

维生素 A 酸和二甲亚砜对鼠胚胎癌细胞的诱导分化(续)

孙君洁 J. 坎比安·皮卡多 M.W. 麦克柏尼
(昆明医学院) (渥太华大学)

鼠胚胎癌(EC)细胞系 P₁₉ 的细胞集合物(aggregates)可以被维生素 A 酸(RA) 或二甲亚砜(DMSO)诱导分化、单个 EC 细胞的集落形成率(PE)高达 40—70%，而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]，并且可以用分化培养中的 PE 来测定未分化细胞的比例。我们已发现在含一定浓度的 RA 或 DMSO 的培养基中仍有未分化的 EC 细胞存在；这些 EC 细胞的增殖和分化过程之间呈动态平衡^[2]。本文进一步发现 RA 和 DMSO 有协同作用，同时用数学模型再次说明了这种动态平衡关系。

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)，加有 2.5% 胎牛血清和 7.5% 小牛血清(Animal Health Laboratories, Toronto)。细胞计数用 ZF 型 Coulter 计数器。维生素 A 酸(Sigma chemical Co.)，10⁻² mol/L，-70℃ 保存；使用中的溶液 10⁻³ mol/L，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。DMSO(sigma)使用时亦用加有血清的培养液稀释。

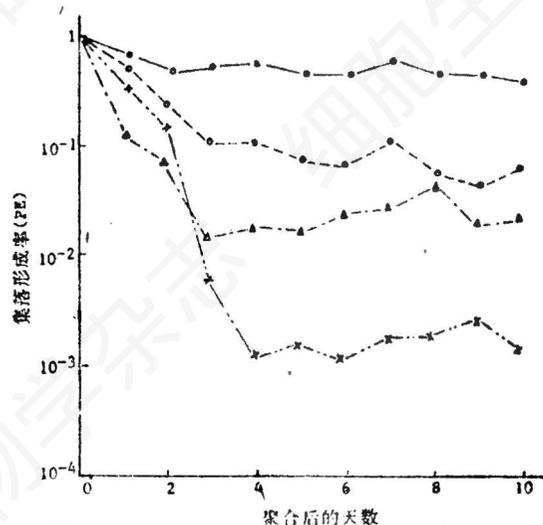
将 EC 细胞在含有或不含有上述分化诱导剂的培养基中作悬浮培养。形成的细胞集合物用 0.25% 胰蛋白酶和 0.1 mol/L EDTA 分散成单个细胞；适当稀释后，接种于 24 孔 Limbro 平皿，置 37℃、5% CO₂ 中孵化一周。形成的集落(colony)用含 1% 甲苯胺蓝(Sigma)的甲醇：醋酸(3:1)固定并染色，计算集落形成率。

结果和讨论

1. 同时使用 RA 和 DMSO

P₁₉ 细胞集合物在含 10⁻⁹ mol/L RA、0.5%

DMSO 或 10⁻⁹ mol/L RA + 0.5% DMSO 的培养基中持续培养，逐日测定集落形成率。如下图所示，经 RA 或 DMSO 处理后，P₁₉ 细胞的 PE 一般在头三天下降，然后趋于平稳。可以认为这种平稳状态是由于 EC 细胞的增殖和分化间呈动态平衡(参见[2])。经过 10⁻⁹ mol/L RA + 0.5% DMSO 处理后，亦出现平稳阶段，不过其平稳水平较之单独使用 RA 或 DMSO 时明显降低。这说明 RA 和 DMSO 可以同时诱导 EC 细胞进行分化。虽然诱导剂 RA 和 DMSO 可能通过不同的途径促使 EC 细胞分化^[4]，但是它们有协同作用。



图：经 RA、DMSO 或 RA + DMSO 处理后的 P₁₉ 细胞集合物的集落形成率

(·—·) 对照组，没有 RA 和 DMSO，
(○····○) 0.5% DMSO，
(△—△) 10⁻⁹ mol/L RA，(×—·—×) 0.5%
DMSO + 10⁻⁹ mol/L RA

2. 数学模型

我们已经发现，经一定浓度的 RA 和 DMSO

处理的 EC 细胞的增生和分化过程之间呈动态平衡^[2]。本文进一步用数学模型从理论上说明这种平衡关系的可能性。

可以假设：每一瞬间 dt ，每个未分化细胞 X 的确产生 vdt 个新的未分化细胞 X' ，同时 X 还生成 rdt 个定向分化细胞 Y ；同样地，在同一瞬间每个定向分化细胞可能生成 kdt 个新的 Y' 。用变量 X 和 Y 代表 X 和 Y 的数目，得线性微分方程式：

$$\frac{dx}{dt} = ax - rx \quad x(0) = x_0 \quad (1)$$

$$\frac{dy}{dt} = ky + rx \quad y(0) = 0 \quad (2)$$

解此方程，得

$$x = x_0 e^{(a-r)t} \quad (3)$$

$$y = \frac{rx_0}{a-r-k} [e^{(a-r)t} - e^{kt}] \quad (4)$$

我们认为此模型描述的是分化过程而不是突变，因为突变要求更复杂和更随机的方法^[5,6]，并且自发的突变率比定向分化率低得多。

用 f 代表未分化细胞的比例，则

$$f = \frac{x}{x+y} \quad (5)$$

将(3)和(4)代入(5)，得

$$f = \frac{1}{1 + \frac{r}{a-r-k} [1 - e^{(k-a+r)t}]} \quad (6)$$

由此可见当 $a > k+r$ 时， $k-a+r < 0$ ，则

$$\lim_{t \rightarrow \infty} f = \frac{1}{1 + \frac{r}{a-r-k}} = 1 - \frac{r}{a-k} \quad (7)$$

换句话说，当 $a > k+r$ 时，此极限是一个正实数值。所以此数学模型预示：当 EC 细胞的增殖率大于 EC 细胞的分化率和分化细胞的增殖率之和时， f 趋于平稳。这种未分化细胞比例的相对稳定提示了它们的增生和分化间的动态平衡。我们可以指定各参数值使方程(7)很好地再现实验结果，即复制出在本文图表以及参考文献[2]的图1、2、3中所观察到的

平稳阶段。

用无限制增长的假设来描述集合物中的细胞的状况是不实际的。上面的 f 的表达式的成立不是依赖于无限制的增生和分化的假设，而是假定细胞的增殖率和分化率是有限的。下述情况较清楚地体现了这一点：假定用同一函数 $V(x, y)$ 修正方程(1)和(2)中的参数 a, k, r ，求出 f 极限的表达式，消去函数 $V(x, y)$ ，而方程(7)仍然成立。

如果药物浓度直接影响净分化率 r 或者增殖率 a ，便可用方程(7)解释参考文献[2]中 EO 细胞的平稳水平和药物浓度相反的实验结果。由于 RA 不影响 EC 细胞的生存和倍增时间^[7]，因而和药物浓度有依赖关系的可能是分化率而不是增殖率；至于 DMSO 的作用方式，尚待证实。

根据本文和参考文献[2]，实验结果和数学模型一致表明，RA 和 DMSO，单独使用和同时使用，在诱导 EC 细胞系 P_{10} 及其突变型进行分化的过程中，都可出现增生和分化间呈动态平衡的平稳期。

摘 要

我们已经发现在含一定浓度的 RA 或 DMSO 的培养基中，EC 细胞系 P_{10} 及其突变型的增殖和分化间呈动态平衡。本文进一步用数学模型说明这种平衡关系的可能性；并且发现 RA 和 DMSO 有协同作用。因而，实验结果和数学模型都表明，RA 和 DMSO 不论单独或同时使用，在诱导 P_{10} 细胞系进行分化时，都可出现增生和分化间呈动态平衡的平稳阶段。

参 考 文 献

- [1] Edwards, M. K. S., et al. 1983, *Mol. Cell Biol.*, 3: 2280-2286.
- [2] 孙君洁等, 1986, 细胞生物学杂志, 8(3): 127-130.
- [3] McBurney, M. W. and B. J. Rogers, 1982, *Dev. Biol.*, 89: 503-508.

- [4] 孙君洁等, 1987, 中华肿瘤杂志, 9(1): 2-5.
- [5] Armitage, P., 1952, *J. Roy. Stat. Soc (ser B)*, 14: 1.
- [6] Northrop, J. H. and M. Kunitz, 1957, *J. Gen. Physiol.*, 41: 119-129.
- [7] Jones-Villeneuve, E. M. V., et al., 1982, *J. Cell Biol.*, 94: 253-262.

人胚大脑神经细胞在无血清培养液中的生长特性

庞智玲 张文治 李兰英

(天津医学院内分泌研究所细胞室)

70年代以来大量采用体外培养技术, 进行脑神经细胞分化发育的研究。目前认为原代的细胞培养物要比多次传代的细胞系更接近体内神经细胞的正常发育状态^[1]。血清具有促进体外培养细胞贴壁和生长的作用, 是培养细胞时不可缺少的成分, 但血清成分尚未完全搞清, 因而必然会影响实验结果的分析。近年来证明血清可以由已知的人工合成培养液和添加某些激素、生长因子、微量元素等所代替, 称无血清培养液(Serum-free Medium, SFM)^[2]。

哺乳动物中枢神经细胞用无血清培养液培养的原代细胞已有报道^[3,4], 但人胚大脑神经细胞培养的资料较少^[5], 且多在培养初期48小时仍使用一定的血清。另外 Atterwill 等(1983)^[6]使用人工合成的无血清培养液培养小脑神经细胞只能存活7天, 最长者达2—3周。

本文介绍无血清原代培养的大脑神经细胞, 并进行了有关细胞形态和功能的鉴定。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 人胚: 选择健康的人工流产胎儿(孕期10至15周者共17例, 16至18周者共4例)大脑半球, 共培养21次。

2. 无血清培养液: 参照 Bettenstein 及 Sato^[2](1979)的方法, 1:1混合 DMEM (JIBCO) 和 Ham's F-12 (Nissui Seiyaku Co.) 的人工合成培养液。添加胰岛素 5 μg/ml、人铁传递蛋白 10 μg/ml、腐胺 100

m mol/L、亚硒酸钠 30 n mol/L、葡萄糖 5 mg/ml、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml、Hepes 缓冲剂 10 mmol/L 免疫组织化学观察时, 加入生理浓度 T₃ (Sigma) 0.20 μg/ml, pH 值为 7.0—7.2。

3. 鼠尾胶: 按 Borstein(1958)法制备。

4. 血清: 使用新生小牛血清。

5. 试剂: [2,3-³H]-γ-氨基丁酸(40 居里/mmol/L, 1 毫居里/ml, 闪烁液是二氧六环、PPO 0.5%, POPOP 0.03%、萘 5.5%。

二、方法

1. 原代单层培养^[7]: 要求脑组织新鲜, 从胎儿娩出至分离细胞接种于培养器皿, 以1小时内为佳。3个月内的胎儿取大脑两侧半球。无菌条件下去净脑膜及血管, Hank's 液充分洗涤, 剪为 0.5—1 毫米³小块, 加入培养液, 悬浮后倾至不锈钢网(孔径 100 μm)上, 轻磨脑组织, 收集细胞悬液, 经 0.1% 结晶紫染色计数活细胞。接种细胞于 25 ml 玻璃培养瓶内, 细胞的最终浓度为 3 × 10⁶/ml, 用于液闪计数。同时接种细胞于放有盖玻片的 35 mm 塑料培养皿 (Linbro, U.S.), 用于观察活细胞形态。将细胞培养皿放入含 5% CO₂ 37℃ 之饱和湿度温箱内培养。

2. 鉴定方法:

(1) Nikon Diaphot 倒置显微镜相差相下进行活细胞观察。

(2) 组织学染色: 用硫堇或焦油紫进行尼氏小体染色, Bodian 银染神经纤维。

(3) 免疫组织化学: 根据 Schmechel (1980) 改良的神经特异性烯醇酶(NSE)抗血清 PAP 法染色^[8]。每组随机计数 500 个细胞, 计算 NSE 阳性细胞的百分率。

(4) 电镜: 培养细胞经离心, 去上清液, 用 2.5%