

的数量和分布以及凝集机制,已有大量的工作。然而,迄今还无完全一致的看法。Nicolson<sup>[1,2]</sup>认为,正常的3T3细胞经病毒诱导后,细胞质膜的流动性发生改变,使原来随机分布的ConA受体出现簇状分布,从而有利于多价的ConA分子对细胞产生凝集作用。Inbar<sup>[7]</sup>用同样的用3T3细胞材料,借助免疫荧光技术研究温度对ConA受体移动的影响,也得到类似的结论。本实验观察到地塞米松处理的细胞呈环状膜荧光的百分率比对照组增高1倍左右,这一现象说明,地塞米松可能影响细胞质膜的流动性,使原来成簇或帽状分布的ConA受体分子向两侧流动,在细胞表面呈随机分布,从而导致环状膜荧光的细胞增多,实验组细胞的凝集程度降低亦可能是这一原因所致。然而,当ConA浓度增高,温育时间延长,实验组与对照组的差异被掩盖。我们分析,这是由于单位容积内ConA分子的数量增加,其与细胞表面受体结合的机率增高,致使实验组也呈现最大程度的凝集。至于细胞经糖皮质激素处理后,膜荧光阳性率降低7—10%,是否由于细胞表面ConA分子的数量有所减少还是其它原因所致,尚有待于精确的定量方法检测。

从本文结果可见,不同振荡时间和不同浓度的地塞米松分别作用48或72小时后,细胞脱落率均低于相应的对照组,尤以激素作用48小时、振荡3分钟和作用72小时、振荡1和3

分钟的实验结果更为明显。这说明地塞米松促使肝癌细胞的粘附性增加。在这方面国外也有类似报道,例如,Ballard等<sup>[8]</sup>见到放线菌素D和放线菌素酮有抑制糖皮质激素诱导大鼠肝癌细胞粘附性增高的作用;Berliner<sup>[9]</sup>在RLC-GAI细胞株(转化的大鼠肝上皮细胞株)也见到类似现象。至于人肝癌BEL-7402细胞粘附性的改变是否因细胞膜的某些组分产生了改变,以及这种改变的机制所在,都是有待进一步阐明的问题。

### 参 考 文 献

- [1] Nicolson, G. L. 1971. *Nature New Biol.* 233: 244—246.
- [2] Nicolson, G. L. 1972. *Nature New Biol.* 139: 193—197.
- [3] 张仕明, 许河生, 卢延龄, 1983年细胞生物学杂志, 5(1) 24—27.
- [4] 陈瑞铭, 朱德厚, 叶秀珍, 沈丁武. 1975. *科学通报*, 20: 434—436.
- [5] Aub, J. C., et al., 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 50: 613—619.
- [6] Heinz, B., et al., 1980. *J. Cell Biol.* 85: 1—8.
- [7] Inbar, M. E. Ben-Bassat, H. and L. Scachs, 1971a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68: 2748—2751.
- [8] Ballard, P. L., and Tomkins, G. M., 1970. *J. Cell Biol.* 47: 222—234.
- [9] Berliner, J. A., and Gerschenson, L. E., 1975. *J. Cellular Physiol.* 86: 523—532.

## 肾上腺糖皮质激素对体外培养的人体肝癌细胞的影响

### Ⅲ. 细胞表面伴刀豆球蛋白受体及相关胚胎抗原的测定\*

许河生 张仕明 毛祖成 卢延龄

(中国科学院 上海细胞生物学研究所)

肾上腺糖皮质激素能诱导大鼠肝癌细胞出现一些正常肝细胞的表型特征,因而使人们对肝癌细胞的逆转问题深感兴趣。关于糖皮质激素对人体肝癌细胞膜特性的影响,我们实验室

毛祖成等的初步工作(未发表)说明,细胞表面伴刀豆球蛋白受体分布出现改变,细胞对外源

\* 徐惠均同志参加部分工作。

凝集素的反应降低,而细胞的粘附性增高。这些事实都说明,在激素作用下,癌细胞原有特性有减弱的现象。癌细胞另一明显的特性是胚胎性抗原的重现。施涓康<sup>[1]</sup>等发现,BEL-7402 人体肝癌细胞株有相关胚胎性抗原。鉴于前述糖皮质激素对人体肝癌细胞的诱导作用,我们打算观察,肝癌细胞相关胚胎性抗原在该激素的影响下是否也出现变化;另外,我们利用定量手段对毛祖成等(未发表)的观察作进一步的探索,研究肝癌细胞表面伴刀豆球蛋白受体分布出现变化的同时,是否也出现量的变化,以期对产生变化的原因有更深入的了解。

## 材 料 和 方 法

### 一、材料

**细胞** 体外培养的 BEL-7402 人体肝癌细胞株<sup>[2]</sup>。

**激素** 水溶性地塞米松磷酸钠盐(上海第九制药厂生产)分子量为 516.51。

**凝集素** 伴刀豆球蛋白(ConA)(Pharmacia 公司产品)经本实验室用 <sup>125</sup>I 碘化。

**抗血清和碘标记的第二抗体** <sup>125</sup>I-羊抗兔免疫球蛋白(简称羊第二抗体),由本实验室自制<sup>[3]</sup>。兔抗人胚胎肝细胞抗血清(简称第一抗血清)由本所施涓康同志供给<sup>[1]</sup>并经人的肝、脾、肾干粉及 ABO 型白细胞吸收。

### 二、方法

**1. 细胞培养与激素处理** 用培液配制成每毫升含有  $5 \times 10^7$  细胞的悬液,取 4 ml 接种于大卡氏并,面积为  $18 \times 12 \text{ cm}^2$ 。用 Hank's 液配制激素溶液,浓度为  $600 \mu\text{g/ml}$ ,作为母液。细胞贴壁后,弃去旧培液,加入含有激素的培养液,使激素的最终浓度为  $7.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,然后按实验要求培养 48 或 72 小时。

**2. 细胞表面相关胚胎抗原的测定** <sup>125</sup>I-标记羊第二抗体的结合试验。按张仕明等 1980 年的方法,采用间接反应法,双管测定。每管  $5 \times 10^6$  细胞与 0.2 ml 不同稀释度的第一抗体于  $37^\circ\text{C}$  温育 30 分钟,用 0.05 M pH 7.4 的 PBS 洗涤四次后,各管加入 <sup>125</sup>I-羊第二抗体约  $5-6 \times 10^4 \text{ cpm}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 30 分钟,然后洗涤 3 次,最后测定 <sup>125</sup>I-羊第二抗体与细胞的结合率。

**3. 细胞表面 ConA 结合量的测定** (1)<sup>125</sup>I-ConA

的制备:按乳过氧化物酶法进行 ConA 碘化<sup>[4]</sup>。碘化反应前加入 0.2 M  $\alpha$ -甲基-D-甘露吡喃糖苷  $81 \mu\text{l}$ ,以保护 ConA 与受体结合的位点。将已碘化的 ConA 通过 G-25 柱,去除游离碘。以一定量的 <sup>125</sup>I-ConA 加入到浓度为  $1 \text{ mg/ml}$  的未标记的 ConA 液中,用该溶液为工作液。(2)细胞与 <sup>125</sup>I-ConA 的结合实验:经激素处理 72 小时及相应的对照细胞分别用 PBS 制成悬液。按每管  $2 \times 10^6$  细胞加入一系列实验及对照管中,弃上清液,并依次加入不同剂量的 ConA 工作液,每一剂量 8 复管。然后于  $37^\circ\text{C}$  温育 30 分钟。经 PBS 洗后,测细胞的总脉冲数。最后,上述各管再加 0.2 M  $\alpha$ -甲基-D-甘露吡喃糖苷  $0.5 \text{ ml}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 30 分钟, PBS 洗涤,再次测定细胞的脉冲数。由于  $\alpha$ -甲基-D-甘露吡喃糖苷专一性地取代了结合在细胞上的 ConA 分子,故测得的脉冲数为细胞与 ConA 的非特异性结合数。总脉冲数减去非特异结合脉冲数,即细胞与 ConA 的实际结合值。

**4. 细胞表面积测量** 将培养 72 小时的实验组及对照组细胞分别从培养瓶内用 PBS 冲下,洗 3 次,用 4% 甲醛固定 30 分钟,再用冷 PBS 洗 3 次,然后将细胞铺在载玻片上,待自然干燥后作 HE 染色,并在显微镜下用描绘仪描出细胞大小,用求积仪计算细胞的面积。

## 实 验 结 果

### 一、激素对人体肝癌细胞表面积的影响

经地塞米松处理的细胞显然比对照组细胞增大。经随机测定了实验组 279 只细胞,对照组 262 只细胞的表面积,其平均值分别为 5.03 和

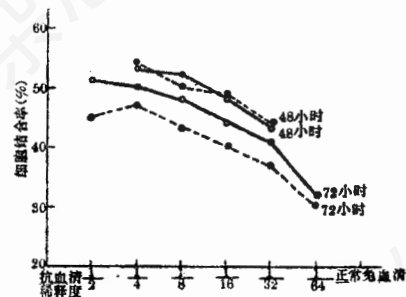


图 1 <sup>125</sup>I-标记羊第二抗体测定 BEL-7402 细胞表面相关胚胎抗原的变化  
●.....● 激素处理组;  
○——○ 对照组;  
△ 正常兔血清组

3.23, 比值为 1.54, 即实验组的细胞面积约为对照组的 1.54 倍。经统计学方法处理,  $p < 0.001$ 。

## 二、激素对人肝癌细胞膜相关胚胎抗原的影响

利用  $^{125}\text{I}$ -羊第二抗体标记技术, 测定了经或不经激素作用的细胞膜相关胚胎抗原的变化。图 1 所示, 用  $7.5 \times 10^{-6}\text{M}$  的地塞米松磷酸钠盐处理细胞, 72 小时以后, 与未处理的对照细胞相比较, 经激素处理的细胞, 第一抗体与细胞表面的相关胚胎抗原的结合率降低。按细胞与  $^{125}\text{I}$ -羊第二抗体结合的饱和点来推算, 经激素处理的细胞所结合的抗体分子数约为对照的 70%; 与此同时, 也测定了相同浓度的激素作

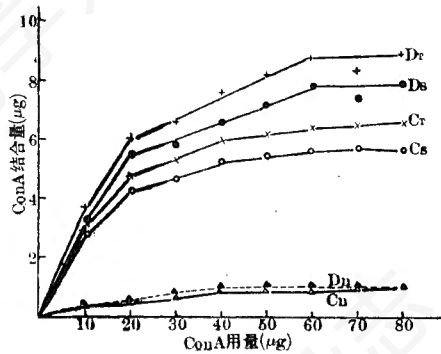


图 2 BEL-7402 细胞与 ConA 的结合曲线

- \*——\*  $\text{D}_T$  激素处理 72 小时后细胞与 ConA 的结合总量;
- $\text{D}_S$  激素处理 72 小时后细胞与 ConA 的特异结合量;
- ×——×  $\text{C}_T$  对照组细胞与 ConA 的结合总量;
- $\text{C}_S$  对照组细胞与 ConA 的特异结合量;
- ▲——▲  $\text{D}_n$  用激素处理 72 小时后细胞与 ConA 的非特异结合量
- △——△  $\text{C}_n$  对照组细胞与 ConA 的非特异结合量

用 48 小时的细胞, 未见与对照组有明显的差别。

## 三、激素对人体肝癌细胞表面 ConA 结合量的影响

实验组和对照组细胞分别和不同剂量的

ConA 反应, 根据  $^{125}\text{I}$ -ConA 饱和结合点换算成 ConA 量来计算, 这两组的细胞表面所结合的 ConA 量稍有差别。图 2 表示去除了各自的非特异性结合量后, 所得到的细胞与 ConA 特异结合量。从图 2 可以看到经激素处理的细胞表面所结合的 ConA 量高于对照组的细胞, 根据这两组细胞在饱和点时结合的总 ConA 量来计算, 实验组细胞表面结合的 ConA 量约为对照组的 1.37 倍。

## 讨 论

伴随细胞的恶性转化, 细胞的抗原常出现变化。例如, 正常细胞抗原的消失、胚胎抗原或一些新的抗原出现<sup>[5]</sup>都是熟知的事实。但是在细胞分化过程中, 胚胎时期出现过的抗原会逐渐减少乃至消失<sup>[6]</sup>, 因而, 抗原性的变化已成为研究细胞分化, 转化或诱导肿瘤细胞分化具有一定意义的指标。Wainberg(1982)<sup>[7]</sup>用地塞米松处理被鸟类肉瘤病毒转化的细胞, 看到细胞抗原的合成能力受到抑制。我们将人肝癌细胞用糖皮质激素处理 48 小时后, 对照组和实验组分别与  $^{125}\text{I}$ -羊第二抗体的结合量虽未显示差别, 但处理 72 小时的肝癌细胞其膜相关胚胎抗原量则有所下降, 与 Wainberg 等的结果相类似。如果将这一现象结合经激素处理后细胞面积增大的事实来分析, 实验组细胞表面单位面积结合的抗体比对照组下降得更为明显。这一事实说明, 肾上腺糖皮质激素不仅能影响 BEL-7402 细胞 DNA 的合成<sup>[8]</sup>, 也能诱导肝癌细胞出现与分化有关的表型特征的改变。

对于正常和转化细胞表面 ConA 结合点的变化, 有过很多研究, 但看法不一。有的工作者认为正常及转化细胞表面的 ConA 结合位点的数量无甚区别<sup>[9]</sup>, 但有人证明, 转化的细胞及被蛋白酶处理过的正常细胞比正常的间期细胞有更多的 ConA 结合位点<sup>[9]</sup>。从我们实验结果来看, 激素处理后的细胞表面结合 ConA 的量高于对照组细胞, 前者约为对照组的 1.37 倍。与此同时, 实验组细胞的表面积增加为对照组

的1.54倍。因此,就细胞表面的单位面积来说,经激素处理的细胞与ConA的结合量不仅没有增高,而且稍有降低。毛祖成等(待发表资料)用荧光素标记的ConA以及凝集试验检测了BEL-7402细胞经糖皮质激素处理后其ConA受体的变化。经激素处理的细胞,其阳性荧光百分率略有下降。同时,经激素处理的细胞对ConA的凝集反应也有所下降。本实验结果与上述观察相吻合,而且进一步提出,细胞对凝集素的反应强度与ConA的结合位点的数量似乎有一定关系。至于结合位点数量的变化是否系决定细胞凝集强弱的唯一因素,尚待更多的工作来证实。

## 参 考 文 献

- [1] 施渭康等, 1977. 动物学报, 23: 337—436.  
 [2] 陈瑞铭等, 1975. 科学通报, 20: 434—436.  
 [3] 张仕明等, 1980. 实验生物学报, 13: 119—126.  
 [4] Marchalonis, J. J. 1969. *Biochemistry J.* 113: 299—305.  
 [5] Matsuoka y. 1976. *In cancer Related Antigens* pp 3—14.  
 [6] Kaeffer, H. P. Billing, K. Levine, A. M. and Golde, D. W. 1980. *In Blood* 56: 11—14.  
 [7] Wainberg, M. A. Silber, L. P. Kanfman, M. and Cohen, S. D. 1982. *J. Cell Science* 55. p 287—299.  
 [8] 张仕明等, 1980. 细胞生物学杂志, 第一期。  
 [9] Ozanne, B. and Sambroek, J. 1971. *Nature New Biology* 232; : 156—160.

## 造血干细胞发生学研究II. 人胚骨髓各型细胞超微结构的分析及探讨\*

施斐曼 刘 永

(军事医学科学院基础医学研究所)

继卵黄囊、胚肝之后,骨髓就是人胚胎主要的造血器官<sup>[1]</sup>。曾在人胚肝造血的研究中<sup>[2]</sup>,从电镜下找到一些证据,不能排除肝本身的间叶细胞在适宜的条件下有可能发展成造血干细胞并向不同系造血细胞发育的可能性。它在人胚骨髓的造血中会是怎样的?骨髓发育中实质细胞和间质细胞又是如何联系的?这些问题在文献中虽有所报道但缺乏系统的电镜观察资料。我们对人胚骨髓造血发育中各型细胞的超微结构作了系统的观察和分析,现报告如下。

## 材 料 与 方 法

本文收集的胚胎标本(电吸人工流产、水囊引产、剖腹取胎)胎龄分布在10~40周间(表1)。

**胎龄计算方法** 鉴于部分标本为电吸胚胎碎组织难以用测量胎儿顶臀长度的方法来估算受精日期,故

表 1 人胚标本胎龄分布

妊娠日期	电镜观察例数	妊娠日期	电镜观察例数
10周	1	16周	2
11 "	3	19 "	1
12 "	4	23 "	3
13 "	5	29 "	1
14 "	1	40 "	1
15 "	1		

一律根据临床医师提供的妊娠妇女末次月经日期来核算胎龄,对于月经周期不规律或胚胎大小与胎龄不符的例子剔除不用。

电吸胚胎碎组织于手术室检出后立即固定,水囊引产和剖腹取胎的胎儿置入冰瓶内取回,一般在2小时内解剖取出骨,因身体各部分的骨骼其发育的先后次序不一,在设计实验时规定取肢体的骨髓,大部取

\* 仪器中心电镜组汪宝珍主管技师制作超薄切片。本文多数流产胚胎由铁道总医院、首钢医院及307医院提供,特此致谢。