

犬肾细胞系的染色体组型分析与 致癌/致瘤性的实验研究

张德礼¹, 李六金³, 夏耕田², 何旭玉², 高步先²,
白晓鸿², 黄高升⁴, 刘尚高⁵, 阎隆飞⁴, 方福德⁶

(¹ 北京大学医学部基础医学院免疫学系, 北京 100083; ² 北京军区联勤部卫生防疫队, 北京 100071;

³ 第四军医大学动物保健品研制中心, 西安 710032; ⁴ 第四军医大学基础部病理学教研室, 西安 710032; ⁵ 中国农业大学动物医学院和生物学院, 北京 100094; ⁶ 中国医学科学院基础医学研究所/中国协和医科大学基础医学院, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

摘要:以人类宫颈癌细胞系 HeLa 为阳性对照,以连传 3 代的犬猫肾原代细胞(CKC、FKC)为阴性对照,对来自国内外不同单位收集的 4 株 MDCK 传代细胞系培养 25~45 代的完整活细胞或冻融裂解细胞进行裸鼠致癌/致瘤实验观察,筛选出致癌性极低、符合细胞遗传学要求、无传染因子污染的几株 MDCK 细胞系用于制苗,并建立了相应的细胞种子库和工作库,供科研和生产使用,4 年运转很好。不同代次 MDCK 细胞系染色体众数所占比率的相差率一般不超过 5%~15%,结构畸变率一般为 0~3%。研究表明,MDCK 细胞染色体遗传特征决定致瘤性质,并具有种属特异性,MDCK 细胞不论核型如何,始终具有致瘤性,但其致癌/致瘤性差,只有超二倍体以上细胞才具有高的致癌/致瘤率(如 YA 株的为 28/58),亚二倍体细胞的致癌/致瘤率很低(其它 3 株 MDCK 细胞的致癌/致瘤率为 5/54),且一般致上皮源性恶性肿瘤,多为高中分化腺癌。冻融裂解癌细胞系(X 株 HeLa、JA 株 Vero、M 株 BHK-21、YA 株 MDCK)的致癌/致瘤性相应降低,极低致癌/致瘤性细胞系(M 株或 JC 株 MDCK)不会因冻融裂解而增加致癌/致瘤性。证明 MDCK 细胞系冻融裂解物不致癌,降低制苗毒液中细胞系基因含量,完全可以将 MDCK 细胞系(M、JB、JC 株)用于犬五联苗生产。MDCK 细胞亚四倍体 YA 株不能用作病毒活疫苗培养基质。找出了 MDCK 细胞系的染色体变异率、软琼脂中克隆形成率、在植物凝集素作用下的凝集性和在裸鼠体内形成癌肿潜力之间的可能相关性,发现细胞系染色体数目增加、克隆形成率增高、凝集性增强,则致癌/致瘤性相应提高。

关键词: 细胞系; MDCK; HeLa; 猫犬肾细胞; 染色体组型; 致癌/致瘤性

Experimental Research on Carcinogenesis or Tumorigenicity of MDCK Canine Kidney Cell(CKC) Lines & Analysis of Their Chromosome Karyotypes

ZHANG De-li¹, LI Lijun³, XIA Geng-tian², HE Xuyu², GAO Buxian²,
BAI Xiaohong², HUANG Gao-sheng⁴, LIU Shang-gao⁵, YAN Long-fei⁴, FANG Fude⁵

(¹ Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100083;

² Beijing Institute of Preventive Medicine, Beijing 100071; ³ Department of Toxicology, Center for Research and Development of Animal Health-care Products, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032;

⁴ Department of Pathology, School of Pre-clinical Education, Fourth Military Medical University,

Xi'an 710032; ⁵ College of Animal Medical Sciences and College of Biological Sciences,

China Agricultural University, Beijing 100094; ⁶ State Key Laboratory of

Medical Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences at the Peking Union

Medical College/Institute of Basic Medical Sciences at the Chinese Academy of Medicine, Beijing 100005)

收稿日期:2000-05-08

基金项目:国家火炬计划重大项目

作者简介:张德礼(1962-),男,陕西山阳人,高级医师,博士,主要从事人类基因组学、蛋白质组学与生物信息学研究。Tel:010-62092541(O);

Fax:010-62091149; E-mail: delizhang@bjmu.edu.cn, delizhang2000@sohu.com, delizhang2000@263.net

Abstract: The chromosomal number variations and structural aberrations of the MDCK cell line, primary feline or canine kidney cell (FKC or CKC) and HeLa cell line were investigated and their karyotypes of conventional chromosome bands were analyzed. The carcinogenesis or tumorigenicity testing of these cell lines in about 232 nude mice for colony formation in soft agarose and for haemagglutination under different concentration of plant lectins of these cells were carried out. It was the prerequisite that the incidence of cancer or tumor in negative-control nude mice inoculated subcutaneously with primary feline or canine kidney cell cultures purified *in vitro* at passage 3 was 0 (0/22) and 0 (0/10), respectively. The incidence of the progressively-growing malignant tumor (MT) in positive-control nude mice inoculated subcutaneously with HeLa cell cultures of KB, X, or NM20/ X strain was 10/10, 25/25 and 5/51, respectively. The results showed that the incidence of tumor in nude mice with tetraploid YA strain of MDCK cell during 20 ~ 45 passages, with hypodiploid JB strain of MDCK cell on passage 25, with di- and hypoploid JC strain of MDCK cell during 2 ~ 15 passages or with hypoploid M strain of MDCK cell during 9 ~ 27 passages was 28/58, 1/5, 4/18 and 0/31, respectively. The chromosomal analysis results showed that the ratio of difference in the rate of modal chromosome numbers between high (mcs + n) and lowest (mcs) passages was not more than 5% ~ 15% and the structure aberrations were generally 0 ~ 3%. These results proved that the genetic characteristics of chromosomal number of cell lines determines their tumorigenicity, but it is species-specific. The MDCK line has tumorigenicity no matter what its chromosome karyotype is, at least it has very low tumorigenicity even when its modal chromosome number is hypoploid. The repeatedly frozen, thawed and split controls of tumorigenicity-positive cell lines (X strain of HeLa, M strain of BHK-21, JA strain of Vero, YA strain of MDCK) have much lower tumorigenicity or are even non-carcinogenesis. And the repeatedly frozen, thawed and split controls of very low tumorigenicity cell lines (M or JC strain of MDCK) are certainly non-carcinogenic and never have increased tumorigenicity. It is thus evident that MDCK cells of M, JB or JC strains can be approved as substrate for the preparation of attenuated viral vaccines, but the MDCK cells of YA strain can not be approved as substrate for the preparation of attenuated viral vaccines. In summary, all strains of MDCK cell line have at least low tumorigenicity, and never have non-carcinogenic MDCK. Very low tumorigenicity MDCK cell strains can certainly be used for the production of canine viral vaccines if the DNA content in the viral cell cultures is significantly decreased through conventional means during the manufacturing process. Therefore, the master cell stock and working cell bank of the MDCK line used for vaccine manufacture were established in China. They are free of infectious agents, and described with respect to cytogenetic characteristics and tumorigenicity. Tests showed that there were correlations among cell line chromosome number variations, anchorage independence in soft agarose, haemagglutination under plant lectins, and tumor-forming ability in nude mice. Thus all the *in vitro* tests were an economical, simple and reliable means for monitoring the tumor-forming ability of the MDCK line in nude mice.

Key words: Cell line; MDCK; HeLa; Feline or canine kidney cell; Karyotypes; Carcinogenesis or tumorigenicity

制苗用人二倍体细胞系 (HDC) 的安全性检定国外已有标准 (Guideline)^[1], 但制苗用传代细胞系 (CCL) 的致癌安全性检定尚无标准。传代细胞系能否用于生物制品生产已争论多年^[2~7], 根据大量研究结果, 作者支持各生产单位必须建立自己的强大传代细胞库, 并须经致癌毒理实验鉴定合格方可用于疫苗生产的观点^[8~11]。

与原代细胞和二倍体细胞相比, 使用传代细胞库可保障安全有效疫苗的标准化、低成本和大规模

生产。作为生物制品研究与生产的重要原材料, 传代细胞系的株系特性, 特别是其致瘤性, 不仅直接影响到疫苗的质量, 而且关系到人畜的健康与安全, 一向为生物制品研究与生产部门所重视。制苗用细胞系应无传染因子污染, 应符合细胞遗传学要求, 尤其应没有致癌/致瘤性^[8~15], 这已基本为国际同行所公认。犬、貉、狐用五联病毒活疫苗, 是采用犬传染性肝炎或犬传染性喉气管炎病毒 (即犬腺病毒 1 型或 2 型) 的致弱病毒株在 MDCK 犬肾细胞系上培养

制成的冻干产品。已有实验证明,肿瘤细胞系的基因皮下或肌肉接种裸鼠可以致癌^[16,17]。若用致癌/致瘤性细胞系培养犬五联弱毒苗,癌基因会随活苗接种而整合入犬体。人类若长期食用整合有癌基因的犬肉,数十年后有可能出现新一代癌症,酿成新的公共卫生问题。目前对犬肾细胞系(MDCK株)的致癌/致瘤性^[18~26]和核型分析研究尚少。本研究旨在确定供生物制品制造用和生物工程产品生产用MDCK犬肾传代细胞系有无致癌/致瘤性。

1 材料与方法

1.1 细胞株

Hela 人类子宫颈癌细胞系(human cervical epithelioid carcinoma),BHK-21 叙利亚仓鼠肾细胞系(C-13,kidney,Syrian Hamster,*Mesocricetus auratus*),Vero^[27]与 MDCK 犬肾细胞系^[22],均经美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏确认,第四军医大学动物保健品研制中心直接从 ATCC 引进(M株),或从中国药品生物制品检定所(JB株)、中国医学科学院(JC株)、中国预防医学科学院(YA株)、军事医学科学院(KA,JA株)、西安交通大学医学院(X株)和第四军医大学口腔医学院(KB株)引进。细胞系的代次为本实验室所传,如 BHK-21 细胞系 M 株引入本实验室时为 50 代,Vero 细胞系 JA 株引入本实验室时为 360 代,MDCK 犬肾细胞系 M 和 YA 株引入本实验室时分别为 49 和 135 代,MDCK 犬肾细胞系 JC 和 JB 引入本实验室时的代次不详,Hela 细胞系 KB 株与 X 株引入本实验室时的代次不详,均按 0 代对待,传后均为 1 代。Hela 细胞 NM20/X 株,为 Hela 细胞 X 株在本实验室连传 20 代皮下接种裸鼠形成癌肿后再行体外培养传代的细胞株。猫肾原代细胞(FKC)和犬肾原代细胞(CKC),本实验室购进健康快生仔的孕猫、孕犬,剖腹取胎肾或刚生下小仔取胎肾,及时消化后再体外培养纯化 3~4 代。Hela 为阳性对照细胞,FKC 和 CKC 为阴性对照细胞。细胞培养方法同文献^[28,29],只是 Hela 细胞的培养基为 E MEM 和 RPMI1640 各半。

1.2 细胞库建立

查清细胞系的建立背景、来源情况、传代代次,在 5~10 代各代次分别冻存种子批,以后每间隔 5~10 代冻存一批,冻存至 46 代以上,并确保无微生物(细菌、霉菌、霉形体、病毒)污染。

1.3 实验动物

Balb/C 无胸腺裸鼠 232 只,体重 18~22g(平均

体重约 20g),约 2 月龄,中国药品生物制品检定所和中国医学科学院上海市肿瘤医院提供。

1.4 瘤切片的病理形态学观察

自动物皮下取出瘤结节,10%甲醛固定,或直接将动物浸泡于 10%甲醛溶液中,次日更换一次固定液,石蜡包埋切片,H.E.染色,镜检。

1.5 细胞染色体遗传变异率和核型分析

方法见文献^[9,30,31]。

1.6 细胞在软琼脂中的抛锚独立生长特性和植物凝集素(PHA)作用下的凝集性实验

方法见文献^[24~26,32]。

2 结果与分析

2.1 细胞系染色体数目变异率、结构畸变率和核型分析与致癌/致瘤性观察

2.1.1 MDCK 犬肾细胞系 MDCK 细胞 YA 株 20~45 代(11~41 代的染色体众数为 130 ± 3 ,所占比率为 43%~58%,较高代次与最低代次细胞染色体众数所占比率之间的相差率为 0~14.85%,结构畸变率为 0~1%以每只 $(0.84 \sim 7.125) \times 10^7 / (0.115 \sim 0.26)$ ml 皮下接种 12 组 58 只裸鼠在 10~44d 观察期内的肿块形成率为 52/58(图版-3),致癌/致瘤率为 27/58,病理组织学观察 29 只裸鼠肿块,15/29 为恶性肿瘤[其中 3/29 为上皮源性恶性肿瘤,1/29 为高分化腺癌,3/29 为高-中分化腺癌,6/29 为中分化腺癌,1/29 倾向为低分化鳞癌(图版-1),1/29 疑为腺癌],14/29 为非肿瘤(其中 11/29 为坏死,1/29 为炎症,1/29 为炎性包块,1/29 为正常组织);另外,5/8 剖检为恶性肿瘤(图版-3),3/8 剖检正常。MDCK 细胞 YA 株 15 代冻融裂解物对照以每只 $3.1275 \times 10^7 / 0.18$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠,在 15d 观察期内的肿块形成率为 2/5,肿块 1/2 缩小,1/2 消退,5/5 剖检正常(表 1)。

MDCK 细胞 JB 株 25 代(13 代的染色体众数为 76 ± 2 ,所占比率为 45%,结构畸变率为 0)以每只 $3.72 \times 10^7 / 0.2$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠,在 41d 观察期内的肿块形成率为 5/5,肿块缩小、消退,致癌/致瘤率为 1/5,病理组织学观察 1 只裸鼠肿块为癌(中分化腺癌)肉瘤(图版-2);另外,4/4 剖检正常(表 1)。

MDCK 细胞 M 株 9~27 代(2~32 代的染色体众数为 77 ± 1 ,所占比率为 30%~51%,相差率为 1.5%~20%,结构畸变率为 0)以每只 $(0.9 \sim$

$5.9375 \times 10^7 / (0.2 \sim 0.25)$ ml 皮下接种 6 组 31 只裸鼠, 在 32 ~ 100d 观察期内的肿块形成率为 31/31, 肿块缩小、消退(图版-4), 致癌/致瘤率为 0/31, 病理组织学观察 2 只裸鼠肿块(图版-4), 1/2 呈腺泡状分布, 细胞异型性不明显, 1/2 为坏死组织; 另外, 29 只剖检正常。MDCK 细胞 M 株 27 代冻融裂解物对照以每只 $1.9875 \times 10^7 / 0.3$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠, 在 93d 观察期内的致癌/致瘤率为 0/5(表 1, 图版-4)。

MDCK 细胞 JC 株 2 ~ 15 代(5 代染色体众数为 77 ± 1 , 所占比率为 42%, 结构畸变率为 0) 以每只 $(1.4 \sim 2.735) \times 10^7 / 0.2$ ml 皮下接种 4 组 18 只裸鼠, 在 25 ~ 92d 观察期内的肿块形成率为 12/18, 肿块增大、缩小或消退, 致癌/致瘤率为 4/18, 病理组织学观察 7 只裸鼠肿块, 4/7 为恶性肿瘤(其中 1/7 为低分化癌, 1/7 为低分化肿瘤), 3/7 为坏死组织; 另外, 11 只剖检正常。MDCK 细胞 JC 株 15 代冻融裂解物对照以每只 $2.73 \times 10^7 / 0.2$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠, 在 90d 观察期内的致癌/致瘤率为 0/5(表 1)。

2.1.2 肿瘤阳性对照 HeLa 细胞系 HeLa 细胞 X 株(完整活细胞与冻融裂解物) 4 ~ 20 代 X 株 HeLa 细胞(超二倍体细胞染色体众数为 62 ± 3 , 所占比率为 69%, 结构畸变率为 2%) 以每只 $(0.605 \sim 8.316) \times 10^7 / (0.10 \sim 0.28)$ ml 皮下接种 5 组 25 只裸鼠, 在 15 ~ 37d 观察期内的肿块形成率为 25/25, 致癌/致瘤率为 25/25, 肿块均呈进行性增长, 病理组织学观察 13 只裸鼠肿块, 均为上皮源性低分化恶性肿瘤。简言之, 皮下接种的 5 组 25 只裸鼠均产生进行性生长的上皮源性低分化恶性肿瘤(100%)。超二倍体 X 株 HeLa 细胞 14 代冻融裂解物以每只 $6 \times 10^7 / 0.22$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠, 在 28d 观察期内的肿块形成率为 2/5, 致癌/致瘤率为 1/5, 肿块均呈进行性缩小乃至消退, 病理组织学观察 3 只裸鼠肿块, 1/3 为肿瘤, 2/3 为坏死。(表 2, 图版-5 ~ 6)。

NM20/X 株 HeLa 细胞为超二倍体和亚四倍体细胞(染色体众数 68 ± 3 , 所占比率为 52%, 结构畸变率为 0), 11 代该株细胞以每只 $5.205 \times 10^7 / 0.2$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠, 在 16d 观察期内的肿块形成率为 5/5, 致癌/致瘤率为 5/5, 肿块均呈进行性增长, 病理组织学观察 5 只裸鼠肿块, 均为 MRT(100%)。

KB 株 HeLa 细胞为超二倍体细胞(染色体众数 60 ± 3 , 所占比率为 72% ~ 76%, 结构畸变率为 5% ~

18%), 5 ~ 22 代该株细胞以每只 $(0.255 \sim 12.75) \times 10^7 / (0.14 \sim 0.2)$ ml 皮下接种 2 组 10 只裸鼠, 在 11 ~ 37d 观察期内的肿块形成率为 10/10, 致癌/致瘤率为 10/10, 肿块均呈进行性增长, 病理组织学观察 5 只裸鼠肿块, 均为恶性肿瘤(MT)。

2.1.3 肿瘤阴性对照猫肾原代细胞(FKC)和犬肾原代细胞(CKC) 0 ~ 4 代 FK(C 二倍体细胞染色体众数为 38, 在 2, 3 和 4 代染色体众数所占比率分别为 34%, 80% 和 36%, 但在 4 代时染色体众数 37 ± 1 所占比率可达 81%, 2 ~ 4 代的结构畸变率为 2% ~ 3%) 以每只 $(0.15 \sim 6.02) \times 10^7 / (0.14 \sim 0.4)$ ml 皮下接种 6 组 22 只裸鼠, 在 9 ~ 64d 观察期内的肿块形成率为 11/12(即部分产生肿块并缩小乃至消退), 无一产生肿瘤(致癌/致瘤率为 0/22)。CKC 第 3 代以 $(1.6 \sim 2.66) \times 10^7$ 接种裸鼠 2 组 10 只, 均形成肿块并消退, 观察 25d 后剖检正常, 无一产生肿瘤(0/10)。

2.1.4 BHK-21 细胞 M 株(完整活细胞与冻融裂解物) BHK-21 细胞 M 株为亚二倍体细胞(众数 42, 比率 28% ~ 30%, 结构畸变率为 0 ~ 1%)。13 代 BHK-21 细胞 M 株以每只 $2.75 \times 10^7 / 0.2$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠, 在 32d 观察期内的肿块形成率为 5/5, 致癌/致瘤率为 5/5。32 代 BHK-21 细胞 M 株以每只 $1.25 \times 10^7 / 0.2$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠, 在 44d 观察期内的肿块形成率为 5/5, 致癌/致瘤率为 5/5(表 2)。肿块均呈进行性增长, 病理组织学观察均为分化比较好的平滑肌肉瘤。

BHK-21 细胞 M 株 32 代冻融裂解物对照以每只 $1.875 \times 10^7 / 0.3$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠, 在 92d 观察期内的致癌/致瘤率为 0/5(表 2)。

2.1.5 Vero 细胞 JA 株(完整活细胞与冻融裂解物) Vero 细胞 JA 株 10 ~ 61 代的染色体众数为 73 ± 3 (结构畸变率为 0 ~ 3%), 所占比率为 46% ~ 85%, 相差率为 1.6% ~ 15.6%, 其中 10 ~ 42 代的染色体众数 73 ± 3 所占比率为 51% ~ 85%, 相差率为 1.6% ~ 14.87%, 二倍体以下细胞所占比率为 0 ~ 6%。

46 代 JA 株 Vero 细胞以每只 $3.075 \times 10^7 / 0.2$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠, 在 14d 观察期内的肿块形成率为 5/5, 致癌/致瘤率为 5/5, 其中 5/5 肿块呈进行性增长, 病理组织学观察 3 只裸鼠肿块, 均为恶性肿瘤(表 2)。46 代 JA 株 Vero 细胞系冻融裂解物以每只 $2.46 \times 10^7 / 0.16$ ml 皮下接种 1 组 5 只裸鼠, 在 11d 观察期内的肿块形成率为 4/5, 致癌/致

表 1 MDCK 犬肾细胞系 YA, JB, M 和 JC 株皮下接种裸鼠的致瘤/致瘤性实验

Table 1 Experimental investigation on carcinogenesis or tumorigenicity of MDCK canine kidney cell line of YA, JB, M or JC strain inside nude mice inoculated subcutaneously

实验组别 No. of groups	裸鼠只数 No. of nude mice	MDCK 株名 MDCK cell status inoculated	细胞代数 Passage of cell cultivation <i>in vitro</i>	接种细胞数目 (1×10^7 / mouse)	接种细胞容量 (ml/鼠) Volume of cells inoculated (ml/mouse)	观察天数 Investigational days	肿块形成率 Incidence of nodule formation	致瘤/致瘤率 Incidence of cancer or tumor formation	进行性增长或缩小 Progressive growing or negative-growing	平均体重/平均瘤重(g) Mean body weight/mean tumor or nodule weight
1	5	YA	20	1.815	0.22	26	3/5	3/5	缩小 Decreasing	24.996(5只鼠)/0.052(5只鼠)
2	5	YA	25	1.863	0.2	44	2/5	1/5	1/2 增大, 1/2 缩小 1/2 increasing, 1/2 decreasing	24.2(5只鼠)
3	5	YA	30	7.15	0.22	40	5/5	3/5	基本稳定 Basically stable	28(5只鼠)/0.056(5只鼠)
4	5	YA	30	7.125	0.22	40	5/5	4/5	基本稳定 Basically stable	24.92(5只鼠)/0.032(5只鼠)
5	5	YA	30	1.1475	0.18	30	5/5	1/5	缩小、消退 Decreasing or disappearing	20.902(5只鼠)/0.02(5只鼠)
6	5	YA	35	3.6	0.2	28	5/5	0/5	增长 Increasing	21.258(5只鼠)/0.08(5只鼠)
7	4	YA	36	3.15	0.21	11	4/4	4/4	增长 Increasing	25.58(4只鼠)
8	4	YA	40	1.5669	0.115	17	4/4	1/4	缩小 Decreasing	22.025(4只鼠)/0.00625(4只鼠)
9	5	YA	40	1.5669	0.115	17	4/5	1/5	缩小、消退 Decreasing or disappearing	19.34(5只鼠)/0.01(2只鼠)
10	5	YA	40	0.84	0.16	15	5/5	0/5	缩小、消退 Decreasing or disappearing	23.42(5只鼠)/0.01(2只鼠)
11	5	YA	41	2.65625	0.25	15	5/5	5/5	缩小 Decreasing	25.14(5只鼠)/0.038(5只鼠)
12	5	YA	45	4.875	0.26	10	5/5	5/5	缩小 Decreasing	20.36(5只鼠)/0.067(3只鼠)
13	5	YA	15*	3.1275	0.18	15	2/5	0/5	缩小、消退 Decreasing or disappearing	21.39(5只鼠)
14	5	JB	25	3.72	0.2	41	5/5	1/5	缩小、消退 Decreasing or disappearing	24.26(5只鼠)
15	5	M	9	1.2	0.2	37	4/5	0/5	缩小、消退 Decreasing or disappearing	23.12(5只鼠)
16	5	M	11, 12	3	0.2	37	5/5	0/5	缩小、消退 Decreasing or disappearing	23.34(5只鼠)
17	6	M	14	5.9375	0.25	32	6/6	0/6	缩小、消退 Decreasing or disappearing	23.7(5只鼠)
30	5	M	23	0.9	0.2	100	5/5	0/5		
31	5	M	23	0.9	0.2	100	5/5	0/5		
32	5	M	27	1.325	0.2	95	5/5	0/5		
27~32	31	M	9~27	0.9~5.9375	0.2~0.25	32~100	31/31	0/31		
33	5	M	27*	1.9875	0.3	93		0/5		
34	3	JC	2	1.4	0.2	25	3/3	0/3	缩小 Decreasing	26.4(5只鼠)
35	5	JC	6	1.4	0.2	25	3/5	1/5	1/3 增大, 2/3 消退 1/3 increasing, 2/3 disappearing	27.54(5只鼠)
36	5	JC	6	1.4	0.2	25	3/5	3/5	增大 Increasing	
37	5	JC	15	2.73	0.2	92		0/5		
34~37	18	JC	2~15	1.4~2.73	0.2			4/18		
38	5	JC	15*	2.73	0.2	90	0/5			

* 表示该代细胞为冻融裂解物对照组。体表光滑、无肿块的裸鼠，如剖检后发现接种细胞局部有残痕或小结节，均做病理切片检查

Represents the repeatedly frozen, thawed & split control of MDCK cell-cultures. Any of the nude mice both with smooth body and with no palpable nodule was examined for further determination by histopathology if it had sign or micronodule body on local site inoculated with cells determined by pathological-anatomic examine

表 2 HeLa, BHK-21 和 Vero 细胞系的完整活细胞和冻融裂解物皮下接种裸鼠的致瘤/致瘤性比较实验的观察结果¹⁾
 Table 2 Comparative results of the experimental investigation on carcinogenesis or tumorigenicity of HeLa, BHK-21 or Vero cell lines between the intact biologically live cells and the repeatedly frozen, hawed & split fragment cell slurry inside nude mice inoculated subcutaneously

实验组别 No. of groups	裸鼠只数 No. of nude mice	细胞状态 Cell status for inoculation	细胞系名称 Cell line inoculated	细胞系株名 Strain name in our laboratory	本室所传细胞代数 Passage of cell cultivatio in vitro in this lab	接种细胞数目(千/鼠) No. of inoculated cells (1 × 10 ⁷ /mouse)	接种细胞容量 (ml/鼠) Volume of inoculated cells (ml/mouse)	观察天数 Investigational days	肿块形成率 Incidence of nodule formatio	致瘤率 Incidence of cancer or tumor formatio	进行性增长或缩小 Progressive growing or negative growing	病理组织学检查 Histopathological examination	处死前肿块均值 (mm × mm) Average of palpable nodule dimensions(mm) before deadly dates	早期肿块均值 (mm × mm) Average of palpable nodule dimensions(mm) during the early period	平均体重/平均瘤重(g) Mean body weight/mean tumor or nodule weight
1	5	完整活细胞 Intact live	HeLa	X	13	8.316	0.225	29	5/5	5/5	增长 Growing	1/1 上皮源性低分化恶性肿瘤 1/1 PDMT originating from epithelium	22.88 × 15.26 ~ 26.14 × 18.86	12 天均长出肿瘤 Pal. tum. elev. on day 12 in all 15.9 × 10.48	27.82(5 mice)/2.285(4 mice) 1 只尸检做病理切片观察 1 necropsy for histopathol test
2	5	完整活细胞 Intact live	HeLa	X	13	0.924	0.225	29	5/5	5/5	增长 Growing	1/1 上皮源性低分化恶性肿瘤 1/1 PDMT originating from epithelium	15.15 × 11.28 ~ 18.56 × 13.26	11.32 × 8.28	26.64(5 mice)/0.9275(4 mice) 1 只尸检做病理切片观察 1 necropsy for histopathol test
3	5	冻融裂解物 FTSC	HeLa	X	14	6	0.22	28	2/5	1/5	缩小、消退 Decreasing or disappearing	2/3 坏死, 1/3 肿瘤 2/3 necroses, 1/3 tumor	6.1 × 4.9	8.55 × 7.2 ~ 6.5 × 5.55	21.792 (5 nude mice)
4	5	完整活细胞 Intact live	BHK-21	M	32	1.25	0.2	44	5/5	5/5	增长 Growing	5/5 SMS	30.2 × 29.7	12 × 7.04	24.3(5 mice)
5	5	冻融裂解物 FTSC	BHK-21	M	32	1.875	0.3	92	0/5	0/5					
6	5	完整活细胞 Intact live	Vero	JA	46	3.075	0.2	14	5/5	5/5	增长 Growing	3/3 恶性肿瘤 3/3 malignant tumor	14.84 × 9.86 (5 mice/on day 10)	11.76 ~ 13.8 × 7.04 ~ 8.24	22.2/0.428 (5 mice)
7	5	冻融裂解物 FTSC	Vero	JA	46	2.46	0.16	11	4/5	/5	缩小、消退 Decreasing or disappearing	4/5 正常, 1/5 可能为肿瘤 4/5 normality, 1/5 may be tumor	6.6 × 5.0	8.3 × 6.75	23.02(5 mice)

1) “/”之前为较大肿块长径 × 短径均值, 之后为较小肿块长径 × 短径均值
 The item before or after “/” represents average of large or small palpable tumor dimensions(mm), respectively

瘤率为 1/5(表 2),其中 3 只肿块呈进行性缩小并消失。

2.2 细胞系软琼脂中克隆形成(抛锚独立生长特性)实验与凝集实验

本实验所用不同株的 HeLa 细胞系, M 株 BHK-21 细胞, JA 株 Vero 细胞, YA 株 MDCK 细胞系在 0.33%软琼脂中均具有抛锚独立生长特性,并在终浓度 3.125 ~ 200 μ g/ml 植物凝集素(PHA)作用下出现凝集现象,而二倍体原代细胞 FKC 与 CKC 不具有抛锚独立生长特性,在不同浓度 PHA 作用下也不发生凝集,其它株 MDCK 细胞的抛锚独立生长特性和凝集性均差,但不够十分规律。这就说明本实验所用不同株的 HeLa 细胞, M 株 BHK-21 细胞, JA 株 Vero 细胞及 YA 株 MDCK 细胞符合肿瘤细胞系体外常规检定特性,并与裸鼠体内致癌/致瘤性观察结果相符。M 株 BHK-21 细胞和 JA 株 Vero 细胞与不同株的 HeLa 细胞一样,缺乏粘附性、接触抑制性,并对血清要求低,FKC 与 CKC 细胞则相反,不具备这些特性,说明本实验所用 M 株 BHK-21 和 JA 株 Vero 细胞及不同株的 HeLa 细胞符合肿瘤细胞系体外常规检定特性。

3 讨论

3.1 不同核型细胞的致瘤性不同,细胞染色体数目变异大小和致癌/致瘤性强弱相关及肿瘤细胞系高变异率株可在裸鼠体内快速选育成功

研究表明,染色体数目变异较小细胞在裸鼠体内增殖处于劣势或被淘汰,而染色体数目变异较大细胞在裸鼠体内增殖处于优势而明显增多。裸鼠虽缺失细胞免疫机能,但作为活体动物仍具有轻微体液免疫机能或天然抵抗力。染色体为二倍体的原代细胞(FKC 和 CKC)不致癌(0/32);HeLa 细胞的致癌/致瘤率为 40/40, MDCK 细胞系的致癌/致瘤性低微,但染色体数目变异越大(指偏离二倍体越远),染色体众数越大(指众数染色体数目越多)、范围越宽,染色体条数越多,致瘤性越强(从分化程度高低和生长速度快慢来看更容易在裸鼠体内形成肿瘤并快速生长),接种细胞量越大,生瘤越快,瘤体细胞染色体数目变异显著加快,染色体条数明显增加。

3.2 细胞染色体遗传特征决定致瘤性质并具有种属特异性

在阴性对照细胞致瘤率为 0 的前提下,HeLa 细胞致瘤率为 100%。X 株和 KB 株 HeLa 细胞均为超二倍体细胞,皮下接种的 7 组 35 只裸鼠均产生进行

性生长的恶性肿瘤(100%)。超二倍体 HeLa 细胞 X 株(众数 62 \pm 3)第 20 代,皮下接种裸鼠成瘤后再体外培养纯化 3 代(标记为 NM20/X 株第 3 代),经染色体观察为超二倍体和亚四倍体细胞,染色体数目明显增加,众数偏移为 68 \pm 3(比率 52%)。超二倍体细胞成瘤后变成的超二倍体和亚四倍体细胞 NM20/X 株第 11 代,皮下接种 1 组 5 只裸鼠均快速产生进行性生长的 MRT。

可见,细胞系染色体遗传特征决定致瘤性质。HeLa 细胞 X 株的染色体众数为超二倍体 62 \pm 3,致瘤性强,接种少量细胞即可快速产生上皮源性低分化恶性肿瘤(100%),且肿瘤生长迅速。KB 株的染色体众数为超二倍体 60 \pm 3,比 X 株变异小,也不如 X 株致瘤性强,加大细胞接种量有利于快速生瘤。NM20/X 株 HeLa 细胞为超二倍体和亚四倍体细胞,染色体众数 68 \pm 3,比 X 株变异大,也比 X 株致瘤性强,均致 MRT(5/5)。

总之,细胞致癌/致瘤性具有种属特异性,即同样染色体核型的不同种类动物细胞系的致癌/致瘤性不同,HeLa 细胞为超二倍体以上细胞,所选育的 NM20/X 株致 MRT 的比率高达 5/5。MDCK 犬肾细胞系致癌/致瘤性差,只有超二倍体细胞才具有高的致癌/致瘤率,亚二倍体细胞的致癌/致瘤率很低,且一般致上皮源性恶性肿瘤,多为高中分化腺癌,更未导致 MRT 产生。

3.3 动物细胞系的染色体变异率、软琼脂中克隆形成率、在植物凝集素作用下的凝集性和在裸鼠体内形成癌肿的潜力之间的相关性

在不同株 MDCK 细胞系均连传 20 ~ 60 代的基础上,在 HeLa 细胞系作为阳性对照和纯化犬、猫肾原代细胞作为阴性对照均成立的前提下,通过系统实验研究,找出了 MDCK 细胞系的染色体变异率、软琼脂中克隆形成率、在植物凝集素作用下的凝集性和在裸鼠体内形成癌肿的潜力之间的可能相关性,发现细胞系染色体数目增加、克隆形成率增高、凝集性增强,则致癌/致瘤性相应提高,这就为细胞系的致癌/致瘤性检定提供了科学、简易、经济的手段。

3.4 MDCK 犬肾细胞系为低致癌细胞系,降低制苗毒液中细胞系基因含量可以将其用于犬五联苗生产

本研究证明 MDCK 株细胞系至少是低致癌/致瘤性细胞系,MDCK 细胞 M 株 9 ~ 27 代以每只 3 \times 10⁷/0.2 ml 皮下接种 5 组 25 只裸鼠,在 37 ~ 100d 观

察期内的肿块形成率为 25/25, 肿块缩小、消退, 致癌/致瘤率为 0/25。只有以每只 $5.9375 \times 10^7/0.25$ ml 皮下接种 1 组 6 只裸鼠(图版-4), 在 32d 观察期内有 1 只裸鼠肿块的病理组织学观察皮下可见 1 个坏死结节, 绝大部分细胞坏死, 周边残存一些腺泡状分布的细胞, 异型性不明显, 难以明确病变性质, 即不能肯定为恶性肿瘤, 其余 5 只均未致瘤。因此, 本研究染色体众数包含二倍体并以亚二倍体为主的 MDCK 细胞 M 株 9~27 代皮下接种裸鼠 6 组 31 只的致癌/致瘤率为 0/31~1/31。与 M 株类似的染色体众数为亚二倍体的 JB, JC, WB 株 MDCK 细胞皮下接种量在低于 $3 \times 10^7/$ 只时均有轻微的致癌/致瘤性, 因此不排除 M 株 MDCK 细胞致瘤的可能性。国际上制苗用非致癌/致瘤性细胞系的筛选一般是以 $1 \times 10^7/0.2$ ml(或低于此接种细胞数量标准)皮下接种裸鼠 21d 不致瘤为检定标准, 按此标准, 本实验 M 株 MDCK 细胞系即为非致癌/致瘤性细胞系, 可用于病毒活疫苗制备。本实验还表明, 冻融裂解细胞系的致癌/致瘤性相应降低, 非致癌/致瘤性细胞系不会因冻融裂解而增加致癌/致瘤性。

4 结论

在建立国内首家 MDCK 犬肾传代细胞系的种子库和工作库的基础上, 以人类子宫颈癌细胞系 Hela 为阳性对照, 以连传 3 代纯化的犬、猫肾原代细胞(CKC、FKC)作为阴性对照, 对 4 株传代细胞系进行了 232 只裸鼠致癌/致瘤实验观察, 筛选出致癌性极低、符合细胞遗传学要求、无传染因子污染的几株 MDCK 细胞系用于制苗。不同代次 MDCK 细胞系染色体众数所占比率的相差率一般不超过 5%~15%, 结构畸变率为 0~3%。同时, 得出以下结论:

(1) 肿瘤细胞系高变异率株可在裸鼠体内快速选育成功, 瘤体细胞染色体数目变异显著加快, 染色体条数明显增加。

(2) 细胞系染色体遗传特征决定致瘤性质, 细胞染色体数目变异大小和致癌/致瘤性强弱相关。

(3) 细胞系致癌/致瘤性具有种属特异性, MDCK 细胞系不论核型如何, 始终具有致癌性, 至少是低致癌/致瘤性细胞系。

(4) 冻融裂解细胞系的致癌/致瘤性相应降低, 非致癌/致瘤性细胞系不会因冻融裂解而增加致癌/致瘤性, 降低制苗毒液中 MDCK 细胞系基因含量可以将亚二倍体 MDCK 细胞系用于犬五联苗生产 MDCK 细胞系冻融裂解物不致瘤, 降低制苗毒液中

细胞系基因含量, 完全可以将 MDCK 细胞系(M, JB, JC 株)用于犬五联苗生产。但 MDCK 细胞亚四倍体 YA 株不能用作病毒活疫苗培养基质。

(5) 在软琼脂中的细胞克隆形成实验和在植物凝集素作用下的细胞凝集实验结果具有规律性, 并与裸鼠体内实验结果一致。

(6) 动物细胞系的染色体变异率、软琼脂中克隆形成率、在植物凝集素的作用下凝集性和在裸鼠体内形成癌肿的潜力之间具有相关性, 这就为细胞系的致癌/致瘤性检定提供了科学、简易、经济的手段。

(7) 不同生物制品研制单位必须建立自己的强大传代细胞库, 并须经检定合格方可启用。随着传代代次的增加, 细胞系的变异增多, 染色体数目增加, 致癌/致瘤性相应提高, 但因培养条件不同而变异速率不一。

References

- [1] Jacobs J P, et al. Guidelines for the acceptability, management and testing of serially propagated human diploid cells for the production of live virus vaccines for use in man. *J. Biol. Stand.* 1981, 9:331 - 342.
- [2] Pearson J. Changing issues of quality control: diploid and non-diploid cell lines. *Dev. Biol. Stand.* 1992, 76:13 - 17.
- [3] Petricciani J C, et al. Karyology and tumorigenicity testing requirements: past, present and future. *Dev. Biol. Stand.* 1998, 93:5 - 13.
- [4] Lee C K. Issues of biological assays for viral vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 1996, 88:41 - 47.
- [5] Petricciani J C. Cell substrates: lessons learned and challenges remaining. *Dev. Biol. Stand.* 1999, 100:57 - 63.
- [6] Lower J. Risk of tumor induction *in vivo* by residual cellular DNA: quantitative considerations. *J. Med. Virol.* 1990, 31:50 - 53.
- [7] Krause P R, Lewis A M Jr. Safety of viral DNA in biological products. *Biologicals*, 1998, 26:317 - 320.
- [8] Zhang D L. Studies on the origin of malignant rhabdoid tumor (MRT) and on the carcinogenesis or tumorigenicity of animal cell lines & analysis of their chromosomal karyotypes. Proceedings of the International Conference on Animal Science and Veterinary Medicine towards the 21st century. Beijing:China Agricultural University Press, Aug. 2000:88.
- [9] Zhang D L, et al. Analyses of chromosomal karyotypes and cytogenetic variations of animal cell lines. *Acta Genetica Sinica*. 2001, 28:327 - 344. (in Chinese)
张德礼, 等. 动物细胞系的染色体组型与遗传变异率分析. 遗传学报, 2001, 28(4):327 - 344.
- [10] Zhang D L, et al. Recent Developments in Toxicology of Animal Cell Lines. *Chinese Journal of Veterinary Bioproducts and Pharmaceuticals*, 2000, 34(1):53 - 57. (in Chinese)
张德礼, 等. 动物细胞系的毒理学研究新进展. 中国兽药杂志, 2000, 34(1):53 - 57.
- [11] Zhang D L, et al. Carcinogenicity or tumorigenicity of animal cell lines and analysis of their chromosome karyotypes. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1999, 19(4):348 - 349, 352. (in Chinese)
张德礼, 等. 动物细胞系的染色体组型和致癌/致瘤性. 中国兽药杂志, 1999, 19(4):348 - 349, 352.

- [12] Zhang D L, et al. Studies of the origin of malignant rhabdoid tumor (MRT)--experimental researches on the MRT evolving in nude mice inoculated with violently variable HeLa cells. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(12):1057 - 1071. (in Chinese)
张德礼,等. 恶性横纹肌样瘤(MRT)的起源研究--高变异率 HeLa 细胞致裸鼠产生 MRT 的实验研究. *遗传学报*, 2000, 27(12):1057 - 1071.
- [13] Zhang D L, et al. Researches on the origin of malignant rhabdoid tumor (MRT)--Experimental researches on MRT evolving in nude mice inoculated with highly variable BHK-21 cell lines. *Progress in Biotechnology*, 1999, 19(3):22 - 39. (in Chinese)
张德礼,等. 横纹肌样瘤的起源研究--高变异率 BHK-21 细胞系致裸鼠产生恶性横纹肌样瘤的实验研究. *生物工程进展*, 1999, 19(3):22 - 39.
- [14] Zhang D L, et al. Researches on the origin of malignant rhabdoid tumor (MRT)--Experimental researches on MRT evolving in nude mice inoculated with highly variable BHK-21 cell lines (Continued). *Progress in Biotechnology*, 1999, 19(4):52 - 56, 72. (in Chinese)
张德礼,等. 横纹肌样瘤的起源研究--高变异率 BHK-21 细胞系致裸鼠产生恶性横纹肌样瘤的实验研究(续). *生物工程进展*, 1999, 19(4):52 - 56 转 72.
- [15] Zhang D L, et al. Researches on the origin of malignant rhabdoid tumor (MRT)--Experimental researches on the MRT evolving in nude mice inoculated with highly variable cell lines. The Proceedings of China Postdoctoral Conference in 2000--Series of medicine, pharmacy and biology. Beijing: Science Press, 2001: 573 - 588. (in Chinese)
张德礼,等. 恶性横纹肌样瘤(MRT)的起源研究--高变异率细胞系致裸鼠产生 MRT 的实验研究. 2000 年中国博士后学术大会论文集医药学与生物学分册. 北京:科学出版社, 2001: 573 - 588.
- [16] Burns P A, et al. Transformation of mouse skin endothelial cells in vivo by direct application of plasmid DNA encoding the T24 H-ras oncogene. *Oncogene*, 1991, 6:1973 - 1978.
- [17] Dortant P M, et al. Risk assessment on the carcinogenic potential of hybridoma cell DNA: Implications for residual contaminating cellular DNA in biological products. *Biologicals*, 1997, 25: 381 - 390.
- [18] UHS, Boerner P, et al. Characterization of chemically and virally transformed variants of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells. *J. Cellular Physiol.* 1985, 122:299 - 307.
- [19] Wuensch S, et al. Phenotypically and karyotypically distinct Madin-Darby canine kidney cell clones respond differently to alkaline stress. *J. Cell Physiol.* 1995, 164:164 - 171.
- [20] Mareel M M, et al. Down regulation of E-cadherin expression in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells inside tumors of nude mice. *Int. J. Cancer*, 1991, 47:922 - 928.
- [21] Schroyens W, et al. Different invasion capacity of NBT II and MDCK in the chick embryo chorioallantois. *Anticancer Res.* 1989, 9:1665 - 1668.
- [22] Gauth C R, et al. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (USA)*, 1966, 122:931 - 935.
- [23] Bruyneel E A, et al. Altered glycosylation in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells after transformation by murine sarcoma virus. *Clin. Exp. Metastasis*, 1990, 8:241 - 253.
- [24] Rather R, et al. Heterotransplantation studies with tissue culture cell lines in various animals and *in vitro* host systems. *J. Biol. Stand.* 1985, 13:13 - 22.
- [25] Kahn P, et al. Cellular tumorigenicity in nude mice. Tests of associations among loss of cell-surface fibronectin, anchorage independence, and tumor-forming ability. *J. Cell Biol.* 1979, 82:1 - 16.
- [26] Levenbook I S, et al. Tumorigenicity testing of primate cell lines in nude mice, muscle organ culture and for colony formation in soft agarose. *J. Biol. Stand.* 1985, 13:135 - 141.
- [27] Rhim J S, et al. Biological characteristics and viral susceptibility of an African green monkey kidney cell line (Vero). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (USA)*, 1969, 132:670 - 678.
- [28] Zhang D L. Development of mink parvovirus vaccines. *Biologicals*, 1997, 25:103 - 111.
- [29] Zhang D L, et al. Evaluation of mink parvovirus vaccines. *Biologicals*, 1997, 25:93 - 101.
- [30] Nelson W J. The distribution of spontaneous chromosome aberrations in BHK21/C13 fibroblasts. *Mutat Res. (Netherlands)* 1979, 59:195 - 201.
- [31] Thomas J A, et al. A comparative study of the mitochondria and karyotypes of BHK21/13 cells and H54 cancer cells derived from the m. C. R. Acad. Sci. Ser. D (French), 1964, 258(25, Group 14):6273 - 6276.
- [32] Zhang D L, et al. Carcinogenesis or tumorigenicity testing of animal cell lines for vaccine preparation by colony formation on soft agar and by agglutination under plant lectins. *Cell Biology International*. 2001, 25:997 - 1002.