

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^[1-2],迄今国内膀胱癌建系仅有一例成功^[3]。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 3×10^4 /ml 每孔,于 37℃ 5% CO₂ 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 1.0×10^6 /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 ⁶⁰Co (800 rad) 全身照射,同时腹腔注射氢化可的松 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 1×10^6 个/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 CO₂ 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 α 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)。

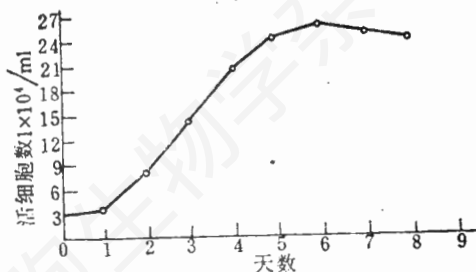


图1 KGBC 细胞的生长曲线

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

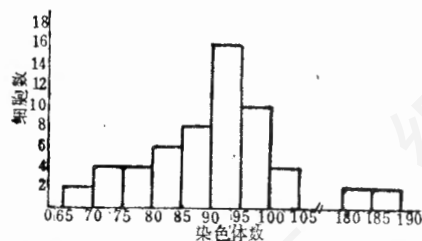


图2 KGBC 细胞的染色体分布图

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 $3 \mu\text{g/ml}$, PHA 在 $20 \mu\text{g/ml}$ 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 LDH_1 峰值最大, LDH_5 峰值最小, 显示其特征性酶谱^[4-6]。

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^[7]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^[8]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^[2]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^[4,5,9]。活细

胞种植到经 γ 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 α 糖原和游离核糖体,细胞表面有微绒毛。($\times 5200_0$ 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、 β -filaments、80—100Å filaments、100Å(10nm)filaments诸多命名。至70年代后期才逐渐统一为intermediate filaments(IF)或100Å(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的肽键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。

韩贻仁(山东大学生物系 250100)