多量粗细不等的墨汁颗粒。

六、接受了大分子或颗粒注入的肝癌细胞的活力

微量注入 FITC-A1b 抗体和墨汁颗粒的肝癌细胞, 经洗涤 6 次后加入新鲜培液, 置 37°C 继续培养, 细胞能正常贴壁生长, 并伸展形成单层的上皮形细胞。培养 20 小时的标本, 在光学显微镜下观察, 显现胞质和胞核的结构正常, 而且有正常的有丝分裂图象(图版图 9)。

讨论和总结

制备完好的血影是取得微量注射成功的前提。我们采用成年兔血分离红细胞, 并选用 K^+ 和 Na^+ 含量倒置的 K^+ -DHK 液为洗涤和保存液, 经预胀低渗, 能得到形态完好而且纯度相当高的血影。红细胞在低渗处理和离心过程中, 上清液色淡红而沉集的血影比正常红细胞色浅并稍透明, 表明有血红蛋白的逸出。与此同时, 溶液中的大分子或颗粒弥散进入血影内。在 FITC-A1b 抗体装载的血影标本中看到均质的而不是环形或半环形的血影内荧光, 在墨汁装载的血影中看到细的墨汁颗粒就是有力的证明。此外, 我们注意到无论是单纯的血影(没有大分子)或是装载有大分子后的血影都比正常红细胞轻。因为在 1500 转/分离心 5 分钟时, 一般无法收集血影, 只有提高离心速度至 3000 转/分离心 5 分钟后, 才能把血影沉集下来。也只有在这种情况下, 才能把残留的或

污染的红细胞与血影分开。

红细胞装载生物大分子的低渗方法有3种^[3]：①透析法；②预胀法；③快速裂溶法。我们的实验选用预胀低渗法是因为这一方法可以进行小体积操作，对于数量不多的大分子可以保证达到血影装载所需要的一定浓度，这比使用多量溶液进行透析或裂溶的方法优越得多。后一装载过程的大分子量耗费较大。此外，我们的实验结果表明，预胀低渗法还可根据所给分子的体积大小适当调整低渗程度，达到装载的目的。如印度墨汁的装载就是在加强低渗程度以后才完成的。

加入不同比例的重蒸水作低渗液，可以得到理想的装有大分子或颗粒的血影，说明红细胞对低渗液有一定的耐受范围。而且，红细胞在含有大分子或颗粒的低渗液中比在纯重蒸水中有更大的耐受力，这可能是由于溶液内形成的胶体状态所使然。

装有大分子的血影与培养细胞融合过程中，许多研究工作者^[3,11,9]曾试用过各种离子，如 Mn^{++} 、 La^{+++} 、 Ca^{++} 或细胞色素 C 等以稳定红细胞膜和提高大分子的注入效率。我们参照 Rechsteiner^[6] 提出的用 Mn^{++} 的最低剂量，在融合液中加入 $0.2mM MnCl_2$ ，可以得到理想的效果。虽然 Wasserman 等^[9] 认为 Mn^{++} 毒性大而 La^{+++} 有提高融合率的优点，但我们用 $0.3mM La(NO_3)_3$ 的实验，培养细胞受到明显损害。至于 Mn^{++} 对稳定红细胞膜的效果及对融合率的影响如何，我们虽未进行检查，但以 FITC-Alb 抗体装载的血影量及微量注射到肝癌细胞内的荧光强度看，融合过程中加入 $0.2mM Mn^{++}$ 是合适的。

肝癌细胞胞质内显现均质荧光和有墨汁颗粒存在是外源大分子微量注入成功的证明。在细胞融合完成的时候及继续培养 20 小时的肝癌细胞群体中，只有部分细胞胞质内有数量不等的细小墨汁颗粒，与培养液中有墨汁颗粒培养

20 小时的肝癌细胞的对照标本迥然不同，后者几乎全部细胞都吞进多量粗细不一的墨汁颗粒，是癌细胞通过吞噬直接从培养液内获得的，而实验过程中融合前后多次洗涤血影、血球及融合细胞，并换入新鲜培养液再继续培养，因此部分癌细胞内显现颗粒可认为是通过血影介导微量注入的。

同一条件下装载 FITC-Alb 抗体的血影分别与 BEL-7402 细胞和 CBRH-7919 细胞融合，荧光镜下显现两者的荧光强度不同，CBRH-7919 的胞质荧光比 BEL-7402 胞质荧光强，说明有更多的 FITC-Alb 抗体分子进入大鼠肝癌细胞内。FITC-Alb 抗体微量注入大鼠肝癌细胞和人肝癌细胞的结果不同是否由于兔血影与两类肝癌细胞的融合效率不同所致，有待进一步实验的证明。

参 考 文 献

- [1] Loyter, A., N. Zakal and R. G. Kulka, 1957. *J. Cell Biol.* 66:292—304.
- [2] Rechsteiner, M. C., 1975. *Exptl. Cell Res.* 93:487—492.
- [3] Schlegel, R. A. and M. C. Rechsteiner, 1975. *Cell.* 5:371—379.
- [4] Furusawa, M., M. Yamaizumi, T. Nishimura, T. Uchida and Y. Okada, 1976. *Med. Cell Biol.* 14:73—79.
- [5] Schlegel, R. A. and M. Rechsteiner 1978. *Med. Cell Biol.* 20:341—354.
- [6] Rechsteiner, M. 1978. *Natl. Cancer Inst. Monoger* 48:57—64.
- [7] Furusawa, M. 1980. *Internat. Rev. Cyto.* 62:29—67.
- [8] Rechsteiner, M. and L. Kuehl 1979. *Cell* 16:901—908.
- [9] Wasserman, M., N. Zakai, A. Loyter and R. G. Kulka 1976. *Cell* 7:551—556.
- [10] Yamaizumi, M., T. Uchida and Y. Okada 1978. *Cell* 13:227—232.
- [11] Yamaizumi, M., T. Uchida, E. Mekada and Y. Okada 1979. *Cell* 18(4):1009—1014.