

- [16] Porter, R. P. et al., 1973, In: *Tissue culture Methods and Applications*. Ed: Kruse, P. F., PP. 93—105, Academic Press, New York.
- [17] Auf'mkolk, B. et al., 1985, *Calcif. Tissue Int.*, 37: 228.
- [18] Rao, L. G. et al., 1977, *Endocrinology*, 100: 1233.
- [19] Vergedal, J. E. et al., 1969, *J. Histochem. Cytochem.*, 17: 799.
- [20] Urist, M. R. et al., 1976, In: *The Biochemistry and Physiology of Bone*. Ed: Bourne, G. H., Vol. 4. PP. 29—35, Academic Press, New York.
- [21] Liberman, U. A. et al., 1983, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 958.
- [22] Nichols, G. Jr. et al., 1971, In: *cellular Mechanisms for Calcium Transfer and Homeostasis*. Ed: Nichols, G. Jr., and R. H. Wasserman, PP. 211—215, Academic Press Inc, New York.
- [23] Sudo, H. et al., 1983, *J. Cell Biol.*, 96: 191.
- [24] Bellows, C. G. et al., 1984, *Calcif. Tissue Int.* 36: 452.
- [25] Tenenbaum, H. C. et al., 1982, *Calcif. Tissue Int.*, 34: 76.
- [26] Tonna, E. A. et al., 1981, In: *Aging and Cell Structure*. Ed: Johnson, J. E., Vol. 1. PP. 251—266. Academic Press, New York.
- [27] 宋新德等, 1987, 氟对人胎成骨细胞培养物生长、分化影响的探讨, 中国地方病学杂志, 6(1):21.

抑癌因子对 Ehrlich 腹水癌细胞结构、 表面形态和聚集能力的影响*

樊景禹

(北京医科大学生物物理教研室)

周爱如 李敏媛** 陈明

(北京医科大学生物化学教研室)

抑癌因子是从 Ehrlich 腹水癌小鼠腹水中提取的具有抑癌活性的肽类物质^[1]。利用 ³H-TdR 参入, 台盼蓝染色、钾离子释放等方法, 已证明抑癌因子对 Ehrlich 腹水癌细胞的 DNA 合成具有明显抑制作用, 并可杀伤肿瘤细胞^[1,2]。这些作用具有肿瘤专一性^[2,3]。同时证明, 在抑癌因子作用于肿瘤细胞的早期即可影响细胞膜的物理性质而使其流动性降低^[4]。本文用电镜下的形态学方法进一步研究了抑癌因子对肿瘤细胞作用的性质和特点。

材料和方 法

1. 抑癌因子的分离 取接种 Ehrlich 腹水癌后 8—12 天小鼠的无细胞腹水液用 80% 乙醇沉淀, 无水乙醇回流, 经 Sephadex G 25 及 Sephadex LH 20 柱层

析分离, 收集第一峰, 冷冻干燥^[1]。

2. 细胞处理 取接种 7 天的 Ehrlich 腹水癌细胞用 PBS 洗涤后悬浮于 5 ml Eagle's 液内, 使细胞浓度为 $4 \times 10^5/\text{ml}$ 。在细胞悬液内加入抑癌因子, 浓度为 $600 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。将上述细胞在 37°C 下分别温育 4、8 和 16(或 18)小时。温育毕, 细胞经 PBS 洗涤, 用于制备电镜样品。对照细胞经同样处理, 但不加抑癌因子。

另取正常小鼠股骨, 用 Eagle's 液冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞并悬浮于 Eagle's 液内, 在其中加入抑癌因子($600 \mu\text{g}/\text{ml}$), 于 37°C 下温育 4 小时。另一管细胞

* 本文部分实验工作由中国科学院 科学基金生字 376 号资助。

** 现在通讯地址: 预防医学中心。

生物物理教研室刘智、卫之涓, 生化教研室罗培良等同志参加有关技术工作, 谨致谢意。

经同样处理但不加抑癌因子作为对照。温育后的细胞用于制备扫描电镜样品。

3. 透射电镜样品制备 细胞先后用3%戊二醛和1%OsO₄固定, 618环氧树脂包埋, 按常规制备成超薄切片, 在Opton EM 109电镜下观察。

4. 扫描电镜样品制备 细胞先后用3%戊二醛和1%OsO₄固定, 乙醇系列脱水, 临界点干燥器(Hitach HCP-2)干燥, 离子镀膜仪(Eiko IB-3)镀膜, 在Hitach S-450扫描电镜下观察。

5. 资料收集与结果处理 在透射或扫描电镜下对细胞分类计数时, 逐个观察每个进入视野的细胞, 直至在一实验条件下累积足够细胞数为止。在透射电镜情况下, 每个载网只观察一张切片上的细胞, 如数量不足, 则取来自另一包埋块的载网继续观察, 以避免对同一细胞的重复计数。分类计数的结果经 χ^2 检验。

结 果

一、抑癌因子对肿瘤细胞聚集能力的影响

Ehrlich腹水癌细胞在Eagle's液内于37℃下温育后, 细胞呈不同的聚集状态。除一部分细胞单个分散存在外, 其余均若干个细胞聚集成团。将细胞分为6组, 单个细胞属第1组, 其余按细胞团中所含细胞数分为5组, 细胞数/团分别为2、3、4、5和>6, 以同一实验条件下细胞在各组中的百分比分布作为细胞聚集能力的指标。在集聚团中的细胞比例越大, 表示细胞聚集能力越强。结果表明, 温育8小时后的细胞聚集能力较温育4小时的有明显增加; 但温育时间延长至18小时, 细胞聚集能力不再发生明显改变(图1)。

由图1可见, 温育4和8小时后, 实验组的细胞聚集能力显著增加, 大约一半细胞聚成6个细胞以上的团块(图版I A)。在温育18小时后, 实验组的细胞聚集能力反而下降, 以至单个细胞所占比例高于对照组。

在相同条件下, 小鼠正常骨髓细胞与抑癌因子温育4小时, 其聚集能力与对照组未见显著区别(图1内插图)。由此可见, 抑癌因子对Ehrlich腹水癌细胞聚集能力的影响可能具有

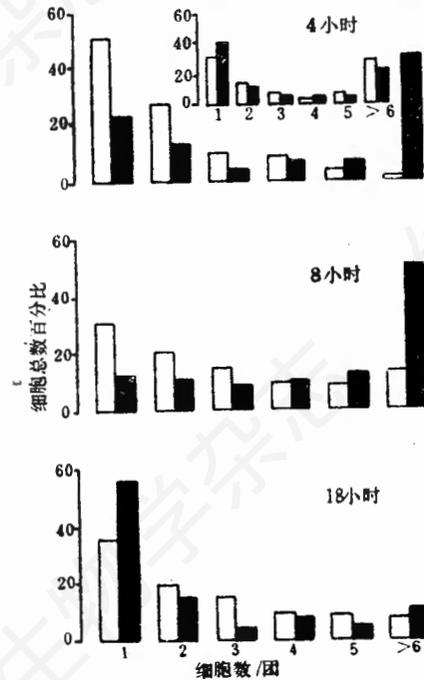


图1 抑癌因子对 Ehrlich 腹水癌细胞聚集能力的影响

每一条件下检查的细胞总数大约为480个。在三个时间点, 实验组与对照组均有显著差异($P < 0.01$)。右上角插图: 抑癌因子对正常小鼠骨髓细胞聚集能力的影响。抑癌因子组与对照组检查的细胞数分别为428和440。两组未见显著差异($P > 0.10$)。□对照组, ■实验组

肿瘤特异性。

二、抑癌因子对肿瘤细胞表面形态的影响

Ehrlich腹水癌细胞在Eagle's液内, 37℃温育时, 其表面形态在扫描电镜下可分为三种类型。I型, 细胞表面布满微绒毛; II型, 表面为泡状突起; III型, 表面光滑, 有少数片状突起。在对照组中, 三型细胞的组成比例不随温育时间而有明显变化。实验组则不然, 细胞的表面形态随温育时间有一定的变化, 以18小时最为明显: I型细胞显著减少, III型细胞显著增多, 达到细胞总数的60%以上(表1)。

三、抑癌因子对肿瘤细胞内部结构的影响

在透射电镜下, 对照组Ehrlich腹水癌细胞大多数结构完好无损。少数细胞结构破坏: 胞核凝集, 胞质肿胀, 基质稀薄, 内质网断裂,

表 1 扫描电镜下细胞表面形态分类(%)变化*

细胞类型	I		II		III	
	对照	实验	对照	实验	对照	实验
4小时	83	87	11	2	6	11
8小时	82	80	7	8	11	12
18小时	89	29	5	9	6	62

* 每一实验条件下观察的细胞数均为 100

表 2 透射电镜下细胞形态分类(%)变化*

细胞类型	完好		破坏		分裂中细胞	
	对照	实验	对照	实验	对照	实验
4小时	93.2	98.0	3.4	2.0	3.4	0.0
8小时	97.3	93.2	2.7	5.1	0.0	0.0
16小时	95.6	3.8	4.4	96.2	0.0	0.0

* 在每一时间点, 对照组与实验组观察细胞数各为 90 和 60

线粒体肿胀, 细胞表面微绒毛减少或消失(图版 IB)。在各温育时间点, 受破坏的细胞均不超过细胞总数的 5%。在温育 4 小时, 偶见有丝分裂的细胞(表 2)。

实验组在温育 4 和 8 小时时, 破坏细胞比例尚未见明显增加。但在 8 小时时发现一部分细胞中出现胞浆裂隙(图版 IC)。16 小时时, 绝大多数细胞结构破坏(图版 IB, 表 2)。整个过程中, 未见有丝分裂中的细胞。

讨 论

本文结果表明, 抑癌因子对 Ehrlich 腹水癌细胞内部结构、表面形态及聚集能力均产生影响。对内部结构的影响始于温育 8 小时。这时, 大部分细胞内部结构与对照细胞无异, 但部分细胞出现胞质裂隙。这种变化的本质及其与随后细胞的广泛破坏的关系仍然不清楚。在温育 16 小时, 大部分细胞结构受破坏, 其比例与台盼蓝染色法发现的杀伤细胞比例接近^[1,2]。

抑癌因子对 Ehrlich 腹水癌细胞表面形态的影响主要发生在温育 18 小时, 表现为 III 型细胞比例明显增加。由于此时大部分细胞结构破坏, 因此, 在本实验中, III 型细胞可能主要代表了破坏细胞的表面形态; 不过, 由于 III 型细胞所占比例(~60%) 低于破坏细胞(>90%), 两者并不呈平行关系。

抑癌因子与 Ehrlich 腹水癌细胞温育 4 和 8 小时组, 均可使细胞聚集能力明显增加, 提示细胞聚集能力的增加可作为抑癌因子对肿瘤细胞作用的早期指标之一。多种因素可影响细胞的聚集能力^[6], 抑癌因子使肿瘤细胞聚集能力增加的原因仍待进一步研究。抑癌因子对肿瘤细胞的这种作用可能具有肿瘤专一性, 因为在同样条件下正常骨髓细胞的聚集能力并不发生变化。至于与抑癌因子温育 18 小时组, Ehrlich 腹水癌细胞的聚集能力下降, 这可能是细胞死亡的一种表现。

摘 要

本文用透射与扫描电镜方法研究了抑癌因子对 Ehrlich 腹水癌细胞的作用。发现, 在抑癌因子作用下, 肿瘤细胞内部结构破坏, 表面形态趋于简化。在抑癌因子作用早期(4—8 小时), 肿瘤细胞聚集能力增加, 这种变化可能具有肿瘤专一性; 在抑癌因子作用 18 小时时, 肿瘤细胞聚集能力下降, 这可能与此时细胞大部分死亡有关。

参 考 文 献

- [1] 李敏媛等, 1982, 中国科学(B), 1:62.
- [2] 崔天一等, 1983, 中国科学(B), 3:236.
- [3] 王新娟等, 1982, 北京医学院学报, 14(3): 249.
- [4] 周爱如等, 1984, 北京医学院学报, 16(2): 92.
- [5] Manly, R. S., 1970, Adhesion in Biological System, Academic Press, New York and London.