

# 人阑尾粘液腺癌细胞系(AP-213)的建立及其生物学特性

祝庆孚 黄靖香  
(解放军总医院)

阑尾腺癌少见,其组织类型与大肠腺癌基本相同<sup>[1,2]</sup>。1984年3月10日,我们在一例阑尾粘液腺癌腹腔广泛转移病例尸检时,选取了小块腹腔转移癌作癌细胞培养,历时已两年,传代135次,细胞生长稳定,多次冻存,复苏、生长良好,已定名为AP-213,国内尚未见体外建立阑尾粘液腺癌细胞系的报告,AP-213细胞系的建立,将为肠癌的研究提供一个实验材料<sup>[3]</sup>。

## 材 料

钱某,男,45岁,3年前曾因腹股沟处局部隆起就诊,疑为疝囊脂肪嵌顿,未作处置,2年前因发烧,疑为疝囊内容感染,行手术摘除,病理证实为粘液腺癌,经B型超声检查,腹腔尚有多个瘤块,已无手术治疗指征,行保守治疗,1984年3月10日病故,于死后9小时尸检(A 2258),见腹腔充满胶冻状肿瘤组织,呈“腹膜假粘液瘤”改变,尸检证实为阑尾粘液腺癌扩散所致,根据如下:

1. 于盲肠浆膜侧阑尾部位查见一个拳头大小的瘤块,尚可以辨认管腔闭锁的阑尾根部,镜下为分化较好的粘液腺癌,癌细胞形态与大肠及阑尾的腺上皮相似,高铁二胺及Alcian blue染色(HID/AB)证实癌细胞内含有硫酸粘液(棕黑色)及唾液酸粘液(蓝色)两种粘液成分,以硫酸粘液为著,与大肠、阑尾上皮及其腺癌的粘液特征相符。

2. 除阑尾以外,从食管至肛门消化道全程粘膜均完好,未再查见肿瘤,虽然大网膜及腹腔脏器均被腹腔扩散的胶冻状肿瘤粘附或相互粘连,经逐一分离,也未查见可疑的原发癌。

3. CEA抗体免疫酶标染色,癌细胞呈阳性反应,也支持肿瘤系发生于肠道上皮并排除了间皮瘤的可能。

总之,本例诊断的根据是充分的。

在尸检同时,选取了小块腹腔转移的癌组织用作细胞培养。

## 建 系 经 过

将选取的癌组织用Hank's液洗涤3次,剪成1mm<sup>3</sup>大小的碎块,用弯头吸管将它们均匀接种于培养瓶内壁,干贴约1小时后,加含有15%新生牛血清的RPMI 1640培养液,pH 7.2,置37℃温箱内培养,至第30天,其中两块组织长出细胞晕,第36天换液一次,第40天吸出其中一个细胞晕的细胞传至另一方瓶,因细胞量少,至第96天细胞才铺满瓶底,乃用胰蛋白酶消化,开始传代培养,一瓶传两瓶,以后每4天传一代,一瓶传三瓶,不再需胰酶消化,现已历时2年余,细胞生长稳定,从未发生污染,多次冻存,复苏及生长均佳,支原体检查阴性(扫描电镜观察,Hoachst 33258染色,荧光显微镜观察)。

## 生 物 学 特 性

1. 细胞形态 倒置显微镜观察,活细胞大多为卵圆形,部分为梭形,呈单层上皮样生长,细胞表面可见多种伪足。将培养不同天数的窄条盖片经固定后进行了多种染色观察:经H. E染色的癌细胞大部为卵圆或圆形,部分为梭形,大小不一,核大深染,核仁明显,核分裂相易见,有的胞浆较宽,核偏于一侧,Alcian blue染色胞浆内有明显的蓝染物,PAS染色胞浆内有少许红染颗粒,AB/PAS复染则呈蓝紫色,以上染色结果与人体肿瘤相同,HID/AB染色则蓝染的涎酸粘液较著,不似体内肿瘤以棕黑色的硫酸粘液较著。

2. 细胞生长速度 将第20代和106代生长旺盛的细胞分别制备成每毫升3.6万和3.0万的细胞悬液各30瓶,第3日起隔日换液,

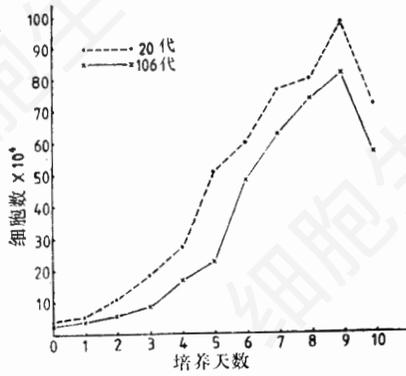


图 1 213 细胞系生长曲线图

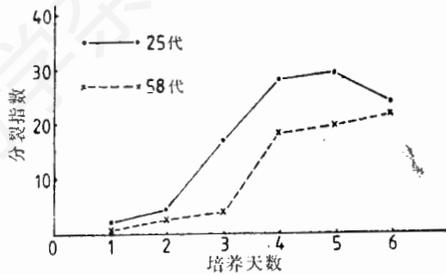


图 2 213 细胞系分裂指数

于接种次日开始，每日各取 3 瓶作细胞计数，取每毫升细胞数的平均值，连续 10 天，绘成曲线(图 1)，见第 1 天增殖均较慢，以后即直线上升，第 9 天达最高峰，第 10 天开始下降，达最高峰时细胞数分别为接种时的 27.3 及 27 倍。

根据倍增时间 =  $0.301 T \div (\log N_2 - \log N_1)$  的公式推算<sup>[4]</sup>，第 20 代细胞 1—3 天倍增时间为 30.4 小时，第 4—6 天为 42 小时，1—6 天平均倍增时间为 35.4 小时，第 106 代细胞的倍增时间基本相似。

3. 细胞分裂指数 取第 25 代和第 58 代细胞各 8 万，置于有盖玻片的小瓶内，隔日换液，每天取盖片 2 张，H·E 染色，计数 2,000 个细胞的核分裂相，第 25 代细胞的分裂指数平均为 15.8%，第 5 天分裂相最多，分裂指数为 29% (图 2)。

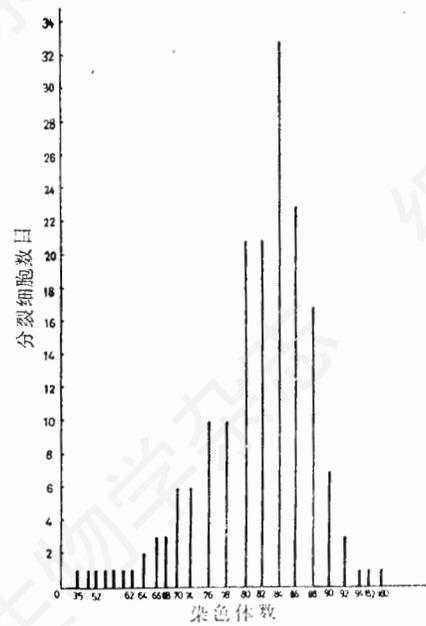


图 3 213 细胞系 175 个染色体众数分析



图 4 213 细胞系染色体组型

4. 集落形成率 将第 50 代和 114 代细胞制备的细胞悬液，按每瓶 150 个细胞各接种

表1 动物接种致癌情况

动物品种	接种细胞数 ( $\times 10^4$ )	生长 天数	动物 只数	肿瘤平均大小 (cm)	最大肿瘤大小 (cm)
上海小白鼠 (试验前一日 接受 300 rad 照射)	380	10	4	$0.5 \times 0.48 \times 0.45$	$1.0 \times 0.8 \times 0.7$
	500	7	2	$1.0 \times 1.1 \times 0.5$	$1.0 \times 1.2 \times 0.5$
		10	2	$1.0 \times 1.2 \times 0.85$	$1.0 \times 1.5 \times 1.0$
		13	1	$1.0 \times 0.8 \times 0.7$	$1.0 \times 0.8 \times 0.7$
	600	8	2	$0.6 \times 0.8 \times 0.8$	$1.0 \times 0.8 \times 1.0$
裸小鼠	500	18	2	$1.8 \times 1.25 \times 1.0$	$2.0 \times 1.5 \times 1.0$

表2 几种检品的CEA值

检品号	检品来源	CEA值 ng/ml
1	AP-213 细胞 $5 \times 10^6$ 离心弃上清, 加 1 ml 蒸馏水 3 次冻溶, 取上清检测	0.84
2	AP-213 细胞培养第 2 天(细胞数 $7 \times 10^5/3$ ml)取上清检测	7.97
3	PLA-801 (肺巨细胞癌)细胞培养第 2 天(细胞数 $6.5 \times 10^5$ )取上清检测	0.51
4	未使用的培养液: 含小牛血清	1.42
5	未使用的培养液: 不含小牛血清	0

10 瓶, 培养 10 天后倾弃培养液, 经固定和 Giemsa 染色后, 计数细胞集落, 集落形成率分别为 45% 及 63.7%。

5. 染色体分析 用第 55 代和 102 代传代第 3 天生长旺盛的细胞, 于试验前一天换液, 试验当日加入秋水仙素, 经低渗, 固定及气干等步骤制片, Giemsa 染色, 对染色体计数、分析, 染色体众数值为 84 (图 3)。按 Denver 系统分析, 各组染色体数目均有增加 (2.6—6 倍不等) 以 D·B·F·G 各组尤为明显, 染色体形状亦有异常; 可见环化, 具近中着丝点及具顶端着丝点的大染色体, 具顶端着丝点的大染色体出现率达 91%, 可视为本细胞系的标记染色体(图 4)。

6. 动物接种 将传代第 3 天生长旺盛的细胞制成悬液, 接种于出生 20 天的上海雄性小白鼠前肢附近皮下, 接种前一日小鼠接受了 300 rad 的照射, 此外, 还接种了 2 只裸小鼠, 结果见表 1, 成瘤率达 100%, 裸小鼠肿瘤生

长最快最大(图版图 1), 镜下, 移植瘤细胞排列呈不规则之索片状, 有的呈腺管状排列(图版图 2), 分化远较人体肿瘤为差。

#### 7. 培养细胞的免疫学检测

(1) 抗细胞角质蛋白单克隆抗体 CAM 5.2<sup>[5]</sup> 免疫过氧化物酶染色为阳性; 细胞角质蛋白为中等纤维的一种, 存在于各种上皮细胞内, 阳性结果可作为上皮起源的证据。

#### (2) 癌胚抗原(CEA)的检测:

A. 抗 CEA 抗体免疫过氧化物酶染色为阳性, 阳性反应物主要位于细胞膜附近, 鼠抗 CEA 抗血清及兔抗鼠 IgG 均为北京生物制品所提供<sup>[6]</sup>。

B. CEA 含量的检测: 用 CEA-EIA 药盒<sup>[6]</sup>测定各种待检品的 CEA 值, 结果表明, AP-213 细胞内 CEA 值明显高于对照检品, 检品 2 的 CEA 值明显高出检品 1, 也说明了位于细胞膜附近的 CEA 是极易分泌于细胞之外的(表 2)。

8. 透射电镜观察 培养细胞在电镜下可见明暗两型细胞, 细胞大小形态不一, 核大, 不规则, 核仁明显, 细胞表面可见微绒毛, 胞浆内游离核糖体及线粒体较多, 并见分泌空泡(图版图4), 裸小鼠移植瘤在电镜下除见以上结构外, 尚可见到瘤细胞间的细胞连接, 如桥粒等(图版图5)。

9. 扫描电镜观察 将在盖片上生长旺盛的细胞, 经固定、喷镀后, 在H-500型扫描电镜下观察细胞的表面特征; 见胞核大, 有的胞浆呈膜状铺展, 可见微绒毛及丝状突起, 有的细胞表面有成簇较大的泡状突起, 可能是该细胞的粘液泡(图版图3)。

### 讨 论

以上各项实验结果表明, AP-213细胞系是具有恶性生物学行为和形态学特征, 并能产生癌胚抗原(CEA)的腺癌细胞, 其生物学特征与该细胞所来自的人阑尾粘液腺癌相似, 但分化却较体内肿瘤为差; 如细胞异形性较明显, 大多不形成腺管结构等, 这种差异的出现, 既可能与肿瘤的异质性有关, 也不排除较长时间的体外培养促成细胞发生变异的因素, AP-213人阑尾粘液腺癌细胞系的建立, 为肠癌的研究

提供了一个实验材料。

### 摘 要

AP-213细胞系是从一例阑尾粘液腺癌尸检病例取材培养建系的, 已历时2年余, 传代135次, 细胞生长稳定, 多次冻存, 复苏生长良好, 细胞倍增时间35.4小时, 分裂指数29%, 染色体为超3倍体, 并有巨大具顶端着丝点的标记染色体, 异种动物接种致瘤率为100%, 并具有产生CEA的能力, 其生物学特性与体内肿瘤相似, 但分化较差, 该细胞系的建立, 为肠癌的研究提供了一个实验材料。

### 参 考 文 献

- [1] Wood, D. A., 1967, Tumors of Intestine. Atlas of tumor pathology, Fascicle 22, First series, P. 177.
- [2] Menon, N. K. et al., 1980, Postgrad Med J., 56: 448.
- [3] 许沈华, 1983, 国外医学, 肿瘤分册, (4): 217.
- [4] Jakoby, W. B. ed., 1979, Methods in Enzymology, III: 141, Cell Culture Academic Press Inc, London.
- [5] 陈德蕙等, 1985, 中华医学杂志, 65: 530.
- [6] 程明等, 1984, 中华肿瘤杂志, 6: 250.
- [7] Goldenberg, D. M. et al., 1978, Cancer, 42: 1546.

## 聚赖氨酸与胶原对培养的鸡胚大脑皮层细胞的影响

王天佑 阎军 梁实 居俐

(北京市神经外科研究所)

随着细胞培养技术的发展, 现在已能做到由中枢神经组织选择性地培养某一类型细胞, 称为单一型培养(Monotypic Culture)<sup>[1]</sup>。通常有两种方法可以得到以神经细胞为主的培养物。一种是用胶原做支持物, 但因胶原有利于星形细胞增殖, 所以须用抗有丝分裂药物抑制其增殖<sup>[2]</sup>。另一种方法是培养前用聚赖氨酸处理培养皿表面, 可帮助细胞贴附而不利于星形

细胞增殖<sup>[3]</sup>。本文拟比较这两种方法的优缺点, 从而了解它们的实用意义。

### 材 料 和 方 法

1. 组织来源: 8天来亨鸡胚, 取双侧大脑半球

本工作得到军事医学科学院赵林普、肖定华, 北京医科大学吴希如, 中国药品生物制品检定所徐锡荣等同志指导, 特此致谢。