

将空气压缩机和 CO₂ 钢瓶调到定压(例如 1 kg/m²), 按一定比率(空气:CO₂100:1/-5)的流量混合, 混合空气增加湿度后, 用过滤器(HA 型 0.45 μm 滤膜或棉塞)除菌, 再通入培养箱、烧瓶、振荡培养器、大型培养瓶等。向烧瓶等培养器内直接通气, 因为易于混入杂菌须经二三个连续的过滤器。适宜的通气量为 10—20 ml/min/每一烧瓶或 2—4 l/min/20 l 容积培养箱。

b. 充足的光照

在光自养培养时, 在光照的混合营养情况下须强光照明, 通常需要 8000—15000 lx。但是在液体培养中生长旺盛, 细胞相互遮蔽, 光合作用的有效限量降

低。此时, 细胞低密度培养就可以促进生长。例如石刁柏细胞在连续培养下, 细胞密度从 5 mg D. W./ml 降低到 2 mg D. W./ml, 细胞倍增时间则从 5.8 天缩短到 1.9 天。

c. 稳定光自养培养的保持

促进光自养的重要因素除上述的以外, 尚有以下几点: 1. 生长素的浓度要低。2. 降低氧分压。3. 增加磷酸的浓度等等。特别是在液体培养基中大量培养情况下, 呼吸活性高, 降低 O₂ 分压对光自养培养是十分重要的。

(周荣仁节译自《植物细胞培养マニュアル》一书的 29~34 页“光独立栄養培養”一节)

人胃管状腺癌细胞系(NGCC-8310)的建立 及其生物学特性的观察

陈惠英 毕慧颖 鞠九龙 张佃乾 乐美兆
(中国人民解放军第八一医院)

建立人癌细胞系, 对癌变机理的探讨, 以及临床诊断, 药物筛选等方面的研究, 提供了较好的细胞实验模型。国内已有数例胃癌细胞系建立的报告, 但尚未见人体胃管状腺癌细胞系建立的报道。我院自一九八三年十月开展了建立该细胞系的工作, 至今已连续体外传代培养近 16 个月, 传至 118 代, 细胞生长旺盛, 定名为 NGCC-8310。

一、材料来源

肿瘤组织取自本院外科手术标本, 患者仇 × ×, 男性, 55 岁, X 线摄片报告为胃小弯侧角切迹处偏后见有一个 2 × 1.5 cm 龛影, 周围粘膜增粗, 部分粘膜破坏, 消化蠕动中断, 符合溃疡型癌, 范围为 6.5 cm。切除的肿块经病理学检查, 诊断为胃管状腺癌。

二、建株经过

将手术切除的胃癌组织标本立即在无菌操作下, 去除结缔组织和坏死组织, 用 Hank's

液冲洗数次, 置入培养皿中, 取出部分供病理诊断, 其余肿块剪成 1—1.5 mm³ 左右的小块, 经少量培养液湿润后, 把组织块分散贴在培养瓶中, 底面朝上, 同时加入 RPMI-1640 培养液 3 ml, 内含 20% 小牛血清, 青、链霉素各 100 u/ml 置 37℃ 培养箱内, 2 小时后, 待组织块粘附瓶壁后, 再轻轻翻转小瓶, 使组织块浸在培养液中, 静置培养, 根据 pH 的变化, 更换培液。于培养第十一天在部分组织块周围生长出细胞晕, 有的组织块周围生长出纤维样细胞, 第二十二天纤维样细胞铺满瓶底, 用 Hank's 液洗二次, 0.25% 胰蛋白酶消化, 进行第一次传代。第三十天行第二代传代。第四十四天观察到一堆生长旺盛的上皮样细胞, 细胞轮廓清楚, 透亮, 纤维样细胞粗大, 内含粗颗

电镜观察得到三〇二医院梁士哲同志的热心指导, 谨致谢意。

粒和空泡。细胞传至第六代已基本呈均一的上皮样细胞。第九十九天传至第八代，细胞生长极其旺盛，每小方瓶接种 20 万/3 ml，3—4 天即可传代。目前已传至 118 代，细胞生长迅速且稳定。

三、细胞生物学特性的观察

1. 细胞形态

长成单层的细胞，用胰蛋白酶消化，接种在含有小盖玻片的方瓶中用光学显微镜观察。接种后 2 小时，细胞基本上呈圆形，4 小时后，分散的单个细胞已贴瓶，6 小时后，绝大多数细胞呈卵圆形，次日可见呈岛状分布的细胞群体，细胞呈扁平样多角形，待长成单层后，可见呈鳞状排列的光滑细胞和极少数圆细胞。细胞成堆生长，表现为接触抑制消失。取出盖玻片染色，镜检，分裂相易见，细胞核大，浓染，核仁清楚 1—3 个，个别细胞可达 5—6 个。计数 3000 个细胞按形态学分类，多角形 80%，纺锤形 17%，圆形 1.9%，瘤巨细胞 1.1%。

2. 细胞生长曲线

取第十二代细胞制成 5×10^4 /ml 悬液，每瓶接种 1 ml，加培养液 2 ml，共 30 瓶，隔日换液，每日取 3 瓶，用 0.25% 胰蛋白酶消化，血球计数板计数，取平均值。(图 1)

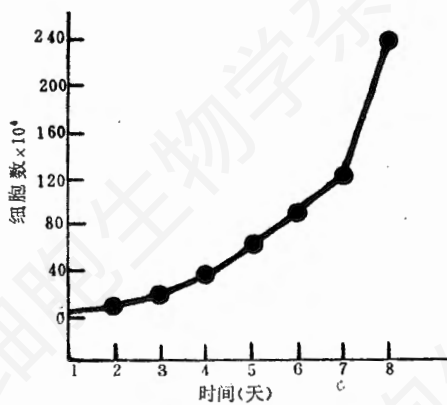


图 1 细胞生长曲线

图示接种后第二天开始，细胞增殖逐渐加快，呈直线上升，第八天达到高峰，第九天开始下降。每 ml 5 万细胞的群体倍增时间为 27.73 小时，可见该细胞系增殖快，恶性程度大。

3. 细胞分裂指数

将第十二代细胞制成 10^4 /ml 悬液，每瓶(内含窄条盖玻片)接种 1 ml，隔日更换培养液，每日取 3 张细胞盖玻片，连续 10 天，细胞盖玻片经 Giemsa 液染色，逐日计 3000 个细胞中的分裂细胞数。(图 2)

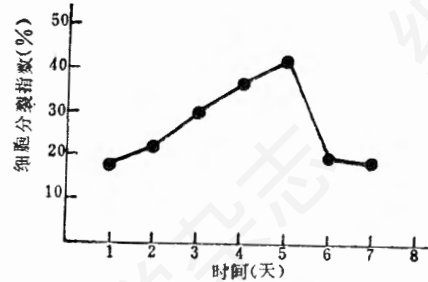


图 2 细胞分裂指数

图示于培养的第 4—5 天细胞分裂达高峰，分裂指数为 42%。

4. 平板集落效应

将第五十三代 45 个细胞/5 ml，接种在 6 cm 直径的培养皿内，共 4 只，置 5% CO₂ 培养箱内，37℃ 静置培养 20 天，吸出培养液加 10% 福尔马林液固定，Giemsa 液染色，计平板集落数，平均集落形成率为 88% ± 7.4。

5. 染色体分析

将第九代、二十七代及五十四代细胞作染色体分析，在传代培养第三天，加秋水仙素，最终浓度为 0.2 μg/ml，培养 3—4 小时后收集细胞，经低渗，固定，制片凉干，Giemsa 液染色。光镜检查计 100 个中期细胞分裂相，

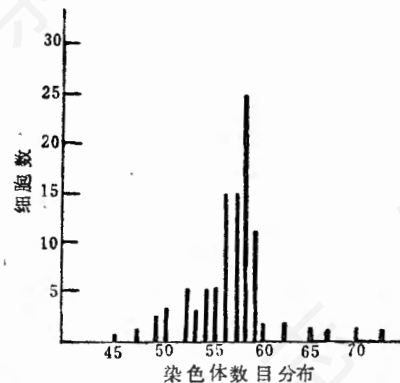


图 3 NGCC-8310 染色体数目分布

观察染色体数目的分布。

观察第二十七代细胞 100 个中期分裂相 (图 3), 染色体数目分布为 47—118, 主峰占 55%, 染色体众数为 58 条, 占 25%, 为超二倍体。

按丹佛体制分组, 各组染色体分布的平均数为: A 组 7.9, B 组 4.5, C 组 20, D 组 5.9, E 组 9.1, F 组 5.2, G 组 3.7, 除 G 组减少外, 其它各组均有不同程度的增加。(图 4)

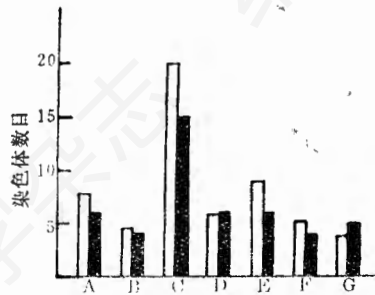


图 4 染色体分布



图 5 NGCC-8310 第 27 代细胞染色体核型

用 G 带分析 20 个中期细胞 (图 5) 发现每个细胞内染色体均见到第 9 号染色体长臂接二条带型, 第 14 号和 15 号染色体随体相接, 为本细胞系的标记染色体。另外 1 号染色体长臂部分断裂丢失, 及环形染色体等畸变现象 (图 6)。三代细胞染色体组型基本一致, 本细胞系染色体形态明显异常, 具有恶性肿瘤细胞的特征。

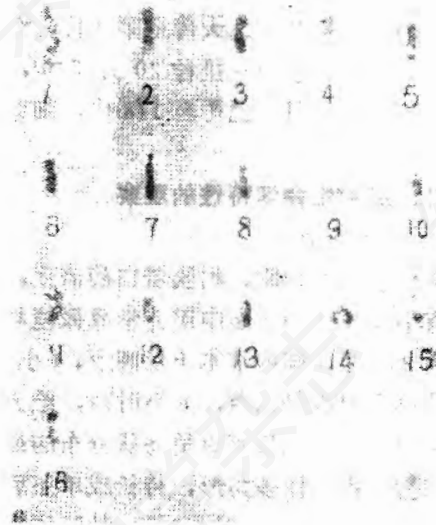


图 6 NGCC-8310 细胞系异常染色体

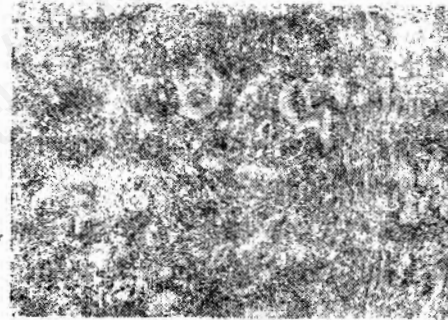


图 7 患者手术标本切片示胃管状腺癌侵及浆膜层 HF×75

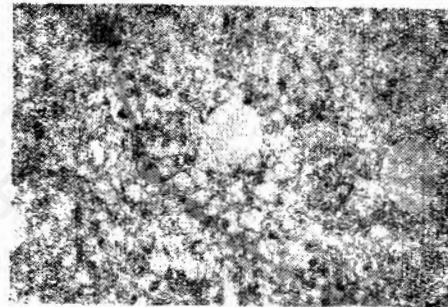


图 8 第 25 代细胞动物接种有管状腺癌结构 H.E×300

6. 动物移植

将第 13 代和第 25 代生长旺盛的细胞, 每代分别制成 $10^7/\text{ml}$ 和 $5 \times 10^8/\text{ml}$ 悬液, 接种 8 只刚断奶、平均体重 110—120 克 Wistar 大白

鼠前肢皮下，每只接种细胞悬液 0.1 ml，接种前一天每只鼠接受 ^{60}Co 全身照射 500 γ ，同时后肢肌肉注射氢化考的松 20 mg/只，接种后第 4 天局部即可触及小结节，于第 7 天、14 天处死动物，作病理学检查。

移植的结果表明，肿瘤生长迅速，成瘤率 100%。病理学观察，细胞体积大，核大深染，染色质较粗，分布不均匀，核分裂相多见，胞浆丰富，部分病理组织学类型与原发癌组织学类型相似。(图 7、8)

7. 透射电镜观察

将传代第三天生长旺盛的细胞，用 Hank's 液冲洗三次，制成细胞悬液，离心沉淀，用 4% 戊二醛经 1% 锇酸双固定，用 Epon 812 包埋，超薄切片，LKBV 型超薄切片机。在国产 DXA4-10 型电镜下观察。

细胞为圆形，椭圆形及不规则形，表面具有较多微绒毛，细胞核大，且形状不规则，多有较深的核切迹，有的形似分叶状。多数细胞有大而明显的核仁，多边集，致密。核异染色质少，而常染色质多。核内可见假包涵体。少量的幼稚细胞，游离核糖体丰富。在有些细胞中具有溶酶体，张力原纤维丝。证明这些细胞为上皮型细胞。未发现病毒颗粒，支原体。(图 9)

8. 液氮冷冻与复苏

传代后第 3—4 天生长旺盛的细胞，用 10% 二甲亚砷制成 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液，分装安瓿作标记，放入纱布袋置液氮罐气态上 30 分钟，再置液氮中。复苏时迅速取出安瓿放 37°C 水浴中速溶，吸出悬液，加入培养瓶中培

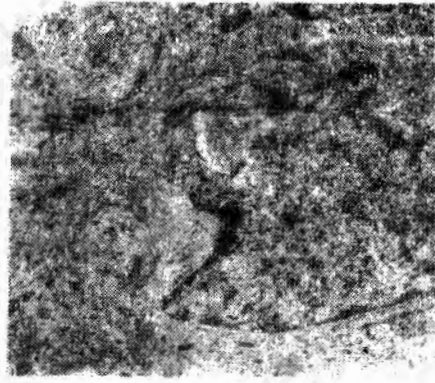


图 9 细胞质中可见张力原纤维丝 $\times 14000$ 倍

养，次日换液，细胞成活率 85% 左右，复苏后细胞形态，染色体分析与冻存前相似。

从本资料综合观察，确定此细胞为人胃管状腺癌细胞系证据是充分的，本细胞系的建立为胃癌的研究提供了一个较好的细胞实验模型。

参 考 文 献

- [1] Rangan, S. R. S., 1972 *Cancer* 29: 117.
- [2] Dobrynin, Yu., 1963, *J. nat. Cancer Inst.*, 31: 1173.
- [3] White, Land. Cox D., 1967, *J. Cancer.*, 21: 684.
- [4] 朱德厚, 1984, 细胞生物学杂志, Vol 6 No 2.
- [5] 董荣春等, 1980, 第二军医大学学报, Vol 1 No 1.
- [6] 陈瑞铭等, 1978, 实验生物学报, 11(1): 37.
- [7] 吴 旻等, 1979, 实验生物学报, 12(1).
- [8] 陈昌伟等, 1983, 北京医学院学报, Vol 15, No 3.
- [9] 王凯华, 1983, 实验生物学报, Vol 16 No 3.
- [10] 大星章一等, 1979 人癌细胞培养, 科学出版社.