

用原位分子杂交技术检测 F9-1 EC 细胞甲胎蛋白基因的表达

林斯骏 何全品

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

许以盛

(中国科学院昆明动物研究所)

甲胎蛋白 (AFP) 是一种糖蛋白^[1,2], 在胚胎发育阶段先由卵黄囊合成, 以后由胚胎肝合成, 成年肝细胞不再合成或合成甚微, 但是肝细胞癌变后又重新合成, 并分泌到血液中, 故属于癌胚性蛋白, 是肝癌临床诊断和实验研究的重要标志物之一。

F9-1 EC 细胞是一种分化潜能很低的胚胎癌细胞, 不分泌甲胎蛋白^[3]。Strickland^[4]使用维生素 A 酸 (RA) 诱导 F9 细胞, 使该细胞发生分化产生脏壁内胚层细胞, 即能分泌甲胎蛋白。我们实验室曾从 F9 细胞株中克隆筛选出 F9-1 和 F9-3 EC 细胞株, F9-1 EC 细胞对 RA 反应敏感, 分化后能分泌 AFP; 而 F9-3 EC 细胞对 RA 反应不敏感, 不被诱导分化, 也不产生 AFP。本文采用原位分子杂交技术, 观察了 F9-1 EC 细胞 AFP 基因在 RA 诱导前后的表达情况, 进一步证实了以往用免疫酶标法的分析结果。

材 料 和 方 法

1. 细胞 F9-1 EC 细胞按常规用含有 10% 小牛血清的 RPMI—1640 培养液培养, 作为对照组, 在培养液中加入 10^{-7} MRA 为实验组。分别培养五天后, 离心收集细胞, 使用 0.5% 胰酶-0.25% 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 溶液加等量生理盐水消化细胞, 使细胞分散, 制成细胞悬浮液, 待用。

2. 甲胎蛋白基因探针 甲胎蛋白 cDNA 来自美国 Tilghman 构建的小鼠 AFP 基因 (5' 端) 克隆 pBR322-AFP₁, 此重组质粒由中国科学院上海生物化学研究所周光宇教授赠送。含有甲胎蛋白 cDNA 的质粒, 经过

大肠杆菌的扩增, 抽提质粒 DNA, Hind III 酶切, 电泳分离, 切出插入片段的凝胶, 用电洗脱以及 DE₅₂ 柱层析, 得到高纯度的甲胎蛋白 cDNA。

甲胎蛋白 cDNA 探针的同位素标记按 Manjatis^[5] 方法稍加修改, 反应液的总体积为 10 μ l, 反应液上 Sephadex G₅₀ 柱后, 用含有 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的 TE 洗脱液, 把结合的与非结合的同位素分开。每管收集 0.5 毫升, 取出其中 10 μ l 做液闪检测, 收集第一个峰 (结合峰), 贮于一般冰箱待用。比放射性强度为 $>1 \times 10^7$ dpm/微克。

3. 细胞处理 按 Saber 法^[6]进行, 此法是在 Brachic^[7]方法的基础上省掉蛋白酶 K 步骤, 能保持较完整的细胞形态。细胞经甲醇/乙酸以 3:1 混合固定后, 0.2 N 盐酸和 70°C 的 2 \times SSC 溶液处理, 不同浓度乙醇脱水, 加入预杂交溶液, 50°C 保持一小时, 换上 ³H cDNA_{AFP} 的杂交溶液, 30°C 保持 3—6 天。用 50% 甲酰胺溶液洗涤 5—8 小时, 换上 2 \times SSC 溶液, 洗二次, 不同浓度乙醇脱水, 以上均在小管中进行, 最后从管中取出细胞滴于载玻片上凉干待用。

4. 放射自显影 按高慧^[8]方法进行, 将有细胞的载玻片涂上核乳胶后, 阴凉干燥, 放 4°C 冰箱曝光 3—4 周后, 取出显影和定影。

5. 染色与观察 用吉姆萨染色液以 1:40 的稀释, 染色 10 分钟, 用水冲洗后在光学显微镜下观察, 统计细胞中黑色银粒子, 此银粒子就是 ³H cDNA_{AFP} 与碱基互补的甲胎蛋白 mRNA 分子杂交的结果。

结 果 和 讨 论

常规培养的 F9-1 EC 细胞, 多为细胞团块, 贴壁力弱; RA 诱导后细胞生长缓慢, 贴壁很

F9-1 EC 细胞由季闻行同志培养提供

表 1 F9-1EC 细胞经 RA 诱导后 AFPmRNA 的原位杂交分析

| 每个细胞 银粒数 | 实验组 (RA ⁺ 组) | | | | | | | | | | | 对照组 (RA ⁻ 组) | | | |
|-------------|-------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------------------|-----|---|----|
| | 0 | 1 | 6 | 11 | 16 | 21 | 26 | 31 | 36 | 41 | 46 | 0 | 1 | 6 | 11 |
| 细胞数 | 8 | 28 | 28 | 61 | 40 | 15 | 10 | 7 | 1 | 1 | 1 | 53 | 141 | 4 | 2 |
| 占总测定细胞% | 18 | | | 82 | | | | | | | | 97 | | | 3 |

牢。以上两组细胞经过胰酶消化和固定液固定后,直接同含有³HcdDNA_{AFP}杂交液进行杂交,细胞未经过酸、热等步骤的变性处理,结果对对照组和实验组细胞均无杂交反应。

按 Saber 方法,细胞经过固定,变性,和³HcdDNA_{AFP}探针杂交以及放射自显影等步骤,观察到实验组的细胞分布很多银粒子,如图 1,对照组细胞没有或仅有极少银粒子,如图 2 所示。说明在未分化的 F9-1EC 细胞,甲胎蛋白基因处于不活动状态,细胞经过 RA 诱导分化后甲胎蛋白基因被激活并进行了表达。

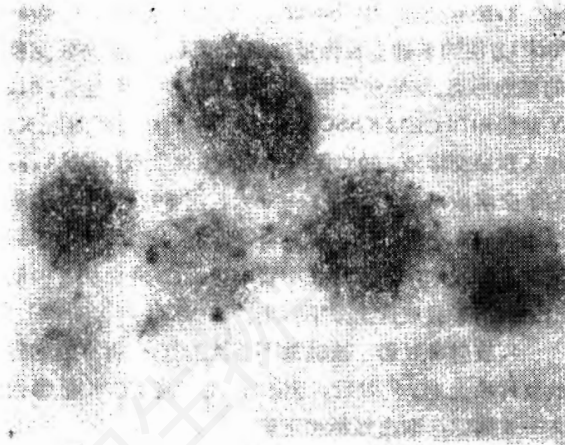


图 1 F9-1EC 细胞经 RA 诱导分化后,用³H cDNA_{AFP} 探针杂交细胞显出黑色银粒子

甲胎蛋白基因被激活后,每个细胞表达能力不一样。我们统计了每组 200 个细胞,因为细胞是圆球形的,所以需要不断调节光学显微镜的焦距,尽可能数清楚每个细胞所含有的银颗粒,如表一。从表中可以看到实验组有 82% 左右 F9-1EC 细胞被 RA 诱导分化,18% 左右细胞未被诱导分化,18% 细胞中有 4% 细胞没

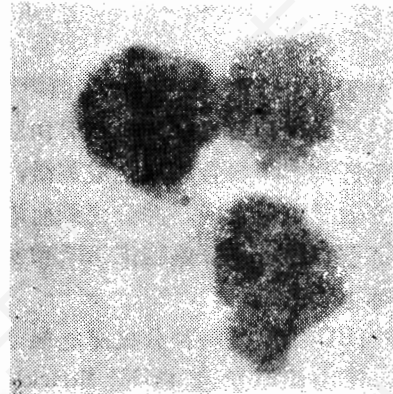


图 2 对照组细胞用³HcdDNA_{AFP} 探针杂交,细胞未见到银粒

有银粒。被诱导分化的每个细胞所含有银粒的数目各不一样,一般含有 6—20 个银粒,最多为 46 个银粒。这种差异的原因还不清楚,一种可能是细胞处于不同的细胞周期,其甲胎蛋白合成速率不一样,如甲胎蛋白量在早 S 期高于晚 S 期,而 S 期又明显地高于晚 G₁ 期^[9]。另一种可能为每个细胞被诱导分化的程度不一致,甲胎蛋白基因被激活的状态也不一样,从而有可能直接影响其转录水平。对照组每个细胞含有 0—5 个银粒的占 97%, 6—15 个银粒的占 3%,说明绝大多数细胞为未分化,只有极少数细胞甲胎蛋白基因有限表达。根据统计学处理,实验组与对照组相比 P 值 < 0.001,差异显著。此结果与 Buc-Caron 等^[10] 人的点杂交相似,不过原位分子杂交较之更为敏感和准确。

本文从甲胎蛋白 mRNA 角度证明了丛笑倩等报告的诱导组 AFP 免疫酶染色呈现细胞质阳性反应,对照组为阴性或弱阳性反应的结果。

参 考 文 献

- [1] 陆选永、曾庆镒, 1984, 生物化学与生物物理进展, 4:2—6.
- [2] 酒井 正春, 1985, 生化学, 57(1). 30—35.
- [3] 丛笑倩, 姚 鑫, 1983, 实验生物学报, 16(1) 93—105.
- [4] Strickland, S. et al., 1978, Cell, 15. 393—403.
- [5] Maniatis, T. 1982, Molecular Cloning, 109—112.
- [6] Saber, A. M. et al. 1983 Proc Natl. Acad. Sci., U. S. A. 80. 4017—4020.
- [7] Brahic, M. et al., 1978 Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 75, 6125—6129.
- [8] 高 慧, 1979 避孕药科研参考资料, 120—132.
- [9] 叶秀珍等, 1983 实验生物学报, 16(3), 293—305.
- [10] Buc—Caron, M. —H., et al., 1983 Teratocarcinoma stem Cells. 411—420.

小鼠红白血病细胞被诱导向终末期定向分化的观察

陈子兴 吴伟林 谢文洁
(苏州医学院血液病研究室)

小鼠病毒性红白血病细胞(Murine Erythroleukemia Cell, 以下简称 MEL 细胞)在红系祖细胞分化过程中相当于 CFU-e 阶段^[1]。在体外培养的条件下, MEL 细胞能被一些化学物质诱导而向终末期定向分化^[2], 表现在逐渐丧失无限增殖能力^[3], 并合成和积累血红蛋白^[4]。这种定向分化是一项复杂的多步骤过程^[5]。细胞在诱导剂作用下先发生向终末期的定向, 然后经过有限次数的分裂达到终末期, 这个过程中存在着一定的动力学规律。本文对 MEL 细胞在液体培养基中被诱导后的增殖和分化现象和在半固体培养基上形成集落的过程进行细致的动态的观察和分析, 来研究 MEL 细胞从定向到表达出终末期表现型的规律。

材 料 与 方 法

1. 细胞株: MEL 细胞株 DS 19 由美国纽约 Sloan-Kettering 癌症中心 Marks 博士提供并引入本实验室。该细胞株悬浮培养于含 10% 小牛血清和青、链霉素各 100 单位/毫升的 α -MEM 培养液(美国 GIBCO 产品)中。细胞在 37°C、含 5% 二氧化碳饱和和潮湿空气的培养箱内培养, 每三天由 2×10^6 细胞/毫

升稀释到 1×10^5 细胞/毫升定量传代。

2. MEL 细胞向终末期定向分化的检测: MEL 细胞经与诱导剂环己亚甲基二乙酰胺(HMBA, Marks 博士赠与)5 mM 共同培养特定时间后, 转移到不含有 HMBA 的盛有 1 毫升 1.8% 甲基纤维素(Fisher 公司产品, CPS 4000)半固体培养基的培养皿中, 在上述培养箱中 37°C 下培养特定时间后, 以 0.2% 二盐酸联苯胺和 3% 过氧化氢染色 5 分钟, 在倒置显微镜下观察集落的大小和联苯胺反应来确定“定向”细胞的百分比。

3. 细胞集落内细胞组成的分析: 在倒置显微镜下, 用微吸管将已染色的集落吸出滴于玻璃片上, 以盖片压开集落, 在普通光学显微镜下观察和计数单个集落中的细胞数。

实 验 结 果

1. HMBA 诱导 MEL 细胞向终末期分化
为了显示被 HMBA 诱导而向终末期定向分化的细胞逐渐丧失了增殖能力, 1.0×10^5 /毫升的 DS 19 细胞在含有 5 mM HMBA 的培养液中培养 4 天后, 将增殖起来的细胞再稀释到 1.0×10^5 /毫升, 分别在含有 HMBA 和不含有 HMBA 的新鲜培养液中进行第二轮培养。培养