

428312

HUMAN BRAIN GLIOMA



主編 杜子威

人脑胶质瘤的研究

原子能出版社

人脑胶质瘤的研究

主 编 杜子威

编 委 杜子威
黄 强
王 尧
奚为乎
杨伟廉

原子能出版社

内容简介

本书汇集了人脑胶质瘤的体外培养、裸小鼠移植、神经生化、神经病理、免疫组化、细胞遗传、抗癌药物筛选、化学治疗、单克隆抗体的制备、导向诊断与治疗、基因文库构建等著者十多年的研究成果,同时还介绍了国外在该方面的研究进展,是我国第一部以人脑胶质瘤基础研究为主,兼顾临床研究的专著,反映了目前该领域的最新进展,适合从事该方面的科研、教学、临床工作的专业人员,有关研究生、进修生和在校大学生参考。

人脑胶质瘤的研究

原子能出版社出版

(北京 2108 信箱)

国营吴江市震泽印刷厂印刷

新华书店总店科技发行所发行·新华书店经售

开本 787×1092 1/16·印张 19.7 字数 447 千字

1992 年 10 月北京第一版·1992 年 10 月北京第一次印刷

印数 1—1000

ISBN7—5022—0800—3

R. 26 定价:25.00 元

前 言

神经系统肿瘤中,胶质瘤的发病率最高,国内外医学界对此极为关注,并早已从基础和临床两方面对人脑胶质瘤进行着深入的研究。

我们自 1972 年以来,分别在苏州医学院附属一院和附属二院内相继建立了脑神经和脑肿瘤研究室,胶质瘤是我们的重点研究课题。廿年来,完成了中国第一株人脑胶质瘤体外细胞系 SHG-44 及其裸小鼠实体瘤模型 NHG-1 的建立、抗人脑胶质瘤单克隆抗体的制备及其生化特征的研究、人脑胶质瘤生物导向诊断与治疗的实验、人脑胶质瘤基因文库的构建等系列研究。

本文汇集 73 篇研究论文,既是我们两个研究室从胶质瘤的细胞水平到分子生物学水平的研究小结,也是全体工作人员、博士和硕士研究生等廿余人的科研成果。现分为九章编印成册,旨在抛砖引玉,便于国内同道给我们更多的指正。书中还附有英文论著全文或摘要,殷切希望国外专家给予帮助。我还希望全书能对神经内外科临床医师、研究生、进修生、在校大学生和有关研究人员有所帮助。

本书得以编写出版,首先要感谢各级领导对我们研究工作的一贯支持,要诚挚地感谢南京医学院侯金镐教授、苏州医学院包仕尧教授和杨仲昆副教授的大力支持,还要感谢默默无闻为本书中有关课题作贡献的所有科技工作者和原子能出版社的大力支持和帮助。

杜子威

1992 年 10 月于苏州医学院

人脑胶质瘤的研究

目 录

第一章 细胞培养

1. 人脑恶性胶质瘤体外细胞系 SHG-44 的建立及其特征 杜子威等(1)
2. 人脑胶质瘤多细胞球体培养方法的研究 孙林泉等(5)
3. 人脑胶质瘤多细胞球体系统的建立及其生物学特性研究 孙林泉等(10)
4. 分泌抗人脑胶质瘤单抗杂交瘤细胞系 SZ-39 的培养及其特性维持
..... 陈晓梅等(14)
5. 人脑恶性胶质瘤细胞培养液氨基酸成份的研究 吴 昀等(17)
6. 生物洁净室在人脑瘤细胞体外长期传代培养的应用 徐庚达等(21)

第二章 动物模型

1. 脑胶质瘤实验动物模型研究的进展 黄 强等(24)
2. 人脑胶质瘤细胞系裸小鼠实体瘤模型 NHG-1 的建立及其特征的研究
..... 黄 强等(27)
3. 人脑室管膜母细胞瘤组织——裸小鼠移植模型 NHE-2 的研究 黄 强等(31)
4. 人脑星形细胞瘤组织裸小鼠移植模型 NHA-8 的研究 兰 青等(37)
5. 脑胶质瘤的同种和异种移植实验研究 黄 强等(41)
6. 人脑胶质瘤细胞 SHG-44 大鼠移植实验 黄 强等(45)
7. 地塞米松对脑胶质瘤移植实验性大鼠淋巴细胞的免疫抑制作用 黄 强等(48)
8. 人脑胶质瘤移植用裸小鼠的管理 黄 强等(51)

第三章 神经生化

1. 神经组织特异 S-100 蛋白及其临床意义 王 尧等(55)
2. 神经组织特异 S-100 蛋白的分离提纯 王 尧等(60)
3. SHG-44 人脑胶质瘤细胞系 S-100 蛋白的检测 王 尧等(64)
4. 人脑胶质瘤及其体外培养细胞系乳酸脱氢酶同功酶的初步研究 王 尧等(66)
5. 人脑胶质瘤裸鼠实验模型 NHG-1 的 LDH 同功酶检测 奚为乎等(69)
6. 恶性胶质瘤体外细胞系及其移植瘤胶质原纤维酸性蛋白免疫组化检测

.....	刘振延等(73)
7. 人脑胶质瘤细胞系裸鼠移植瘤模型 NHG—1 的病理及免疫组化特征	刘振延等(77)
.....	刘振延等(77)
8. 血清唾液酸测定及其在脑瘤诊断中的应用	吴洪飞等(81)
9. 多胺与脑肿瘤的关系	吴 昀等(85)

第四章 细胞遗传

1. 人脑胶质瘤遗传学研究的进展	李晓楠等(89)
2. 13 例人脑胶质瘤实体瘤染色体分析	李晓楠等(92)
3. Methodologic Study of Direct Preparation for Chromosome Analysis of Human Solid Brain Tumors	Li Xiaonan, et al(97)
4. 人脑瘤裸小鼠实体瘤模型的细胞遗传学研究	李晓楠等(105)
5. 裸小鼠人脑胶质瘤模型 NHG—1 的染色体分析	马文雄等(111)
6. 人脑恶性胶质瘤体外细胞系 SHG—44 的染色体 G 带、R 带和 C 带分析	马文雄等(114)
.....	马文雄等(114)
7. 荷人脑瘤裸小鼠模型(NHG—1)的活体骨髓细胞 SCE 及染色体畸变分析	马文雄等(118)
.....	马文雄等(118)

第五章 肿瘤治疗

1. 脑胶质瘤的综合治疗	黄 强等(121)
2. 环己亚硝脲治疗脑胶质瘤的远期疗效分析	黄 强等(127)
3. 人脑胶质瘤裸小鼠模型 NHG—1 实验性化疗的研究	黄 强等(130)
4. 局部微波加温程度对裸小鼠—人脑胶质瘤生长影响的探讨	范 明等(133)
5. 不同加温时间治疗后 ³ H—TdR 掺入量变化的观察	范 明等(137)
6. 10—羟基癸烯酸抗裸小鼠人脑胶质瘤活性的初步研究	黄 强等(140)
7. 10—羟基癸烯酸抗亚硝基脲类药物骨髓抑制的实验研究和临床应用	黄 强等(143)
.....	黄 强等(143)
8. DBc—AMP 治疗恶性胶质瘤——附七例报告	朱凤清等(146)
9. OK ₄₃₂ 对恶性胶质瘤的疗效观察	朱凤清等(150)

第六章 药物筛选

1. 体外肿瘤化疗药物敏感性预测试验	孙林泉等(152)
2. 裸小鼠同位素参入法测定人体肿瘤细胞增殖能	黄 强等(157)
3. ³ H—TdR 掺入裸鼠移植瘤作为抗癌药药物筛选方法的初步研究	黄 强等(160)
4. 利用荷瘤裸鼠研究抗癌药物筛选流程的建议	黄 强等(162)
5. 在荷瘤裸小鼠体内研究抗癌药物筛选流程	许期年等(166)
6. 抗癌药敏感性测试的实验研究与临床初步应用	黄 强等(170)
7. 抗恶性胶质瘤药物筛选的方法学研究	黄 强等(173)

8. 人脑胶质瘤体外细胞系 SHG-44 筛选植物抗癌药的研究 I · 粗制品的
初筛选实验..... 孙林泉等(177)
9. 人脑胶质瘤体外细胞系 SHG-44 筛选植物抗癌药的研究 I · Bliss
正规机率单位法测 IC₅₀ 的实验..... 左剑玲等(181)

第七章 单克隆抗体

1. 抗胶质瘤单克隆抗体的制备及临床应用研究..... 杨伟廉等(184)
2. 抗人脑胶质瘤细胞系 SHG-44 单克隆抗体的研究 杨伟廉等(189)
3. 抗人脑胶质瘤单克隆抗体的制备及其特征..... 杨伟廉等(190)
4. ¹³¹I-McAb SZ-39 在裸小鼠人脑胶质瘤模型内的显像研究 杨伟廉等(195)
5. 抗胶质瘤细胞单克隆抗体 SZ-38 及其识别抗原的生化特征 杨伟廉等(198)
6. 免疫转移电泳法识别 MW180kd 的胶质瘤相关抗原 杨伟廉等(203)
7. 抗人脑胶质瘤单克隆抗体 SZ-39 特异性及其识别抗原的初步鉴定
..... 杨伟廉等(206)
8. 抗人脑胶质瘤单克隆抗体 SZ-39 对脑瘤的导向作用 杨伟廉等(210)
9. 抗人脑胶质瘤单克隆抗体 SZ-39 对胶质瘤靶作用的研究 杨伟廉等(214)
10. 抗人脑胶质瘤单克隆抗体 SZ-39 在移植性脑瘤内的组织学分布
..... 杨伟廉等(217)
11. 抗人脑胶质瘤单克隆抗体 SZ-39 的免疫组织化学检查 杨伟廉等(220)
12. Localization of ¹³¹I-Labelled Anti-glioma Monoclonal Antibody SZ-39
in Human Brain Tumor Transplanted in Nude Mice Yang Weilian, et al(223)

第八章 导向诊治

1. 人脑胶质瘤导向诊断与治疗的研究进展..... 黄 强等(228)
2. 影响抗肿瘤单克隆抗体导向作用的因素分析..... 兰 青等(231)
3. ¹³¹I 标记胶质瘤单克隆抗体 SZ-39 在脑瘤患者体内分布及药代动力学研究
..... 杨伟廉等(235)
4. Biodistribution and Tumor Images of ¹³¹I-Labelled Anti-glioma Monoclonal
Antibody SZ-39 in Patients with Brain Tumors Yang Weilian, et al(239)
5. 人脑胶质瘤导向诊断的临床价值..... 黄 强等(247)
6. 双核素免疫导向诊断脑胶质瘤的实验和临床研究..... 何广仁等(251)
7. 抗人脑胶质瘤单克隆抗体导向药物的选择性细胞毒作用..... 朱剑虹等(256)
8. 单克隆抗体-阿霉素免疫交联物在脑胶质瘤裸鼠模型体内导向治疗的
初步研究..... 朱剑虹等(259)
9. 单克隆抗体携带阿霉素对人脑胶质瘤皮下和脑内实体瘤模型的导向
治疗作用..... 朱剑虹等(262)
10. Preclinical Trials with Monoclonal Antibody-Adriamycin Immunoconjugate
for the Targeting Chemotherapy of Human Brain Gloma Zhu Jiangong, et al(266)

第九章 基因文库

1. GFAP 基因克隆的免疫筛选对人脑胶质瘤 cDNA 基因文库的鉴定 覃文新等(278)
2. 用 λ gt11 载体构建人脑胶质瘤基因文库 王 尧等(282)
3. 人脑胶质瘤 mDNAs 的分离钝化及其 cDNAs 合成 覃文新等(286)

I . Cells Cultrue

1. Establishment of Human Malignant Glioma Cell line (SHG—44) and
Observafion on its Characteritics Du Ziwei, et al(1)
2. Methodilgical studies on culture of human brain glioma multicellular
spheroids Sun linqan, et al(5)
3. Establishment of Human Brain Glioma Multicellular Spheroid System
and its Bilogical Charcteristics. Sun Lingquan, et al(10)
4. Culture and Maintain Characteristics of the Hybridima Cell line SZ—39
Secreting McAb Agasinst Human Glioma. Chenxiaomei,et al(14)
5. Studies on Amino Acids Changes in Liguid Culture Media from Human
Malignant Glioma Cells Wu Yun,et al(17)
6. Application of Biocleanroom to the Long Term Culture of Human Brain
Tumor Cells Xu Gengda,et al(21)

I . Animal model

1. Advances of Glioma Animal Models Huang Qiang,et al(24)
2. Establishment of Human Glioma Cell Line—Nude Mice Solid Tumor Model
NHG—1 and its Characteristics Huang Qiang,et al(27)
3. Study of the Nude Mice—Human Ependymblastoma Xenoglaft Model
NHE—2 Huang Qiang,et al(31)
4. Study on the Nude Mouse Human Astrocytoma Model NHE—2 Lan Qing, et al(37)
5. Experimental Studies on the Home—and Hetero—Transplantation of
Brain Glioma into Rats and Nude Mice Huang Qiang, et al(41)
6. Experimental Studies on the Human Glioma Cell Line SHG—44
Transplanted into Rats Huang Qiang, et al(45)
7. Effects of Dexamethasone on the Depression of Lyphocyte Immune
Response in the Experimental Rats with Transplanted Glioma.
..... Huang Qiang, et al(48)
8. The Management and Maintenance of Nude Mice for
Heterotransplantation of Human Glioma Huang Qiang, et al(51)

II. Neuro—biochemistry

1. Nerous Tissue Specific S—100 Protein and Its Clinical Application Wang Yao, et al(55)
2. Purification of Nerrous Tissue Specific Proteins Wang Yao, et al(60)
3. S—100 Protein Assay for SHG—44 Cell Line Derived from Human Malignant Glioma Wang yao, et al(64)
4. The preliminaly Research of LDH Isoenzyme for Human malignant Glioma and Cultured Cell Line in Vitro Wang yao,et al(66)
5. The Dection of LDH Isoenzymes with Nude Mice Experimental Model NHG—1 For Glioma in Human Brain Xi Weihu,et al(69)
6. Immunohistochemical Assay of Glioma Fibrillary Acidic protein in Culture cell Line from Human Malignant Glioma and its Implanted Tumor in Nude Mice Lir Zhengyang, et al(73)
7. The Pathological and Immunohistochemical Features in the Implanted Tumor Cells of Nude Mice Model—1 (NHG—1) from Human Malignant Glioma Liu Zhenyan, et al(77)
8. Determination of Serum Sialic Acid and its Appication in Brain Tumor Wu Hongfei, et al(81)
9. The Relationship Between Brain Tumor and Polyamin Wu Yin, et al(85)

IV. Cytogenetics

1. Cytogenetic Study of Human solid Tumors Li Xiaonan,et al(89)
2. Serial Chromosome Analysis of Xenografts from 3 Human Glioma Nude—Mouse Models with Direct Preparation Li Xlaonan,et al(92)
3. Methodologic study of Direct preparation for Chromosome Analysis of Human solid Brain Tumors Li Xiaonan,et al(97)
4. Cytogenitic Study of Human Solid Brain Tumors and Xenografts in Athymic Nude Mice Li Xiaonan,et al105()
5. The Chromosomal Analyses of Human Malignant Glioma Cells from Nude Mice Model(NHG—1) Ma Wenxiong,et al(111)
6. Chronosome Analysis Human Glioma Cell Line SHG—44 with G—, G and R—Banding Techniques Ma Wenxing, et al(114)
7. Analisys of Sister Chromatid Exchange and Chromosome Malformation in NHG—1 Bone Marrow cells Ma Wenxiong,et al(118)

V. Tumor therapy

1. Combined Therapy of Human Malignant Gliomas Huang Qiang,et al(121)

2. Analysis of Long—term Effects of CCNU on Gliomas of the Brain.
..... Huang Qiang,et al(127)
3. Study on Experimental Chemotherapy with Nude—Mice xenograft
Model of Human Brain Glioma (NHG—1) Huang Qiang,et al(130)
4. Effects of Local Microwave Hyperthermia in Nude Mice Heterotransplanted
Malignant Glioma Fan Ming,et al(133)
5. Observation on the Changes of ^3H —TdR Incorporation After
Hypertherm Treatment for Different Time Fan Ming, et al(137)
6. Preliminary Studies the Antitumor of 10—Hydroxy—2—Decenoic Acid
from Royal Jelly with the Human Glioma Xenograft in Nude Mice.
..... Huang Qiang,et al(140)
7. Experimental Study and Clinical Application of 10—Hydroxy—2—Decenoic
Acid Against Bone Marrow Arresting of Nitrosourea Medicine
..... Huang Qiang,et al(143)
8. Dibutyryl Cyclic Adenosine Monophosphate(DBc—AMP)in the Treatment
of Recurrent Malignant Gliomas—Report of 7 Patients Zhu Fengqing,et al(146)
9. The Effect of OK₄₃₂ on Malignant Cerebral Glioma Zhu Fengqing,et al(150)

VI. Anti cancer drugs screening

1. In Vitro Tests for Predictive Cancer Chemotherapy Huang Qiang,et al(152)
2. Observation of the Proliferation Potentiality of Human Tumor Cells by
Incorporating Isotope in Nude Mice Model Huang Qiang,et al(157)
3. The Preliminary Study on the Anticancer Drug Screening Assay with ^3H —TdR
in Corporated into Xenografts in Nude Mice Huang Qiang,et al(160)
4. Suggestion of Study on the Anticancer Drugs Screening Program
with Human Tumor Xenografted Nude Mice Huang Qiang,et al(162)
5. Study on the Anticancer Drugs Screening Program with Human Tumor
Xenografted Nude Mice Xu Qian,et al(166)
6. Experimental Study and Preliminary Clinical Trial on the Sensitivity
Test of Anticancer Drugs. Huang Qiang, et al(170)
7. Methodological Studies of Screening of Anti—malignant Glioma Agents
..... Huang Qiang,et al(173)
8. Screening for Herbal Anticarcinogens with Human Brain Glioma Cell
Line SHA—44 Su Linghan,et al(177)
9. Primary Study on Screening Potential New Anticancer Drugs from Plant
Extracts Using Human Glioma Cell Line SHG—44 Su Linquan,et al(181)

VI. Monoclonal Antibody

1. Preparation and Clinical Application of Monoclonal Antibodies Against Human Gliomas Yang Weilian, et al(184)
2. Study on Monoclonal Antibodies Against Human Brain Glioma Cell Line SHG—44 Yang Weilian, et al(189)
3. Establishment and Characteristics of Monoclonal Antibodies Against Human Brain Glioma Yang Weilian, et al(190)
4. Investigation of Radioimmunolocalization of ^{131}I —McAb SZ—39 in Nude Mice Bearing Human Glioma Yang Weilian, et al(195)
5. Biochemical Characteristic of Antiglioma Monoclonal Antibody SZ—38 and its Recognized Antigen Yan Weilian, et al(198)
6. The Detection of a Glial Tumor—associated Antigen with Molecular Weight of 180kd by Electrophoretic Transfer—ELISA method Yan Weilian, et al(203)
7. Preliminary Characterization on Specificity and its Target Antigen Human Glioma Yang Weilian, et al(206)
8. The Guiding Action of Anti-Human Glioma Monoclonal Antibody SZ39 to Brain Tumor Yang Weilian, et al(210)
9. The Targeting Action of Anti-Human Glioma Monoclonal Antibody SZ39 to Glioma Yang Weilian, et al(214)
10. Histologic Distribution of Anti—Glioma Monoclonal Antibody SZ39 in Human Xenograft Brain Tumors Yang Weilian, et al(217)
11. Immunocytochemistry of Anti—Glioma Monoclonal Antibody SZ39 in Human Xenograft Brain Tumor Yang Weilian, et al(220)
12. Localization of ^{131}I -labelled Anti-Glioma Monoclonal Antibody SZ-39 in Human Brain Tumor Transplanted into Nude Mice Yang Weilian, et al(223)

VII. Targeting diagnosis and therapy

1. Advances of Targeting Diagnosis and Targeting Therapy in Human Malignant Gliomas Huang Qiang, et al(228)
2. Analysis of Influencing Factors for Targeting Action of Antitumor Monoclonal Antibody Lan Qing, et al(231)
3. Biodistribution and Pharmacokinetics of ^{131}I —labelled Anti—Glioma Monoclonal Antibody SZ39 in Patients with Brain Tumor Yan Weilian, et al(235)
4. Biodistribution and Tumor Images of ^{131}I —labelled Anti—Glioma Monoclonal Antibody SZ39 in Patients with Brain Tumor Yan Weilian, et al(239)
5. The Clinical Value of Targeting Diagnosis of Human Brain Glioma —— 30 Cases Analysis. Huang Qiang, et al(247)

6. The Experimental and Clinical Evaluation of Dual Radionuclide
Immunotomography for Diagnosis Human Glioma He guangren, et al(251)
7. Selective Cytotoxicity of Targeted—Drug by Anti—Glioma Monoclonal
Antibodies Zhu Jianhong, et al(256)
8. Preliminary Study of Targeting Chemotherapy Brain Glioma in the
Nude Mouse Model with Monoclonal Antibody Adriamycin Immunoconjugates
..... zhu Jianhong, et al(259)
9. Monoclonal Antibody—Guided Chemotherapy in Nude Mice Bearing
Subcutaneous and Intracranial Human Brain Glioma Xenografts
..... Zhu Jianhong, et al(262)
10. Preclinical Trials with Monoclonal Antibody-Adriamycin Immunoconjugate
for the Targeting Chemotherapy of Human Brain Glioma ... Zhu Jianhong, et al(266)

X. Human Glioma cDNA Library

1. Qualitative Identification of the Human Glioma cDNA Library by
Immunoscreening of GFAP cDNA Clones Qin Wenxin, et al(278)
2. Construction of the Human Glioma cDNA Library Using λ gt11
Vector Wang Yao, et al(282)
3. Purification of mRNAs from Human Glioma and Synthesis of
its cDNAs Qin Wenxin, et al(286)

附: ABSTRACTS OF ORIGINAL ARTICLES (291)

封面照片: 人脑胶质瘤裸小鼠移植模型 NHG—1 实体瘤 GFAP 免疫组化染色, 棕色为 GFAP 阳性颗粒, 位于胞浆内

封底照片: 上图为人脑胶质瘤导向诊断 SPECT 扫描, 红色斑塊为免疫复合物, 绿色环形圈为颅骨, 缺损处为手术时去骨瓣所致。诊断胶质瘤复发

下图为人脑胶质瘤体外细胞系裸小鼠实体瘤模型 NHG—1 整体摄影, 移植瘤位于右肩皮下

人脑恶性胶质瘤体外细胞系 SHG—44 的建立及其特征

杜子威 徐庚达 王 尧 刘振延 黄 强
郭玉华 陈桂林 李 斌 谈琪云 奚为乎

(苏州医学院)

我们于 1979 年开始进行人脑恶性胶质瘤细胞的体外培养,其中命名为 SHG (SUZHOU HUMAN GLIOMA)—44 的细胞已培养了 3 年以上,生长旺盛,现传至 107 代。本文报告建系过程和有关特征。

材 料 和 方 法

一、材料来源:额叶星形细胞瘤 II~III 级的患者,女性,32 岁。

二、培养方法:术中取脑瘤组织,按神野哲夫的方法^[1]用 Eagle 培养液作单层静止培养,细胞贴壁生长,2~3 天换培养液 1 次。传代时间为 7~10 天。

三、形态观察:在相差显示显微镜下见肿瘤细胞形态有:(1)星形:胞浆突起较多,呈星状。核呈圆形或椭圆形,位于中央;(2)梭形:细胞突起消失,胞体向两极伸长,呈长梭形。核较大,呈椭圆形,亦位于中央(图 1)。传代后第 1~2 天细胞生长缓慢,以星形为主,3~5 天后细胞密布瓶底时以梭形为主。若再次传代,细胞的形态又重复上述周期性演变。

四、液氮保存:用 10%二甲亚砜作为细胞低温保护液。细胞贮存于液氮瓶中,6 个月时存活率为 70%。

特 征

一、细胞增殖周期时相:取对数生长期细胞,用³H—TdR 连续标记法^[2],测定标记有核细胞的百分率和有丝分裂细胞的百分率,绘制曲线图,测得 T_g:52 小时、G₁:35 小时、G₂:9 小时、S:8 小时。又用流式细胞光度技术(Flow cytometry FACS—III 型)测得 G₁:54.57%, S:15.17%, G₂+M:30.25%。其直方图见图 2。

二、染色体分析^[3]:用传代后 3 天的细胞,低渗法染色体计数,计算 102 个细胞的染色体分布。结果是超三倍体 89.2%,超四倍体占 4.9%,不足三倍体仅占 5.9%。还选择染色体分散较好的 10 例进行组型分析,缺少 B₄ 的 8/10 例。全例见到不能分组的染色体 2 个者为 8/10,3 个者 2/10。

三、动物异种移植:以 6×10^6 和 1×10^7 个细胞(69,70 代)分别接种于生后 10 天的 Wistar 大鼠脑内和 NC 系裸小鼠皮下。移植成功率,注射地塞米松的大鼠是 9/13,未注射地塞米松的大鼠为 4/15,裸小鼠为 7/11。传代移植的成功率大白鼠为 11/11,裸小鼠为

77/77。其中裸小鼠已传至 11 代,载瘤生存时间为 54 ± 15.4 天。



图 1 培养 3 天的细胞在相差显微镜下见星形和梭形两种细胞。第 100 代

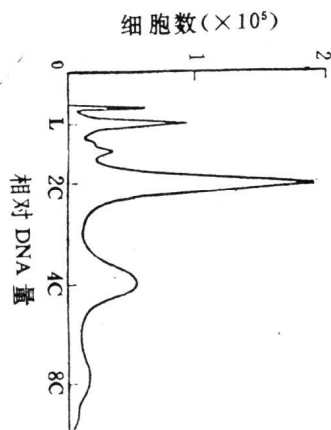


图 2 流式细胞光度直方图
1. 正常淋巴细胞,二倍体
2C: G_1 期 4C: $G_2 + M$ 期 2C~4C 为 S 期



图 4 见微绒毛突起和散乱排列于胞质中的微丝 $\times 39\ 000$



图 3 裸小鼠传代移植瘤,第 10 代

四、形态学特征:

1. 培养细胞: 生长在盖玻片上的细胞, HE 染色, 光镜所见与相差显微镜下见到的活细胞形态基本一致。
2. 移植瘤: 脑内呈弥漫性生长, 光镜见瘤细胞呈椭圆形和星形, 细胞丰富, 排列较密,

核染色质较深,可见 1~2 个小核,2~3 个高倍视野内见到 1 个核分裂象。皮下的肿瘤细胞形态与脑内基本相同,在组织疏松处大多呈星形。PTAH 染色显示神经胶质纤维。VG 和 Foot 染色未显示胶原和网状纤维。电镜见瘤细胞及其核的形状呈多形性。胞体为星形、梭形或多边形。核膜平整或有不同程度的凹褶。核内常染色质较多,异染色质呈颗粒状或斑块状,且聚集在核膜下,核仁大。瘤细胞表面有微绒毛样突起,胞体内有少量微管和许多微丝,散乱排列于胞质中(图 4)。

五、生化特征:

1. 乳酸脱氢酶(LDH)同工酶:取培养细胞,移植瘤及其再培养细胞的匀浆上清液进行醋酸纤维膜电泳分离同工酶,用 NBT 显色体系显色⁽⁶⁾。结果,从 9~62 代的培养细胞先后 6 次测定 LDH 同工酶,均显示 LDH_{5.4} 占优势,即呈 M 型。移植瘤及其再培养细胞亦呈 M 型。

2. S-100 蛋白:参照 LSOBE 法⁽⁵⁾,自猪脑提取 S-100 蛋白。所得蛋白制品在圆盘电泳上呈单一区带,用植村的抗 S-100 血清进行双向免疫扩散时,呈单一沉淀线,氨基酸分析结果与植村的基本一致⁽⁶⁾,揭示所得 S-100 是纯品。按 Dannies 法免疫家兔⁽⁷⁾,制备 S-100 抗血清,所得抗血清与 SHG-44 细胞匀浆上清液进行对流免疫电泳,又以 S-100 蛋白和鼠脑匀浆上清液作为阳性对照,鼠肝匀浆上清液和牛血清白蛋白作为阴性对照,结果表明,SHG-44 细胞中存在 S-100 蛋白。

3. GFA 蛋白的免疫酶标组织化学:利用 DAKO PAP KIT(K507)试剂进行检测。原患者肿瘤、大鼠和裸鼠移植瘤组织、SHG-44 细胞和移植瘤再培养的细胞均呈阳性,即细胞浆和突起为红棕色,经 HE 复染后核呈淡蓝色。正常脑组织中的星形细胞亦呈阳性。脑膜瘤和少枝胶质瘤细胞的胞浆和突起为淡灰色,即阴性。说明本系细胞及其移植瘤和原患者瘤细胞中均存在 GFA 蛋白。

讨 论

Barker、Ponten 指出,胶质瘤的培养细胞有星形、梭形和上皮形等。冈本指出^[8],体外培养细胞的形态变化可能由于:(1)细胞本身的周期性变化;(2)细胞外环境的改变;(3)细胞群体的变化。这是被误认为细胞形态变化的三种原因。我们观察到本系细胞从 M 期的球形分裂成二个星形或梭形细胞,认为形态变化可能与细胞周期性改变有关。

SHG-44 的染色体分析结果与 Ponten 的报告相似,以超三倍体为主,流式细胞光度仪测定提示本系细胞为四倍体,显示了恶性肿瘤的特征。见到的不能分组染色体是否为标记染色体,有待进一步研究。

动物移植是一种较好的检验恶性肿瘤的方法。本实验注射地塞米松鼠的移植成功率明显提高,这与地塞米松能使胸腺、脾萎缩,免疫淋巴细胞减少,造成实验鼠的免疫抑制有关^[9]。Franagan 发现裸小鼠以后,为肿瘤移植实验开拓了新的前景。本系细胞接种裸小鼠以后能长期传代,进一步证实了其恶性特征。

神野^[1]、高仓^[2]报告,体外培养的人脑恶性胶质瘤细胞的 LDH 同工酶呈 M 型,认为在生化上反映了肿瘤细胞的恶性特征。本系细胞的 LDH 同工酶亦呈 M 型,与他们的报告相符。

关于将成纤维细胞误认为胶质瘤细胞问题,本实验用特殊染色法,在光镜下见到了神经胶质纤维,未见胶原和网状纤维,在电镜下见到了较多的微丝结构,认为可除外这一问题。

Benda 首先证实了大鼠脑胶质瘤体外培养细胞能合成 S-100 蛋白^[10],随后各家利用这一特征,作为一项生化指标,对胶质瘤细胞进行鉴定。Eng 等报告 GFA 蛋白存在于星形细胞中,Schachner 等报告抗 GFA 蛋白血清用于酶标免疫组化时能特异性地使星形细胞染色^[11]。因此认为 GFA 蛋白是星形胶质细胞的特异蛋白。本系细胞中检出 S-100 蛋白和 GFA 蛋白,进一步证实本系细胞是星形胶质瘤细胞。

(本研究系日本埼玉医科大学植村庆一教授、北京师范大学薛绍白、宋平根老师和我院王 瑛、薛永权医师协助,特此致谢)

参 考 文 献

- [1]神野哲夫. 他. 乙卜恶性神经胶芽肿,长期继代培养株 细胞学 检索. 神经进 步 1971;(4)958
- [2]大章星一. 他. 人癌细胞培养 北京:科学出版社 1979:66,139
- [3]Wilson CB, et al. Chromosome analysis of glioblastoma multiforme. Neurology 1970;20:821
- [4]王 尧,等. 醋纤膜电泳分离 LDH 同工酶染色法的改良 中华医学检验杂志 1983;(1):59
- [5]Lsobe T, et al. Reinvestigation of extremely acidieprotein in bovine brain. Biochim Biophys Acta 1977;(1): 222
- [6]植村庆一. 神经组织酸性蛋白质分画. 蛋白质,核酸,酵素 1969;14:19
- [7]Dannies PS, et al: Structural properties of bovine brain S-100 protein. J Biol Chem 1971;(20):6,276
- [8]中井 之助. 组织培养 东京:朝仓书店 1964:200
- [9]黄 强. 地塞米松对实验性鼠胶胶质瘤移植的影响 中国神经精神疾病杂志 1982;6:321
- [10]Benda P, et al. Defferentiated rat glial cell strain in tissue culture. Sciture 1968;161:370
- [11]Schachner M, et al. Ultra structural localization of glial fibrilary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labelling, J Cell Biology 1977;75:67

人脑胶质瘤多细胞球体培养方法的研究

孙林泉* 黄 强 徐庚达 奚为乎 杜子威**

(苏州医学院脑神经研究室)

内容提要 本实验用静止培养法观察了接种细胞密度、血清浓度、琼脂或琼脂糖浓度及用于溶解琼脂或琼脂糖的不同溶剂对人脑胶质瘤细胞系 SHG-44 多细胞球体形成的影响。接种 $1\sim3\times10^6$ 细胞于铺有 10ml 0.75~1.0% 琼脂或琼脂糖—生理盐水或培养液底层的培养皿(直径为 90mm)中,加入 15ml 含 20% 小牛血清的 Eagle's MEM 培养液,所得到的球体大小较均匀,形态较圆,3~4 天即可形成完整紧密的球体,重复性良好。本法与旋转瓶培养法相比,具有操作简便、经济省时等优点。

关键词 胶质瘤;多细胞球体

多细胞肿瘤球体(简称球体)是由多个肿瘤细胞聚集而成的,在体外培养液中以三维结构形式生长的球样细胞团块。球体具有普通单层培养细胞所没有的结节性肿瘤的特性,提供了一种比移植性肿瘤动物模型更为简便、省时、经济的体外实体瘤模型^[1,2]。1970 年 Sutherland 等^[3]首先发展了球体系统;1978 年 Carlsson 等^[4]首次把球体培养技术用于人脑胶质瘤细胞系的研究。目前,在国外球体系统已广泛地应用于实验肿瘤学研究领域中,而国内仅有关于食管癌细胞球体应用研究的报道^[5~7]。本文报道人脑胶质瘤 SHG-44 细胞系的球体制备过程,并观察了各种因素对球体形成的影响。

材 料 和 方 法

一、单层细胞培养 实验用细胞为本室建立的人脑胶质瘤细胞系 SHG-44^[8]。培养基 s MEM,称取 9.4g 溶于 1000ml 双蒸水中,加入青、链霉素各 100 μ g/ml,谷氨酰胺 0.3 μ g/ml,0.22 μ m 孔径的滤膜过滤除菌。用前加入经 56℃、30 分钟灭活的无菌新生小牛血清,常规用浓度为 20%。消化液用 0.25%胰酶—0.02%EDTA 无钙镁溶液。 5×10^5 细胞接种于底面积为 40cm² 的培养瓶培养,每周换液 3 次。培养 3~4 天时,收集细胞用于球体培养。

二、球体培养 球体培养按 Yuhas 方法^[9],具体操作如下:

(一)半固体底层培养皿的制备 称取琼脂或琼脂糖 0.5~1.0g,分别溶于 100ml 双蒸水或生理盐水中,制成 0.5%、0.75%和 1.0%三种浓度,煮沸 15 分钟备用。以培养液为溶液时,先把琼脂糖用双蒸水配成双倍浓度,煮沸 15 分钟,冷却至 50℃时加入等量双

* 博士研究生

** 导师