

一组小鼠白血病细胞系的建立及生物学特性的研究*

万景华 张淑靖 糜静娴 齐淑玲
吴克复 甘 蒂 杨保青 徐丽娟

(中国医学科学院血液学研究所, 天津)

许 良 中

(上海医科大学肿瘤医院)

摘 要

本文建立了一种经 PHA-脾条件培养液刺激, 在体外形成白血病干细胞克隆后, 再经体内传代, 发病后在体外连续培养建成白血病细胞系的新方法。采用此方法成功地建立了 T 抑制淋巴细胞白血病 L7811-85, L7212-85 细胞系, 非 T 非 B 淋巴白血病 L1210-86, B 淋巴白血病 P388-86 及红白血病 FLCL 细胞系等。对上述细胞系进行了较系统的生物学特性研究。电子显微镜观察中发现, 白血病细胞的病毒颗粒在体外传代时 A 型颗粒消失, C 型颗粒出现。并发现在 L7811-85 细胞系培养上清液分离的组分中, 有白血病相关抑制活性的存在。

关键词: 小鼠白血病细胞系, 生物学特性, 建系方法, RNA 病毒颗粒, 自激因子

近 20 年来, 肿瘤细胞生物学的主要成就都与使用细胞培养有关。白血病细胞系能在体外传代中保存白血病特性, 并可长期连续传代, 是体外研究白血病细胞生物学行为的有力工具, 历来受到国内外的重视^[1]。为了建立白血病细胞系, 我们在对白血病干细胞培养研究的基础上, 探索了刺激白血病干细胞生长的各种条件, 其中包括不同的培养体系; 来自腹腔、脾、胸腺的细胞作为饲养细胞的应用; PHA, PHA 白细胞和 PHA 脾条件培养液; 肿瘤转化生长因子 (肺腺癌 L7EP-a-2 细胞系条件培养液); 组织生长因子 (表皮生长因子、血小板衍生长因子、成纤维细胞生长因子) 等。结果发现 PHA 脾条件培养液 (PHA-SCM) 有较强的刺激白血病细胞增殖的作用。并在此基础上建立了一种体内外结合的小鼠白血病细胞系建系新技术。还对已建立的一些细胞系进行了较系统的生物学特性的研究。

一、材料与方 法

1. 可移植性小鼠白血病模型 L7811 和 L7212 为我室自建的小鼠淋巴细胞白血病^[2,3]。

1987 年 9 月 13 日收到修改稿。

* 国家自然科学基金资助项目。

L1210 及 P388 由中国医学科学院药物研究所提供。Friend 红白血病小鼠由日本京都大学病毒研究所花岡正南教授赠予。

2. 动物 L7811 和 L7212 的易感动物为纯系 615 小鼠, L1210, P388 和 Friend 红白血病为 DBA/2 纯系小鼠。

3. 培养基 为含 16% 小牛血清(天津生化厂), 青霉素及链霉素各 100u/ml, 200mmol/L 1 谷氨酰胺及 10^{-5} mol/L 2 巯基乙醇的 RPMI 1640 培养基 (Difco)。

4. PHA-SCM 制备 脾细胞取自正常昆明小鼠, 用培养液配成细胞浓度为 5×10^5 /ml, 加入 1% PHA-P (Difco)。在 5% CO_2 , 37℃ 培养 7 d 后, 收获上清。

5. 定量极限稀释法液体微培养技术 参阅文献[4]。

6. 建系方法 小鼠白血病腹水或脾细胞从体内取出后, 用剪刀将脾脏剪一小口, 用钝器轻轻挤出脾细胞并通过不锈钢滤网制成单细胞悬液。用培养基调节细胞浓度为 1×10^6 /ml, 并加入 5% PHA-SCM。在 24 或 96 孔培养板中, 5% CO_2 , 37℃ 饱和湿度空气中培养 14—18d 后可见细胞集落形成。为了使这些在体外形成的集落细胞大量增殖, 并逐步适应体外环境, 将这些集落细胞接种于易感小鼠腹腔中。16d 后, 小鼠发病并形成腹水或白血病。取腹水或脾中瘤细胞在不加刺激因子的培养液中传代培养建成细胞系。

7. 细胞形态学及免疫学分型研究 细胞用离心涂片机涂片进行 Wright-Giemsa 染色及 ABC 免疫化学分型观察^[5]。透射及扫描电镜标本的制备见文献[6], 并分别在 H-600 透射电镜和 S-520 扫描电镜中观察。

8. 致病力及病理学研究 将不同浓度细胞悬液腹腔接种易感动物, 观察腹水形成与否以及小鼠存活天数。动物濒死时处死作病理学切片检查。将 108 代 L7811-85 细胞分别接种 615 小鼠腹腔、皮下、肌肉及静脉, 观察存活天数及白血病类型, 并比较了接种不同代数 L7811-85 细胞后动物存活时间及在杂种昆明小鼠中的发病情况。

9. 细胞动力学研究 将细胞接种在 96 孔微孔池中, 逐日计数存活细胞数, 在半对数纸上画出细胞生长曲线。细胞克隆形成率测定采用定量极限稀释法液体微培养方法^[4]。应用光神霉素-溴化乙锭 DNA 染色技术, 在 Phywe ICP-22 流式细胞分光光度计中测定细胞 DNA 含量, 并计算各细胞周期的百分比。克隆形成细胞增殖周期的测定采用 ^3H -TdR 自杀试验再接种观察集落形成率的方法^[7]。细胞动力学参数的计算参见文献[8]。

10. 染色体分析 采用常规方法及 G 显带方法进行细胞系的核型分析^[9]。

11. L7811-85 细胞系分泌因子活性组分的分离及测定 条件培养液应用 Sephadex G-150 凝胶过滤方法进行组分分离, 细胞增殖抑制活性以 ^3H -TdR 参入率为指标进行测定^[10]。

12. 抗癌药物筛选 应用 L7811-85 细胞系同时对 4 种常用抗癌药阿糖胞苷 (Arac)、高三尖杉酯碱 (Hom)、柔红霉素 (DNR) 及长春新碱 (VCR) 进行体外集落培养、 ^3H -TdR 参入和拒染法细胞抑制率测定, 并与体内给药动物疗效进行对比^[11]。

二、结 果

1. 白血病细胞系的建立

应用上述方法自 1985 年 2 月起, 从相应的可移植性小鼠白血病模型中, 陆续建成了 L7811-85 (已传 141 代)、L7212-85 (已传 70 代)、L1210-86 (已传 41 代)、P388-86 (已传

30 代) 和 FLCL (已传 42 代)。

为了进一步检验此建系方法的可靠性, 曾对昆明种小鼠中移植传代的 S180 及肝 Ca 细胞应用此法进行建系培养, 也都成功建成了细胞系。表明此建系方法对小鼠非白血病肿瘤细胞建系也有一定价值。

2. 细胞形态学及免疫学分型

培养细胞悬浮于培养液中不贴壁生长, 呈葡萄串状聚集。细胞涂片形态见图 1。

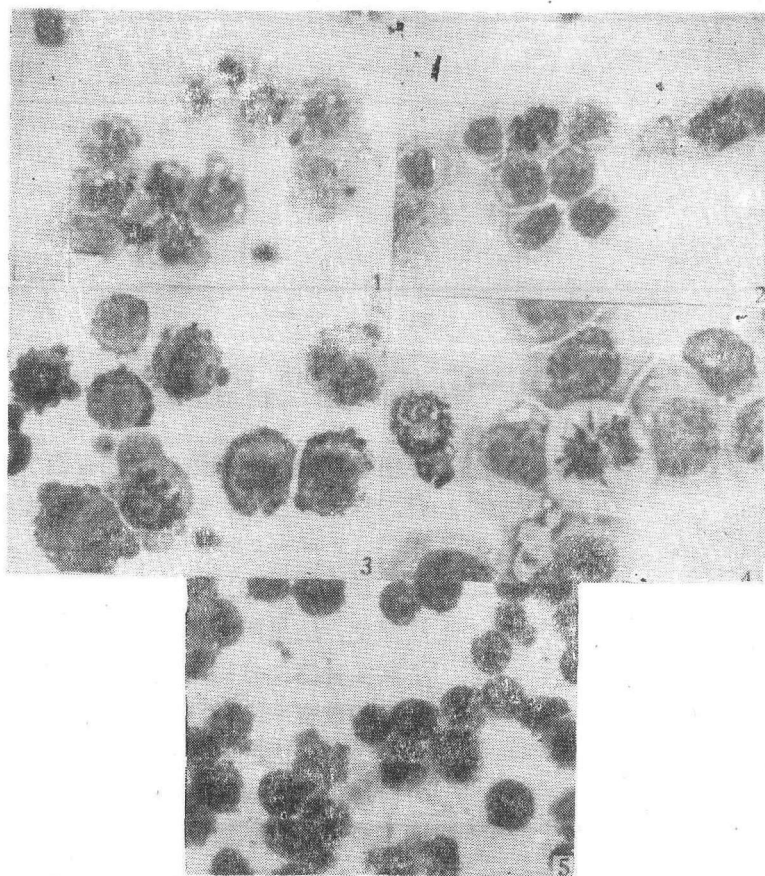


图 1 五株小鼠白血病系的细胞形态 (Wright-Giemsa 染色) $\times 600$

(1——L7811-85, 2——L7212-85, 3——L1210-86, 4——P388-86, 5——FLCL)

表 1 小鼠 T 细胞单抗免疫学分型结果

细胞系	Thy1,2	Lyt-1	Lyt-2	Iak ²	IgG	免疫学类型
L7811-85	+	-	+	-	-	抑制性 T 细胞白血病
L7212-85	+	-	+	-	-	同上
L1210-86	-	-	-	-	-	非 T 非 B 淋巴白血病
P388-86	-	-	-	+	+	B 淋巴白血病

小鼠 T 细胞单抗 ABC 免疫学分型结果表明: L7811-85, L7212-85 属抑制性 T 淋巴细胞白血病; L1210-86 属非 T 非 B 淋巴细胞白血病; P388-86 为 B 淋巴细胞白血病 (表 1)。

表2 白血病细胞系接种发病情况

细胞系	接种动物	接种细胞 $\times 10^5$ /只	动物数	发病数	死亡数	生存天数
L7811-85	615	1.0	10	10	10	9.6
L7212-85	615	1.4	8	8	8	19.8
L1210-86	DBA/2	7.0	8	8	8	14.6
P388-86	DBA/2	1.0	8	8	8	17.0
FLCL	DBA/2	1.0	5	5	5	19.4

表3 接种 L7811-85 于不同部位的发病观察

接种部位	动物数	接种细胞/只	发病数	存活天数	白血病类型
腹腔	10	10^5	10	9.6	腹水型
皮下	10	10^5	10	15.0	局部瘤块型
肌肉	10	10^5	10	16.8	同上
静脉	10	10^5	10	8.4	全身型

3. 致病力及病理学研究

各株细胞系细胞分别进行腹腔接种, 每组 6—10 只小鼠, 接种细胞数为 $1.0—7.0 \times 10^5$ /只, 均 100% 发病(表 2)。

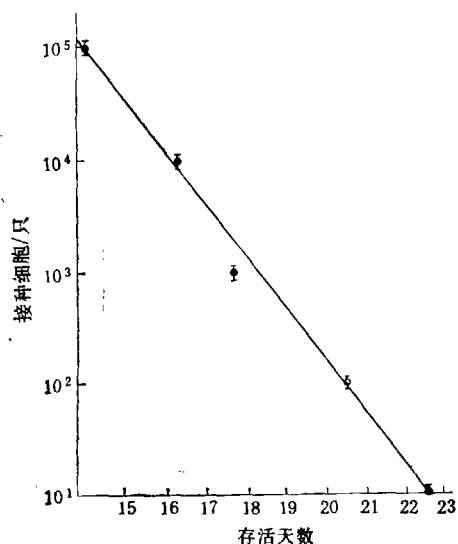


图2 L7811-85 接种细胞数与小鼠生存天数的关系

根据接种细胞数对数与存活天数推算回归方程。从图 2 可见, 接种细胞数与生存天数有较好的相关 ($r = -0.99$, $y = 11.3 - 0.46(x)$)。

108 代 L7811-85 细胞分别接种在 615 小鼠不同部位, 结果所有被接种小鼠均 100% 死亡, 并按不同接种部位分别产生腹水、局部瘤块和全身型白血病的改变(表 3)。病理检查还发现白血病细胞在全身各脏器内的浸润较为广泛, 并累及骨髓和脑膜。

接种第 20 代 L7811-85 细胞 10^5 /只于杂种昆明小鼠, 10 只小鼠中有半数发生腹水, 但以后自发消退。接种 70 代细胞, 则 9 只动物全部发病, 其中 2 只死于白血病, 生存天数为 17.3d 表明随传代代数增加, 细胞的致病力有所提高。

4. 细胞动力学研究

(1) 细胞生长曲线测定 图3示白血病细胞

系的细胞生长曲线, 一般可分为指数生长期、生长平稳期及下降期。分析了 L7811-85 细胞系第 11, 22 及 87 代的细胞生长曲线, 可见随传代代数增加, 细胞生长加速, 增殖时缩短(图 3(b))。

(2) 细胞克隆形成率测定 表 4 为白血病细胞系克隆形成率测定的结果。不同代数 L7811-85 细胞克隆形成率随传代代数增加而提高。

(3) 细胞 DNA 含量分布及周期时相比例 图4列示了白血病细胞系 DNA 含量分布及

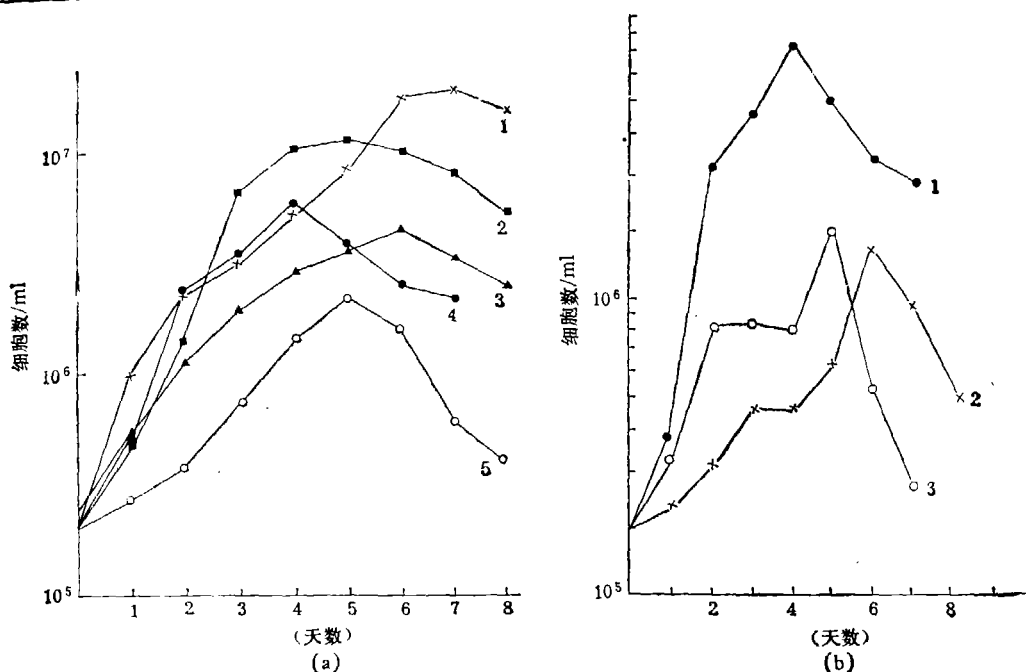


图 3 (a) 五株小鼠白血病细胞系在微孔池中细胞生长曲线

(1—L7211-85, 2—L1210-86, 3—L7811-85, 4—P388-86, 5—FLCL)

图 3(b) L7811-85 细胞不同代数细胞生长曲线的比较

(1—87 代, 2—11 代, 3—22 代)

表 4 白血病细胞系克隆形成率比较

细 胞 系	克隆形成率(%)
L7811-85 原代	0.06—0.1
19 代	1.5
32 代	8.0
53 代	11.1
83 代	13.9
L7212-85	20.8
L1210-86	13.4
P388-86	1.0
FLCL	3.9

各细胞周期所占比例。

根据对 L7811-85 群体细胞动力学研究的结果, L7811-85 的细胞动力学参数见表 5。

(4.) L7811-85 克隆形成细胞增殖时的测定 用³H-TdR 自杀试验再接种观察集落形成的方法,测得第 123 代 L7811-85 细胞系克隆形成细胞的增殖时为 16.7 h, S 期为 7.9 h。线性回归方程为 $y = 47.53 + 5.99(t)$ (图 5)。

5. 染色体分析

L7811-85 细胞系的染色体众数为 41。对 6 个 41 条染色体的细胞进行了 G 显带核型分析,其核型为 41, XX, + Mar。此标记染色体的大小近似 3 号染色体,但深染的端着丝点

表 5 L7811-85 细胞动力学参数

动 力 学 参 数	数 值
T_D 倍增时 (h)	19.6
T_S 合成时 (h)	7.7
T_{G_1} 合成前期 (h)	9.5
T_{G_2} 合成后期 (h)	1.8
MI 分裂指数 (%)	2.3
T_M 分裂时 (h)	0.65
T_{pot} 潜在倍增时 (h)	16.6
ϕ 细胞丢失指数	0.153
K_p 细胞生成率/h	0.0418
K_l 细胞丢失率/h	0.0064

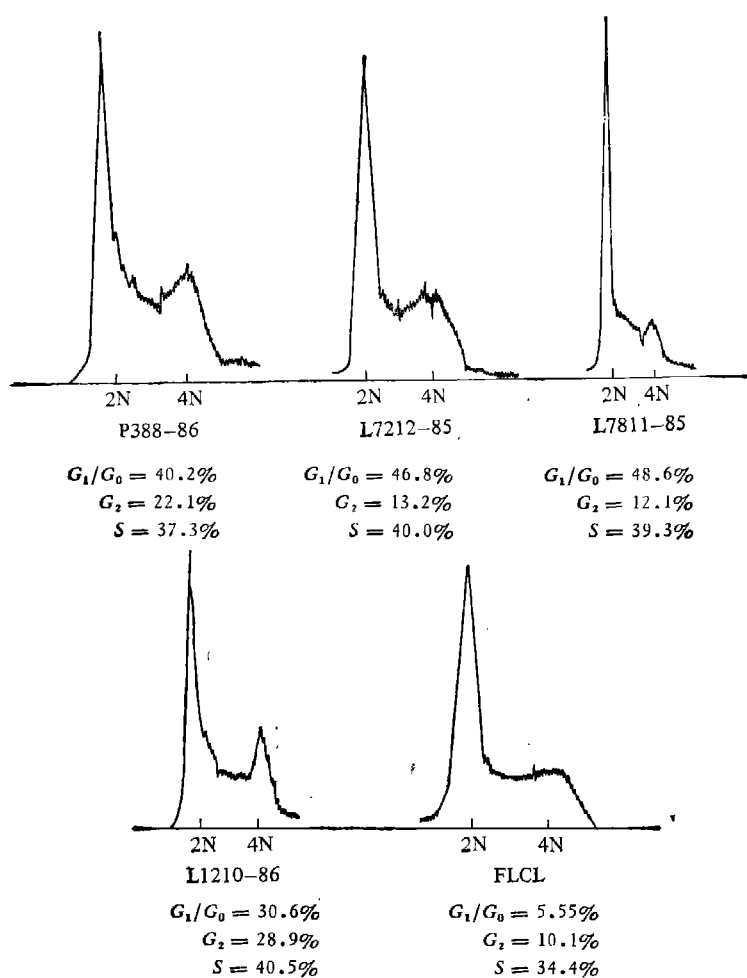


图 4 五株小鼠白血病细胞系 DNA 含量分布

下为一条很宽的浅带,其下有 2—3 条均匀分布的暗带,而与 3 号染色体不同。41 条染色体均显 C 带,进一步证实此细胞系的性染色体为 XX。各白血病细胞系染色体核型分析的比较见表 6。

表 6 三株白血病细胞系染色体的比较

细胞系	计数细胞	染色体数目(比例%)	干细胞系染色体数	标记染色体*
L7811-85	351	36—43(99)	41	1A
L1210-86	145	63—72(86)	69	5B1C1M
P388-86	106	63—72(80)	71	6B1C1M

* A 示大小近似 3 号染色体的标记染色体；B 示中或亚中着丝点染色体；C 示带明显随体的染色体；M 示微小染色体。

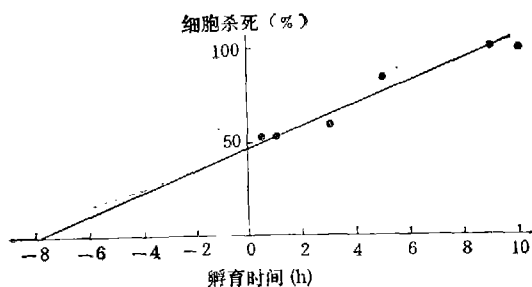


图 5 L7811-85 克隆形成细胞应用 ^3H -TdR 自杀试验进行细胞周期分析
($r = 0.95$, $y = 47.53 + 5.99t$)

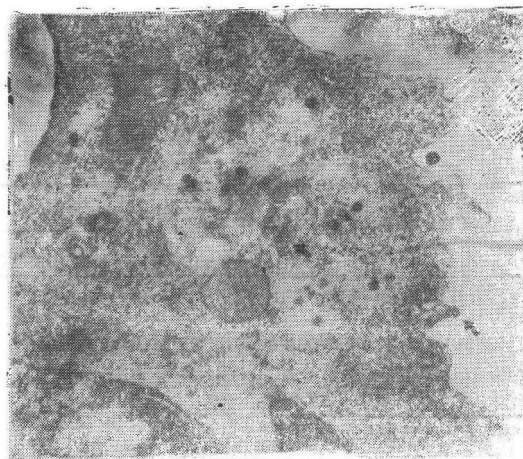


图 6 127代 L7811-85 细胞内的 C 病毒颗粒及其向胞浆外出芽现象 $\times 9000$

6. 超微结构观察

对细胞系进行的透射和扫描电镜观察表明,各细胞系形态均有明显的异型性,细胞大小不一,核畸形,细胞器较少且发育异常。扫描电镜显示各细胞系均无支原体感染。

在各细胞系的细胞胞浆、内浆网及细胞间隙中均见有数量不等的病毒颗粒存在(表 7)。L7811 原代小鼠腹水白血病细胞中的病毒颗粒呈中心透亮圆形:由两层同心圆的壳组成,中心为电子透亮区,内壳似比外壳有较深的电子密度,两层壳中间有稍淡的嗜锲物质。颗粒外径约 82nm,类似 A 型病毒颗粒,散在分布于胞浆和内质网内。在 L7811-85 细胞系中病毒数量随着体外培养代数的增加而逐渐增多。不但分布于细胞胞浆内也见于细胞间隙。胞浆中的病毒颗粒,一种呈中心透亮圆形,形态类似上述 A 颗粒,属于不成熟的 C 颗粒;另一种呈实心圆形,中央有一电子密度较深之类核,属于 C 病毒颗粒。上述成熟及不成熟 C 型病毒颗粒均有向

表 7 不同细胞系病毒形态及分布比较

细胞系	数量	形态	位置			分布	出芽
			胞浆	内浆网	间隙		
L7811-85	大量	中心透亮或实心圆形	+	+	+	成堆或散在	细胞间隙、内浆网
L7212-85	大量	同上	+	+	+	同上	同上
P388-86	少量	实心圆形	+	-	+	散在	细胞间隙
L1210-86	中等	中心透亮或实心圆形	+	+	-	成堆或散在	内浆网

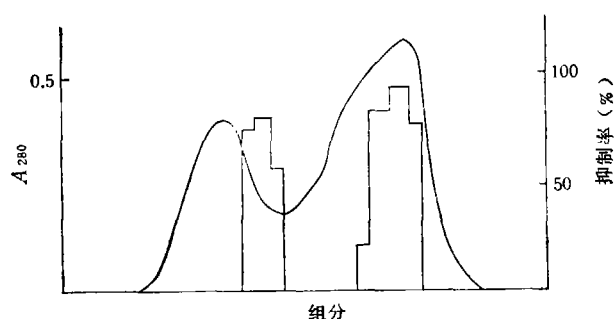


图 7 L7811-85 细胞培养液上清分离组分及其对自身白血病细胞的抑制作用

表 8 L7811-85 上清组分对白血病细胞系 ^3H -TdR 参入作用

靶 细 胞	对 照 组 分		抑 制 率(%)
	cpm($\bar{X} \pm SE$)		
L7811-85	4977 $\pm$ 425	1348 $\pm$ 520	83
P388-86	2190 $\pm$ 167	684 $\pm$ 204	69
L7212-85	9718 $\pm$ 479	3957 $\pm$ 193	59
人粒单白血病 J ₆₋₁	10832 $\pm$ 693	6047 $\pm$ 485	44

细胞外出芽的现象(图 6)。当将细胞系再接种于正常成年小鼠腹腔,所产生的腹水细胞胞浆内又主要见 A 型颗粒,未见向细胞出芽。这种现象经反复证实并在 L7212-85 细胞系中亦可见到。

7. 分泌因子活性的测定

在对 L7811-85 细胞培养上清液分泌因子的探索中,以 ^3H -TdR 参入抑制率为指标,测定其上清液分离组分对白血病细胞的作用。结果组分中 4—5 万及 7—8 万分子量段对白血病细胞有一定的抑制作用(表 8 及图 7)。这些组分经链霉蛋白酶、酸、热等作用分析不同于已知的铁蛋白类物质。

8. 在抗癌药筛选及药效试验中的应用

以 L7811-85 细胞系为对象,同时对 4 种抗癌药进行了四种体内及体外筛选方法的比较研究。结果显示三种体外方法与体内整体动物给药所得结果一致(表 9),各自从不同角度反映了药物对细胞的作用。用于抗癌药筛选及药敏试验均有一定的意义。

表 9 三种体外测定结果与整体疗效的比较

药 物	³ H-TdR 参入法	拒染法	集落培养	生命延长 (%)
	ID ₅₀ (μg/ml)			
阿糖胞苷	0.015	0.016	0.003	206
高三尖杉酯碱	0.017	0.075	0.0063	178
柔毛霉素	0.132	0.1	0.014	110
长春新碱	0.195	>0.16	0.28	113

四、讨 论

白血病细胞系的建立不仅对白血病细胞可深入地进行研究, 而且对探索白血病的病因及发病, 瘤细胞增殖、分化及其调控以及药物筛选、实验治疗、病毒学、免疫学和分子生物学等方面都有重要的研究价值。由于体内细胞不完全适应在体外环境下生长, 因而建立体外细胞系具有一定的难度^[12]。本文通过在易感小鼠体内接种的过渡, 较好地解决了这一困难。本建系方法具有建系成功率高、细胞在建系中可不断被克隆纯化、清除污染等优点, 因而具有重要的实用价值, 并已在国内推广使用, 为国内外广泛用于抗癌药筛选的白血病动物模型。FLCL 红白血病细胞对于研究白血病病毒病因, 白血病细胞的诱导分化具有重要价值。

L7811-85 细胞经连续传代后细胞生长加速, 倍增时缩短, 克隆形成率提高, 并观察到细胞恶性程度增加, 接种单个细胞或接种于杂种昆明小鼠也能发病致死。

对 L7811-85 和 L7212-85 细胞系电镜追踪观察证明, 在原代细胞内存在 A 病毒颗粒, 当形成细胞系后, 病毒颗粒增加并转化为向细胞间隙出芽的 C 病毒颗粒。再接种细胞于小鼠腹腔, 所得白血病腹水细胞中又只见 A 病毒颗粒。体外细胞系和腹水细胞内病毒类型不同, 是否是宿主细胞所处的外部环境变化造成并影响其生物学特性有待进一步研究。文献中证实, 胞浆外 C 病毒颗粒有致瘤性, 而池内 A 颗粒没有^[13]。但尚未发现如我们看到的 A 颗粒见于小鼠体内腹水细胞, C 颗粒见于体外培养的细胞系中, 而将培养细胞再植入体内, C 颗粒又消失的现象。

在 L7811-85 上清液中还分离出白血病相关自泌因子 (Autocrine)^[14], 对自身及其他白血病细胞的 ³H-TdR 参入有明显的抑制作用。值得进一步深入研究。

赵轶轩、李惠萍、冯敏、亢非、刘黎等同志参加部分技术工作, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Hozumi, M., *Critical Rev. Onco/Hemat.*, 3(1985), 23.
- [2] 褚建新等, 中华肿瘤杂志, 3(1981), 287.
- [3] 褚建新等, 中华血液学杂志, 3(1982), 12.
- [4] 万景华, 中华医学杂志, 65(1985), 292.
- [5] 许良中等, 上海医科大学学报, 13(1986), 241.
- [6] Qi S. et al., *Chinese Medical Journal*, 100(1987), 34.
- [7] Wan, J. & Morley, A. A., *Intar. J. Cell Clonin*, 3(1985), 106.
- [8] Stell, G. G., *Growth Kinetics of Tumours*, Oxford Clarendon Press, 1977, 56.
- [9] Seabright, M., *Lancet*, 1971, ii: 931.
- [10] Wu, K. et al., *Int. J. Cancer*, 35(1985), 477.
- [11] 万景华, Morley, A. A. 药学报, 20(1985), 418.
- [12] Hishima, I. et al., *In Vitro*, 22(1986), 127.
- [13] 程立, 肿瘤基础理论, 上海科技出版社, 1980, 57.
- [14] Furmansk, P. et al., *Leukemia Rev. Int. Defer Inc Cancer*, Vol 2, 1984.