

Isolamento di un ceppo cellulare da tumore di origine chimica su hamster

EVA ZILKA (*) e ITALO ARCHETTI

Laboratori di Microbiologia

Riassunto. — È stato ottenuto un ceppo cellulare, che è ormai al 60° passaggio, partendo dal miofibrosarcoma HS6 di hamster. Da questo ceppo sono stati isolati quattro cloni, di cui due costituiti da elementi a carattere fibroblastico e due epiteliale.

È stata studiata la sensibilità delle cellule del ceppo e dei cloni per diversi virus e si è iniziato lo studio del potere oncogeno delle cellule dei quattro cloni. Il potere tumorigeno delle cellule del ceppo non era affatto cambiato dopo 60 passaggi.

Summary. (*Separation of a cell strain from a tumor of chemical origin in hamster*). — A cell strain was established from hamster myofibrosarcoma HS6. Four clones were separated from this strain, two of which had cells with fibroblastic, and two with epithelial characteristics.

The susceptibility of the strain and its clones to different viruses was investigated together with the oncogenic property of the clone cells. The tumorigenicity of the cell strain in hamster was unchanged after 60 passages.

Numerosi AA. hanno riferito sull'isolamento di ceppi (**) cellulari provenienti da tumori spontanei umani (BARON & RABSON, 1957; CAILLEAU, 1960; HO, KUANG & CHING, 1962; MC ALLISTER & CORIELL, 1959; VAN DER VEEN, BOTS & MES, 1958) e da tumori spontanei animali (DI PAOLO, 1962; MOORE, 1962) o indotti da sostanza chimica (CRAB, 1946) o da virus (ROUSE,

(*) Borsista dei Laboratori di Microbiologia. Indirizzo attuale: Istituto di Microbiologia ed Epidemiologia, Boulevard Stoletoff 44, Sofia, Bulgaria.

(**) Per linea cellulare si intende una coltura di cellule che abbiano superato un minimo di dieci passaggi con crescita soddisfacente; il ceppo cellulare è caratterizzato da una crescita continua, la quale si manifesta dopo che la linea cellulare si è ben stabilita (RUZICKSA, 1964), in genere dopo 9-12 mesi dall'inizio dell'esperimento.

STROHL & SCHLESINGER, 1966) ed adattati a crescere in terreni di varia costituzione.

In questa nota vengono presentati i dati sull'ottenimento di un ceppo cellulare derivato dal tumore HS6 di CRABB (1946) e la sua coltivazione continua *in vitro* in terreno con siero di vitello. Viene inoltre riferito l'isolamento di cloni cellulari, lo studio della sensibilità delle cellule ad alcuni virus e quello del loro potere oncogeno.

La linea tumorale HS6 è stata ottenuta da CRABB nel 1944, partendo da un miofibrosarcoma di derivazione essenzialmente fibroblastica, indotto originariamente dall'A. su hamster siriano mediante inoculazioni sottocutanee ripetute di 9,10-dimetil-1,2-benzantracene. Questa linea tumorale, ricevuta dal Dr. Crabb alcuni anni or sono, viene mantenuta nel nostro Istituto mediante passaggi continui su hamster.

MATERIALI E METODI

Soluzioni e terreni di coltura.

Nei primi due mesi dalla coltivazione delle cellule è stato usato un terreno di crescita contenente: siero di vitello neonato 5 %; siero di vitello adulto 10 %; MEM (EAGLE, 1959) 85 %; penicillina 100 UI/ml; streptomina 100 µg/ml. Dopo questo periodo il terreno è stato cambiato e consisteva di: siero di vitello adulto 10 %; lattalbumina 10 %; MEM 80 %; antibiotici come sopra. Poichè le cellule HS6 sono molto esigenti e necessitano di un terreno molto ricco, il terreno di mantenimento era identico a quello di crescita.

Per il distacco delle cellule è stata adoperata una soluzione (ATV) così costituita: NaCl 40 g; KCl 2 g; glucosio 5 g; NaHCO₃ 2,9 g; tripsina (1:250 Difco) 2,5 g; versene 1 g; rosso fenolo (0,2 %) 5 ml; H₂O bidistillata 1000 ml. Questa soluzione veniva filtrata per Seitz e conservata a 4° C. Al momento dell'uso si diluiva nella proporzione 1:5 con H₂O bidistillata.

Per la tripsinizzazione del tessuto tumorale è stata usata tripsina al 0,25 %.

Distacco e distribuzione delle cellule.

Dopo circa 2' di contatto con ATV a temperatura ambiente, le cellule venivano staccate dalla parete del recipiente di coltura e la sospensione cellulare veniva raccolta e centrifugata per 5' a 1000 giri per minuto. Il sedimento veniva risospeso in terreno con pH 7,2 in modo da avere una concentrazione di circa 200.000 cellule/ml di terreno: queste venivano distribuite in tubi (1 ml), in bottiglie quadrate da 200 ml (15 ml) o in bottiglie di Roux da un l (50 ml).

Dopo il 30° passaggio si procedeva al distacco delle cellule ogni 5-7 giorni. Il cambio del terreno veniva fatto ogni 2-3 giorni nei primi 3 mesi ed in seguito ogni 3-4 giorni, secondo le condizioni dello strato cellulare.

Isolamento dei cloni.

Per l'isolamento dei cloni è stato seguito il metodo di GAVRILOV & SMIEVA (1963), lievemente modificato. Quando il numero delle cellule sia molto piccolo rispetto al volume del terreno, esse stentano notevolmente a crescere: per questo motivo è stato usato il cosiddetto terreno già metabolizzato, che facilita l'attecchimento e la moltiplicazione delle cellule, che si trovano in condizione di alta diluizione. Tale terreno non è altro che il comune terreno che è stato a contatto con le stesse cellule da tripsinizzare nelle 24 ore precedenti il distacco e che è stato centrifugato per 10' a 3000 giri/minuto per eliminare i detriti cellulari. Il terreno nuovo in cui venivano distribuite le cellule tripsinizzate consisteva di 1 parte di terreno già metabolizzato ed 1 parte di terreno fresco. Dopo la conta le cellule venivano distribuite in bottiglie quadrate in ragione di 40, 100, 200, 500 e 1000 cellule per bottiglia. In queste condizioni solo alcune cellule riuscivano ad attaccarsi al vetro ed a crescere: dopo 2 giorni dall'inseminamento si osservava con il microscopio e le cellule che apparivano sicuramente come singole venivano segnate sul vetro. Le bottiglie con grande numero di cellule o senza cellule erano scartate. Il numero di cellule più adatto per ottenere un buon risultato è stato quello di 100 o 200 per bottiglia.

Le cellule segnate venivano osservate ogni giorno e trascorsa una settimana dall'inizio, là dove si era formata una colonia, prima che esse cominciasse a migrare, venivano asportate mediante una pipetta Pasteur con punta ricurva e seminate in tubi contenenti terreno metabolizzato. Ottenuto uno strato abbastanza confluito, la coltura veniva distaccata, le cellule contaminate e il procedimento di clonaggio veniva ripetuto nel modo sopra descritto. Per ottenere la purificazione di un clone è necessario clonare almeno 3 volte; in questo esperimento la purificazione è stata effettuata 4 volte.

Congelamento delle cellule.

È stato seguito il metodo descritto da STULBERG, SOULE & BERMAN (1958) con lievi modifiche riguardanti il numero delle cellule per fiala e il terreno usato dopo lo scongelamento.

RISULTATI

Ottenimento del ceppo cellulare e isolamento dei cloni.

È stato ottenuto un ceppo cellulare dal tumore HS6 di hamster mediante tripsinizzazione del tessuto e coltivazione continua delle cellule in bottiglie

quadrate, cambiando il terreno regolarmente ogni 2 giorni. Il primo passaggio è stato fatto dopo 2 giorni dalla tripsinizzazione del tessuto tumorale, dopo di che le cellule non vennero staccate con ATV per la durata di un mese. Alla fine del primo mese è stato eseguito il secondo distacco e le cellule ottenute da una bottiglia furono distribuite in due con terreno metabolizzato. Il terzo distacco è stato fatto dopo 15 giorni e i passaggi successivi avvennero ad intervalli di 10 giorni, cambiando regolarmente il terreno. Dopo 3 mesi dall'inizio dell'esperimento le cellule vennero distaccate ogni settimana, cambiando il terreno ogni 3 giorni. Nei primi 6-7 mesi si notò in alcuni casi degenerazione spontanea, la quale si verificava generalmente subito dopo il cambio del terreno o dopo il distacco. La degenerazione cominciava con l'arrotondamento di alcune cellule e si diffondeva a tutto il monostrato in 24-48 ore. Questo aspetto era molto simile all'effetto citopatico causato da virus: sono state fatte prove per ottenere l'isolamento di eventuali agenti virali presenti in queste cellule degenerate, inoculandole in colture primarie di cellule renali di scimmia *Rhesus* o in colture dello stesso ceppo HS6, ma i risultati sono sempre stati negativi.

Dopo circa 9 mesi dall'inizio dell'esperimento questa degenerazione spontanea era quasi scomparsa. Il ceppo cellulare era ormai più stabile, ma esigeva che si procedesse al distacco con regolarità: le cellule non resistevano più di 10 giorni, anche se il terreno veniva cambiato.

Da queste cellule ormai giunte al 30° passaggio (8 mesi dopo l'inizio dell'esperimento) sono stati isolati 4 cloni (indicati come clone 1, 2, 3 e 4), i cui elementi avevano un aspetto morfologicamente diverso; due, il clone 1 e il clone 3, erano fibroblasto-simili (Fig. 1-B e 1-D), mentre gli altri due presentavano un aspetto epiteliale (Fig. 1-A e 1-C).

Sensibilità delle cellule del ceppo non clonato e dei cloni a diversi virus.

È stata studiata la sensibilità del ceppo non clonato per i seguenti virus: polio tipo 1; ECHO 1, 2, 4, 7, 9; influenzale A₂; *Herpes simplex*; virus vaccिनico; adenovirus della scimmia (SV₁₇ e SV₅₉). Solamente il virus dell'*Herpes simplex* (Fig. 2-A, 2-B, 2-C, 2-D) e il virus vaccिनico causavano un effetto citopatico (Tab. 1): il titolo del virus vaccिनico, ottenuto in cellule HS6, era uguale a quello ottenuto in coltura primaria di cellule renali di scimmia (*Macacus rhesus*).

È stata poi considerata contemporaneamente la sensibilità delle cellule dei 4 cloni al virus erpetico: essa è risultata relativamente bassa per le cellule del clone 4 (DICT₅₀ = 10^{-4.5}/ml), mentre in quelle dei rimanenti tre era quasi identica (circa DICT₅₀ = 10^{-9.5}/ml).

Le cellule dei cloni si sono dimostrate sensibili in modo qualitativamente identico a diversi altri virus: i dati sono raccolti nella Tab. 1.

TABELLA 1.

Sensibilità delle cellule del ceppo HS6 e dei suoi cloni a diversi tipi di virus

Ceppo di virus	Materiale di provenienza	Linea prima dell'isolamento dei cloni	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4
Polio 1 (Brunhilde)	RS	—	—	—	—	NF
Echo 1 (Farouk).	RS	—	—	—	—	NF
Echo 2 (Cornelis)	RS	—	—	—	NF	NF
Echo 4 (Pesascek)	RS	—	—	—	NF	NF
Echo 7 (Wallace)	RS	—	—	—	NF	NF
Echo 9 (Vispo)	RS	—	—	—	NF	NF
Aftoso A (Quinzano)	RSu	NF	+	+	+	+
Aftoso O (Cremona) ?	RSu	NF	+	+	+	+
Sindbis	CTo	NF	+	+	+	+
Mayaro	CTo	NF	+	+	+	+
West Nile	CTo	NF	+	+	+	+
Bunyamvera	CTo	NF	+	+	+	+
Influenza (A ₂ /England/1961) . . .	LA	—	NF	NF	NF	NF
Sendai	LA	NF	+	+	+	+
SV 17	RS	—	NF	NF	NF	NF
SV 39	RS	—	NF	NF	NF	NF
<i>Herpes simplex</i> (HS)	ET	+	+	+	+	+
Vaccinico (Lister)	ET	+	+	+	+	+

— = resistente, + = sensibile.

RS = cellule renali di scimmia *Rhesus* ;

RSu = cellule renali di suino ;

CTo = cervello di topo neonato ;

LA = liquido allantoideo ;

ET = cellule di embrione di pollo ;

NF = la prova di sensibilità non è stata fatta.

Tutti i ceppi usati fanno parte della collezione del nostro Laboratorio.

Ci sembra interessante ricordare il risultato avuto piastrando il virus vaccinico, secondo il metodo di DULBECCO & VOGT (1954), su monostrati di cellule appartenenti ai due tipi di cloni sopraricordati. Mentre le placche formatesi nelle cellule di tipo epiteliale erano rotondeggianti e per nulla dissimili dai molti tipi di placca che si hanno di solito con molti altri virus, quelle

che si ottenevano nelle cellule di tipo fibroblastico presentavano sempre una forma allungata, grossolanamente parallela alla direzione dei grossi fasci cellulari da cui appare costituito il monostrato (Fig. 3-A e 3-B).

Tumorigenicità delle cellule del ceppo e dei cloni.

Il potere tumorigeno del ceppo cellulare si è mantenuto costante dopo l'11^o, il 38^o, il 46^o e il 60^o passaggio e anche dopo scongelamento delle cellule dalla temperatura di conservazione a -80°C .

Per dimostrare la tumorigenicità delle cellule dei cloni sono stati inoculati per via sottocutanea gruppi di hamster con quantità diverse di cellule appartenenti ai primi 3 cloni e precisamente con 10, 100, 1000 e 10.000 elementi. In tutti i casi si è avuta la formazione di tumori se pure in una percentuale diversa di animali sino alla concentrazione di 100 cellule. Queste esperienze, completate dallo studio del quarto clone, sono tutt'ora in corso e formeranno oggetto di un'altra nota.

DISCUSSIONE

La costituzione di un ceppo cellulare con caratteristiche morfologiche e metaboliche ben definite e costanti ha notevole importanza sia per studi virologici, come anche per ricerche di ordine biochimico e, allorchando il ceppo sia tumorigeno, per studi teorici e pratici nel campo dei tumori.

Vi sono ormai numerosi ceppi cellulari derivati da tessuti normali o patologici sia umani, sia animali: molti di essi sono dotazione comune alla maggioranza dei laboratori di ricerca. Anche noi siamo riusciti ad ottenere dal tumore HS6 di hamster un ceppo cellulare che è già al suo 60^o passaggio *in vitro*.

Secondo RUZICKA (1964), che ha pubblicato i suoi risultati sull'ottenimento di ceppi cellulari da rene di scimmia, vi sono due momenti particolarmente importanti nel periodo di stabilizzazione di un ceppo cellulare: 1^o) quello corrispondente al primo distacco della coltura primaria e che avviene, secondo l'A., verso la fine della prima settimana di coltivazione; 2^o) quello in cui la linea è già stabilizzata, e cioè circa 85-98 giorni dall'inizio.

Nel nostro caso il primo distacco è stato fatto già al secondo giorno, mentre i successivi sono stati compiuti rispettivamente dopo 1 mese, 15 giorni, 10 giorni sino a 7 giorni fra uno e l'altro. Come del resto risulta dalla molteplice bibliografia in proposito, non vi è una regola precisa nei procedimenti per ottenere una linea cellulare; perciò i nostri risultati si riferiscono al particolare tessuto da cui siamo partiti e non possono essere affatto generalizzati, anche se i momenti critici citati da RUZICKA (1964) sono quasi sempre presenti.

Come è ben noto, la morfologia delle cellule in coltura continua può variare notevolmente rispetto a quella delle cellule primarie. Il tumore HS6 è un miofibrosarcoma, costituito quindi da elementi di varia origine: purificando ripetutamente il ceppo cellulare mediante la tecnica dei cloni si sono ottenuti due tipi di cellule, uno a carattere nettamente fibroblastico e l'altro a carattere epiteliale, l'uno e l'altro ben differenziabili tra di loro.

STOKER & MACPHERSON (1964) hanno comunicato l'isolamento di una linea cellulare da hamster siriano sensibile per molti virus appartenenti al gruppo pox, al gruppo erpetico, al gruppo dei myxovirus e a quello degli arbovirus. La sensibilità si estendeva anche a diversi ceppi di virus rabico, aftoso e della stomatite vescicolare. Il virus polioma determinava trasformazione, senza produzione di virus infettante. Tutti e 3 i tipi di virus polio e alcuni ceppi di rinovirus non si sviluppavano affatto.

Fra i virus da noi presi in considerazione, quello aftoso, alcuni arbovirus (Sindbis, Mayaro, Bunyamvera, West Nile), un ceppo di parainfluenza 1 (Sendai), quello erpetico (*H. simplex*) e quello vaccinico crescevano nelle cellule HS6, determinando anche un evidente effetto citopatico. Non abbiamo paragonato la sensibilità delle cellule di hamster normale in coltura primaria con quella presentata dalle cellule del ceppo HS6, però possiamo dire che le cellule appartenenti a 4 cloni derivati da HS6 avevano una diversa sensibilità al virus dell'*H. simplex*. Infatti, mentre le cellule derivate da tre cloni erano sensibili in maniera quasi identica a questo virus, le cellule del quarto clone lo erano meno, così che il titolo del virus raggiungeva un valore di circa 2 logaritmi inferiore a quello ottenuto con le cellule degli altri cloni.

SANFORD *et al.* (1958), studiando le linee cellulari derivate da cloni di cellule di tessuto normale di topo, hanno notato in due di queste linee, differenti sia dal punto di vista morfologico, sia metabolico, che avevano anche una capacità tumorigena notevolmente diversa, allorchè venivano inoculate in un ceppo di topi geneticamente puro. Per questo motivo abbiamo ricercato anche noi se vi fosse una diversa tumorigenicità nelle cellule dei cloni derivati dalla linea HS6. I primi risultati fanno ritenere che esista una differenza nel potere oncogeno dei due tipi di cellule isolate nei cloni: è però necessario un più grande numero di dati per potere stabilire questo fatto con maggiore certezza.

7 ottobre 1966.

BIBLIOGRAFIA

- BARON, S. & A. S. RABSON, 1957. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **96**, 515.
CAILLEAU, R., 1960. *Cancer Res.*, **20**, 837.
CRABB, E. D., 1946. *Cancer Res.*, **6**, 627.
DI PAOLO, J. A., 1962. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **109**, 116.
DULBECCO, R. & M. VOLT, 1954. *J. Exptl. Med.*, **99**, 167.

- EAGLE, M., 1959. *Science*, **130**, 432.
- GAVRILOV, V. I. & R. G. SMIEVA, 1963. *Probl. Virol. USSR*, **3**, 361.
- HO, S., C. C. KUANG & P. Y. CHING, 1962. *Chinese Med. J.*, **81**, 659.
- MCALLISTER, R. M. & L. L. CORIELL, 1959. *Cancer Res.*, **19**, 1040.
- MOORE, G. E., 1962. *Science*, **137**, 986.
- ROUSE, H. C., W. H. STROHL & R. W. SCHLESINGER, 1966. *Virology*, **28**, 633.
- RUZICKSA, P., 1964. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.*, **12**, 275.
- SANFORD, K. K., R. M. MERWIN, G. Z. HOBBS, M. C. FIORAMONTI & W. R. EARLE, 1958. *J. Natl. Cancer Inst.*, **20**, 121.
- STOKER, M. & I. MACPHERSON, 1964. *Nature*, **203**, 1355.
- STULBERG, C. S., H. D. SOULE & L. BERMAN, 1958. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **98**, 428.
- TAKAOKA, J., H. KATSUTA, M. ENDO, K. SATO & H. OKUMURA, 1963. *Japan J. Exptl. Med.*, **32**, 351.
- VAN DER VEEN, I., L. BOTS & A. MES, 1958. *Arch. Virusforsch.*, **8**, 230.

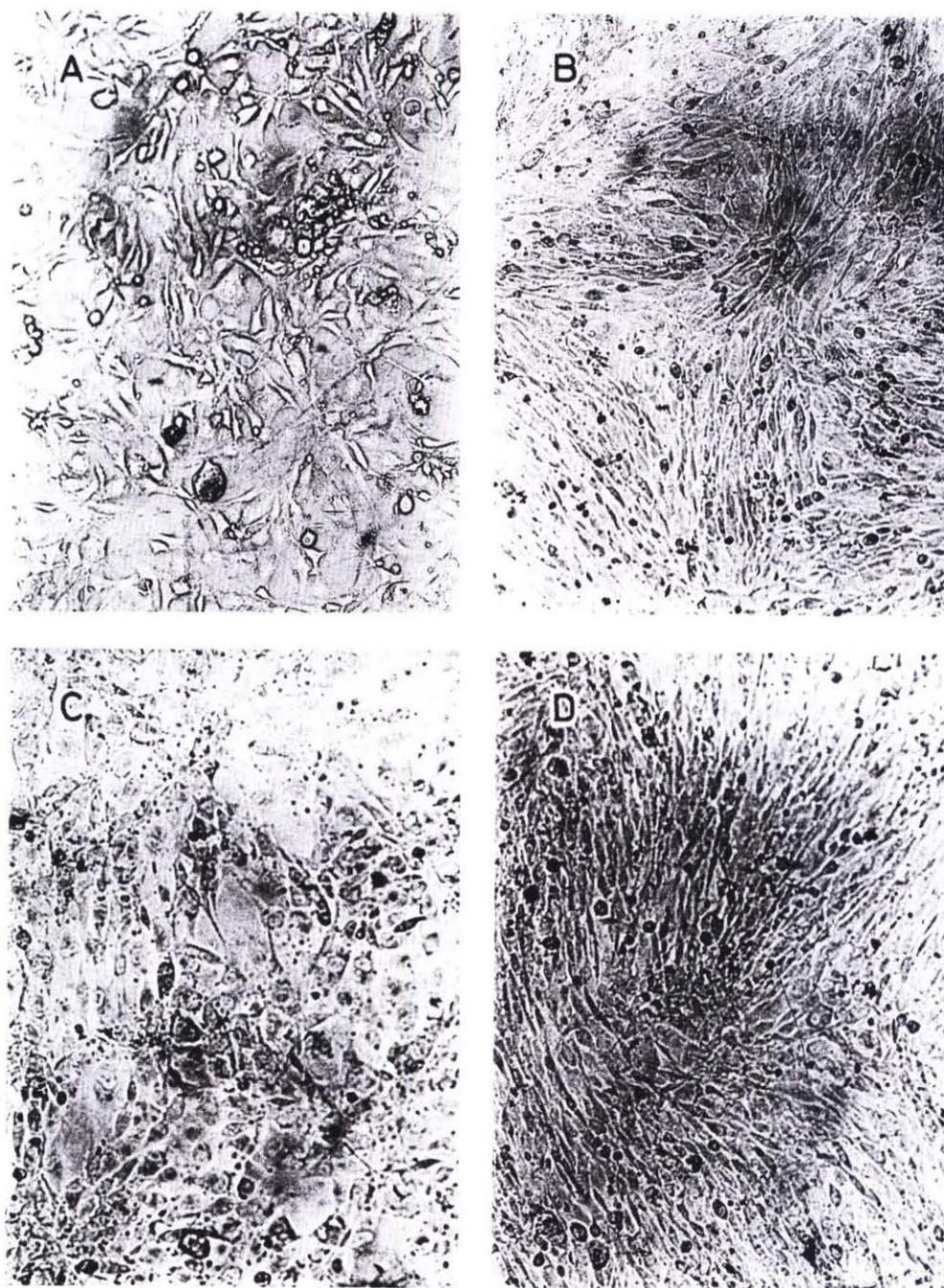


Fig. 1. — Diverso aspetto morfologico dei quattro cloni isolati dal ceppo cellulare HS6 :
B e D, cloni 1 e 3 fibroblasto-simili ; A e C, cloni 2 e 4 epiteliale-simili ($\times 80$).

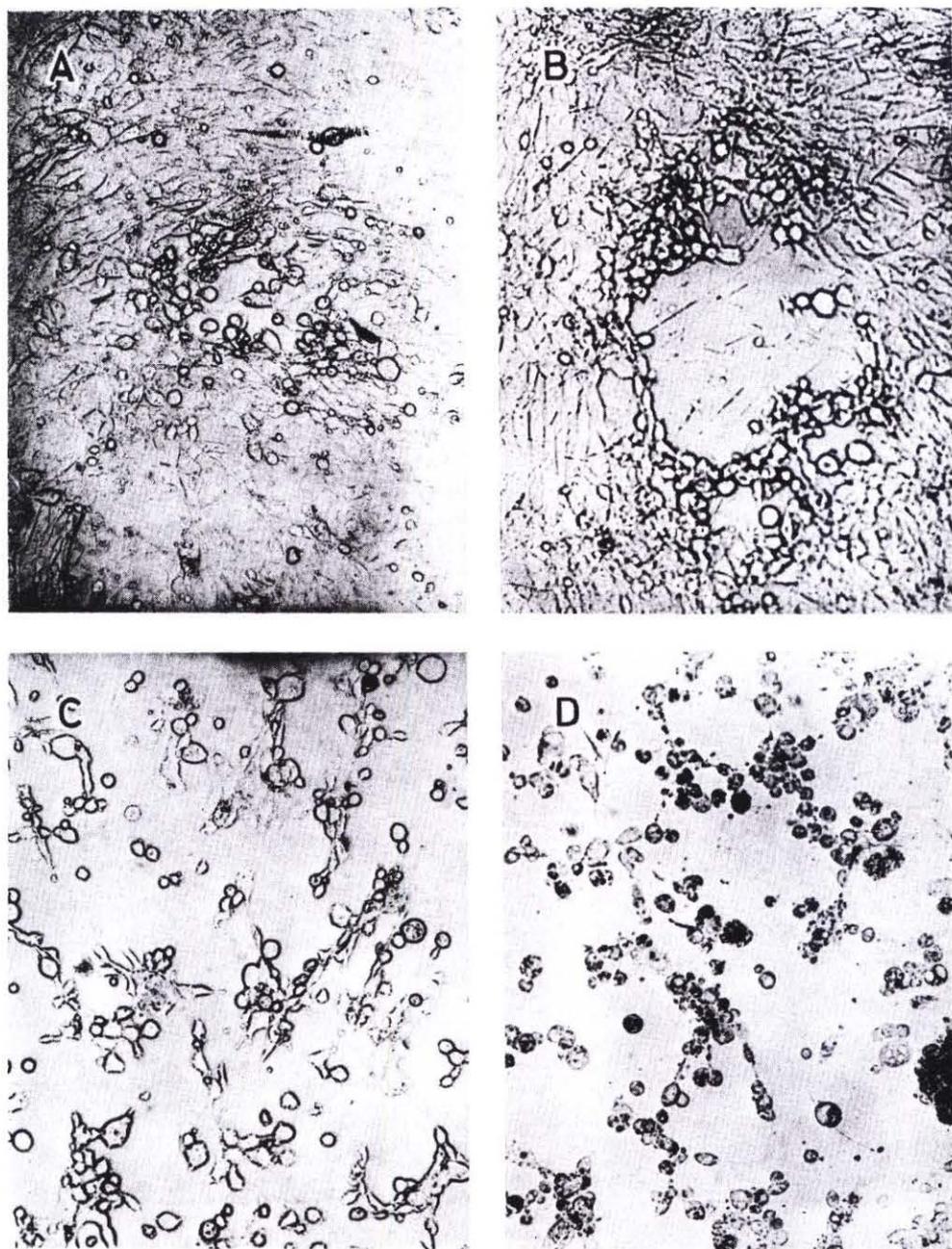


Fig. 2. — Effetto citopatico da *Herpes simplex* sulle cellule del ceppo cellulare HS6 ($\times 80$).



Fig. 3. — Aspetto delle placche da virus vaccinico ottenute con le cellule dei cloni 1 e 3 ($\times 15$).