

- [9] J. O. Rochaix and A. P. Bird, 1975, *Chromosoma*, 52, 317.
- [10] A. J. Flavell and D. Ish-Horowicz, 1981, *Nature*, 292, 591.
- [11] C. W. Douglas 1982, *Microbiol. Rev.*, 46, 208.
- [12] 大西 昇, 山田康之, 山岸秀夫, 1983, 第8回植物组织培养シンポジウム講演要旨集, p. 20
- [13] T. Kunisada and H. Yamagishi, 1983, *Plasmid*, 9, 8.
- [14] 国贞隆弘, 山岸秀夫, 1983, 生物物理, 23, 98.
- [15] H. Yamagishi, T. KUnisada and T. Tsuda, 1982, *Plamid*, 8, 299.
- [16] 山岸秀夫, 1975, 核酸の化学工, p. 349. 东京化学同人.
- [17] 山岸秀夫, 1981, 遺伝子观察への旅, p. 41, 东京大学出版会.

人转移性胰腺癌细胞系 (PU-pan-1) 的建立及其生物学特性

盛宏森 *邵今一 罗江明 孔燕国 蔡力行 钟守先 朱 预
(北京协和医院外科)

胰腺癌在国内外的发病率及死亡率逐年上升。在美国, 胰腺癌死亡人数在恶性肿瘤中居第五位。由于胰腺位于腹腔深部, 早期症状不明显, 一旦出现梗阻黄疸或腰背疼痛时已属晚期, 切除率很低, 五年生存率更低。

为了探讨胰腺癌的发病机理, 寻找胰腺癌新的诊治手段, 建立胰腺癌体外实验模型是很必要的。国外以原发肿瘤或转移癌为材料已建立了多株胰腺癌细胞系, 如 SW-1990, HGC-25, PANC-1 等等^[1-4]。国内尚未见报告。我们自 1986 年 7 月开始着手建系, 从获得转移性胰腺癌的原代培养物开始, 至今已在体外稳定传代一年余, 计共 75 代, 定名为 PU-pan-1。

一、培养细胞的组织来源

肿瘤组织直接取自手术中。患者 1986 年 7 月 1 日剖腹探查时, 见胰头部有约 8 cm 直径肿物, 质地硬, 针吸组织做细胞学检查找到癌细胞。胃肠道及胆囊探查均未及肿瘤, 肝脏表面有大量灰白色赘生结节, 切取结节送病理检查, 同时进行组织培养。病理证实为来自胰腺的转移性中度分化腺癌。H. E. 染色切片显示

肝组织中有大小不等的癌转移结节, 大多位于汇管区附近。转移癌组织中纤维组织大量增生, 癌腺体大小不等, 呈导管样排列, 偶见低乳头状结构突入管腔, 癌细胞呈中度异形性, 可见明显的核仁, 并可见分裂相(图 1)。

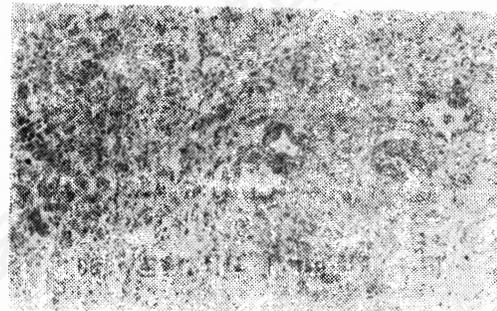


图 1 手术标本切片示转移癌, 在肝组织中, 周围有大量纤维组织 H. E. $\times 100$

二、建系经过

将取下的肝脏转移癌组织用加抗菌素的 PBS(pH 7.4) 冲洗三次, 在无菌条件下用手术刀切成约 1 mm³ 小块, 加入少量含 20% 胎牛

* 中国协和医科大学生理教研室

血清(天津血研所)青链霉素各 $100 \mu\text{g/ml}$ 的 RPMI 1640 培养液(Difco、美国),使小组织块均匀地贴附在塑料培养瓶底(Falcon、美国),静置 48 小时后,加入新鲜培养液,在含 $5\% \text{CO}_2$, 37°C 温箱内培养,以后每周半量换液两次。二周后瓶底出现较多成纤维样细胞,逐渐占据大部分瓶底,四周后一些组织块周围出现单层贴壁的上皮样细胞,呈铺路石样向外扩展,组织块周边出现乳头样生长的瘤块。随着上皮样细胞占据面积增大,成片成纤维样细胞中不断出现逐渐增大的上皮样细胞岛。二个月后,上皮样细胞约占据瓶底 $1/3$ 面积。用含 0.25% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA 的 PBS 溶液进行消化传代,同时按照体外培养时成纤维样细胞贴壁快的特性,将尚未贴壁的上皮样细胞逐代选择转移至新的培养瓶中培养,传至第五代时所见几乎全部为上皮样细胞。以后可在含 10% 新生牛血清 RPMI 1640 培养液中稳定传代,约每四天一次。

三、形态观察

1. 相差显微镜观察,细胞为椭圆形、核

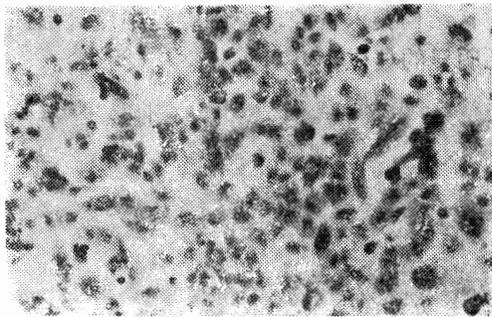


图 2 PU-pan-1 H.E.染色 $\times 100$

形及多边形,大小不一,轮廓清晰、透亮。细胞呈铺路石样排列,铺满后有重叠生长现象。细胞核大,核仁清楚而大,一般为 $2-3$ 个,胞浆相对较少,核浆比约为 $1:2-3$,胞浆内有空泡及粗颗粒。

2. 普通光镜观察,将癌细胞接种在盖玻片上,贴壁伸展后用 95% 酒精固定, H. E. 染色。光镜观察见细胞呈多边形,大小不一,细

胞核大浓染,核仁大而色深,细胞质较少,核浆比约为 $1:2-3$,胞浆含有嗜酸性的细颗粒,常可见分裂相(图 2)。

3. 透射电镜观察,取第 10 代及 20 代生长活跃的细胞以 PBS 漂洗,离心沉淀,用 4% 戊二醛经 1% 锇酸双固定包埋切片。电镜观察见细胞外形不规则,核大,染色质丰富,分布不均匀,有多个较大的核仁,核膜凹陷明显,粗面内织网丰富并扩张,胞浆基质内有较多的游离核糖体,高尔基体丰富,胞浆内有分泌颗粒(图 3)。

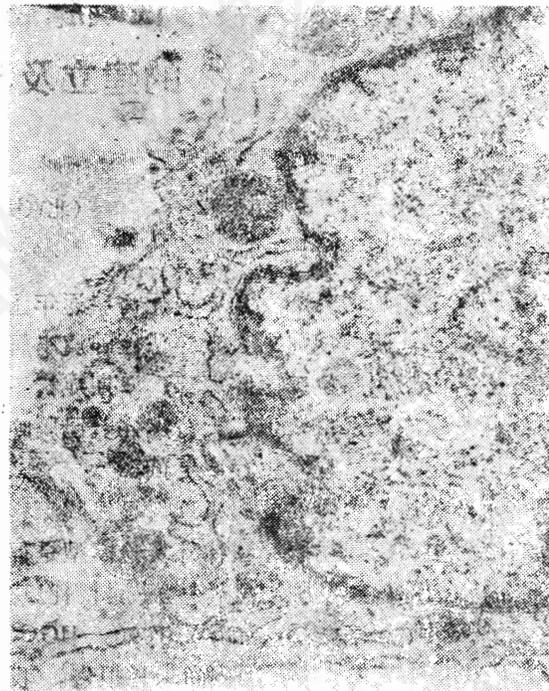


图 3 PU-pan-1 透射电镜可见分泌颗粒及扩张的内织网 $\times 15000$

四、细胞生长情况

1. 分裂指数

将第 10 代细胞制成密度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 的悬液接种在带有盖玻片的平皿内,72 小时后洗去培养液, 95% 酒精固定, H. E. 染色,计数得 72 小时的分裂指数值 3.4% 。

2. 生长曲线

取第 10 代细胞制成密度为 $5 \times 10^4/3 \text{ ml}$ 的

悬液, 接种于 35 mm 平皿共 30 个, 每日取三个平皿, 消化后用白血球计数板计算平皿内细胞密度, 取平均值绘成生长曲线(图 4)。

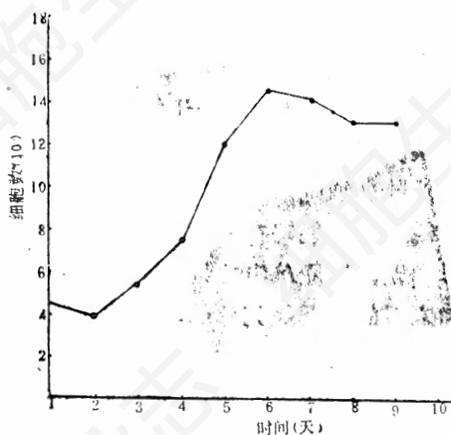


图 4 细胞生长曲线

接种后第一天细胞数略下降, 第二天增殖加快, 第六天达高峰, 第七天开始下降, 群体倍增时间均为 82.9 小时。

图中表明接种后第一天细胞数下降, 第二天回升, 然后增殖逐渐加快, 第六天达到高峰, 第七天细胞数有所下降。根据公式 $TD = \frac{T \cdot \lg 2}{\lg(N/N_0)}$ 计算每毫升 4.5 万细胞的群体倍增时间为 82.9 小时。

3. 集落形成率

取第 40 代细胞制备成单细胞悬液 (50 个/5 ml) 接种在三只 50 ml 培养瓶中, 三周后, 吸去培养液, 95% 酒精固定, 经 H. E. 染色计数, 其集落形成率为 46%。

五、刀豆球蛋白结合试验

细胞涂片经甲醇固定, 分别用刀豆球蛋白 1:1000 及 1:10000 染色, 结果均呈褐色, 刀豆球蛋白结合试验为阳性。

六、PAS 和卡红染色

贴附在玻片上的细胞经 PAS 和卡红染色, 显粉红色, 提示胞质中有粘液颗粒。

七、支原体污染检查

以荧光染料 Hoechst 33258 对贴壁在玻片上的细胞进行染色, 胞质区无荧光出现。经透

射电镜复核证实本细胞系无支原体污染。

八、染色体分析

将第 10 代细胞进行染色体分析, 传代培养 72 小时后, 加秋水仙胺, 其终浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 再培养三小时后, 用胰酶消化, 收集细胞, 经低渗处理及固定, Giemsa 染色, 油镜计数 100 个中期细胞分裂相, 染色体众数为 64 条, 占 24%, 为亚三倍体。染色体图形及数目分布分别见图 5 及图 6。

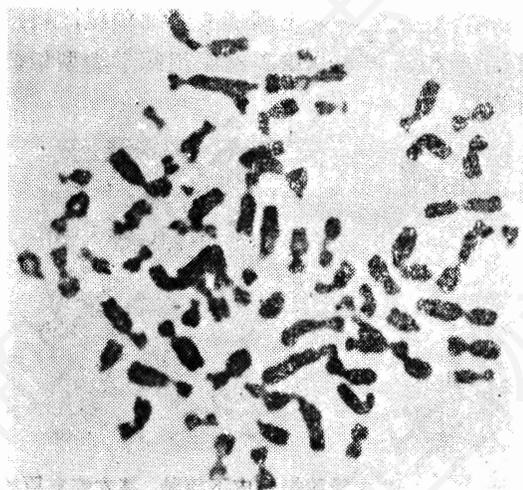


图 5 PU-pan-1 的一个 64 条染色体细胞

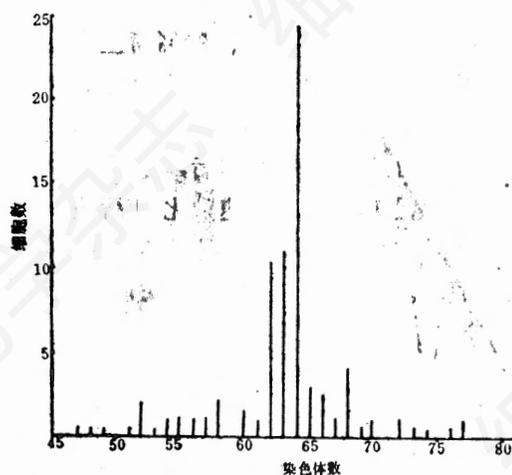


图 6 PU-pan-1 染色体数目分布, 众数为 64 条主峰占 58%

第 25 代及 35 代重复染色体分析结果与第 10 代相似。

九、异种移植

将第12代及25代细胞 5×10^6 个注射于裸鼠NIH/nu(中国医学科学院动物中心提供)肩部皮下,两周后全部可见结节,一个月时约0.7cm直径硬结,取出结节进行病理切片检查,见癌细胞大多呈腺状结构排列,部分腺状结构聚集在一起,部分腺状结构分散在纤维组织中,有些“腺腔”中充满粘液。癌细胞呈中度异形性,多为长椭圆形,核染色质丰富,可见分裂相,胞浆透明或充满嗜酸性细颗粒,病理组织学类型基本与原培养物癌组织学类型相似(图7)。

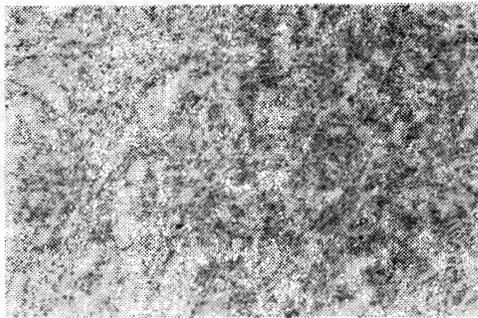


图7 第12代细胞裸鼠皮下接种,基本恢复原始培养材料的组织类型 H.E. $\times 100$

十、冷冻及复苏

以含10%二甲基亚砷及20%新生牛血清的培养液制成 1×10^6 个细胞/ml悬液,分装于玻璃安瓶或塑料冷冻管中,逐渐降温,以每2—3分钟降1度,至 -80°C 后,置液氮中保存。复苏时置 40°C 水浴迅速融化,清洗一遍后,进行贴壁培养。冷冻一周至半年的细胞均能复苏成功。细胞形态,生长情况以及染色体分析与冷冻前相同。

讨 论

PU-pan-1取材于胰腺癌病人肝转移结节。

手术中见到胰腺有8cm直径肿瘤,经穿刺病理证实为胰腺癌。肝脏转移结节病理证实为胰腺来源的转移性腺癌,肿瘤细胞呈导管样排列,组织学表现与胰腺导管腺癌相同。根据病史,辅助检查及手术探查,消化道无其他肿瘤,因此可以认为PU-pan-1细胞系的原培养组织是胰腺癌的肝转移癌灶。PU-pan-1细胞具有恶性肿瘤细胞系生长的特点及腺癌细胞形态及超微结构,能够在异种动物再现原标本的组织学类型,因而确定此细胞为人转移性胰腺腺癌细胞系的根据是充分的。本细胞系的建立将为进一步研究胰腺癌的机理提供体外实验模型。

摘 要

PU-pan-1细胞系取材于胰腺癌病人肝转移结节,在体外传代一年余,计75代。该细胞系具有恶性肿瘤细胞系生长的特点,分裂指数为3.4%,群体倍增时间为82.9小时,集落形成率为46%,具有腺癌细胞形态及超微结构,染色体众数为64条。PU-pan-1能够在裸鼠再现原标本组织学类型,无支原体污染,能够长期冷冻保存,将为进一步研究胰腺癌的机理提供体外实验模型。

参 考 文 献

- [1] Akaki, T., and Kimoto, T., 1977, *Acta pathol. Jon.* 27: 51-58.
- [2] Grant, A. G., 1979, *Br. J. Cancer* 39: 143-151.
- [3] Kaku, M., et al., 1980, *Gann* 71: 596-601.
- [4] Lieber, M., et al., 1975, *Int. J. Cancer* 15: 741-747.