

B7-2 小鼠胚胎癌细胞的无血清培养*

施渭康 包林平

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

恶性 B 7-2 胚胎癌 (EC) 细胞是从 129/SV-ter 小鼠睾丸自发畸胎瘤经腹腔移植和体外培养并克隆化而获得的^[1,2]。它具有类似于早期胚胎细胞的许多生物学特性,不仅在体内能分化为多种类型的体细胞^[3],在体外经化学药物诱导也能分化为内胚层样细胞,并发生许多表型标志的变化^[2,4]。EC 细胞是开展哺乳类胚胎早期发育、细胞分化、癌细胞本质和癌胚关系等研究的较好实验材料。然而,在 EC 细胞体外诱导分化实验中,利用含有小牛血清的培养液存在着许多缺点,不仅因为血清中常含有影响 EC 细胞分化的因子,而且其中的一些蛋白可能与加入的诱导物有相互作用,使分析诱导物的作用机理复杂化;同时,血清中未知成分也妨碍对 EC 细胞内源性生长调节分子的研究^[5]。考虑到这些问题,近年来用已知的蛋白、脂类、激素、生长因子和某些稀有元素等物质加到基础培养液以替代小牛血清,发展了适于一些 EC 细胞生长的人工培养液^[6,7]。不同类型的 EC 细胞需要不同的增添物。本文介绍一种适于 B 7-2 EC 细胞克隆株生长的 B 7-85 无血清人工培养液。

材料和方法

一、B 7-85 液配制

RPMI-1640, HAM/F 12 (Nissui Seiyaku Co.) 和 DMEM (Gibco) 三种营养液按体积 3:1:1 比例配制成基础培养液,加入细胞生长所必需的其它成分:胰岛素 (2 微克/毫升, Sigma), 人转铁蛋白 (5 微克/毫升, Sigma), 牛血清白蛋白 (1 毫克/毫升, Sigma), 谷氨酰胺 (600 微克/毫升, 上海生化所试剂厂) 和硒元素 (1×10^{-8} mol/L)。按上述组份配制的无血清人工培

液称为 B 7-85 液。

二、细胞培养

B 7-2 EC 细胞在含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中生长, 3—4 天需传代一次。在转为无血清培养时, 传代细胞保留 1/3 体积的原培养液, 加入 2/3 体积的新鲜 B 7-85 液。细胞培养 3—4 天后再次传代, 仍然用 1/3 传代前的原培养液和 2/3 新鲜 B 7-85 液。随着细胞的不断传代, 逐渐降低了细胞培养的血清含量。经过 10 代左右的适应性培养, 不再需要保留一定比例的原培养液, 直接将细胞传至完全不含小牛血清的 B 7-85 液。在无血清 B 7-85 液生长 40 余代后, 分析它们的生长特点。

三、³H-胸腺嘧啶核苷掺入试验

取 24 孔塑料板, 每孔均加以 1 毫升 5×10^4 B 7-2 EC 细胞, 分组各用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液和 B 7-85 液培养 24, 48, 72, 96 和 120 小时。按实验组别加入 1 微居里/毫升 ³H-胸腺嘧啶核苷 (比度为 27.2 居里/毫克分子, 上海原子核研究所) 标记 4 小时。离心收集细胞, 用 PBS 洗涤, 乙醇/冰醋酸 (3:1, V/V) 液固定, 15 分钟后用 10% 三氯醋酸洗二次, 再以 0.1 mol/L pH 7.2 PBS 洗一次。200 微升 0.2 mol/L NaOH 溶解细胞, 加入 5 毫升闪烁液。Backman LS 9800 计数器测定掺入细胞的脉冲数 (cpm)。

四、长瘤率检测

为比较生长在 B 7-85 液和含血清常规培养液中的 B 7-2 EC 细胞在同系宿主体内的分化潜能和长瘤率, 将细胞接种于 129/SV-ter 品系小鼠左右腋部皮下, 10 只雄鼠共 20 个接种点, 每点接种 1.5×10^6 细胞。接种后 30 天计算长瘤率, 并随机取部分瘤组织用 Bouin 液固定, 常规组织学切片观察。

* 本文由自然科学基金 85-539 号资助。并承蒙姚鑫教授热情鼓励和支持, 谨致谢意。

结果和讨论

一、B7-85液及其组份对B7-2 EC细胞生长的影响

B7-2 EC细胞生长在含10%小牛血清的RPMI-1640培养液,细胞界限清楚,以单个半悬浮状态生长为主。我们曾直接把RPMI-1640培养液中小牛血清浓度降至5%,虽然细胞仍然能缓慢生长,但传代2—3次后,细胞逐死亡;血清浓度降至2%,细胞根本不能生长。以RPMI-1640培养基为主,适当地配以DMEM, HAM/F12和其它必需物质组成的B7-85液,则能够维持B7-2 EC细胞增殖和传代,细胞形态和含10%牛血清中的无明显差别。我们也曾将生长在含10%小牛血清培养液的细胞不经过适应性培养,直接转入B7-85液培养,但未获得传代成功。B7-2 EC细胞由含有血清的培养液转入无血清培养过程中,必需添加传代前细胞的旧培养液,这一现象提示B7-2 EC细胞生长可能也依赖于细胞自身分泌的类似小牛血清中的某种生长因子。

B7-85液的组成除了基础培养基成分外,还含有牛血清白蛋白、转铁蛋白、胰岛素、谷氨酰胺和硒元素等物质。从B7-85液中,逐个撤除其中的补充物质,发现各个组份对B7-2 EC细胞生长均有程度不同的影响(表1)。以生长在10%小牛血清培养液的细胞数为对照,比较不同组份人工培养液中细胞生长的相对百分率,其中白蛋白影响最大,缺乏白蛋白的B7-85液, B7-2 EC细胞生长3天的细胞总数仅是含10%小牛血清的14%,大部分细胞趋于死亡。白蛋白是血清的主要成分,具有维持渗透压,转输各种激素、脂肪酸等多种功能,并对细胞生长有促进作用^[8]。然而,牛血清白蛋白脱脂后,则对细胞生长无促进作用^[9]。有些EC细胞无血清培养需特地添加脂蛋白一类物质^[7]。我们所用的小牛血清白蛋白未经脱脂处理,可能杂有微量与蛋白络合的脂类。因此,血清白蛋白对B7-2 EC细胞生长

表1 B7-85液中各种组份对B7-2 EC细胞生长的影响

培液组成	细胞数* ($\times 10^5$ /毫升)	相对生长速 率** (%)
10%小牛血清的 RPMI-1640	43	100
RPMI-1640 + HAM/F ₁₂ + DMEM	4.5	10.5
RPMI-1640 + HAM/F ₁₂ + DMEM +		
(1) BSA + In + Se + Tr + Gln	38	88.4
(2) BSA + In + Se + Tr	31	72.1
(3) BSA + In + Se + Gln	28	65.1
(4) BSA + In + Tr + Gln	24	55.8
(5) BSA + Se + Tr + Gln	23	53.5
(6) In + Se + Tr + Gln	6	14.0

* 收集培养3天的细胞计数, 2—3次实验的平均值。

** 各组成培养液生长3天的细胞数相对于含10%小牛血清常规培养液中细胞数比较的百分率。

BSA-牛血清白蛋白, In-胰岛素, Se-硒, Tr-人转铁蛋白, Gln-谷氨酰胺。

的促进作用还不能排除所含脂类物质的影响。

二、B7-2 EC细胞在B7-85液中的生长率和胸腺嘧啶核苷掺入

B7-2 EC细胞在含10%小牛血清培养液中的倍增时间约为24小时。当细胞接种数为 1×10^5 /毫升, 72小时后细胞数已增加到 5.7×10^5 /毫升。此后, 细胞即处于密度依赖抑制状态; 而在B7-85液的细胞倍增时间约为27小时, 72小时后细胞数增加到 4.5×10^5 /毫升, 比在10%小牛血清培养液中生长的细胞数少 1.2×10^5 /毫升。在96小时, 细胞生长才趋于饱和, 细胞数和含10%小牛血清的非常接近(表2)。³H-胸腺嘧啶核苷的掺入试验也得到同样结果。在B7-85液中, 细胞培养24—72小时, ³H-胸腺嘧啶核苷掺入迅速增加, 表明这期间的细胞有一个快速增殖期。其后, ³H-胸腺嘧啶核苷掺入降低, 细胞生长速度下降。至96小时, 同样细胞处于密度依赖抑制状态, 因而在120小时, 仅检测出很低的同位素掺入脉冲数(表2)。结果表明, B7-85人工培养液能较好地支持B7-2 EC细胞生长和增殖, 当细胞达到较高密度后, 细胞增殖明

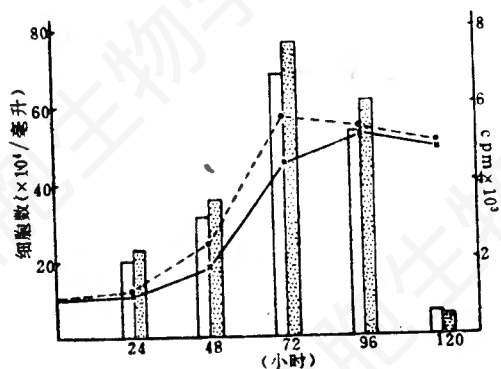


表2 B7-85液中的B7-2 EC细胞生长速率和胸腺嘧啶核苷掺入

×—× 在B7-85液中的细胞生长曲线
 ●---● 对照组,在含10%小牛血清常规培养液中的细胞生长曲线
 □ B7-85液, ³H-胸腺嘧啶核苷掺入脉冲数(cpm)
 ▨ 常规培养液, ³H-胸腺嘧啶核苷掺入脉冲数(cpm)。均系2—3次实验的平均值

显下降。将B7-85液和含10%小牛血清的培养液相比较, EC细胞在B7-85液中的生长速率显得缓慢些,说明B7-85液尚缺乏某些存在于小牛血清中的因子,还有待进一步完善。但就细胞形态和生长行为而言,与含血清的常规培养液相比较,未发现有明显的差别。

三、长瘤率

将生长在B7-85液的B7-2细胞接种到同系小鼠腋部皮下,10只雄鼠共20个接种点,2周后,除3个接种点未长瘤外,17个接种点均长出大小不同的瘤子,最大可达18×15×12 mm,长瘤率为85%。部分瘤组织切片观察,发现除EC细胞外,主要是腺管样结构,也发现个别肾小体和类神经管样组织。长瘤率和瘤组织中的分化细胞类型与我们以前报道的在含有小牛血清的常规培养液中生长的B7-2

EC细胞一样^[2]。

摘 要

本文报道以RPMI-1640, DMEM和HAM/F12人工培养基做基础培养液,加入牛血清白蛋白、胰岛素和转铁蛋白等物质,发展了一种无血清(B7-85)培养液。在B7-85液中,B7-2 EC细胞生长速率虽略低于含10%小牛血清常规培养液,但细胞形态、生长行为和在同系宿主体内的长瘤率及分化潜能,均未发现存在区别。因此,B7-85液是适于B7-2 EC细胞生长的无血清人工培养液。这种人工培养液中除胰岛素外,没有人为地增添外源性多肽生长因子,这将有利于分析B7-2 EC细胞和其分化细胞产生的内源性生长因子。

参 考 文 献

- [1] 施渭康,从笑倩,1982,细胞生物学杂志,4(2): 27—29.
- [2] 从笑倩,姚鑫,1984,实验生物学报,17(3): 309—321.
- [3] 姚鑫,从笑倩,1985,实验生物学报,18(2): 239—249.
- [4] 从笑倩,陈振国,姚鑫,1986,实验生物学报,19(3): 369—379.
- [5] Heath, J. K., 1983, *Cancer Surveys*, 2: 141—164.
- [6] Rizzino, A. and C. Cowley, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 457—461.
- [7] Heath, J. K. and M. J. Deller, 1983, *J. Cell. Physiol.*, 115: 225—230.
- [8] Yamane, I., O. Murakami, and M. Kato, 1975, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149: 439—442.
- [9] Kan, M. and I. Yamane, 1982, *J. Cell. Physiol.*, 111: 155—162.
- [10] Stoker, M. G. P. 1967, *Nature*, 215: 171—172.