

RA 和 DMSO 对鼠胚胎癌细胞的诱导分化*

孙君洁

(昆明医学院)

J. 坎比安·皮卡多 J. 克雷格 M.W. 麦克柏尼

(渥太华大学)

胚胎癌(EC)细胞是来自畸胎瘤的多能干细胞。鼠胚胎癌细胞系 P₁₉ 可以被维生素 A 酸(RA)或 DMSO 诱导分化。单个 EC 细胞能增殖形成肉眼可见的集落,其集落形成率高达 40-70%;而在同样条件下,分化细胞的集落形成率却非常低(一般小于 10⁻⁶)。已经证实,在分化过程的早期就有集落形成能力的丧失^[1];同时,分化培养中的平皿效率已被用来测定未分化细胞的比例^[2]。因此可以假设,经 RA 或 DMSO 处理后的 EC 细胞集落形成率的丧失是和它们的定向分化相一致的。本实验发现在含上述药物的培养基中仍有未分化的 EC 细胞存在,它们的比例趋于稳定,其水平的高低与药物浓度相反。实验结果提示,经 RA 或 DMSO 处理的 EC 细胞的增殖和分化过程之间呈动态平衡。

材料和方法

P₁₉ 是具有整倍体雄性核型的鼠胚胎癌细胞系^[3]。培养液用 α -MEM(Flow Laboratories, McLean, VA), 加有 2.5% 胎牛血清和 7.5% 小牛血清(Animal Health Laboratories, Toronto, Ontario)。细胞计数用 ZF 型 Coulter 计数器。维生素 A 酸(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) 溶于 DMSO (10⁻²M), -70℃ 保存,使用中的溶液用 100% 乙醇将之配制成 10⁻³M, 4℃ 避光保存,不超过一周;实验时,再用加有血清的培养液稀释至 10⁻⁷—10⁻⁹M。DMSO (Sigma), 使用时用加有血清的培养液稀释至 0.5—1% 的浓度。

EC 细胞在含有或不含 RA 或 DMSO 的培养基中,作悬浮培养,形成细胞集合物(aggregates)^[4]。后

者用 0.25% 胰蛋白酶和 0.1mM EDTA 分散成单个细胞,经台盼蓝检验,活细胞占 90% 以上。已分散的单个细胞用加有血清的 α -MEM(不含 RA 和 DMSO)适当稀释后,接种于 24 孔 Limbro 平皿,置 37℃、5% CO₂ 中孵化一周。形成的集落(colony)用含 1% 甲苯胺蓝(Sigma)的甲醇:醋酸(3:1)固定并染色,计算集落形成率(Plating efficiency, PE)。

结果

1. P₁₉ 细胞集合物在含各种浓度的 RA 或 DMSO 中持续培养,逐日测定其单个细胞的集落形成能力。图 1 及图 2 说明,经 RA 或 DMSO 处理后,EC 细胞的集落形成率一般在

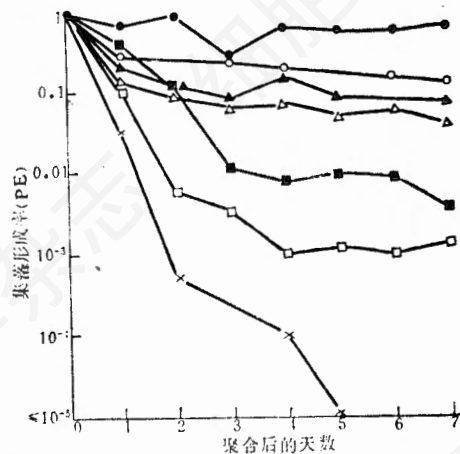


图 1 P₁₉ 细胞集合物经各种浓度的 RA 处理后的集落形成率: (●—●) 没有 RA; (○—○) 1 × 10⁻⁹ M; (▲—▲) 5 × 10⁻⁹ M; (△—△) 1 × 10⁻⁸ M; (■—■) 2.5 × 10⁻⁸ M; (□—□) 5 × 10⁻⁸ M; (×—×) 1 × 10⁻⁷ M

* 此项研究是在加拿大渥太华大学完成的。

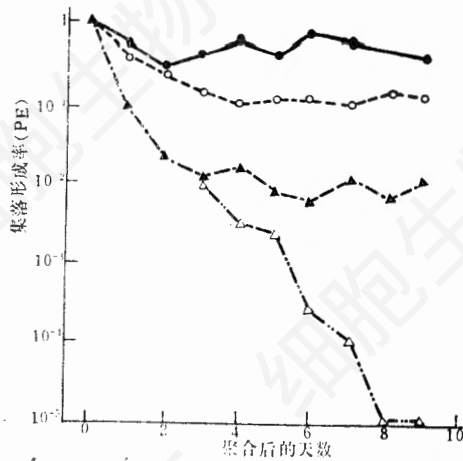


图2 经各种浓度的DMSO处理的 P_{19} 细胞集合物能形成集落的细胞的比例。(●—●)没有DMSO, (○—○)0.5%DMSO, (▲—▲)0.6%DMSO, (△—△)1%DMSO。

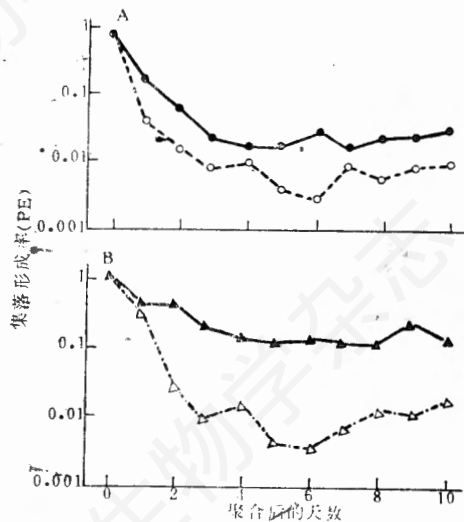


图3 A: (●—●)经 $10^{-8}M$ 处理的 D_3 细胞集合物PE, (○—○)经0.6%DMSO处理的01A1细胞集合物PE。
B: RAC_{65} 细胞集合物经不同浓度DMSO处理的PE: (▲—▲)0.5%DMSO, (△—△)0.6%DMSO。
集落形成率一般在头三天下降, 然后趋于平稳(A, B), 其平稳水平的高低与药物浓度相反(B)。

头三天下降, 然后趋于平稳, 其水平和药物浓度有关, 浓度愈高, 水平愈低。用同样方法处

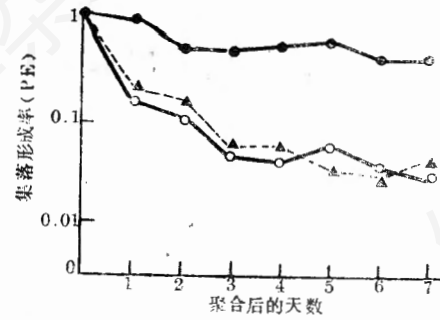


图4 经 $5 \times 10^{-8}M$ RA 处理10天后形成的一个集落性克隆, 再用RA处理时的集落形成率。(●—●)对照组, 没有RA, (○—○)暴露于 $1 \times 10^{-8}M$ RA, 亲代 P_{19} 细胞对 $1 \times 10^{-8}M$ RA的反应特征如▲—▲所示。

理 P_{10} 的三个突变型 D_3 、01A1和RAC65, 得到相似结果(图3A及B)。

2. 由于分化是不可逆的, 如果EC细胞都逐步分化, 则PE应不断下降, 直至探测不出, 如图1和图2中用 $10^{-7}MRA$ 或1%DMSO所得的结果。但是如上所述, 使用的药物在一定剂量范围内时, PE趋于平稳, 这说明经药物诱导的集合物中仍有未分化的EC细胞存在。为了排除这种现象可能由于培养的EC细胞成分不纯, 它们对RA和DMSO的敏感性不同所致, 我们作了以下的实验: 从 P_{10} 细胞经 $5 \times 10^{-8}MRA$ 处理10天后形成的集落中, 任意挑出10个集落, 分别分散成单个细胞, 再用RA处理。结果证实它们的反应特征都没有改变。图4所示为其中的一个集落性克隆对RA的反应, 与亲代 P_{10} 细胞非常相似。因此, 看来用不纯成分来解释平稳水平是不恰当的。

3. 对平稳期的另一个解释是: 可能集合物中的EC细胞增殖很缓慢, 可能它们在有机会被药物诱导分化以前就已经退出细胞周期, 处于不进行细胞分裂的状态。为此, 我们作了下面的实验: 分别于实验开始后的第2天和第4天移去RA, 几天以后, EC细胞的比例回升(图5)。这提示RA处理的集合物内的EC细胞仍在增生, 仍活跃地处于细胞周期中, 并且那些摆脱了RA诱导分化作用的EC细胞仍可

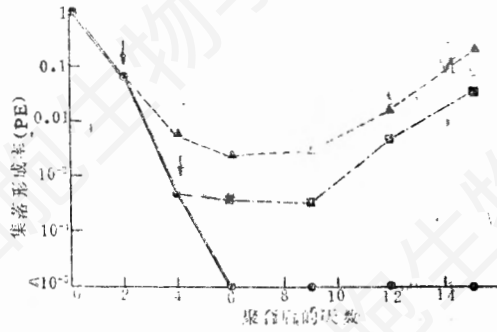


图5 P₁₀细胞在移去RA后的集落形成率。(●—●)集合物在整个实验过程中皆经受RA的作用；(▲---▲)经受两天的作用；(■---■)经受4天的作用。箭头表示药物移去的时间。

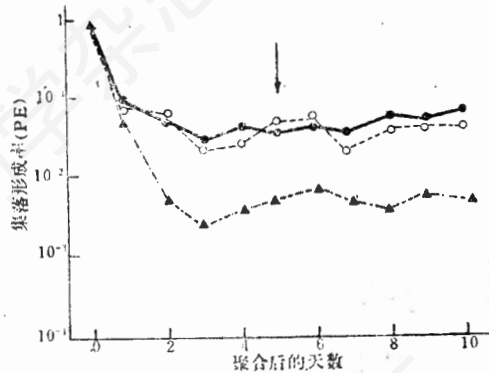


图6 RA浓度改变对EC细胞O1A1集落形成率的影响。(●—●)RA $10^{-9}M$ ；(○---○)RA的浓度于第5天(箭头所示)由原来的 $10^{-9}M$ 加大到 $10^{-8}M$ ；(▲---▲)RA $10^{-8}M$ 。

在原位增生。其他二个实验也未发现EC细胞处于细胞周期之外(Campione-Piccardo等,待发表)。

根据以上结果,可以认为进入平稳期时,一方面已有大量的EC细胞被药物诱导分化,另一方面集合物中仍有未分化的EC细胞在增生。可以设想后者分裂生成的子代细胞中,有的继续被药物诱导,定向分化;有的则仍保留多能干细胞的功能(自我复制,仍是EC细胞)。而且,只有这些不断生成的EC细胞在集合物中的比例相对稳定时,PE才趋于稳定。因此我们认为:图1、2、3中所见到的平稳状态提示

EC细胞的增殖和分化之间保持着动态平衡。
4. 进入平稳期后,再加大药物浓度,PE一般不随之下降(图6)。这说明在平稳阶段的EC细胞对RA浓度的变化不敏感。

讨论

我们观察到当EC细胞以集合物形式在RA或DMSO存在时进行培养,其克隆效率和药物剂量有依赖关系。一般来说,PE在头三天下降,以后趋于平稳;平稳期的水平和药物浓度相反。由于我们没有发现亲代EC细胞的异质性,同时看来集合物中的EC细胞是增生的,因而初步得出结论:平稳期代表动态平衡,即EC细胞的增殖率由RA或DMSO诱导的分化率所平衡。

或许上述分化实验的模式可以较普遍地运用。在定向分化的随机性已为克隆分析所证实的系统中,如我们的模式所示,未分化细胞的比例下降,且渐达到平稳状态。例如,鼠红白血病(MEL)细胞的定向分化已被证实为一随机过程,定向分化细胞的比例趋于平稳,其水平与诱导剂的剂量成比例^[5,6]。在分化中的鼠黑色素瘤细胞也观察到未分化细胞比例的平稳状态^[7]。

已经发现,诱导EC细胞分化所形成的细胞型取决于特定的EC细胞系、细胞培养的方式、诱导手段、诱导剂的种类和诱导剂的浓度^[8-11]。在P₁₀细胞系的诱导分化中,细胞集合物的形成是重要的,象DMSO,只有在细胞聚合时,才起诱导分化作用。高浓度的DMSO(0.5%—1%)可诱导P₁₀细胞分化成肌肉细胞^[1]。但是,RA诱导P₁₀细胞产生肌肉组织所需的浓度则低得多(10^{-9} — $10^{-7}M$);而且,在RA浓度较高时($>10^{-7}M$)便可诱导生成神经元和星形细胞^[4,11]。从诱导剂浓度的影响来看,DMSO较RA更明显:DMSO剂量稍有增加,就使集合物内的EC细胞大幅度下降(图2)。此外还观察到,进入平稳期的P₁₀突变型O1A1对RA浓度的改变不敏感(图6)。以上这

些结果提示, EC 细胞的诱导分化过程是复杂的, 同时看来 RA 和 DMSO 的作用方式也并不相同。

球状的肿瘤细胞的集合物已被广泛用于研究物理和化学因子对细胞的作用, 因为这种球状体中的细胞所处的条件更接近于活体内肿瘤中细胞的状况^[12]。球状系统的一个主要缺点是其内的所有活细胞都是恶性的。现已证实, 组成自然发生肿瘤的大多数细胞是干细胞的分化了的后代, 而干细胞本身所占的比例比较小^[18]。经 RA 或 DMSO 处理的 EC 细胞集合物可作为类似于人类自发性肿瘤的球状模型, 其中的干细胞的比例小、稳定而且可以控制。

参 考 文 献

[1] Edwards M. K. S. et al., 1983, *Mol. Cell Biol.* 3:2280—2286.

- [2] Rosenstrauss M. J. and Levine A. J., 1979, *Cell*, 17: 337—346.
 [3] McBurney M. W. and Rogers B. J., 1982, *Dev. Biol.* 89: 503—508.
 [4] Jones-Villeneuve E. M. V. et al., 1982, *J. Cell Biol.*, 94: 253—262.
 [5] Gusella J. and Housman D., 1976, *Cell* 8: 263—269.
 [6] Mager D. and Bernstein A., 1978, *J. Cell Physiol.* 94: 275—286.
 [7] Bennett D. C., 1983, *Cell* 34: 445—453.
 [8] Strickland S., 1981, *Cell* 24: 277—278.
 [9] Hogan B. L. M. et al., 1981, *Nature* 291: 235—237.
 [10] Speers W. C. et al., 1979, *Am. J. Pathol.* 97: 583—584.
 [11] Edwards M. K. S. and McBurney M. W., 1983, *Dev. Biol.* 98:187—191.
 [12] Sutherland R. M. et al., 1981, *Cancer Res.* 41: 2980—2984.
 [13] Pierce G. B. and Wallace C., 1971, *Cancer Res.* 31: 127—134.

选择性标记基因和 V-erb B 基因对哺乳动物细胞的转移及其转录产物的检测

徐卫明 朱德厚 姚 鑫

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

近十几年来, 应用 DNA 转移的方法将克隆基因或细胞总 DNA 导入离体培养的哺乳类细胞, 已成为研究真核细胞基因调控的一个重要方法。一般要获得克隆基因稳定表达的细胞系, 需要用选择性标记的基因^[1]。对于具有 TK⁻、aprt⁻ 或 hprt⁻ 缺陷的细胞, 通常可以用相应的互补基因作为选择基因^[2]。对于不具有特殊遗传缺陷的细胞, 可以用显性转移基因 Xgpt^[3], neo^[4] 或 dhfr^[5] 基因作为选择基因, 加上需要研究的本身不带选择标记的目标基因对细胞共转移, 二种基因都可以稳定地整合到宿主细胞染色体, 通常有 10—90% 的可能性, 但

因为要获得稳定的转移基因的克隆需要长时间和大量的工作, 并且共转移中需要 10⁹ 细胞才能检测到 RNA 的表达产物, 因此筛选和检测的工作量有时异乎寻常地大。为了提高检测的灵敏度, 我们应用了近二年新发展的 RNA 快速打点杂交法, 对转移后的细胞进行检测^[6,7]。结果发现, 只需 10⁵ 到 10⁶ 细胞就可以明显地观察到克隆基因的表达情况。

材 料 和 方 法

一、细胞

小鼠 L-TK⁻ 细胞株是一株 TK 基因缺陷的 L 细胞