文章编号: 1000-5404(1999)11-0880-04

人脑胶质瘤细胞系 CHG-5的建立及其生物学特性的分析

陈自强, 卞修武, 辛 榕, 殷育松 (第三军医大学基础医学部病理学教研室, 重庆 400038)

【提要】 目的: 建立一人脑胶质瘤细胞系并探讨其生物学特性。方法: 取胶质瘤新鲜手术标本, 经组织块法培养并克隆、建株, 采用光镜、电镜、免疫组化、流式细胞术、染色体分析及异种移植瘤实验对细胞株生物学特性进行观察。结果: 原位肿瘤、细胞株及移植瘤标本经电镜证实为星形细胞源性, 免疫组化呈 GFAP、Vimentin及 VEGF阳性, 异种移植成瘤率高。与 SHG-44细胞比较, GFAP表达强, Vimentin表达弱。结论: CHG-5为一恶性胶质瘤细胞系, 且其生物学特性可能与 SHG-44细胞有所不同。该细胞高表达血管生成因子。

关键词 胶质瘤细胞系; 细胞体外培养
中图法分类号 R730.264; R739.41 文献标识码 A

胶质瘤是常见的脑肿瘤之一, 其病因及生长因素与其他肿瘤一样尚不清楚。对胶质瘤的深入研究需要建立一系列具有不同生物学特性的胶质瘤细胞系。目前国内外报道的胶质瘤细胞株已有近 10种, 其中国外较多, 所使用的胶质瘤细胞系主要包括人胶质母细胞瘤细胞系[1]和大鼠胶质瘤细胞系(如 C6), 这些细胞大多呈 GFAP低表达[2]。国内目前人体胶质瘤细胞株有 SHG-44(苏州)、TJ105(天津)、XHG-92(西安)等, 其中以 SHG-44细胞的生物学特性报道最多, 它是胶质瘤Ⅲ~Ⅳ级[3]; XHG-92目前已失传。为了进一步探索胶质瘤的特性并满足实验研究的需要, 我们建立了来源于人脑胶质瘤的细胞系, 并进行了克隆, 建立了 CHG-5细胞株, 探讨了其部分生物学特性。

1 材料与方法

1.1 标本来源与细胞培养方法

肿瘤取自我校附属西南医院脑外科手术标本, 患者男性, 29岁, 病理诊断为右额叶混合型胶质瘤(星形细胞和少突胶质细胞瘤)Ⅱ级。石蜡切片上进行 GFAP免疫组化染色, 并进行电镜制样和观察。参照文献[4]进行组织块法培养, 使用含 10%小牛血清的 PRMI 1640培养基。传至第 24代时用无限稀释法进行克隆, 然后每隔 5代冻存 1批, 每隔 2月复苏 1支。3~5 d传代 1次, 1~3 d换液 1次。

1.2 形态学观察

在倒置显微镜下观察培养中的活细胞。传代时将部分细胞传于盖玻片上, 3~5 d后, 用 75%酒精室温固定, HE染色; 移植瘤取部分常规石蜡制片, HE染色; 细胞及移植瘤均常规电镜制样, 透射电镜观察。

1.3 细胞动力学和遗传学特征检测

生长曲线: 将第 45代细胞制成悬液后计数, 然后平均分配于 12个 25 ml培养瓶中, 每天取 1瓶观察并计数, 绘制出生长曲线, 求得细胞群体倍增时间。

细胞周期测定: 取培养 72 h的细胞, 制成悬液, 离心后用 pH 7.0的 0.01 mol/L PBS洗, 再离心, 用 70%酒精固定后, 碘化丙锭(PI)染色, FACStar^{plus}型流式细胞仪检测细胞倍体及细胞周期, 测出各期百分比。

染色体 G显带分析: 取培养 72 h的细胞加入秋水仙素(终浓度为 0.06 μg/ml), 再培养 6 h后, 收集细胞, 离心, 弃上清, 逐滴加入 0.75 mol/L KCl, 37°C低渗 40 min; 加入 3∶1甲醇室温固定 30 min×2, 滴片, 自然干燥后 Giemsa染色, 油镜检查。

异种种植: 将第 41代细胞制成悬液后, 分别接种于 2只 BALB/B nu/nu裸小鼠胸、腹皮下, 2周后观察, 有皮下结节形成者为阳性。待结节长至直径约 1.5~2.0 cm时, 取结节行光、电镜及 GFAP、碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)、FGF受体(FGFR)、血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)免疫组化检查, 并将部分结节研磨后再接种于另 2只 BALB/B nu/nu裸小鼠胸、腹皮下, 如是传代, 已传 5代。

1.4 免疫组化染色

将生长于盖玻片上的细胞用 75%酒精固定 40 min后, 晾干, 一分为九, 用中性树胶粘贴于载玻片上, 常规 LSAB法进行, 一抗分别为 GFAP、Vimentin、VEGF、bFGF、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)和 S-100蛋白。

2 结果

2.1 形态观察和免疫组化结果

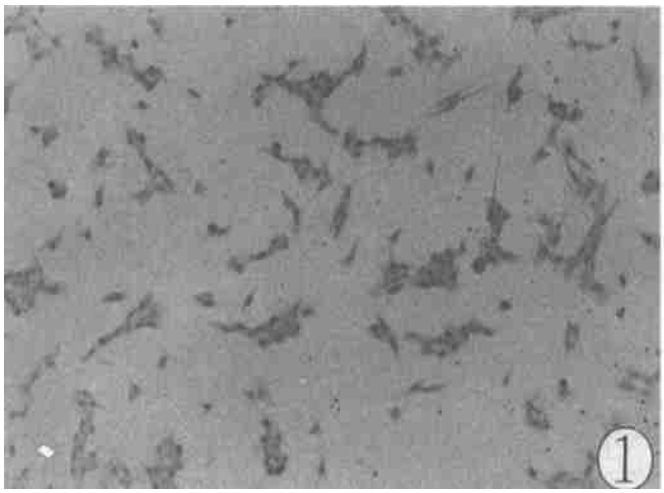
原位瘤组织学见部分区域瘤细胞呈圆形、椭圆形、星形, 胞浆中等, 嗜酸性。胞核呈圆形、卵圆形, 瘤细胞弥散分布。部分区域瘤细胞以圆形为主, 胞浆较少, 核周有空晕。透射电镜见部分瘤细胞突起较多, 胞质内有较多的中间丝; 部分瘤细胞突起少, 核较圆, 胞浆内细胞器较少, 缺乏中间丝。血管内皮细胞间缝隙增宽。免疫组化见部分瘤细胞呈 GFAP阳性。

培养瘤细胞在倒置显微镜下有 3种形态: 圆形、星形和梭形, 星形细胞一般有 3~4个突起, 胞浆中等、较暗, 核较亮, 圆

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39570295)
作者简介: 陈自强, 男, 1969.09.07生, 河南省内乡县人, 在读硕士生, 助教, 主要从事肿瘤诱导分化方面的研究, 发表论文 3篇 电话: (023)68752246
收稿日期: 1999-03-25; 修回日期: 1999-07-16

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

形、椭圆形各约 1/2 传代后 1~ 2 d内,圆形细胞较多,以后梭形细胞较多,培养时间越长,梭形细胞越多,再次传代后,重复上述形态演变。生长 5 d的细胞,圆形、星形与梭形细胞均可见,以梭形细胞为主,胞浆中等,且核以圆形占优势,深染,核分裂像不易见。透射电镜观察:可见较多微绒毛及大量内质网,游离核糖体和较多的线粒体,中间丝不明显,部分细胞可见明显的脂滴。免疫组化染色见瘤细胞胞浆呈 GFAP(见图 1)及 iNOS强阳性,VEGF(见图 2)及 bFGF S-100蛋白阳性,vimentin弱阳性。



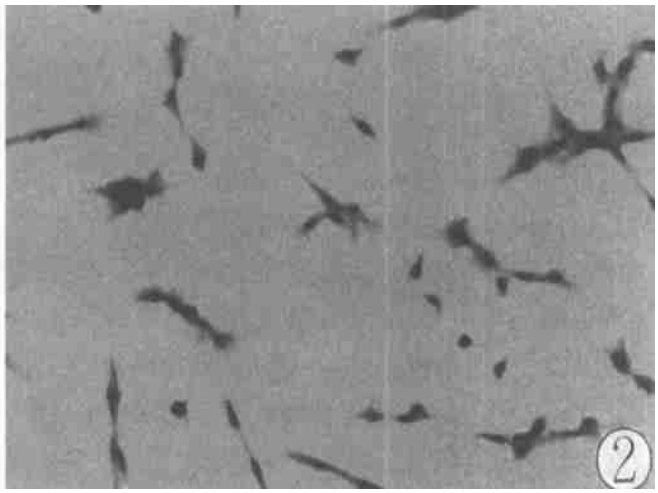


图 1　CHG-5细胞胞浆呈 GFAP染色阳性　(LSAB× 200)

Fig 1　Positive staining for GFAP antibody in the cytoplasm of CHG-5 cells　(LSAB× 200)

图 2　CHG-5细胞胞浆呈 VEGF染色阳性　(LSAB× 200)

Fig 2　Positive reaction of VEGF in the cytoplasm of CHG-5 cells　(LSAB× 200)

异种种植实验可见第 1、2只 2周后注射部位均有皮下结节形成。瘤的大小与接种细胞数量呈正相关。瘤结节研磨后再接种裸鼠仍有皮下结节形成,且越往后传,出现皮下结节时间越短。

移植瘤组织学表现为瘤细胞弥散分布,呈圆或椭圆形,胞浆中等,核圆或椭圆形,深染,可见核分裂像,见图 3 电镜下见细胞可见短的突起,核不规则,细胞器以线粒体为主,中间丝不明显,见图 4 免疫组化见其部分瘤细胞胞浆呈 VEGF bFGF S-100蛋白阳性,GFAP弱阳性。

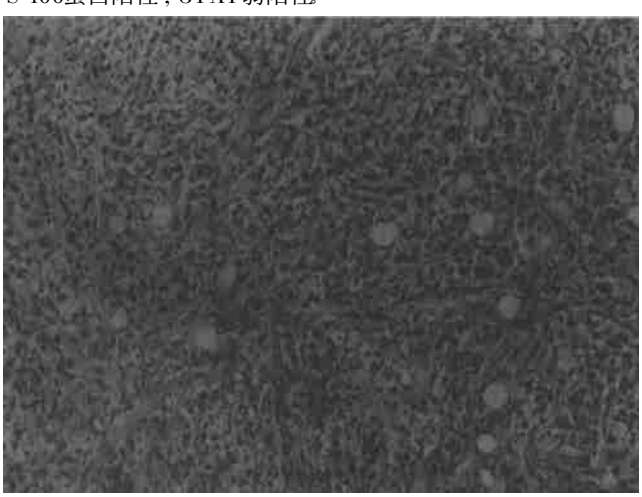


图 3　移植瘤瘤细胞呈圆形或椭圆形,核深染　(HE× 200)

Fig 3　Round or oval glioma cells with anaplastic nuclei in the xenograft　(HE× 200)

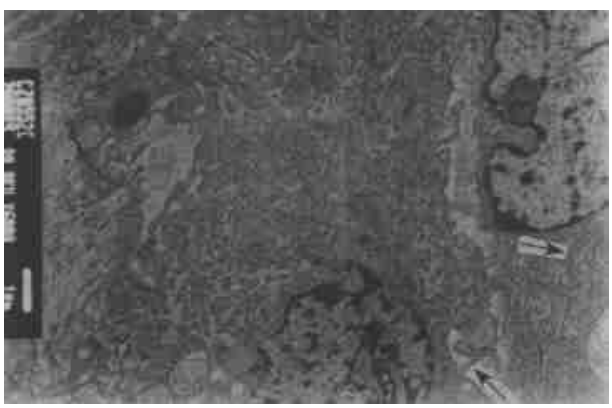


图 4　电镜下移植瘤细胞可见短的突起(→),核不规则,细胞器以线粒体为主,中间丝不明显　(TEM× 6 000)

Fig 4　Glioma cells with irregular nuclei and short processes, many mitocondria in cytoplasm while intermediate filaments not obvious　(TEM× 6 000)

2.2　细胞动力学和遗传学特征

接种后,第 1、2天细胞增殖较慢,第 3、4、5天细胞数目直线上升,第 6天以后细胞重叠生长,数目无明显变化。细胞群体倍增时间约为 39 h,细胞增殖周期约为 49.6 h,流式细胞仪测得 G_1期占 70.9%;S期占 26.3%;G_2+ M期占 2.8%。

染色体检查,显示二倍体占 36%,三倍体占 45%,超三倍

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

体占 19%。

3 讨论

3.1 CHG-5细胞的生物学特性

我室以往的研究显示,SHG-44细胞具有低表达 GFAP高表达 Vimentin的特性,表明其分化很低。本文报告的 CHG-5细胞株,经过 1年多的体外培养,现已传至第 76代,各种生物学特性相对比较稳定。

GFAP一直被视为星形细胞及其肿瘤的特异标记物,在诊断及鉴别诊断上具有重要价值。GFAP可与 Vimentin共同表达于星形细胞肿瘤中,前者与分化程度呈正相关,后者与分化程度呈负相关。二者的表达水平也有助于分析胶质瘤的预后情况。目前国内外研究者常将 GFAP的表达水平做为胶质瘤诱导分化的最可靠指标[5,6]。

本系细胞免疫组化示 GFAP强阳性,S-100蛋白阳性,表明其为星形细胞源性肿瘤。与 SHG-44细胞相比,形态上略有差异:圆形核增多,梭形细胞较 SHG-44细胞短、少;且 GFAP表达明显较 SHG-44细胞强,表明此细胞分化程度较高;这为更加深入地研究胶质瘤提供了较好的实验材料。异种移植实验更证明了本系细胞的恶性特征。

3.2 血管生成因子表达情况及其意义

血管生成在肿瘤生长中的作用已得到普遍共识。VEGF和 bFGF除表达于一些已血管化的组织和胚胎组织及伤口愈合过程中外,还表达于很多原位瘤组织和细胞系[7],其过度表达可使肿瘤生长加快。有报道认为 NO对肿瘤微血管结构和功能有调节作用[8],对 VEGF的表达亦有调控作用,有 NO存在的环境下,VEGF促血管生成作用增强[9],应用 iNOS抑制剂可阻止 VEGF诱导的血管生成[10]。本系细胞及其移植瘤细胞胞浆中均有 VEGF bFGF iNOS表达,说明本细胞株虽然分化程度较高,仍有血管生成因子表达,此特性与其他细胞株亦不同,更加有利于抗血管生成的研究。

3.3 关于胶质瘤细胞原代培养的体会

我们自 1997年 9月起先后 6次原代培养人脑胶质瘤细胞,每例均采用了组织块培养法和匀浆培养法,最后建株成功的只有 1例,且培养时细胞贴壁生长好一些的均为块培养法进行的。所以我们的体会是:① 肿瘤细胞的建株,尤其是贴壁生长的细胞,组织块法培养较匀浆法成功率高一些。② 组织块不宜太小,2 mm× 2 mm× 2 mm左右最适宜,用少许培养基浸润 3~ 5 h后再倒转 6~ 10 h,使组织块贴壁后再倒转回来加培养基进行培养,能明显提高成功率。

参考文献

[1] Engelhard H H, Duncan H A, Dal Canto M. Molecular characterization of glioblastoma cell differentiation [J]. Neurosurgery, 1997, 41(4): 886- 896.

[2] Ebert P S, Saicman M. Differentiation therapy is potentiated by chemotherapy and hyperthermia in human and canine brain tumor cells *in vitro* [J]. Neurosurgery, 1994, 34(4): 657- 664.

[3] 杜子威,徐庚达,王 尧,等.人脑恶性胶质瘤细胞体外长期传代培养的研究 [J].江苏医药, 1983, 3(8): 2- 4.

[4] 司徒镇强,吴军正.细胞培养 [M].西安: 世界图书出版西安公司, 1996. 69- 71.

[5] Rajan P, Mckay R D. Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS[J]. J Neurosci, 1998, 18(10): 3620- 3629.

[6] 卞修武,史景泉,辛 榕,等.去甲二氢愈创木酸对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44生长和分化的影响 [J].中华病理学杂志, 1997, 26(5): 285- 288.

[7] Potgens A J, Lubsen N H, van Altena M C, *et al*. Vascular permeability factor expression influences tumor angiogenesis in human melanoma lines xenografted to nude mice[J]. Am J Pathol, 1995, 146(1): 197- 209.

[8] Fukumura D, Jain R K. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors [J]. Cancer Metastasis Rev, 1998, 17(1): 77- 89.

[9] Papapetropoulos A, Garcia Cardena G, Madri J A, *et al*. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells [J]. J Clin Invest, 1997, 100(12): 3131- 3139.

[10] Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, *et al*. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor induced angiogenesis [J]. J Clin Invest, 1997, 99(11): 2625- 2634.

(编辑 冷怀明)

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

Establishment of human glioma cell line CHG-5 and its biological features

CHEN Zi-qiang, BIAN Xiu-wu, XIN Rong, YIN Yu-song (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To establish a human malignant human glioma cell line and investigate its biological features. Methods: Surgically resected specimen of a case of mixed astrooligodendrocytoma of grade Ⅱ was collected. After primary culture and cloning, a cell line designated as CHG-5 was established and its biological features were studied with optical and electron microsopies, immunocytochemistry, flow cytome try, karyotype analysis and experimental transplantation to nude mice. Results: The surgical specimen, cell line and xenografted tumor exhibited the characteristics of glioma under electron microscopy. Immunohistochemical staining for GFAP, vimentin and VEGF were positive. There was a high rate of xenografted tumor formation in nude mice. CHG-5 cell line showed a stronger reaction to GFAP and weaker reaction to vimentin than SHG-44 cell line. Conclusion: CHG-5 cell line is cell line of malignant glioma and certain biological characteristics of CHG-5 are different from those of SHG-44.

Key words glioma cell line; cell culture

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(39570295)

(上接 879页)

BUN 7.83 mmol/L, Cr 87.9μmol/L。血常规: Hb 130 g/L, WBC 8.2× 10^9/L, N 0.78, L 0.22, Pt 96× 10^9/L。肝功: ALT 48 IU/L。心肌酶谱 AST 130 IU/L, CPK 1 627 IU/L, LDH 664 IU/L, HBDH 626 IU/L。胸片"右上肺炎伴不张"。诊断:① 溺酒糟池;② 呼吸衰竭(Ⅱ型);③ 吸入性肺炎伴右肺不张;④ 重度休克;⑤ 缺氧性脑病;⑥ ARDS;⑦ 多器官功能衰竭。入院后立即给予安定、鲁米钠止痉,多巴胺、地塞米松、甲基强的松龙、速尿、毒 K及碳酸氢钠、654-2等药物治疗,予限制入量,遥控心电监护、经皮测定氧饱和度、二氧化碳监测仪等仪器监护。入院后 2 h 40 min测血压仍为 0,2 h 45 min给予纳洛酮 10μg/kg静注 1次,1 h后测血压升至 12/8 kPa,再予纳洛酮 10μg/kg静注,血压维持于 11~ 12/8~ 9 kPa,继续予抗感染,纠正酸中毒,强心,气管插管,纽邦 2000 E呼吸机人工通气等治疗,血 pH值入院后 3 h升至 7.327 入院后 13 h神智好转,呼之能应。入院后 19 h患儿突然再次出现抽搐,双侧瞳孔一大一小,对光反射消失。即行控制性过度通气治疗,保持 $PaCO_2$在 3.33~ 4.67 kPa, PaO_2在 12.0~ 20.0 kPa 30 min后双侧瞳孔恢复等大。3 h后复查血气: pH 7.299, $PaCO_2$ 5.22 kPa, PaO_2 15.09 kPa, HCO_3^- 20.5 mmol/L。继续给予甘露醇等治疗。入院 29 h脱离呼吸机,后期予促进脑细胞功能恢复药物。出院后随访,患儿智力正常。

2 讨论

纳洛酮是阿片受体特异性拮抗剂,拮抗内啡肽,能重新建立前列腺素和儿茶酚胺的循环机制,增加左室收缩力,提高动脉压[1];同时,对Ⅱ型呼吸衰竭及酒精中毒治疗亦有效,故而使用该药 1 h后休克回逆。

本例患儿心功能受损,脑疝时如选择甘露醇降颅压可导致心肺功能恶化甚至肾小管坏死。为此,我们选择了控制性过度通气。方法:气管插管下,吸入 0.4~ 1.0浓度氧气,使 PaO_2维持在 12~ 20 kPa, $PaCO_2$维持在 3.33~ 4.67 kPa,而以 3.33~ 4.0 kPa最为理想。持续数分钟即起降低颅压作用($PaCO_2$每下降 0.133 kPa脑血流量可减少 4%,脑容量可减少 0.049 ml/100 g脑组织)。其作用可维持 2~ 3 h。过度通气时间以不超过 1 h为宜。若 $PaCO_2$低于 2.67 kPa时,可引起脑缺血、缺氧,反而加剧颅内高压[2]。本患儿过度通气维持 30 min脑疝回纳,生命体征稳定,后继甘露醇维持降低颅压,效果满意。若病情反复,应每 4 h进行一次血气分析、调整人工呼吸机之频率、潮气量、呼吸比及压力。作者认为,控制性过度通气降低颅内高压,尤其是与休克并存时不失为无创抢救脑疝的一优先选择。

关键词　控制性过度通气;纳洛酮;休克;脑疝

中图法分类号　R720.597　　文献标识码　B

参考文献

[1] 马黎霞,李春生,范立民.纳洛酮在抢救重度休克中的应用[J].吉林医学,1996,17(4):237-239.

[2] 董宗祈,杨立志.小儿颅内高压的过度通气治疗[J].中国实用儿科杂志,19994,9(1):15-16.

(编辑　汪勤俭)

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