

SMMC-7721 人体肝癌细胞株的建立及其生物学特性的初步观察

病理解剖学教研室 董荣春 周荣华 吕发度 陶文照

原发性肝癌是一种危害性较大的恶性肿瘤,过去对肝癌的研究,多采用由致癌剂诱发的肝癌动物模型,包括它的移植性实体瘤和腹水型或由体外培养建立的细胞株,但这种动物的肝癌模型毕竟和人体肝癌的生物学特性存在着相当大的差异。因此,通过组织培养在体外建立人体肝癌细胞株,对肝癌的研究具有重要价值。迄今为止,有关人体肝癌细胞株的报道不多。中国科学院上海细胞生物研究所于1960年首先成功地建立了BEL-16人体肝癌细胞株⁽¹⁾,1974年又建立三株^(2,3)。南非 Prozesky 等于1973年报道建立二株⁽⁴⁾,以后日本(Doi 1975)⁽⁵⁾,美国(Jørgen, 1975)⁽⁶⁾,英国(Macnab, 1976)⁽⁷⁾和我国江苏启东肝癌防治研究所(1977)⁽⁸⁾,也相继建立肝癌细胞株。

我室从1976年9月开始,对30例人体肝癌手术切除标本进行了体外培养,其中仅一例在体外建株获得成功。到1980年3月4日已连续培养950天,并传到第126代,我们把这一细胞株命名为SMMC-7721,现将该细胞株的建立过程及其生物学特性作一简要报道。

材料和方法

材料来源:我们于1977年8月4日从我校第一附属医院肝外科取得肝癌手术切除标本,患者史××、男性、50岁,手术前甲胎蛋白电泳阳性,血凝1:1000₊₊₊,磷酸己糖异构酶50单位,乳酸脱氢酶295单位,γ-谷氨酰转酞酶44单位,HBsAg(-),病理诊断为肝细胞性肝癌Ⅱ~Ⅲ级,肝炎,肝硬化。

培养方法:我们在取得标本后的三小时内进行培养,先用Hanks液冲洗几次,然后切成1×1立方毫米的组织块,用Hanks液洗去红细胞及组织碎片,即将组织块接种到培养瓶内(组织块间隔1厘米左右),瓶口加塞后移入37℃培养箱内一小时,待组织块较牢固地粘贴于瓶壁后,再加新鲜培养液4毫升,置37℃培养箱内静置培养。培养液为20%小牛血清+80% RPMI 1640培养液,每毫升培养液内加青霉素100单位,链霉素100微克,培养液的pH为7.2~7.4。

培养11天后,在接种的组织块周围有细胞晕生长,每隔三天换培养液一次,继续培养三周后瓶壁细胞生长较密集,弃旧培养液后,用Hanks液冲洗细胞,再以0.15%胰酶(Difco 1:250)在室温下消化3~5分钟,弃去胰酶后,加入培养液,用滴管将瓶壁上的细胞冲下成细胞悬液,分别接种于二只培养瓶内,进行静置培养,这是第一代细胞。

在传出第一代细胞后的一个月內,细胞生长一直良好,且以上皮形细胞为主,但以后细胞增长的速度又渐缓慢,从1977年8月27日传出第一代细胞后的三个月內,只传到第5代,但从第6代开始(1977年12月21日)细胞的生长又见旺盛,一般每隔7~10天即可传代一次,这种从原代培养刚传出的细胞,在开始阶段细胞的增殖缓慢,以后趋向稳定而迅速的生长,这可能是细胞在体外适应环境的过程,如能耐心而谨慎地渡过这个缓慢生长期,往往是培养细胞建株成功的关键⁽³⁾。

SMMC-7721 细胞株的生物学特性

(一) 细胞形态观察:

我们观察了单层细胞的活体相差(图4), 除了一些处于有丝分裂阶段和衰老退化而变圆的细胞外, 主要以上皮形细胞的生长占优势。此外尚有部分梭形和多核的瘤巨细胞。除了光学显微镜的观察之外, 我们对第15代细胞用国产DXA-4-10型电子显微镜进行了观察, 其细胞的亚微结构有以下表现(图8):

细胞表面有多数微绒毛呈指状突起、胞质内的细胞器呈区域性分布, 细胞核增大, 核浆比例增高, 核膜呈皱折状凹陷而使细胞核呈不规则形, 核内常出现几个核仁, 有时在核仁内尚可见到电子密度增高的嗜银颗粒。

(二) 染色体数目及其核型:

我们计数了56个中期分裂相, 并对其中的20个分裂相进行了核型分析, 其结果如下:

1. 本细胞株染色体数目分布为44~107个, 染色体的主流范围在54~58个, 占总数的70%, (图1) 不论是干细胞系(Stemline)还是边细胞系(Sideline)大部分属超二倍体, 只少数分裂相是亚二倍体和超四倍体细胞。这和Doi报道的HLE及HLF细胞株在培养第238天及278天时的染色体数目相似⁽⁵⁾。

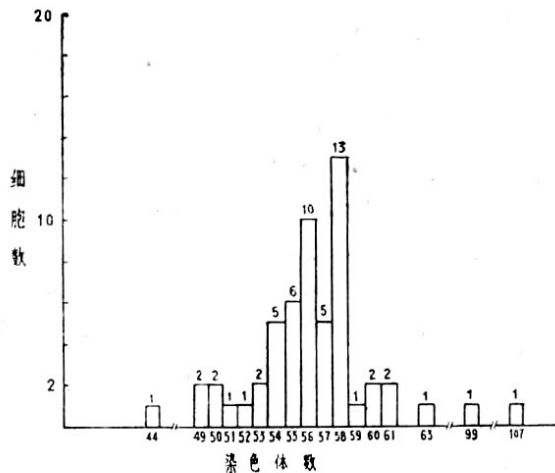
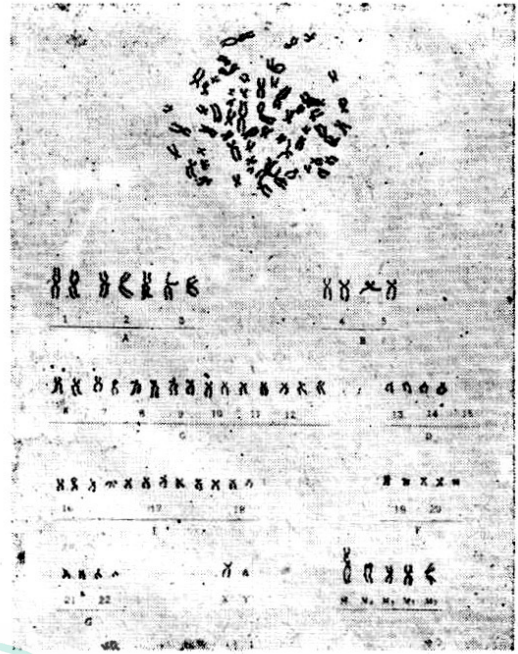


图1 SMMC-7721细胞培养220天(第15代)染色体数目分布



SMMC-7721 人体肝癌细胞株染色体核型

2. 群的分布: 根据20个分裂相核型分析的结果(见上图), 各群染色体分布的平均数:

A群 6.45 B群 4.05 C群 18.15 D群 4.85
E群 12.55 F群 5.25 G群 1.75

我们把本细胞株群的分布和正常细胞相对照, 可以看出其中A、B、C、E和F群增加而D、G群减少, 而其中以C、E群的增加和G群的减少最为显著。所以+C、+E、-G为本细胞株群分布的特征性表现(图2)。

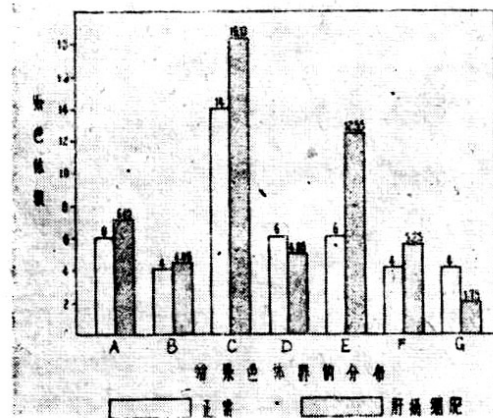


图2 SMMC-7721 人体肝癌细胞株20个分裂相核型中群的分布

3. 染色体结构异常：本细胞株异常染色体出现频繁，其形态有以下几种类型：

M₁：中着丝点巨大染色体

M₂：B 群亚中部着丝点长臂延长染色体

M₃：C 群中等长度中着丝点染色体，其中又有二种情况：一种是长臂等臂染色体；另一种是短臂等臂染色体

M₄：D 群端着丝点长臂延长染色体

经20个分裂相核型分析的结果，其中异常染色体在分裂细胞中的出现比例如下

异常染色体	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
出现个数	4/20	8/20	36/20	4/20

从上表可以看出，其中 M₃ 出现的频度最高，其次是 M₂、M₁和M₄，这几个异常染色体在本细胞株的分裂相中较为常见，另外还看到不少无着丝点的碎片及单体断裂、裂隙、部分缺失和双着丝点染色体，一般认为这是恶性肿瘤细胞继发的赘生现象而不是其发生的原因。

(三) 甲胎蛋白的免疫荧光反应：

为了解该细胞株的生化代谢特点，我们用间接免疫荧光方法检测了该细胞株(第15代)的甲胎蛋白，结果在荧光显微镜下显示了多数细胞的胞浆内有较强的 AFP 亮绿色荧光反应(图5)，而对对照组均为阴性。

AFP 免疫荧光反应的阳性结果表明，本细胞株在体外培养的条件下，仍能继续产生 AFP。

(四) 乳酸脱氢酶(LDH)同功酶的检测：

我们收集培养细胞(第22代),120万/毫升，用反复冻溶和细胞匀浆的方法，使细胞破裂，然后离心沉淀取上清液，用醋酸纤维膜电泳法检测了 SMMC-7721 (第22代)细胞株 LDH

同功酶，结果显示深浅和宽窄不等的5个区带，并用 CH-174 型光密度计扫描(滤色片波长 600nm)测得其各部分活力占总活力的百分数分别为 LDH₁ 3.6%；LDH₂ 25.3%；LDH₃ 29.3%；LDH₄ 26.8%；LDH₅ 14.9%(图3)。这和陈瑞铭等报道的三株人体肝癌细胞株LDH同功酶的结果相类似⁽³⁾。

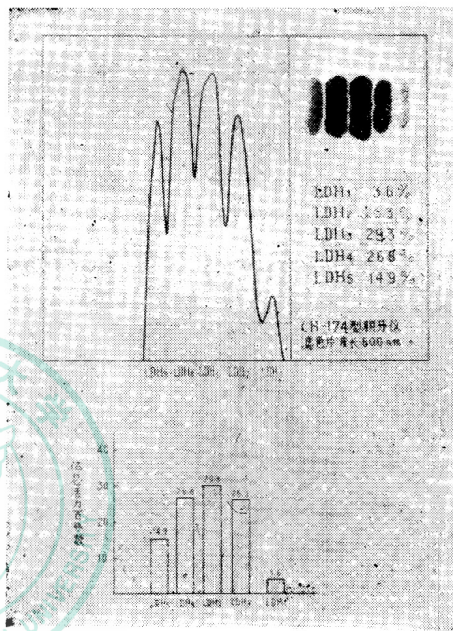


图3 SMMC-7721 肝癌细胞株乳酸脱氢酶同功酶比例

(五) 动物异种接种：

将本株细胞悬液 0.5 毫升，接种于事先经 ⁶⁰Co 全身照射(照射剂量 300r)的刚断奶不久、体重为70~85克的雄性大白鼠前肢腋下，同时在动物后腿皮下注射醋酸氢化可的松混悬液25毫克，接种后的第3天再给动物注射醋酸氢化可的松25毫克，以维持免疫抑制作用。在接种后的7~11天解剖动物，原接种部位均有米粒或绿豆大小的灰白色瘤结节生长(见表1)。

表1 SMMC-7721 细胞株悬液动物接种结果

动物编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
接种细胞数/只	10 × 10 ⁶	25 × 10 ⁶	5 × 10 ⁶	10 × 10 ⁶	5 × 10 ⁶	10 × 10 ⁶	10 × 10 ⁶	10 × 10 ⁶	5 × 10 ⁶
接种天数	7*	10*	10*	11	11	11*	10*	10	9*
瘤重(毫克)	35	70	15	30	25	90	65	20	55

(*动物因出血死亡后解剖)

从上表可以看出，接种后瘤结节的生长率是高的，但瘤结节的大小和接种的细胞数没有明显的一致性。瘤结节用10%中性甲醛固定，石蜡包埋切片，苏木精、伊红(H.E.)染色，光学显微镜检查，瘤结节的周边部细胞生长较好，而瘤结节的中心部分则多数均有坏死，但瘤结节的组织结构与原手术切除标本(图6)的病理形态相类似(图7)。

总 结

本文报道人体肝癌细胞株(SMMC-7721)的建立过程和对此细胞株某些生物学特性的初步观察。

通过对本细胞株的观察和分析，可归纳以下几点：

(一)本细胞株的生长较为迅速而稳定，一般每隔7~10天即可传代一次，细胞形态以上皮形占绝大多数；

(二)从细胞的亚微结构形态看，符合癌细胞的一般特征；

(三)对该细胞株染色体核型分析看，其额外增加的染色体，大部分属于A、B、C、E和F群，其中C、E群的增多更为显著，而G群的减少也甚突出(图2)，本细胞株培养220天(第15代)染色体数目的分布为44~107，主流范围在54~58个(图1)，占总数的70%，这

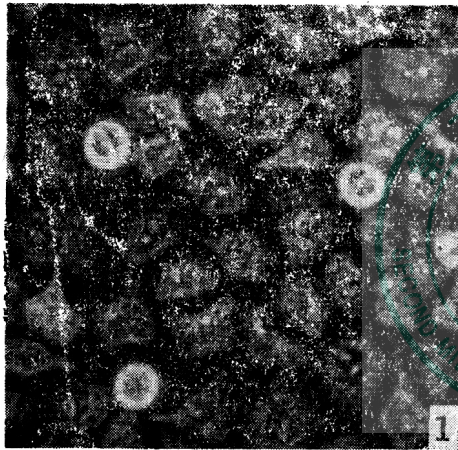


图4 SMMC-7721单层细胞(第100代)活体相差显微镜图象×134

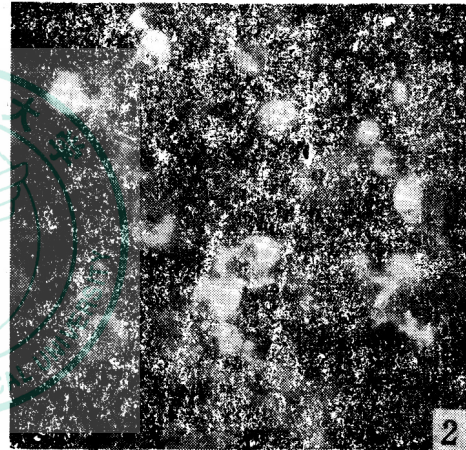


图5 SMMC-7721(第15代)细胞的AFP免疫荧光反应×160

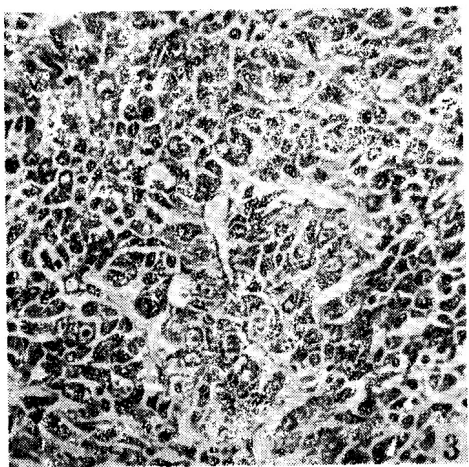


图6 SMMC-7721细胞培养时肝癌手术切除标本的病理切片H.E.×107

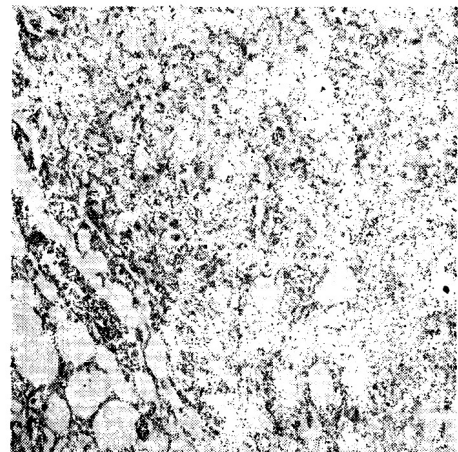


图7 SMMC-7721细胞动物接种第9天生长的瘤结节其形态和原手术切除标本的病理切片相类似H.E.×107

和 Ishihard, Sandberg (1963~1969) 报道的肝癌染色体数目分布44~103相接近。也和Doi的HLE及HLF细胞株在培养238天和278天时的染色体数目相一致⁽⁵⁾。

(四) 本细胞株 AFP 的免疫荧光反应为阳性。

(五) 本细胞株 LDH 同功酶酶谱的变化符合肝癌细胞的一般特征。

(六) 动物异种接种的瘤结节, 经病理切片检查, 其组织形态和原来手术切除标本的病理切片相类似。

SMMC-7721 人体肝癌细胞株的建立, 不仅有助于了解肝癌细胞的某些生物学特性, 而

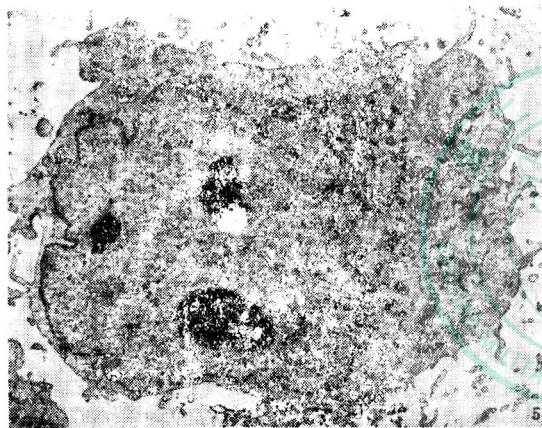


图8 SMMC-7721细胞(第15代)的电镜图象 ×15000 细胞表面有少数微绒毛突起, 核大, 核浆比例增高, 核膜呈皱折状凹陷而使细胞核呈不规则形, 核内常有多个核仁, 胞质内的细胞器呈区域性分布。

且对肝癌防治的实验研究和基础理论研究提供了一个较好的细胞实验模型。

参考文献

1. 陈瑞铭: 一株人体肝癌细胞的建立及一些初步的观察, 肿瘤研究论文集 39~47, 1962。
2. 陈瑞铭等: 人体肝癌体外细胞株 (BEL-7402) 的建立及其特征, 科学通报(9):434~436, 1975。
3. 陈瑞铭等: 体外培养三个人体肝癌细胞系的建立及其特征, 中国科学9(12):1225~1233, 1979。
4. Prozesky OW, et al: In vitro culture of cell lines from Australia antigen positive and negative hepatoma patients, In "Liver", Proc Int al Liver Conf. held at the Univ. Cape Town Med. School (Eds, Saunders, ST & Terblanche, J) Part 15 Special (1973), 358-359. London: Pitman Medical Books.
5. Doi I, Namba M and Sato J: Establishment and some biological characteristics of human hepatoma cell lines. GANN 36:685, 1975.
6. Jørgen Fogh and Germain Trempe: New human tumour cell lines in Jørgen Fogh (ed): Human tumour cells in vitro. P 115-159, Plenum Press New York. 1975.
7. Macnab GM, et al: Hepatitis B Surface antigen Produced by a human hepatoma cell line Brit J Cancer 34 (5) : 509, 1976.
8. 启东肝癌防治研究所等: 启东肝癌细胞株(QGY-7703)的建立及其特性, 上海市1977年度肿瘤年会论文资料
9. Electron Microscope Laboratory, Second Military Medical College; Ultrastructural investigation of primary hepatic carcinoma. C M J 4(2):111-122, 1978.