

相联接的 V-erb B 基因也导入了受体细胞,问题是该基因能否得到表达,结果我们用 RNA 快速打点杂交法在刚转化出来的只有接近于二个小北京瓶的培养物(1.5×10^6 细胞)就检测到了目标基因的表达。如果用常规 Northern 印迹方法检查,需要 10^9 细胞,这就需要至少 10 个大的卡氏瓶细胞培养物。因此用 RNA 快速打点杂交法对转移的克隆基因表达的检测提供了一个简便快速的初筛方法。为了看一看是否这一情况也适用于其它克隆基因的转移实验,我们也用了最常用的基因转移模型: tK 基因(疱疹病毒)转化 L-TK⁻ 细胞,得到了相似的结果。有时对一个未知功能的 DNA 片段进行转移或对一个克隆基因虽然已知功能但其编码的蛋白或多肽尚未有适当的生化或免疫化学的方法检测时,利用 RNA 快速打点杂交法进行检测将是一个有效的途径。

当然,这种方法对 RNA 产物只能给以粗略的量的估计,并不能达到严格地准确地定量。同时对于转移后克隆基因转录的 mRNA 的种类和状态也还有待于进一步地用 Northern 印迹的方法进行分析。

小 结

利用 RNA 快速打点杂交法,在 10^5 — 10^6

细胞的情况下,检测到了 pAGO 质粒转化 L-TK⁻ 细胞后 TK 基因的表达和 pZineo SV(B) erbB 转化 NIH/3 T 3 细胞后 erbB 基因的表达。

参 考 文 献

- [1] Wigler, M. et al., 1977. *Cell* 11: 223.
- [2] Wigler, M. et al., 1979. *Cell*, 16: 777—785.
- [3] Mulligan, R. C. & Berg, P. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 2072—2076.
- [4] Southern, J. & Berg, P. 1982. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 327—341.
- [5] Wigler, M., et al. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 3567—3570.
- [6] Bressor, J. et al., 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80: 6523—6527.
- [7] Bressor, J. et al., 1983. *DNA* vol. 2 no. 3: 243—254.
- [8] Garapin, F. G. et al., 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 3755—3759.
- [9] Cepk, C. L. et al., 1984. *Cell*, 37: 1053—1062.
- [10] Manitis, T, et al., 1982. *Molecular cloning*. P, 86—94.
- [11] 唐永明, 1985, 介绍一种快速、简便地测定 poly (A) RNA 的方法——快速打点杂交法,待发表。

新生大鼠肝细胞系 NRL-84 的建立及其特性的研究

陈尊器 葛日萍

(汕头大学医学院)

朱德厚 叶秀珍 陈瑞铭

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

自从五十年代后期发现甲胎蛋白(AFP)以来,经过一系列研究,其与肝癌的关系已被肯定。虽然近年已有了一些人体和动物的肝癌细胞系、株^[1-3],但建立能够反映 AFP 变化动态

的正常肝细胞系,对于进一步开展实验研究和应用,将是非常重要的一环。我们已从纯品系 wistar 新生大鼠肝组织获得体外长期培养的正常肝细胞,定名为新生大鼠肝细胞系 NRL-84,

现已连续培养20代。本文报道该系细胞培养建立的过程及其一些生物学特性研究结果。

材料与方 法

一、取材及培养

纯品系 wistar 新生大鼠, 无菌剖腹取肝, 在解剖显微镜下切成 1—1.5 mm³ 小块, 接种于细胞培养瓶。加含 10% 小牛血清的缺精氨酸 Eagle's 培养液, pH 7.3, 于 37°C 静置培养, 每天观察。至第 3 代后改为含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 其它培养条件相同。

二、细胞的生物学特征

1. 一般形态学观察 在 Nikon 倒置显微镜下随时作活细胞观察并摄影。扫描电镜标本用 2.5% 戊二醛固定、1% 锇酸再固定, 经脱水、临界点干燥、镀金后, 在 ISM-35 C 型扫描电镜观察并摄影。

2. 生长速度 取第 5 代培养细胞, 按 1.0×10^4 、 3.0×10^4 及 5.0×10^4 三种细胞密度接种培养, 隔天取样 2 瓶计数, 连续 14 天, 其余每隔 4 天换液一次。将结果绘制生长曲线, 并计算细胞群体倍增时间。

3. 分裂指数 第 5 代细胞接种于带有小盖片条的培养瓶, 隔天取样, Bouin's 液固定, HE 染色, 分别计 500 个细胞中期分裂相。

4. 染色体数目及分布 培养 3 天的细胞加秋水仙素处理, 收集细胞, 常规制作染色体片, Giemsa 液染色, 检查 50 个细胞中期的染色体数, 绘出分布图。

5. 软琼脂细胞集落形成试验 取直径 6 cm 的灭菌塑料平皿, 在无菌条件下先加 0.5% 琼脂铺底, 上层再加 1.0×10^4 /皿细胞密度的 0.3% 琼脂糖培养液, 置 5% CO₂ 培养箱, 37°C 培养 3 周左右, 观察生长状况。

三、检测 AFP 动态

1. 间接免疫荧光法 取培养在小盖片条上生长的单层细胞, 固定后分别加兔抗大鼠 AFP 抗血清, 再加荧光素异硫 氰酸盐标记的羊抗兔免疫球蛋白抗血清 (FITC-IgG), 迅速在 olympus BH-RFL-W 型荧光显微镜观察并摄影。

2. 对流免疫电泳 在琼脂糖板的样孔上, 分别加入各代细胞的培养液及抗血清后, 进行对流免疫电泳。部分培养液再作微量免疫电泳, 进一步了解沉淀带的特异性。

3. 核酸原位杂交 按 Brahic 法^[4]加以改良。培养细胞小盖片条经固定、酒精不同梯度脱水后, 分别加 ¹²⁵I-PRAF₆₅ 及 ³H-PRAF₆₅ (大鼠 AFP-cDNA 克

隆 3' 末端片段 PRAF₆₅, 系由约翰霍金斯大学吴仲蓉博士赠送), 在特制湿盒内进行杂交, 经甲酰胺等处理后作放射自显影, 观察细胞内银粒分布及数量并摄影。

结 果

一、培养过程细胞生长动态

经过 5 天培养, 部分小组织块周围开始有少数细胞长出。之后, 发现其中有 3 处小组织块长出的细胞较多, 呈多边形, 比较均一, 鱼贯排列并向四周放射生长, 逐渐形成生长晕 (图版—图 1)。随着培养天数的延长, 生长晕的细胞也不断增多, 向邻近扩展。此时同瓶中的其它小组织块, 有的已经脱落, 有的生长甚慢, 经选择性地保护, 保留上皮样细胞生长晕。细胞数目继续增多, 紧贴瓶壁, 铺展成单层, 及至几乎占据全瓶。随之以 0.15% 胰酶—0.02% EDTA 液混合消化, 冲散生长在瓶壁上的细胞, 原瓶继续培养。细胞散布紧贴于瓶壁, 有单个分散或三、五成群 (图版—图 2), 逐渐繁殖成小岛状和连成片层。生长较茂密时, 以同法消化, 接种于另一培养瓶, 进行第一次传代, 继续培养。又经历约 3 周进行第二次传代, 此后 4—5 天换液, 约 2 周可传瓶一次, 至第三代改用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 细胞能恒定地生长并繁殖传代。曾将第 5 代细胞冻入液氮 (-196°C), 2 个月后复甦率达 90% 左右, 细胞生长情况良好 (图版—图 3)。现已培养历时一年多, 传 20 代, 生长稳定, 冻存。

二、细胞的一般生物学特征

1. 相差显微镜下连续活体观察 见到细胞界限清晰, 胞浆较丰富, 胞浆内含大小不等的颗粒。胞核圆或椭圆形, 核仁可见, 分裂相较多。细胞形态颇为一致, 主要为上皮样多边形, 基本上未见梭形细胞。扫描电镜见细胞表面微绒毛较稀疏、粗短 (图版—图 4)。

2. 细胞增殖状况 三种不同接种密度的细胞增长情况结果见表 1。

表1 三种不同浓度 NRL-84 细胞接种增长数

| 培养天数 | 接种细胞数(10^4 /ml) | | |
|------|--------------------|-----------------|-----------------|
| | 1×10^4 | 3×10^4 | 5×10^4 |
| 2 | 4.0 | 6.5 | 12.1 |
| 4 | 6.3 | 8.4 | 21.8 |
| 6 | 12.2 | 17.3 | 30.1 |
| 8 | 16.6 | 24.4 | 28.3 |
| 10 | 14.3 | 22.1 | 24.1 |
| 12 | 12.6 | 20.9 | 19.6 |
| 14 | 12.1 | 18.9 | 17.2 |
| 最大倍数 | 16.6 | 8.1 | 6.0 |

可以看出,三种密度的细胞数培养后都是上升的。 3.0×10^4 /ml 组在第8天为最高,约达8.1倍,此时 5.0×10^4 /ml 组开始下降。传代后细胞分裂指数也逐步上升,第8天达48%,以后逐渐下降,至14天为3.9%。群体倍增时间为57.6小时。

3. 染色体数目及分布 结果见图1。染色体分布于39—67条范围,主峰为40—44条,占62%;众数42条,占38%。未发现特殊异常染色体。

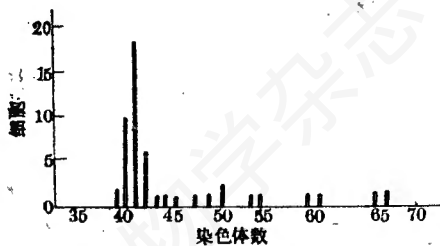


图1 染色体数目及分布

4. 软琼脂试验 接种 1.0×10^4 /皿细胞,培养3周,未见有细胞集落形成。

三、AFP 合成、分泌动态

1. 间接免疫荧光试验 早期的培养细胞(第1—2代),胞浆内见到黄绿色强荧光反应(图版一—图5),第4—5代开始减弱,延续至第7代,反应已甚弱。

2. 对流免疫电泳 第1—2代细胞培养液中可测到AFP,其含量约在300 ng/ml范围,

免疫电泳呈单一弧形沉淀线。至第5代细胞,培养液中已测不出AFP,免疫电泳也未见沉淀线出现。

3. 核酸原位杂交 早期的培养细胞胞浆内的AFP mRNA增加,杂交后的放射自显影见到胞浆内有散在的银粒存在(图版一—图6),至第5代后,这种现象有减弱。

讨 论

本文报道从 Wistar 新生大鼠肝组织成功地建立了一个上皮样细胞、有功能的正常肝细胞系,现定名为 NRL-84。这系细胞有两个主要特点:① 建系初期,选用缺精氨酸 Eagle's 培养液,不利于非上皮细胞的生长,有选择地保护、保留上皮样生长晕及其细胞,提高了细胞群体的纯度。正是由于细胞比较均一,所以相应地提高了实验效果的一致性和分析结果的可靠性;② 该系的早期培养细胞保持了AFP分泌的功能,但随培养时间的延长,AFP迅速趋向降低和停止。在我们近期的另一组实验研究中又发现^[5],细胞经用某些化学诱变剂后,AFP可重现复升。如停止药物作用并再继续培养,AFP又可逐渐消失。细胞具有AFP自然消长的这种状态,正是肝病研究上十分有用的标志。因此,它是一个比较理想的实验模型。

一般而言,正常细胞的建系较恶性细胞困难,这是因为正常细胞来源于已分化成熟的组织,生长条件要求较严格。而肿瘤细胞分化较差,生长已失去控制,具有无限制繁殖的能力,适应环境条件的范围也较大,所以比较容易生长。在大鼠肝上皮细胞的培养上,较早的是1952年Likely的报道^[6]。但因培养一段时间之后,往往被成纤维细胞所占据,因此失去了原有的目的。后来根据上皮样细胞与成纤维细胞对培养表面的贴附力不同的特点,改进了培养方法,可以有步骤地弃去成纤维细胞或抑制其生长,筛选以上皮样占绝对多数的细胞系和建立克隆细胞^[7-8],也有用无血清培养液培养^[9]。由于研究目的不同,对于细胞系的运用

也各有所取。例如,有着重于形态学、酶学或激素^[10]等各方面。AFP是肝癌的一个带特征性的标志,所以建立能够反映AFP消长动态的细胞系,对于肝癌的病因发病机理和生物学特性研究,将是一个很好的实验材料。该系正常新生大鼠有功能的肝细胞的建立,在国内尚属首次报道,而从能反映AFP动态的细胞系来说,国外也很有限。

既然AFP是一个重要标志,那么有必要在培养细胞及其培养液中分别及时检测发现。为了比较客观地表达细胞的AFP状况,我们应用了以核酸原位杂交反映细胞内AFPmRNA的转录水平、以间接免疫荧光反映细胞内AFP的合成和以对流免疫电泳反映细胞AFP分泌状况等三方面的检测体系,力求综合分析,提高判断结果的科学性和准确性。从我们利用该系细胞在另一组实验研究的检测结果分析中,表明要比用单独任一项的结果评价更加客观,

具有一定意义,是一组有价值的检测方法。

参 考 文 献

- [1] Chen Ruiming et al., 1980, *Scientia Sinica*, 23(2):236.
- [2] Doi, I. et al., 1975, *Gann.*, 66 (4): 385.
- [3] 朱德厚等, 1980, *实验生物学报*, 13 (1): 113.
- [4] Brahic M. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75(12): 6125.
- [5] 葛曰萍、陈尊器等, 1986, *实验生物学报*, 19(2): 193-201.
- [6] Likely G. D. et al., 1952, *J. Nat. Canc. Inst.*, 13:177.
- [7] Chessebeuf M. et al., 1974, *Biochimie*, 56: 1365.
- [8] Williams G. M. et al., 1971, *Exp. Cell. Res.*, 69: 106.
- [9] Nissiey S. P. and P. A. Short, 1977, *Cell*, 11: 441.
- [10] Chessebeuf M. and P. Padieu, 1984, *In Vitro* 20(10):780.

人中性粒细胞 C₃ 受体 YC 玫瑰花结形成及其形态学观察

刘友华*

(中国医科大学细胞生物学研究室)

异物被吞噬细胞吞噬时通常需要经过细胞膜上受体的识别和粘附。大量实验证明,无论是中性粒细胞还是巨噬细胞,其细胞表面均存在有Fc受体和C₃补体受体,它们在吞噬细胞识别、结合、吞噬抗原颗粒及传递抗原信息中起着协同作用^[1,2]。体内外各种因子或微环境均能影响表面补体受体的活性^[3]。

本文根据酵母多糖可激活血清C₃旁路的原理,将酵母菌与人血清共同保温,形成YC复合物,它与表面具C₃受体的细胞结合形成YC玫瑰花结^[4]。我们用此技术检测了人正常中性粒细胞表面的C₃受体,应用光镜和扫描

电镜技术观察了人中性粒细胞所形成的YC玫瑰花结的形态学特征,并讨论了一些影响中性粒细胞YC玫瑰花结形成的因素。

材 料 和 方 法

一、人中性粒细胞的分离制备

人中性粒细胞的分离制备参照Ferrante等^[5]方法,稍加改进。其简要过程是,用20ml 76%泛影葡胺(上海信谊制药厂)加入90ml 9% Ficoll液(瑞典

本文承王芸庆教授审阅,谨此致谢。

* 现在工作单位: 中国医学科学院基础医学研究所。