DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.026
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

文章编号:1000-5404(2000)05-0465-05

论著

人膀胱癌细胞波状层次生长的研究

邓国宏,丛延广,刘俊康,徐启旺,袁泽涛 (第三军医大学生物波研究中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察人膀胱癌细胞(BIU)在体外培养条件下的生长有序行为。方法 将BIU细胞悬液进行局限区域接种,待其形成贴壁生长的群落后进行宏观和显微动态观察及参数测量(扩展直径、扩展速率、细胞形态、细胞平均密度、细胞平均大小、脱氢酶活性、对pH的敏感性等)。结果 体外细胞培养条件下,局限区域生长的BIU细胞群落能出现明显的层次特性,不同区域细胞的形态、大小、密度、脱氢酶活性以及对pH的敏感性均存在差异。结论 空间封闭和生物耗散导致细胞自组织,其结果表现为生长有序行为。本实验为人体细胞的波动生长提供了一个简单可控的初步模型。

关键词:人膀胱癌细胞;细胞培养;自组织;生物波
中图法分类号:Q28;R737.14 文献标识码:A

Study of wavy laminar growth of humn urinary bladder cancer cell colony *in vitro*

DENG Guo-hong, CONG Yan-guang, LIU Jun-kang, XU Qi-wang, YUAN Ze-tao (Biowave Research Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the ordered growth behavior of human urinary bladder cancer cell line under culture *in vitro*. Methods The suspension of human urinary bladder cancer cells was inoculated to the localized areas. After the cells grew alone the wall to form colonies, macroscopic and microscopic observations of the spreading diameter, spreading rate, cell shape, average cell density, average cell size and dehydrogenase activity and its sensitivity to pH were dynamically performed. Results Under culture conditions, obvious laminar structure appeared in the locally growing colonies of human urinary bladder cancer cells and there was difference of the shape, size, density and dehydrogenase activity and its sensitivity to pH among the cells in different zones. Conclusion Space closing and biodissipation lead to the self-organization of the human urinary bladder cancer cells. Consequently they show ordered growth behavior. In this paper, a simple and controlled model of wavy growth of human cells is provided.

Key words: human urinary bladder cancer cell colony; cell culture; self-organization; biowave

现代生物学研究主要依靠生物技术和遗传技术分析由内部信号控制的细胞及大分子运动的规则。随着研究的深入,人们开始对大分子之间和细胞之间的分工及联系感兴趣,关注它们如何通过自组织演化为细胞集落和生物个体。即使是粘菌、变形杆菌、大肠杆菌等原核生物也存在分化和多细胞行为[1],胚胎发生这种自组织的分化和发育过程更是展现出大自然精巧的复杂性。然而,从微观大分子运动规律到宏观群体细胞行为的转变还是一个极具挑战性的问题[2]。生物波的实验研究[3]以原核细胞为模型,尝试揭示群体细胞自组织节律性生物活动的规律。本研究采用生长迅速、贴壁能力强并且对不利生长环境有相当抵抗力的人膀胱癌细胞株(BIU)进行实验,以研究群体细胞在体外培养条件下的多细胞行为。

1 材料与方法

1.1 BIU细胞

为人膀胱癌细胞株,本校新桥医院肿瘤科分离并建株。培养条件为1640培养基,含15%小牛血清,37°C、5%CO_2。

1.2 1640细胞培养液

按常规方法配制。

1.3 脱氢酶活性孵育液

2.5 mg氯化三苯基四氮唑(TTC)溶于10 ml 1640培养液(临

作者简介:邓国宏(1972—),男,四川省犍为县人,硕士,助教,主要从事生物复杂性方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752190

收稿日期:2000-01-29;修回日期:2000-03-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用前配制), 混匀, 以无菌微量超滤器超滤除菌。

1.4 BIU 细胞的局限接种

常规传代的融合单层 BIU 细胞, 用 0.25%胰酶消化 10~15 min 后, 将细胞吹下, 得到浓度约 1×10^6/ml 的细胞悬液。向无菌培养瓶中加入适量新鲜 1640 培养液, 水平静置 5 min。将上述准备好的细胞悬液用弯头滴管取 1 滴轻轻滴入水平静置的培养瓶中。接种过程中勿使培养液晃动, 接种后培养瓶保持原位静置。24 h 后, 可取出培养瓶开始观察。

1.5 BIU 细胞群落层次生长的观察

对局限区域内生长的细胞群落, 每 2~3 d 观察 1 次。

1.5.1 采用直尺(精度为 1 mm)直接测量细胞群落的扩展距离。

1.5.2 在倒置干涉相显微镜下, 采用 5 mm× 5 mm 网形目镜测微尺, 对细胞群落中不同区域内的细胞平均密度和大小进行测量(测定 4 个视野, 取平均值)。在 25 倍物镜下, 网形目镜测微尺的面积相当于培养瓶中 200 μm× 200 μm 的区域。

1.6 BIU 细胞群落脱氢酶活性的观察

在 BIU 细胞群落生长过程的不同阶段, 换用脱氢酶活性孵育液, 37℃、5% CO_2 孵育 12 h, 吸除, 重新换用新鲜 1640 培养液继续培养。根据细胞着色(红色)的深浅可反映生理状态下群落中不同区域细胞脱氢酶活性的时相变化。

1.7 生长过程中培养液 pH 的测定

将瓶中的培养液吸出, 置于粗口试管中, 采用 PHB-2 便携式酸度计(上海三信仪器厂)进行 pH 的测定。

2 结果

2.1 BIU 细胞的局限生长

细胞悬液接种水平放置的培养瓶中, 各培养瓶保持静置 12 h, 则细胞沉降于接种局部区域并贴壁, 形成一个直径约 8~16 mm 的圆形或近圆形细胞群落。

细胞群落的发展大致可分为 2 个阶段:①融合期。群落中最初稀疏分布的细胞, 逐渐生长增殖并融合成片, 此过程约需 7~10 d。在此期间, 细胞群落的面积不扩张, 只是群落内部细胞数量增加。②扩展期。当内部空间被融合成片的细胞占满后, 细胞群落开始向外扩展。

按照开始扩展时接种区域内细胞的密集程度, 可将细胞群落分为 2 种类型: Ⅰ 型和 Ⅱ 型。Ⅰ 型群落一般较大, 在细胞融合成片、胞间空隙消失后, 即开始向外扩展。Ⅱ 型群落一般较小, 大量细胞在底层融合单层细胞的基础上堆积形成密集的细胞堆团后, 群落才开始向外扩展。

表 1 3 个Ⅰ 型细胞群落的直径测定结果(l/mm)

Tab 1 Diameters of three type Ⅰ cell colonies(l/mm)

Growth time(d)	Colony 1	Colony 2	Colony 3
0	13	10	8
7	13	10	8
10	13	12	9
20	16	15	14
24	17	17	16
36	22	21	
42	24	23	
50	27		

细胞群落的扩展速率可由下式计算:

$$\text{扩展速率}=\frac{\text{群落最终半径}-\text{融合期群落半径}}{\text{群落生长时间}-\text{群落融合期时间}}$$

从表 1 结果可以计算出, 群落 1、2、3 的扩展速率分别为 175 μm/d、214 μm/d 和 235 μm/d。

2.2 细胞群落生长的层次特征

一旦进入扩展期, 细胞群落即出现明显的层次特征。当接种区域的细胞融合成片后, Ⅰ 型群落即分为中央区和边缘区, 边缘区较窄, 仅 1~2 mm 宽。显微镜下观察, 边缘区细胞形态呈扁平多角形大细胞, 分布较稀疏, 以单层为主, 很少有重叠细胞。中央区细胞紧密成片, 一般有二层细胞: 底层贴壁的细胞呈梭形, 体积较小, 胞间无间隙; 在底层细胞上有较多的圆形或近圆形小细胞。

随着群落的生长, 中央区也向外扩展, Ⅰ 型群落的中央区直径随群落的扩展而增长, 但边缘区宽度始终保持恒定。中央区扩展到一定距离, 又出现新的层次。在中央区与边缘区交界处, 形成一环致密带。显微镜下观察, 此致密环是由许多密集的细胞堆团组成, 每个堆团又由大量圆形小细胞堆积而形成。如果常规换液维持培养液 pH 为 7.1~7.2, 则随着细胞群落向外扩展, 致密环直径也随之增大, 但环的宽度不变。

我们在显微镜下对一个Ⅰ 型 BIU 细胞群落不同区域细胞的数量、大小和形态作了粗略测量, 结果见表 2。

表 2 BIU 细胞群落不同区域的细胞分布

Tab 2 Cell distribution of different zones in BIU cell colony

	Cell shape	Average cell density(cell/square area)	Average cell size(μm²)
Peripheral zone	Polygonal, flat, large cells; There were spaces between cells; some small round cells	16	60× 50
Dense ring	Crowed groups of small round cells	> 60	12× 200
Central zone	Basal cells are lozenge-like, with moderate size, sticked; no space between cells; quite a few small round cells above them	33	(Lozenge-like cells) 20× 60; (round cells) 12× 20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Ⅱ型细胞群落进入扩展期后也表现出明显的层次特征, 最初可分为中央区和扩展区, 其中央区为致密细胞堆团, 扩展区以单层细胞向外扩展。和Ⅰ型群落不同, Ⅱ型群落的中央区较小, 一旦形成, 则直径不再增加而是固定不变; 扩展区较宽, 向外扩散至较远距离后才在边缘内侧形成类似Ⅰ型群落的致密环。这样, Ⅱ型群落从外向内依次可分为边缘区、致密环、间区、中央致密区, 见图 1。

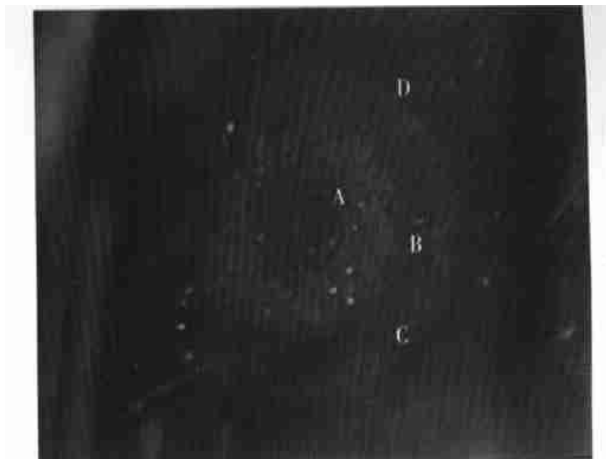


图 **1**　Ⅱ型 **BIU** 细胞群落的层次结构(生长 **32 d**, 直径 **28 mm**)

在明亮背景下可见, Ⅱ型群落存在明显的四个区域; A. 中央致密区; B. 间区; C. 致密环; D. 边缘区

Fig 1　**BIU cell colony of type** Ⅱ **(grew for 32 d, 28 mm in diameter)**

Contrast with bright background, four obvious zones of type Ⅱ colony could be seen: A. central dense zone; B. intermediate zone; C. dense ring; D. peripheral zone

2.3　BIU 细胞群落不同区域的脱氢酶活性

TTC 可被细胞内多种脱氢酶作用, 受氢后产生红色的三苯基甲[illegible], 通过此方法可反映细胞的呼吸活性[4]。我们将细胞群落置于 TTC-1640 培养液中孵育 12 h 后, 细胞还原 TTC 为红色的甲[illegible]而显色。

Ⅰ型群落在致密环形成前, 中央区呈均一的红色, 而边缘区着色极淡。致密环形成以后, 中央区和边缘区细胞呈淡红色甚至无色, 而致密环呈深红色。随着红色致密环向外扩展, 中央区也向外扩展, 但中央区着色很浅甚至无色, 见图 2。显微镜下观察, 边缘区及中央区细胞内有少量甲[illegible]颗粒(宏观上表现为淡红), 细胞形态清晰; 而致密环上有大量柱状或方形甲[illegible]晶体析出于胞外(宏观上表现为深红), 细胞形态模糊。Ⅱ型群落的中央区和致密环为红色, 而间区及边缘区着色很淡, 见图 3。

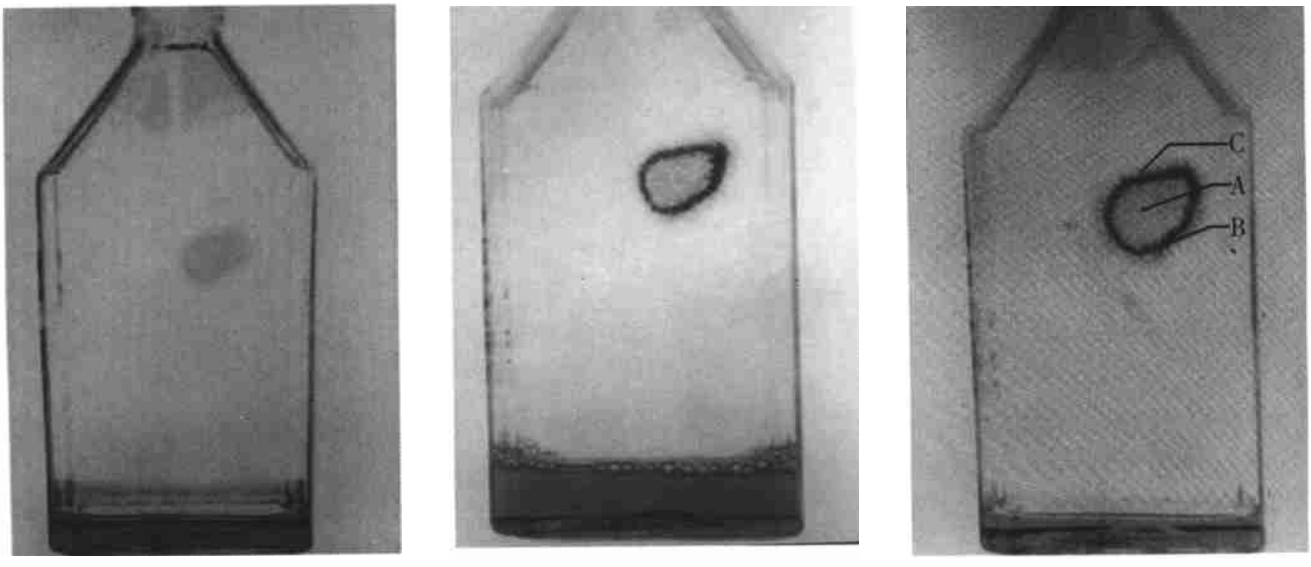


图 **2**　Ⅰ型 **BIU** 细胞群落的扩展过程及其脱氢酶活性

从左至右, 可见细胞群落由小扩大(从 10 mm 到 23 mm, 42 d), 红色致密环也随之向外扩展

A. 中央区; B. 致密环; C. 边缘区

Fig 2　The spreading process and dehydrogenase activities of type Ⅰ **BIU colony**

From left to right, we could see small cell colony grew into large one(from 10 mm to 23 mm, 42 d), and red dense ring was expanding.

A. central zone; B. dense ring; C. peripheral zone

2.4　代谢性 pH 降低对细胞群落生长的影响

在生长过程中, pH 降低对细胞群落层次结构的形成有促进作用。已形成融合单层向外扩展却未出现层次结构的群落, 若培养基 pH 降低至 6.6 维持 12~24 h, 可促进致密环的形成。边缘区内层有圆形小细胞大量增殖, 在底层融合单层细胞上形成密集的细胞堆团。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

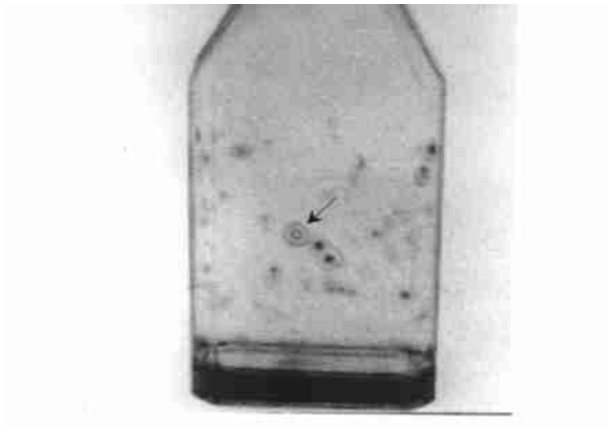


图 3 Ⅱ型 BIU 细胞小群落(4~8 mm)的脱氢酶活性

图中每个Ⅱ型小群落均是由单个BIU细胞生长而形成的。由于经历过酸性培养环境,群落的层次性显得更为明显。箭头所示的群落出现了二环结构

Fig 3 Dehydrogenase activities of small type Ⅱ BIU colony(4~8 mm)

Each small type Ⅱ colony of Fig 3 grew up from single BIU cell. Laminar structures were more clear after colony had been experiencing acid growth enviroment. Arrow indicate a colony which presented two rings

实验中还观察到,群落中不同层次区域的细胞对 pH 降低的反应是不同的。若 pH 降至 6.4~6.5 维持 24 h,Ⅰ型群落的中央区融合单层细胞易脱落,而边缘区及致密环细胞仍贴壁良好;Ⅱ型群落的间区细胞易脱落,而边缘区、致密环和中央致密区细胞贴壁良好。

3 讨论

常规的体外细胞培养,其目的通常是扩增细胞或判断微生物、药物、生物制剂等对靶细胞的作用。因而采用细胞悬液接种于整个培养瓶中,产生均一分布的单层贴壁细胞或细胞混悬液。这种条件下,培养的细胞在形态、生理特性等方面失去差异,也没有层次,只是数量的简单增加和空间的均一扩展、堆积。我们将 BIU 细胞悬液接种于局限区域(直径约 10 mm 左右的圆形区域)内,结果发现,局限接种的细胞群体能从均一的融合单层发展为不均一的边缘区、致密环和中央区,表现明显的层次结构:在Ⅰ型或Ⅱ型 BIU 群落中,致密环各方向上的单层细胞分裂增殖的空间位点相对于中央区是严格等距的,且在时间上是等时的,因此在宏观上表现为时空一致的群体有序行为。

BIU 细胞群落层次结构的出现伴随着生理行为的相应变化。细胞氧化的主要方式是脱氢作用,脱氢酶活性的强弱反映出细胞能量代谢的活跃程度。致密环上的细胞脱氢酶活性高,表明其能量代谢活跃,这可能与细胞增殖旺盛有关;边缘区和中央区细胞脱氢酶活性相对较低,表明其能量代谢不活跃。中央区细胞由于空间封闭,处于相对静息状态,因此能量消耗少;边缘区细胞形态伸展,蠕动[5]是其主要耗能活动,因此能量代谢也不强。在粘附特性方面,中央区(Ⅰ型群落)或间区(Ⅱ型群落)细胞对代谢性 pH 降低相对敏感,导致贴壁能力下降而易于脱落。贴壁行为是细胞膜和玻璃表面的一种物理作用,贴壁能力下降表明中央区(Ⅰ型群落)或间区(Ⅱ型群落)细胞的胞膜性状发生改变。

Lee 等[6]采用具有表面电荷活性基团梯度的聚乙烯膜(PE)培养中国仓鼠卵巢细胞(CHO),发现 CHO 细胞在 PE 膜表面按照电荷基团梯度形成细胞数量的梯度,发生再分布。在我们的实验中,细胞培养瓶具有均一的玻璃表面,无特殊基质分子梯度。因此,BIU 细胞群落的层次生长不是一种人工行为,而是群体细胞自组织生长的有序行为。其自组织的机制可能在于 2 个方面:①空间封闭效应。细胞若处于边缘区,一般不会停止向外蠕动而增殖。一旦细胞落后于边缘而陷入群落内部,生长空间受到限制,少量细胞(致密环区)即发生增殖、堆积,由扁平伸展的多角形大细胞增殖为多层细胞堆团;而大量细胞(中央区或间区)进入相对静息状态,体积缩小,代谢减低。②生物耗散与生态的非线性相互作用。细胞群落生长、扩展等生物耗散过程使生态环境发生变化,导致培养液代谢性 pH 减低。pH 降低可促进无层次的细胞群落出现层次结构:少量细胞增殖形成致密环;大量细胞(中央区或间区)体积减小,代谢减低,生命相对静息甚至失去贴壁能力而脱落,脱落后的细胞或迁移到新的空间或消亡。这种大量细胞消亡、少量细胞存活的过程与细菌的群选择[7]和高等生物的细胞凋亡[8]是一致的。此外,BIU 细胞群落的层次结构不是一成不变的,相反,它是随时间推移而动态变化的。随着致密环向外扩展,同一区域的细胞先后经历蠕动、增殖和静息 3 种过程。

本实验表明,在体外细胞培养这种简单的环境中,由于空间的不均一性和生物耗散性 pH 降低,群体细胞却可以表现出有序的多细胞行为。实际上,Ⅱ型 BIU 群落已显示出节律性层次结构。可以期待本实验能为人体细胞的波动生长提供一个简单可控的初步模型。虽然 BIU 细胞来源于肿瘤细胞系,但在本实验中却不能简单地将它们按肿瘤细胞看待。因为边缘区、致密环和中央区细胞之间,其形态和生理状态已发生变化,对不利环境的敏感性和反应性也各不相同。基

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

于上述考虑,本实验对抗肿瘤药物的体外试验可能有一定的参考价值。值得注意的是,空间封闭和代谢性 pH 降低两种效应均作用于相同区域——边缘内层细胞而引起细胞增殖,这是一个有趣的现象。对于空间封闭效应和代谢性 pH 减低如何引起边缘内层细胞增殖,其信号基础及分子机制是亟需研究的问题。

参考文献:

[1] Allison C, Hughes C. Bacterial swarming: An example of prokaryotic differentiation and multicellular behavior[J]. Sci Prog, 1991, 75(298): 403—422.
[2] Eshel B J, Levine H. The artistry of microorganisms[J]. Sci Amer, 1998, 279(4): 82—87.
[3] 徐启旺, 刘俊康, 袁泽涛, 等. 生物波[J]. 科学, 1999, (11): 47—49.
[4] 牛志卿, 刘建荣, 吴国庆. TTC-脱氢酶活性测定法的改进[J]. 微生物学通报, 1994, 21(1): 59—61.
[5] Thomas P S. The machinery of cell crawling[J]. Sci Amer, 1994, 271(3): 40—49.
[6] Lee J H, Lee J W, Khang G, *et al*. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces[J]. Biomaterials, 1997, 18(4): 351—358.
[7] Dubrkin M. Cell interactions in myxobacterial growth and development[J]. Science, 1985, 230(2 133): 18—24.
[8] Gottlieb R A, Nordberg J, Skowronski E, *et al*. Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents in preceded by intracellular acidification[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(2): 654—658.

(编辑 冷怀明)

文章编号: 1000-5404(2000)05-0469-01

经验与短篇

生长抑素、垂体后叶素治疗食管静脉曲张破裂出血的疗效比较

Effect of somatostatin and pituifrinum in treatment of esophageal varices bleeding

方小松, 周子成 (第三军医大学附属西南医院消化内科, 重庆 400038)

食管静脉曲张破裂出血是肝硬化失代偿期最常见严重的并发症,病死率高达 50%[1],临床治疗棘手,手术危险大,远期效果不理想。为探讨有效的药物治疗,我们对本院 1992 年 3 月至 1998 年 1 月期间住院的肝硬化并发食管静脉曲张破裂出血并采用生长抑素(施他宁或善得定)和垂体后叶素治疗的 41 例患者进行分析,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 病例选择

41 例均为住院确诊的肝炎后肝化失代偿期病人。25 例外科手术证实,8 例为大结节改变,17 例为小结节改变。37 例经急诊胃镜证实为食管静脉曲张破裂出血。4 例根据近期胃镜检查及出血的特点,诊断为食管静脉曲张破裂出血。病例分为垂体后叶素治疗组及生长抑素治疗组,两组的临床情况见表 1。

1.2 治疗方法

施他宁(瑞士雪兰诺公司生产)首次 250 μg 加入生理盐水 20 ml 静脉推注,然后用 3 mg 加入 500 ml 液体中以 250 μg/h 速度持续静脉滴注;善得定(瑞士山德士药厂生产),首次 0.1 mg 加入生理盐水 20 ml 静脉推注,然后用 0.5 mg 加入 1 000 ml 液体中静滴维持 24 h。垂体后叶素 50 U 加入 500 ml 液体中静脉滴注维持 12 h,最大剂量用至 100 U/d。大便转黄后停止用药。

表 1 临床情况比较

	垂体后叶素组	生长抑素组
例数	25	16
男/女	13/12	13/3
年龄(岁)	53.79(35~79)	50.13(34~70)
平均病程(年)	7.24	9.88
肝功能 Child 分级		
A	0	0
B	0	0
C	25	16
食管静脉曲张程度[2]		
轻度	6(27.27%)	3(20.00%)
中度	9(40.90%)	8(53.33%)
重度	6(27.27%)	4(26.67%)
出血程度		
轻度	5(20.00%)	3(18.75%)
中度	10(40.00%)	5(31.25%)
重度	10(40.00%)	8(50.00%)

作者简介: 方小松(1967—), 女, 重庆市人, 主治医师, 现在重庆市第一人民医院消化内科, 重庆 400011。电话: (023) 68773049

收稿日期: 1999-04-30; 修回日期: 1999-10-15

(下转 473 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net