

Study on Establishing Mouse EP Tumor Cell Line

小鼠 EP 瘤细胞株建立的初步研究

LIU Jun-kang, WU Xiao-lan,
ZHANG Rong-hua, XU Qi-wang*

(Biowave Research Center, Department of Laboratory Medicine,
the Third Military Medical University, Chongqing 400038,
China)

刘俊康/吴小兰/章荣华/徐启旺*
(第三军医大学医学检验系生物波研究室,
重庆 400038)

【摘要】背景与目的:探讨淋巴细胞通过诱导能否成为肿瘤细胞。材料与方法:应用小鼠黑色素瘤细胞培养液离心的上清液,再经过滤所获滤液,稀释成不同浓度,用于淋巴细胞体外培养诱导,通过体外培养和动物试验进行成瘤性及体内体外传代特性观察。结果:荷 B16 瘤体 4 个月的小鼠淋巴结内分离细胞,体外诱导成瘤细胞,命名为 EP 瘤细胞。其体内可稳定成瘤传代,体外初期呈肿瘤细胞生长特征,传代中逐步丧失。结论:初步证明淋巴细胞可以在特定环境中转变为肿瘤细胞。

【关键词】癌起源;肿瘤;淋巴细胞

中图分类号:R73

文献标识码:A

文章编号:1004-616X(2007)04-0313-03

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To explore whether lymphocytes could be induced into tumor cells. MATERIALS AND METHODS: Lymphocytes were cultured and induced with different concentrations of the culture medium supernatant of tumor cells. Cell culture and animal experiments were employed to study growth characteristics, tumor-forming ability and subculturing features. RESULTS: The lymphocytes acquired from a mouse carrying B16 tumor for 4 months, were cultured into a strain of tumor, named EP tumor strain, which could subcultured and form tumors *in vivo*. The characteristics of tumor cells became less obvious with increasing passaging, and ultimately disappeared in the sixth to seventh generation. CONCLUSION: Lymphocytes could transform into tumor cells under specified conditions.

【KEY WORDS】origin of cancer; tumor; lymphocyte

生物波研究较早地关注非平衡环境中临界点上发生特殊生命现象的问题,通过实验,探讨了抗菌素浓度梯度作用下细菌生长所发生的“O”管现象^[1],逐步促成了条件论的理论进展^[2],在此理论指导下,也探讨了体外培养的膀胱癌细胞波动生长的特点^[3],进而针对癌细胞生长动力学特征,借助生物波实验模型研究结果认识和探讨肿瘤的生长和发生规律,在黑色素瘤荷瘤鼠动物模型研究中观察到瘤体包膜下或在包膜与包膜之间存在囊状结构,并在包膜下常见大量的小体积细胞,其形态上类似于淋巴细胞。与文献有关肿瘤浸润淋巴细胞的报道极为相似^[4]。这些使研究人员产生了一个问题:淋巴细胞是否有

可能在肿瘤局部受环境影响而转化为肿瘤细胞,并且以此导致肿瘤的扩张生长呢?在此基础上,本文设计了体外诱导小鼠淋巴结细胞形成肿瘤细胞的实验,旨在探讨癌细胞的起源特点,为癌症的调节治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

KM 种小鼠,由第三军医大学动物所提供,常规饲养;B16 细胞株购自上海细胞生物研究所,由本科室传代保存;H.HCP-01W 型 CO₂ 孵箱,美国 Forma scientific Inc. 生产;BX410 型 Olympus 多功能显微镜,日本奥林

收稿日期:2006-11-10;修回日期:2007-03-26

作者简介:刘俊康(1968-),博士,副教授,研究方向:生物复杂性。Tel:

023-68752191 E-mail:liujunkang@163.com.

* Correspondence to: XU Qi-wang Tel 023-68752191 E-mail: tmmubc@163.com

com

巴斯公司; Olympus 倒置显微镜; 细胞培养用常规试剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠淋巴结的分离 参见文献[5]的方法进行。

1.2.2 小鼠淋巴细胞体外培养诱导

1.2.2.1 诱导剂的制备 将 B16 细胞用 RPMI-1640 培养基培养至细胞重叠生长,继续培养 2 d。待有细胞脱落,且培养液 pH < 6 时将此培养液收集于离心管中,以 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液超滤,滤液作为诱导剂。

1.2.2.2 诱导剂各孔浓度的分布 于 12 孔培养板的第 1 到 12 孔中加入诱导剂及含 20% 血清的 1640 培养基,其配置情况见表 1。

表 1 诱导剂和含 20% 小牛血清的 1640 培养基体积比系列

Table 1 Series of the ratio of the volumes of inducer and RPMI-1640 containing 20% calf sera

Component(ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inducer	1.0	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
RPMI-1640	1.0	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2.0

1.2.2.3 细胞接种 将上述分离取得的淋巴结用手术刀将其剖开,加入约 1.5 ml Hank's 冲洗呈囊状的淋巴结内部,制得细胞悬液,于上述 12 孔培养板的第 2 至 12 孔中再分别加入该细胞悬液 0.1 ml,第 1 孔加入 0.1 ml Hank's 液作为诱导剂空白对照,用于检查诱导剂中是否存在 B16 细胞或在放置过程中产生微生物污染等变化。

1.2.2.4 培养环境及培养时间 将以上接种有淋巴细胞的细胞培养板,于 37 °C, 5% CO₂ 孵箱中培养,并观察淋巴细胞生长状态。

1.2.3 细胞成瘤实验 将体外诱导后具有肿瘤细胞生长特征的淋巴结细胞及 B16 细胞分别制成细胞浓度为 1 × 10⁷/ml 的细胞悬液,于小鼠左后腿肌肉内接种,每只接种 0.1 ml,观察成瘤情况及统计成瘤率。

1.2.4 瘤体细胞的原代培养 采用胰蛋白酶消化培养方法,传代培养采用贴壁型生长细胞的消化传代方法^[6]。

2 结果

2.1 小鼠的 B16 瘤体包膜间小囊状结构与小鼠淋巴结比较

小鼠肌肉接种 B16 细胞后所形成的 B16 瘤体长至 2.0 cm 以上时,从其瘤体包膜之间取得小囊状结构,其与小鼠淋巴结在大小、外观及表面硬度和光滑度上没有

明显区别。取囊中内容物布瑞氏染色观察,均为淋巴细胞的形态特征。并对 B16 瘤体包膜之间的小囊状结构及小鼠淋巴结做石蜡切片、HE 染色观察,两者图像无差异(图 1,2)。

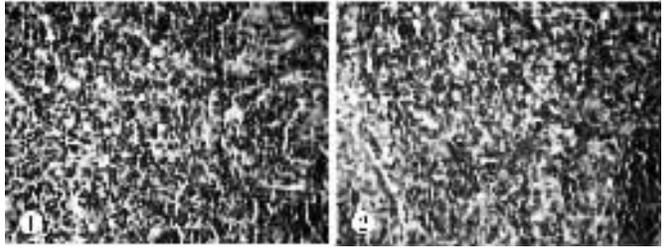


图 1 B16 瘤体包膜间的小囊状结构石蜡包埋切片(HE × 400) 图 2 小鼠淋巴结石蜡包埋切片(HE × 400)

Figure 1 Paraffin embedded slice of the small cyst structure between the envelope of B16 tumor (HE × 400) Figure 2 Paraffin embedded slice of lymph-node of mouse (HE × 400)

2.2 荷 B16 瘤体小鼠瘤体同侧与异侧腹股沟淋巴结内细胞体外诱导培养结果

从小鼠的淋巴结分离诱导试验中,选择出 1 只荷瘤状态维持近 4 个月,瘤体大小已近 4 cm 的昆明种小鼠进行本试验,在近瘤体一侧分离的淋巴结,其大小约 4 mm,表面有血丝,外观略显黑色,本实验中称为同侧淋巴结,而在对侧略微变大的淋巴结(约 2.5 mm),无其它异常,称为对侧淋巴结,分别将其中的细胞于预先加有不同浓度诱导剂的培养孔中进行体外诱导培养试验。在培养的前 10 h 内在镜下可见细胞悬浮,不贴壁,数量较大,在倒置显微镜下,平均每个视野中(× 400)细胞存在 1 000 个左右(图 3),从第 3 d 起出现少量贴壁生长的细胞,对侧淋巴结细胞的第 3~4 孔,成团,并在 4~5 d 出现梭形,成小片生长,但仍然有许多圆形的淋巴样细胞(图 4),进而至 9~10 d 细胞铺满整个瓶底,同时可见众多的其它细



图 3 取自淋巴结内的细胞在诱导剂中培养 3 d 以悬浮方式生长(× 400)

Figure 3 The suspended growth of cells collected from lymph-node in the early stage of culture within 3 days (× 400)

胞变黑和更加明显的悬浮。约 15 d 后,细胞呈多角形,并失去其接触抑制特点,出现大片重叠生长等肿瘤细胞特点(图 5)。在其余各孔中未见相同生长特征的细胞。而同侧淋巴结细胞则在第 3、4、7、8 孔中出现对侧淋巴结中 3、4 孔的生长特征。并且对这些细胞采用贴壁型生长细胞

的消化传代方法,传于新的培养板中,加入含 1% 小牛血清的 1640 培养基,于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱培养,发现其传代次数有限。我们依其来源特点,因其与埋殖在肿瘤体内的小囊状结构中的细胞相似,故称为嵌入前癌细胞 (embed prior tumor cell, EP) 即 EP 细胞。

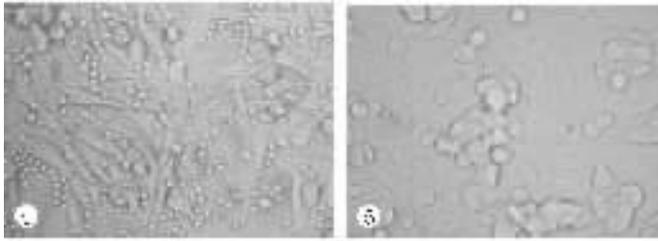


图 4 取自淋巴结内的细胞在诱导剂中培养 5 d 后生长结果 (×400)
图 5 取自淋巴结内的细胞在诱导剂中培养 15 d 后生长特点 (×400)
Figure 4 The growth state of the cells collected from lymph-node cultured more than 5 days (×400) Figure 5 The growth feature of the cells collected from lymph-node cultured more than 15 days (×400)

2.3 EP 瘤细胞成瘤实验结果

将 EP 细胞进行传代培养。然后各接种 10 只小鼠,以 B16 细胞为对照,观察各组小鼠的成瘤情况并统计成瘤率。结果 EP 细胞接种后成瘤时间均为 7 d,而 B16 细胞成瘤时间也是 7 d。成瘤过程及成瘤率相当 (均约 70%),仅成瘤后形成的瘤体有区别:EP 瘤内容物呈白色浆状,表面有包膜。B16 细胞形成的瘤体外观呈黑色,内容物中呈黑、白相间的坏死组织。对 EP 瘤体及 B16 瘤体进行石蜡切片、HE 染色 (图 6、7)。由图可见 EP 瘤体内部细胞排列有序,细胞成条状梭形,着色较均匀;B16 瘤体细胞无序排列,胞核大而明显,细胞质染色深浅不一。

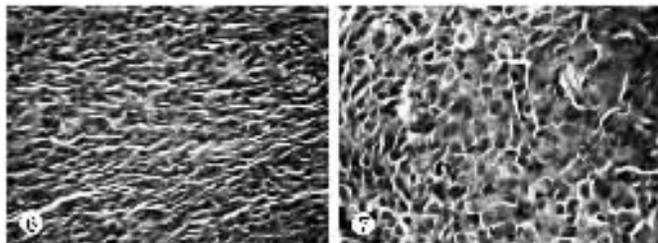


图 6 小鼠 EP 瘤体石蜡包埋切片 (HE ×400) 图 7 B16 瘤体石蜡包埋切片 (HE ×400)

Figure 6 Paraffin embedded slice of EP tumor of mouse (HE ×400)
Figure 7 Paraffin embedded slice of B16 tumor of mouse (HE ×400)

2.4 EP 瘤体细胞体外传代培养特点

对 EP 瘤细胞形成的瘤体,进行原代分离培养,分体内和体外传代。体内传代从瘤体组织分离的细胞不经体外培养直接接种小鼠,现已传至 13 代,其成瘤特性稳定;体外传代中至第 3、4 代后见到梭形细胞逐步减少,胞体变圆,继续传代细胞生长速度减慢,至第 6~7 代后细胞多悬浮不易生长。对传代过程中细胞成瘤性检查表明,第 3~4 代细胞仍可成瘤但成瘤时间多延后至 10~12 d,且成瘤率降至 25%~40%,并且接种局部多伴随

水肿反应,第 6、7 代细胞不能成瘤。

3 讨 论

淋巴细胞作为一种非终末细胞,在体内执行功能的过程中已表现出分布广、对环境刺激因素敏感、容易发生母细胞化等特点。淋巴细胞与癌细胞的关系长期以来受到关注,但受癌症治疗困难较大的驱使,多侧重于类似于肿瘤浸润淋巴细胞等应用方面的研究^[7]。30 余年研究显然从治疗的角度仅得到一些教训,但是其提供的现象是确定的,即淋巴细胞与肿瘤体在位置上常常有共存的表现。这对本项工作的开展曾起到提示作用。本研究作为一个设计性实验经历两年多时间、上百次分离诱导,终于获得特殊的癌细胞株,具备肿瘤细胞的无接触抑制的生长特征,并且能形成瘤体,可在体内稳定传代并成瘤。但在体外传代中表现出逐步丧失瘤细胞生长特征,成瘤性也逐步降低的“返祖化”现象。而 B16 细胞在体外传代中其瘤细胞生长、成瘤性稳定。以上说明本研究所得 EP 细胞瘤不是 B16 细胞转移到淋巴结中生长的结果。关于体外传代中出现的“返祖化”现象,可能与传代时离开了原先的含有诱导剂的环境,而仅用含 1% 小牛血清的 1640 培养基有关,尚有待于对这种细胞从表面分子、转化功能、返祖特点等方面进行研究。

本研究结果说明可从淋巴结内细胞诱导出瘤细胞。虽然其诱导成功率尚有待提高,研究结果对探讨癌的起源,提供了新的依据。

参考文献:

- [1] 郭刚,王源,刘俊康,等.多粘菌素 B Sub-MICs 导致大肠杆菌自溶的研究[J].中国微生物学杂志,1997(2):8-11.
- [2] 徐启旺,刘俊康.生物波与人体抗癌能力诠释[M].香港:新青年出版社,2005:54-58.
- [3] 邓国宏,丛延广,刘俊康,等.人膀胱癌细胞波状层次生长的研究[J].第三军医大学学报,2000(5):465-469.
- [4] Okada K, Komuta K, Hashimoto S, et al. Frequency of apoptosis of tumor infiltrating lymphocytes induced by fas counterattract in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(9): 3560-3564.
- [5] 陈兴,于继云,程绍辉.抗 4-1 BB 单克隆抗体诱导肿瘤细胞致敏的小鼠腹股沟淋巴结 T 细胞在体外表达 IFN-γ[J].中国比较医学杂志,2005,15(2):67-70.
- [6] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,2006:72-80.
- [7] Kristen MD, Henry TL. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs): Lessons learned in 30 years of study[J]. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 2005, 5: 149-166.