

# 人体膀胱移行细胞癌细胞系 KGBC 的建立及其生物学特性

陈志龙 马世兴

(成都军区昆明总医院单克隆室)

继 52 年人宫颈癌 HeLa 细胞建立以来，国内外已相继建立了不少肿瘤细胞系，但泌尿系统肿瘤体外长期培养较为困难<sup>[1-2]</sup>，迄今国内膀胱癌建系仅有一例成功<sup>[3]</sup>。我们为制备膀胱癌单克隆抗体，进行了膀胱癌细胞体外培养，现把成功建系的一例报告如下。

## 材料和方法

**一、病例** 患者徐××，男，54岁，于 1990 年 8 月 10 日行膀胱部分切除术切除膀胱癌，病理诊断为，膀胱移行细胞癌Ⅱ-Ⅲ级，并右髂总动脉上淋巴结转移。

### 二、建系经过

1. 取材和培养条件 从手术切除的膀胱癌中选取出血坏死较少的癌组织，用 GKN 液洗去血液，剪碎至 1 mm 大小，接种于 50 ml 小方瓶中。培养液为 RPMI 1640，含小牛血清 20%，青链霉素各 100 单位/ml，谷氨酰胺 400 μg/ml，用 5% 碳酸氢钠调 pH 至 7.0~7.2，放入 37℃ 培养箱中静止培养。

2. 培养经过 培养 10 天后组织块周围长出上皮样细胞。至培养第 27 天，上皮样细胞已长成单层。用 0.25% 胰蛋白酶消化处理后传代，细胞不易分散，大部分仍呈大小不等的细胞片块，但能贴壁生长。以后生长加快，约 4~6 天可传代一次，用 RPMI 1640 完全培养液维持生长，并继续传代。至今已 10 个多月，传代 65 代。

### 三、细胞生物学特性鉴定

1. 形态结构特性 在倒置显微镜下观察培养活细胞的形态及生长特点，盖片培养细胞经 HE 和瑞氏染色观察细胞学特征。电镜观察第 40 代细胞超微结构。

2. 细胞生长曲线及倍增时间 将第 35 代长成单层的细胞用胰蛋白酶消化后接种于 24 孔塑料培养板中，接种数为  $3 \times 10^4/\text{ml}$  每孔，于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养

箱中培养，每 2 天换培养液一次，以接种当天为 0 天，自接种次日起，每天取 3 孔作活细胞计数，取其平均值绘制生长曲线，并推算细胞倍增时间。

3. 染色体核型分析 按常规方法对第 9 代和第 21 代细胞进行染色体核型分析。

4. 癌细胞克隆形成率 用有限稀释法把第 35 代细胞接种到 96 孔塑料培养板中，待细胞下沉后，计算含单个细胞的孔数，7~10 天后观察其克隆生长情况。

5. 异种移植 培养第 27 代和第 42 代细胞，经胰蛋白酶消化后用 GKN 液洗一次，再用无血清 1640 液制备成  $1.0 \times 10^8/\text{ml}$  细胞悬液，各接种于半月龄昆明种小鼠 2 只，在腋窝，腹股沟两处作皮下注射，每处注射 0.3 ml。小鼠在接种前一天用  $^{60}\text{Co}(800 \text{ rad})$  全身照射，同时腹腔注射氯化可的松 0.2 mg，连续 2 天。形成结节后作组织学检查。

6. 细胞表面凝集素受体检测 将长成单层的第 61 代细胞制备成  $1 \times 10^6/\text{ml}$  细胞悬液，分别与不同稀释度刀豆球蛋白(ConA)及植物血凝素(PHA)等量混合，5~10 分钟后在光镜下观察凝集情况。

7. 乳酸脱氢酶(LDH)同工酶测定 细胞在 50 ml 培养瓶中长成单层后，用刮子刮下，反复冻融及吹打使细胞破碎，离心收集上清液，用琼脂糖平板进行电泳，使同工酶分离，NAD-PMS-NBT 染色，显色区带用光密度计扫描定量测定。

**四、支原体检查** 用反复冻融法将培养细胞破碎后，用接种环接种到支原体培养基，在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2~3 周并观察结果。

## 结 果

1. 形态学特征 培养细胞形态为上皮样，镶嵌排列。细胞界限不很清楚，呈明显的重叠生长。当细胞厚度增加明显时，可见部分脱落。细胞质充满细小颗粒。盖片培养的细胞经

HE 和端氏染色后光镜下观察见形态呈上皮样，大小不一，核大，核仁明显，核分裂相多，胞浆丰富，内有许多小空泡而呈泡沫状(图版图 1)。PAS 染色充满 PAS 阳性颗粒(图版图 2)。超微结构(图版图 3)发现此细胞系显示一些正常泌尿道上皮与膀胱肿瘤的特征。多数细胞有不规则卵圆的核，类似膀胱基底和中间细胞，部分细胞核圆，类似膀胱表面细胞。前者核染色质丰富，核周几乎总存在染色质，核仁 1 至数个，结构均一或有一显著的淡染区，后者细胞核较大，染色质少。许多细胞表面有微绒毛，某些细胞表面相互平行连接，细胞间隙较窄，未见真正的桥粒和紧密连接。许多细胞胞浆有丰富的  $\alpha$  糖原及大量游离核糖体，但粗面内质网稀少，有许多大小不等的胞浆空泡，线粒体和溶酶体较少，未见病毒和支原体。

2. 生长曲线和倍增时间 细胞接种后 24 小时开始增殖，第三天生长速度加快，第六天到达顶峰。倍增时间为 28 小时(图 1)。

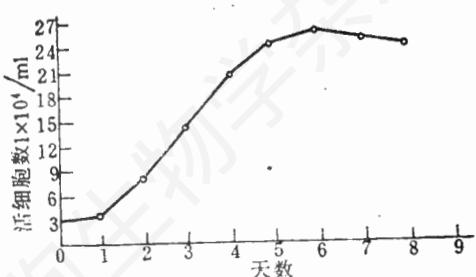


图 1 KGBC 细胞的生长曲线

3. 染色体分析 分析 50 个中期细胞，染色体数为非整倍体，分布范围较广，从 65 到 190 条，众数为 90—95 条(图 2，图版图 4)。

4. 癌细胞克隆形成率 接种后 7—10 天观察，在 40 个单个细胞孔中有 33 孔长成了克隆，克隆形成率为 82.5%。

5. 异种移植 2 次移植均在接种 3—7 天后可在皮下摸到米粒大小的结节，解剖发现结节与肌肉粘连不能分离，切片检查见存在肿瘤

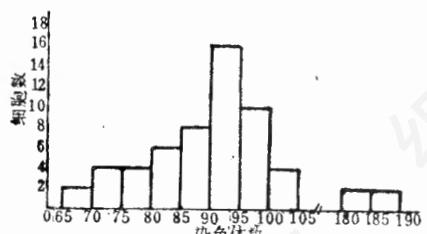


图 2 KGBC 细胞的染色体分布图

细胞，并侵犯肌层。组织形态与原膀胱癌相符(图版图 5—6)。

6. 细胞表面凝集素受体检测 结果表明 ConA 在  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ , PHA 在  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  浓度时，5—10 分钟均能使 KGBC 细胞出现凝集，显示细胞为恶性。而 ConA 使细胞凝集更明显，可能是与细胞表面不同基团结合引起的。

7. 同工酶测定 结果显示肿瘤细胞的 LDH 同工酶出现 5 个峰，其中  $\text{LDH}_1$  峰值最大， $\text{LDH}_5$  峰值最小，显示其特征性酶谱<sup>[4-6]</sup>。

四、支原体检查 支原体培养经 2—3 周连续观察，均为阴性。

## 讨 论

膀胱癌在体外较难长期培养，国内仅有 一例建系成功。为何膀胱癌比其他部位肿瘤难于在体外长期培养，原因尚不清楚。Nayak 等<sup>[7]</sup>发现分化差的，体内有转移的膀胱癌相对容易建立长期培养。John 等<sup>[8]</sup>复习的有原发癌组织学检查的 13 例膀胱癌细胞系，其中只有 2 例来自分化好的癌。Ishihara 等<sup>[2]</sup>发现染色体为近三倍体的细胞较易长期培养。本例膀胱癌细胞系 KGBC，亦来自分化较差的(Ⅱ—Ⅲ级)并有淋巴结转移的膀胱癌。染色体数也明显异常，众数为近 4 倍体。与多数已建立的膀胱癌细胞系相似。

KGBC 细胞体外培养形态为上皮样，贴壁铺石样生长，生长速度快，倍增时间 28 小时，接触抑制消失，呈明显的重叠生长，表现了恶性细胞的生长特征。光镜和电镜下细胞的形态结构特征符合膀胱癌细胞系特征<sup>[4,5,9]</sup>。活细

胞种植到经 $\gamma$ 射线照射和激素处理的小鼠皮下能生长，并沿肌间纤维侵犯肌层，其组织结构与原发膀胱癌相符，表明KGBC细胞的确来自原发膀胱癌。

KGBC细胞在体外培养已近10个月，传代65代，经多次液氮冻存和复苏，细胞生长良好，表明是一株能在体外稳定生长的膀胱癌细胞系，可以为膀胱癌的研究提供有价值的材料。

### 摘要

本文报告建立了一株人膀胱移行细胞癌细胞系，命名为KGBC。KGBC细胞已在体外培养了10个月，传代65代。组织培养中，KGBC细胞形态为上皮样，呈单层或多层生长，接触抑制消失。光镜和电镜下，KGBC细胞的形态结构与膀胱移行细胞癌的形态结构相似。第27代和第42代细胞异种移植，能在小鼠体内生长，组织相与原发癌相似。第9代和第21代细胞的染色体数从65到190条，众数为90—95条。第35代细胞倍增时间为28小时。细胞经液氮保存，复苏良好。这些表明已建立了一株能在体外稳定生长的人膀胱癌细胞系。

### 图版说明

1. 盖片培养KGBC细胞，形态呈上皮样，大小

不一，核大，核仁明显，可见核分裂相，胞浆丰富，内有许多小空泡而呈泡沫状。(瑞氏染色 $\times 40$ )

2. 盖片培养KGBC细胞，胞浆内充满PAS阳性颗粒。(PAS染色 $\times 40$ )

3. KGBC细胞有不规则卵圆形核，核染色质边聚，核仁明显，浆内有许多大小不等的空泡，丰富的 $\alpha$ 糖原和游离核糖体，细胞表面有微绒毛。 $(\times 5200$ 倍)

4. KGBC细胞的染色体92条。

5. 原发膀胱癌的组织相，分化较差。(HE染色 $\times 20$ )

6. 小鼠皮下的移植瘤组织相。(HE染色 $\times 20$ )

### 参考文献

- [1] 大星章一等著，吴政安等译，1979，人癌细胞培养，P 125—127。
- [2] Rigby, C. C. et al., Br. J Cancer 1970; 24: 746—754.
- [3] 俞莉章等，1989，中华泌尿外科杂志 10: 131—134。
- [4] Yeh, M. Y. et al., J Sur Oncol 1988; 37: 177—184.
- [5] Lin, C. W. et al., Cancer Res 1985; 45: 5070—5079.
- [6] Kyriazis, A. A. et al; Cancer Res 1984; 44: 3997—4005.
- [7] Nayak, S. K. et al., Br J Cancer 1977; 35: 142—151.
- [8] John, R. W. et al., Cancer Res 1986; 46: 3630—3636.
- [9] Russell, P. J. et al., Int J Cancer 1988; 41: 74—82.

### 名词讨论

#### 中间丝(intermediate filaments)

自60年代后期，陆续发现了直径约8—10nm的细胞质丝。最初由于对这类纤丝的性质不清楚，曾有filaments、intermediate filaments、 $\beta$ -filaments、80—100 Å filaments、100 Å(10nm)filaments诸多命名。至70年代后期才逐渐统一为intermediate filaments(IF)或100 Å(10nm)filaments。IF的中文名亦很纷繁，如中等纤维、中间纤维、居间纤维、中间丝等。

IF的直径介于肌动蛋白丝与肌球蛋白丝(粗丝)和微管之间，命名冠以“中间”修饰词是恰当的。与微管相对而言，IF、微丝和粗丝同属纤丝filaments范畴。既然microfilaments和thick filaments分别称为微丝和粗丝，那么IF则理应称为中间丝。

在细胞生物学中，filaments是指由分子构成的最基本的单位纤丝，fibril(原纤维)和fiber(纤维)则是代表由纤丝构成的更复杂的高层次结构。例如，在肌肉结构中，myofilaments(肌丝)是代表由肌动蛋白或肌球蛋白组成的基本纤丝，myofibrils(肌原纤维)则是指细胞质中由若干肌丝组成细线状显微结构，而muscle fibers(肌纤维)则代表肌细胞形成的纤维。因此，filaments应称为丝或纤丝，如果称为纤维，则显然是放大了等级。

目前，各型IF的肽链序列和结构形式的共同特点已基本查清。基于分类命名一致和等级水平有别之故，建议将IF定名为中间丝。