

- Biol.*, 23:53.
- [9] 简令成等, 1984, 实验生物学报, 17: 149.
- [10] Falconer, M. M. et al., 1988, *protoplasma*, 144: 46.
- [11] 简令成等, 1989, 植物学报, 31: 737.
- [12] Jian Ling-cheng et al., 1984, Abstracts of the Papers Presented at the Third International Congress on Cell Biology, Tokyo, Japan, P. 490.
- [13] Lachney, C. E. & T. A. Lonergan, 1985, *J. celi Sci.*, 74: 219.
- [14] O'Brien, T. P. & K. V. Thimann, 1966, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 56: 888.
- [15] Parthasarathy, M. V. & Muhlethaler, K., 1972, *J. Ultrastruct. Res.*, 38: 46.
- [16] Seagull, R. W. et al., 1987, *J. Cell Biol.*, 104: 995.
- [17] Sachs, H. et al., 1976, *Cytobiologie*, 14: 49.
- [18] Seagull, R. W., 1986, *Can. J. Bot.*, 64: 1373.
- [19] Shimmen, T. & M. Yano, 1986, *Protoplasma*, 132: 129.
- [20] 马永泽, 阎隆飞, 1988, 植物学报, 30: 285.
- [21] 阎隆飞等, 1984, 生物化学与生物物理学报, 16: 399.
- [22] Cleveland, D. W., 1987, *J. Cell Biol.*, 104: 381.
- [23] Gultinan, M. J. et al., 1987, *Plant Mol. Biol.*, 10: 171.
- [24] Raha, D. et al., 1987, *Plant Mol. Biol.*, 9: 565.
- [25] Marks, M. D. et al., 1987, *Plant Mol. Biol.*, 10:91.
- [26] Hightower, R. C. & R. B. Meagher, 1986, *Genetics*, 114: 315.
- [27] Shah, D. M. et al., 1983, *J. MOL. Appl. Genet.*, 2:111.
- [28] Hightower, R. C. & R. B. Meagher, 1984, *EMBO J.*, 3[2]: 403.

## 研究工作

# 云南宣威肺腺癌细胞系 SLC-89 的建立及其生物学特性

陈志龙 朱玉琨 阎伟 马世兴 莫宽 黄丽娜

(昆明, 成都军区昆明总医院单克隆室 650032)

云南宣威是我国肺癌的高发地区<sup>[1]</sup>, 建立宣威肺癌细胞系对于肺癌的研究有着较为重要的意义。我们从1989年2月开始建立了一株宣威肺癌细胞系, 现报告如下:

## 材料和方 法

一、病例 患者曾××, 男, 42岁, 宣威县人。1989年2月10日手术切除左上肺癌组织, 病理诊断为肺低分化腺癌, 部分呈透明细胞腺癌改变, 并肺门淋巴结转移。

### 二、建系经过

1. 取材 从肺癌病灶中 选取出血坏死较少的癌组织, 用GKN液洗去血液, 剪至约1mm大小, 接种于35mm培养皿中培养。培养液为RPMI 1640,

含小牛血清20%, 青链霉素各100单位/ml, 谷氨酸胺400μg/ml, 用5%碳酸氢钠调pH至7.0—7.2。放入含5%CO<sub>2</sub>培养箱于37℃静止培养。

2. 培养经过 培养物每2—3天换液1次, 6天后肺癌组织周围有上皮样细胞长出, 并伴有巨噬细胞和成纤维细胞, 还可见淋巴细胞和红细胞。培养15天后, 把培养皿中生长的细胞转入24孔塑料板中, 培养到第27天, 悬浮的组织 和细胞大部死亡, 上皮样细胞活性较好, 贴壁生长, 其上可见单个或3—4个一起的透亮圆细胞, 此时细胞开始增殖, 但很缓慢。至培养第61天, 细胞增殖加快, 进行传代培养, 半个月后又传1代, 至培养第95天已传4代。此后细胞生长旺盛, 形态仍为上皮样, 平铺生长, 其上圆细胞较多。此时上皮样细胞贴壁较紧, 需要用胰蛋白酶消化

处理后才能传代,一般3—6天可传1代,以后用常规RPMI 1640完全培养液维持培养。

### 三、细胞生物学特性鉴定

1. 形态学特征 在倒置显微镜和光镜下观察活细胞和染色细胞形态,并做原发癌和移植瘤组织的石蜡切片,HE和PAS染色后进行组织学观察。

2. 超微结构观察 用橡皮刮刀刮下第48代对数生长期细胞,按常规方法制备电镜标本观察。

3. 细胞生长曲线和倍增时间 将第86代和第150代培养成对数生长期的细胞制成 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 细胞悬液,分别种于30个5ml小方瓶中于 $37^\circ\text{C}$ 培养箱中培养,每2天换液1次,以接种当天为0天,每24小时取出3瓶,用胰酶消化后作活细胞计数,取其平均值绘制生长曲线,并推算倍增时间。

4. 癌细胞克隆形成率 将第81代细胞用有限稀释法种植到96孔塑料培养板中,待细胞沉底后计算含1个细胞的孔数,并置于 $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$ 培养箱培养,观察单个细胞克隆生长情况。

5. 染色体观察 将第30代和第150代细胞按常规方法制备染色体,计数并观察染色体形态。

6. 异种移植 将第50代细胞制成细胞悬液后,洗1次,再用无血清RPMI 1640液配成 $1.5 \times 10^7/\text{ml}$ 细胞悬液,接种于雌性Balb/c nude裸小鼠2只,鼠龄1个月,重20克,在腋窝、腹股沟两处各作皮下注射,每处注射0.3ml,接种数为 $4 \times 10^6$ 细胞。

7. 细胞表面凝集素受体检测 将第150代细胞制备成 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的单个细胞悬液,与不同稀释度的刀豆蛋白(ConA)等量混和,3—5分钟后在光镜下观察凝集现象,确定凝集效价。

四、支原体检测 把培养成单层的细胞用橡皮刮刀刮下后反复冻融及吹打,使细胞破碎后用接种环接种到支原体培养基上,于 $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$ 和普通培养箱培养2—3周,每日观察支原体生长情况。

## 结 果

1. 形态学特征 培养细胞呈上皮样,形态为多边形和梭形,镶嵌排列,有明显的重叠生长(图版图1)。盖片培养后经HE和瑞氏染色见细胞大小不一,异形明显,核较大,圆而居中,可见核分裂相,核仁明显,多为1个,圆形(图版图2)。PAS染色胞浆充满PAS阳性颗粒。电镜观察,细胞表面有微绒毛,细胞

核大,凹陷明显,核仁显著,浆中有糖原,粘液小体和较多板层小体(图版图3,4)。未见病毒和支原体。

2. 细胞生长曲线和倍增时间 第86代和第150代细胞生长曲线相似,都在接种24小时后才开始明显增殖,到72小时增殖最快,以后又逐渐减弱,到第6天时细胞密度最大,此后细胞数基本不增加或略为减少。种植第2天,第86代细胞的细胞数是种植时的1.9倍,第150代是种植时的2.1倍,可见第150代细胞增殖速度稍快,而且细胞最大密度也较大,第86代细胞的倍增时间为26.4小时,第150代是25.4小时(图1)。

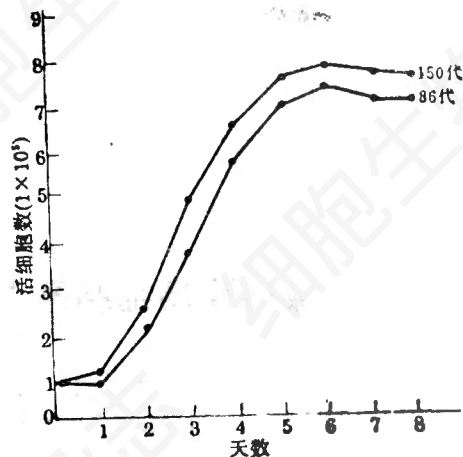


图1 SLC-89细胞的生长曲线

3. 染色体检查 观察第30代和第150代中期染色体细胞各50个,均为人型染色体,数目都为非整倍体(图版图5)。第30代细胞染色体数为40—97条,众数为47—48条,第150代细胞染色体数为70—114条,众数为93—94条。可见此细胞在长期培养后染色体数目显著增加,第150代细胞的染色体众数几乎是第30代细胞的2倍(图2)。

4. 癌细胞克隆形成率 96孔培养板上有一个细胞的孔共38个。培养10天后有34孔长出克隆,克隆形成率为89%。

5. 异种移植 接种后1个月,裸小鼠皮

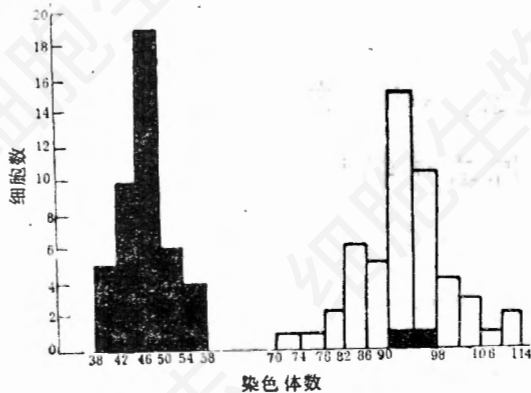


图2 SLC-89细胞染色体分布图

■ 第30代细胞  
□ 第150代细胞

下出现肿瘤结节, 70天达0.5—0.8 cm大小, 解剖见肿瘤侵犯小鼠皮下结缔组织及肌肉, 中心有坏死。切片显示的腺癌形态主要为透明细胞腺癌, 与原发肺癌的组织结构相似(图版图6, 7)。PAS染色亦为阳性。

**6. 细胞表面凝集素受体检测** 结果表明ConA在8 μg/ml浓度时, 在3—5分钟能使培养细胞出现凝集。

**7. 支原体检测** 经2—3周培养后经检查未发现支原体生长。

## 讨 论

肺癌细胞系SLC-89系来自原发肺癌病灶。根据光镜, 电镜观察的细胞形态和结构特点, 染色体分析, 细胞生长特性以及能在裸鼠体内生长移植瘤, 并且移植瘤的组织象与原发肺癌的组织象相似等, 均表明此细胞系确实来自肺癌组织。此细胞系已在体外培养两年多, 连续传代196代, 经液氮多次冻存均复苏良好, 形态无明显变化, 说明此细胞系已成为稳定的

肺癌细胞系<sup>[2]</sup>。细胞在长期培养后, 增殖速度以及最大生长密度虽有所增加, 但变化不大, 生长曲线形态亦基本一致。然而第150代细胞的染色体众数几乎是第30代细胞的2倍, 变化很显著, 这是否是细胞相互融合, 还是多倍体细胞更易增殖造成的, 需进一步观察。

肺癌细胞培养建系国内外虽有报告<sup>[3-5]</sup>, 但本例肺癌组织来自全国肺癌死亡率最高的宣威城区, 因此可能对肺癌研究有特殊意义。

## 摘 要

本文报告1例来源于云南宣威县患者的肺癌标本, 经体外培养建系成功, 命名为SLC-89。该细胞系细胞经HE, 瑞氏染色形态符合癌细胞特征。在体外培养已两年多, 传代196代, 细胞冻存后复苏生长良好。第86代细胞倍增时间为26.4小时, 染色体数为非整倍体, 众数为超二倍体, 长期培养后染色体数明显增加。细胞接种裸鼠有移植瘤生长, 组织象与原发肺癌组织象相似。电镜观察细胞表面有微绒毛, 浆中可见分泌颗粒, 有较多板层小体, 表明来源于肺泡上皮。

## 参 考 文 献

- [1] 宣威县肿瘤防治办公室等, 1977, 云南医药, 3: 50—53.
- [2] 潘琼婧, 1985, 细胞生物学杂志, 7(2): 93—94.
- [3] 大星章一等著, 吴政安等译, 1979, 人癌细胞培养, P. 98—104.
- [4] 汪蕙等, 1985, 中华肿瘤杂志, 5(2): 85—88.
- [5] 梁明达等, 1985, 中华肿瘤杂志, 7(23): 81—84.