

抗 8 氮鸟嘌呤的 F9 胚胎瘤细胞突变株的建株*

徐卫明 宋秋宝 姚 鑫

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

近年来,小鼠胚胎瘤细胞(EC细胞)已成为研究胚胎分化、肿瘤发生的一个很好的实验模型^[1]。利用体外培养的EC细胞,通过诱变剂处理和筛选,可以获得具有特定基因突变标记的EC细胞株。例如利用碱基类似物8氮鸟嘌呤(8AG)或5-溴脱氧尿嘧啶核苷可以分别筛选到次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)缺陷或胸腺嘧啶核苷激酶(TK)缺陷的突变株。前者同时又是人类列许尼汉(Lesch-nyhan)综合症的病因。因此建立这种类型的突变株,不仅可以利用酶的缺陷突变作为细胞融合的选择性标记,而且利用EC细胞可以在体内或体外诱导分化的特性,研究涉及某些遗传突变基因的调控和表达^[2]。

材 料 和 方 法

一、材料

取自F9-1克隆细胞株^[3],在RPMI-1640加10%小牛血清的培养液中培养,每隔2—3天传代一次。

二、诱变

取对数生长期的细胞,用最终浓度3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ N-甲基-N-硝基-亚硝基胍(MNNG)处理。18小时后,细胞离心收集,用D-Hank's生理盐水洗涤后,换新鲜培养液培养。MNNG处理过的细胞一般要经过3—4天培养才能恢复旺盛生长。

三、筛选

用软琼脂加药物的方法筛选。

双层软琼脂(平板分上下二层),上层含琼脂糖0.25%,下层含0.5%。二层琼脂糖均含有20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的8氮鸟嘌呤(8AG)。铺下层琼脂板时先将预先温育(56 $^{\circ}\text{C}$)的1%琼脂糖(Serva出品)与等体积的双倍浓度的RPMI 1640(含10%小牛血清)培养液迅速混合,加入8AG,铺于50mm平皿(FaLecon)中,每皿5ml。待下层琼脂糖凝固后,以胰酶消化经诱变剂处理后生长3—4天的细胞,离心收集,悬浮于双倍浓度的

RPMI 1640培养液中,立即与等量的0.5%琼脂糖混合,加入8AG,然后将其铺于下层琼脂之上,每皿2ml,细胞浓度 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。在含5%CO₂培养箱中培养(37 $^{\circ}\text{C}$),7—10天出现肉眼可见大小(大于0.1mm)的细胞集落。以后每隔二天换一次含有20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 8AG的新鲜培养液(每皿2ml),待细胞集落直径长到1mm左右,便可挑出扩大繁殖。

四、扩增

挑出集落,置24孔板(Limbro公司出品)中继续培养,集落大小达2mm左右时,接种入小北京瓶。待细胞大量增殖后,冻存于液氮中(保护液为10%二甲亚砜)。先后按此法挑出10个细胞集落,取其中集落I细胞经软琼脂克隆后供分析用,其余仅有6个作了抗性试验及³H-次黄嘌呤掺入试验。

五、抗性定性测定

1. 对8AG敏感性的鉴定 取待测突变型细胞及野生型细胞**,分别悬浮于0.25%琼脂糖平板,每皿(50mm)1000个细胞。8AG分为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 二种浓度组,每组包括三个平皿。并各取同一细胞悬液混和于不加药的琼脂平皿做对照(各一个平皿)。10天后计数克隆数。

2. 生长曲线测定 待测突变细胞以 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 接种于小北京瓶中。分三组:对照组不加任何特殊药物(即一般培养液)。实验组I加20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 8AG,实验组II加HAT培养液(H,次黄嘌呤 $1 \times 10^{-4}\text{M}$; A,氨基嘌呤 $4 \times 10^{-7}\text{M}$; T,胸腺嘧啶 $1.6 \times 10^{-5}\text{M}$)。每组隔24小时,各取三瓶细胞计数,至96小时为止。然后根据藏本博行^[4]的方法,计算对数增殖期细胞增殖二倍的时间即细胞倍增时间。

六、HAT敏感性鉴定

实验分加HAT与不加HAT二组,每组各三个平皿,每皿1000个细胞。10天后计数克隆数。另外以

* 本文中曾得到包林平、季闻行同志的帮助,钟逸新同志协助显微摄影,谨致谢意。

** 本文中突变型细胞是指F9-1 aza突变型细胞而野生型细胞指的是原来的F9-1克隆细胞株。

表1 野生型和突变型细胞对8 AG敏感性的测定

细胞类型	对照克隆数	10 μ g/ml 8 AG*	10 μ g/ml 8 AG/对照**	20 μ g/ml 8 AG*	20 μ g/ml 8 AG/对照**
野生型	125	1	0.8%	0	—
突变型	144	130	90%	140	97%

* 单位为克隆数, ** 单位为克隆率(%), 数据均取自三个平皿中克隆的平均数。

高密度细胞(10^5 细胞/毫升)接种于含 HAT 的培养皿中, 10 天后计数克隆数。

七、 ^3H -次黄嘌呤掺入试验

突变型及野生型细胞各以 5×10^4 /毫升浓度接种于放有小盖片的指管中培养。48 小时后, 加入 ^3H -次黄嘌呤(Amersham 公司出品, $1.2 \text{ Ci}/\text{mmol}$) $3 \mu\text{Ci}/\text{ml}$, 继续培养 24 小时。取出盖片用生理盐水洗涤后, 用甲醇: 冰醋酸(3:1)固定。核 IV 型液体乳胶涂片。曝光 7 天后, ID 19 b 显影液显影。甲基绿-焦宁染色。

八、染色体计数和分带

对数生长期细胞加入秋水仙素 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$, 37°C 继续培养 2 小时后, 收集细胞。用 0.075 M KCl 低渗处理 20 分钟。G 带用 0.15% 胰酶处理 3—4 秒。C 带用 0.2 N 盐酸处理 1 小时后, 再用 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 处理 15 分钟, $2 \times \text{SSC}$ 处理 1.5 小时, 1:10 吉姆萨 (pH 6.8) 染色 10 分钟。

九、动物接种试验

接种 F 9-1 aza 突变株细胞于同系 129/SV-ter 小鼠(雄鼠)皮下, 每只小鼠接种二个点, 每点各含 1×10^6 个细胞。7—10 天后肿瘤形成。取瘤组织以 Bouin 氏液固定, 切片后苏木精伊红染色观察。

结 果

一、8 AG 抗性鉴定

1. 克隆数的比较 在相同细胞接种数(1000 个/皿)的情况下, 野生型和突变型细胞在不加 8 AG 的对照琼脂板中形成肉眼可见大小($>0.1 \text{ mm}$)克隆的数目基本相同(表 1)。但在含 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 8 AG 的琼脂糖平板中, 野生型细胞不能形成克隆(图版图 1), 而突变型细胞形成的克隆数与不加药物的对照培养基中形成的克隆数基本相同(表 1; 图版图 2)。

2. 生长曲线测定: 从图 1 可以看出, 当

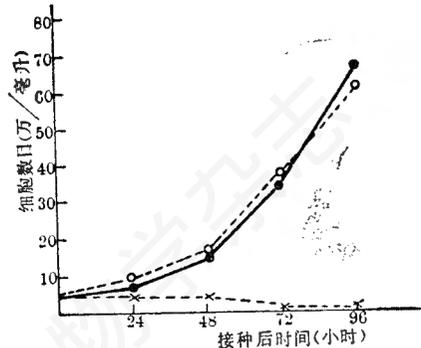


图 1 8 AG 抗性突变细胞株生长曲线的测定

● 对照组
○ 20 μ g 8 AG 实验组
× HAT 实验组

每隔 24 小时取样时, 对照组和含 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 8 AG 的实验组细胞的生长曲线基本上平行, 经计算对照组和实验组的细胞倍增时间都在 16 小时左右, 说明 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 8 AG 浓度对突变株细胞的生长并无影响。相反, 在含有 HAT 的培养液中, 突变株的细胞数目不再增加, 从 48 小时后细胞数目开始减少, 72—96 小时大多数细胞死亡。

表 2 野生型和突变型细胞对 HAT 敏感性的测定

细胞类型	对照组克隆数*	实验组克隆数**	实验组克隆数/对照组克隆数(%)
野生型	120	110	91%
突变型	180	0	—

* 在不含 HAT 的培养皿中。

** 在含 HAT 的培养皿中。

二、HAT 培养基敏感性试验

试验结果如表 2 所示。在相同细胞接种数的情况下, 野生型细胞在含有 HAT 的琼脂板中形成的克隆数目与在对照琼脂板中的克隆数目基本相同。但突变型细胞不能在含 HAT 的

琼脂板中形成克隆(图版图3、4)。即使在高密度细胞的琼脂板中(1×10^5 细胞/ml)也未发现有克隆形成。

三、 ^3H -次黄嘌呤掺入试验

HPRT 酶是核酸合成“应急通路”的主要酶系之一。它能将次黄嘌呤磷酸化成次黄苷, 转而形成 AMP 和 GMP, 掺入核酸大分子。如果该酶发生缺陷, 细胞将不能利用次黄嘌呤合成

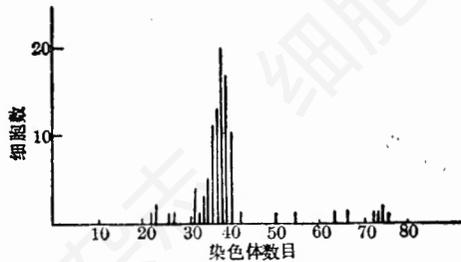


图2 F9-1 抗8AG 突变株染色体分布图

DNA 和 RNA。因此利用放射性标记的次黄嘌呤可以有效地定性检测细胞是否具有 HPRT 酶缺陷^[5]。我们的结果如图5、6所示, 突变型细胞完全不能掺入 ^3H -次黄嘌呤, 野生型细胞掺入强烈。

四、染色体计数和分带

突变株细胞基本上保持 F9 细胞的核型特征。计数 100 个分裂相得到的染色体分布图如图2所示。71% 分裂相染色体数在 36—40 之间。染色体众数为 38。核型中有一个中间着丝点的标记染色体, 它是由一对常染色体 8 在着丝点处融合形成。我们用 C 带染色显示该着丝点处缺乏 C 带异染色质, 因此是一个非常显著的标记(图版图7、8 长箭头指的染色体)。C 带显示核型中还有另一个缺乏着丝点 C 带异染色质的顶端着丝点标记染色体, 它可能是由染色体 4 和染色体 17 或 18 相互易位而形成的^[6]。

五、动物接种试验

突变型细胞和野生型细胞一样, 接种小鼠皮下后 7—10 天即可形成瘤块, 直径可达 1.5 厘米左右。病理切片检查, 无分化组织存在, 都是恶性 EC 干细胞。

讨 论

从以上鉴定结果看来, 我们建立的这株 F9-1aza 突变细胞株是一株抗高浓度 8 氮杂鸟嘌呤并具有恶性生长能力的 EC 细胞突变株。它具有 HPRT 酶缺陷的几个特点: (1) 抗 8 AG 碱基类似物; (2) 对 HAT 培养基敏感; (3) 不能掺入放射性标记的次黄嘌呤^[7]。因此这株突变株具有遗传的选择性标记。

F9 EC 细胞是近年来国际上通用的“无能”胚胎癌细胞, 在体外培养中一般保持 EC 细胞的形态特征, 接种于同系小鼠皮下只产生高度恶性的畸胎瘤, 即瘤块几乎全由未分化的 EC 细胞组成。我们分离出的这株 F9-1aza 突变株也具有这样的特征。近年来的研究表明, 这种“无能”的特性是相对的, 当在体外用维生素 A 酸处理后, 这种细胞可以被诱导分化而形成原始内胚层特征的细胞^[8]; 或用细胞融合的方法与小鼠胸腺细胞融合后, 可以产生具有各种胚层组织的畸胎瘤^[9]; 这就对于了解癌细胞的恶性表型的表达和细胞分化的关系问题提供了一个很好的实验系统。最近, 我们利用这株 F9-1aza 细胞与大鼠胸腺细胞融合, 已经成功地获得了具有 F9 细胞和大鼠胸腺细胞染色体组型的杂种细胞, 它失去了恶性的表型而获得了成纤维类或上皮类细胞的表型^[10]。因此这个突变株对于我们今后做细胞融合以及胚胎嵌合体等方面的工作, 是一个很有价值的实验材料。

小 结

利用 N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍处理 F9-1 EC 细胞, 再用软琼脂加 8 氮杂鸟嘌呤的方法成功地筛选到一株抗 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 8 氮杂鸟嘌呤的 F9-1aza 突变株。经对其 8 AG 抗性鉴定、HAT 敏感性鉴定及生长曲线测定, 表明该株细胞对 8 AG 具有稳定的抗性, 对 HAT 培养基敏感, 不能掺入 ^3H -次黄嘌呤。该突变株染色体众数为 38, 接种于同系小鼠皮下形成无分化细胞的恶性畸胎瘤。

参 考 文 献

- [1] Graham, C. F. 1977. In "Concepts in Mammalian Embryogenesis" (M. I. Sherman, ed MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 315-397).
- [2] Martin, E. R. 1980. *Science* 209:768-776.
- [3] 从笑倩, 姚鑫. 1983. 实验生物学报, 第16卷第1期第93-99页。
- [4] 藏本博行. 1975. 引自“人癌细胞培养”[日]. 大星章-菅野井夫主编. 吴政安, 王永潮, 李申德译. 科学出版社. 1979年版, 第63-67页。
- [5] O'Neill, J. P., et al. 1977. *Mutat. Res.* 45: 91.
- [6] Stewart, C. 1980. *J. Embryol. Exp. Morph.* 58:289-302.
- [7] Littlefield, J. W. 1964. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 29:161.
- [8] Strickland, S. 1981. *Cell*, 24:277-278.
- [9] Rousset, J. -P., et al. 1983. *Develop. Biol.* 96:331-336.
- [10] 徐卫明, 宋秋宝, 姚鑫. 1984. F9“无能”胚胎癌细胞与小鼠胸腺细胞融合产生分化细胞. 未发表资料。

人外周血 B 淋巴细胞在琼脂培养基内的增殖特性

马祥瑞 汪 涛 王洪云
(苏州医学院 放射医学系)

近年来建立的淋巴细胞集落培养技术, 无疑地将促进人们对于淋巴细胞的了解。J. Radnay 等^[1]于 1979 年用双层琼脂培养技术, 以 Pokeweed 为丝裂原, 获得人外周血 B 淋巴细胞集落。Izaguirre 等^[2]将 B 淋巴细胞悬液接种到含有 3×10^5 /ml 受照射的自身或同种 T 淋巴细胞、20% T 淋巴细胞条件培养基和 0.8% 甲基纤维素的培养体系内, 用 Pokeweed 作丝裂原, 也培养出人的 B 淋巴细胞集落。本文将介绍以脂多糖(LPS)、小鼠红细胞(MRBC)及牛血清白蛋白(BSA)为丝裂原, 用单层琼脂培养技术, 研究人外周血 B 淋巴细胞在琼脂培养基内的增殖情况。

材 料 与 方 法

在无菌条件下, 采集健康献血员的肝素抗凝静脉血, 用淋巴细胞分离液进行分离, 获得单核样细胞悬液。用 RPMI-1640 培养液稀释成一定浓度的细胞悬液。将其分成五组, 分别加入适当浓度的 LPS(20 μ g/ml, sigma), 0.5% MRBC, 5% BSA, LPS + 0.5% MRBC 和 LPS + 5% BSA。然后制成含 0.3% 琼脂(日本琼脂粉)培养体系, 分装到有机玻璃培养皿(直径 1 cm, 容积 0.2 ml)内, 并置于密封的、含 CO₂ 的潮湿空气中 37°C 培养。在不同的时间间隔内镜检, 进行集落计数。实验观察时间: 前三组在接种后第 2、

6、8、10 天, 后二组则在接种后第 2、4、6、8、天。

为比较研究人外周血 B 淋巴细胞增殖的动力学, 我们按照苏燎原等^[3]建立的实验方法, 用 Eagle's 和 RPMI-1640 培养液进行 B 淋巴细胞培养。接种后第 7 天收获。在收获前 18 小时注入 ³H-TdR (1.2 μ Ci/培养瓶)。培养细胞收获到 49 型滤膜(上海产)上。用国产 FJ353 型双道液体闪烁计数器测量各组的 ³H-TdR 掺入率(epm)。

在预实验中曾选用三种细胞浓度, 虽然各实验组的集落计数均随培养时间延长而增多, 但以每个培养皿内含 0.75×10^5 细胞的浓度最宜。

集落划记标准: 凡由 30 个或 30 个以上的细胞组成的细胞团, 都记为一个集落。

结 果

实验中曾检验过 10 名健康献血员的外周血 B 淋巴细胞在琼脂培养基内增殖情况。献血员的各实验组的各个观察点都设有 5 个平行样品。各组的实验结果为 10 名献血员的平均值。液体培养实验: 每个人的各观察点仅有 3 个平行样品。各组的实验结果也是 10 名献血员的平均值。分别介绍如下:

(一) 集落计数

在 LPS、0.5% MRBC 和 5% BSA 分别作用