

人肺鳞癌细胞系 CHLH-1 建立

刘鸿程,黄盛东,龚德军,刘晓红,袁 阳,徐志云*

(第二军医大学长海医院胸心外科,上海 200433)

[摘要] **目的:**建立人肺鳞癌细胞系,探讨其生物学特性。**方法:**取人肺鳞癌新鲜手术标本,经组织块体外培养并克隆建系,命名为 CHLH-1。采用光镜、电镜、染色体核型分析及异种移植瘤实验对细胞系生物学特性进行观察。**结果:**原位肿瘤、细胞系及移植瘤标本经光镜、电镜证实该细胞系具有鳞状上皮性恶性细胞特征,并观察了其体外生长曲线、倍增时间和分裂指数;染色体核型分析众数为 60~68,为亚三倍体;裸鼠皮下异种移植形成移植瘤。**结论:**根据细胞系特征显示该细胞系是一新建的肺鳞癌细胞系。

[关键词] 鳞癌;细胞系;肺

[中图分类号] R 394.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1375-03

Establishment of human lung squamous carcinoma cell line CHLH-1

LIU Hong-cheng, HUANG Sheng-dong, GONG De-jun, LIU Xiao-hong, YUAN Yang, XU Zhi-yun* (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a human lung squamous carcinoma cell line and to study its biological characteristics. **Methods:** Lung squamous carcinoma specimens were freshly resected during operation; the tissues were incubated *in vitro* and the cell line was named CHLH-1. The biological characteristics of the cells were studied by light microscopy, electron microscopy, chromosome analysis and transplantation experiment. **Results:** Cells from the specimens of the primary tumor, the CHLH-1 cell line and the cells from transplanted tumor possessed the characteristics of malignant squamous epithelium under light and electron microscope. The cell growth curve, doubling time and mitotic index were also observed *in vitro*. Nuclear chromosome analysis revealed that the tumor was a subtriploid with a mode of 60-68 per cell. Tumor nodes were observed under the skin of nude mice by heterogenic transplantation. **Conclusion:** The characteristics of the established cell line suggest that it is a newly established human squamous carcinoma cell line.

[KEY WORDS] squamous carcinoma; cell line; lung

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12): 1375-1377]

肺癌是我国十大恶性肿瘤之一,其死亡率在癌症总死亡率中占第 3 位^[1],近年来,虽然其诊治水平有了较大的提高,但 5 年生存率仍不高^[2]。而建立肺癌细胞系对于研究肺癌演变、侵袭转移、多药耐药的分子机制、生物学特征,以及开发抗肺癌新药等均有十分重要的理论和临床意义^[3]。肺是一个开放性器官,其肿瘤组织易受细菌、霉菌的污染,较难培养。我们利用 1 例肺鳞癌的手术标本,采用原代培养方法建立了一个新的细胞系 CHLH-1,为肿瘤研究工作提供重要的材料。

1 材料和方法

1.1 标本来源 标本取自我科 58 岁男性患者。病理诊断:左肺上叶低至中分化鳞状细胞癌。支气管断端“-”,肺门淋巴结、第 10 组淋巴结转移“+”。

1.2 培养方法 将肿瘤标本浸入含双抗的 RPMI1640,送实验室。在无菌条件下,用含有双抗的 PBS 冲洗,剔除血管、包膜和坏死组织后剪成约 1 mm³的组织块,充分洗涤。在无菌条件下,将剪好的组织块贴于少量培养液的 25 ml 培养瓶壁上,每瓶 12 块,置于 37℃ CO₂ 孵箱。4 h 后接触培养液,使组织块浸于培养液中^[4]。4 d 后半量换液。20 d 后出现细胞克隆,将克隆挑出,胰酶消化传代 1 次。细胞长至 80%左右传代。

1.3 生长曲线 细胞悬液接种于 24 孔板内,接种数量以

7~10 d 能长满但不发生生长抑制为度。隔天取出 3 个孔的细胞进行计数。以培养时间为横轴,细胞数为纵轴,连接成生长曲线^[5]。

1.4 分裂指数 细胞悬液接种于事先放置有小盖玻片的 6 孔板内,接种要求同生长曲线。每 24 h 取出一个玻片,甲醇固定, Giemsa 染色。逐日计数 2 000 个细胞中的中期分裂数,持续分析 1 周。分裂指数 = 分裂象细胞数平均值/总细胞数平均值。

1.5 克隆形成率 接种分散均匀的细胞于 6 孔板中,每孔 1 000 个细胞,静止培养 2~3 周。当培养板中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。甲醇固定加适量 Giemsa 染色,计数克隆数。克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 × 100%。

1.6 染色体分析 取对数生长期的细胞经秋水仙素作用 6 h,经 0.075 mol/L KCl 低渗处理。甲醇-冰醋酸固定处理,冰

[基金项目] 上海市科委基金 (04JC14006)。Supported by Fund of Science and Technology Committee of Shanghai Municipal Government(04JC14006)。

[作者简介] 刘鸿程,博士,主治医师。现在同济大学附属上海市肺科医院胸外科,上海 200433。E-mail:lhcsz@163.com

* Corresponding author. E-mail: zhiyunx@hotmail.com

湿片滴片, 室温老化后用胰酶处理, Giemsa 染色, 油镜下观察染色体数目及形态。

1.7 裸鼠成瘤实验 取 8 代细胞悬液 0.1 ml 接种于 5 只裸鼠背部皮下, 接种细胞量为 5×10^6 /只, 后于 50 代以 5×10^6 /只、 1×10^6 /只接种于 10 只裸鼠背部皮下, 观察瘤结节形成情况。

2 结果

2.1 形态观察

2.1.1 活细胞形态 倒置显微镜下细胞大小不等, 癌细胞呈团块状分布, 细胞体小, 呈圆形, 细胞铺满瓶底后有重叠现象。细胞多呈不规则多角形, 少数为梭形或圆形, 生长旺盛, 可见多个分裂象, 核仁明显(图 1)。



图 1 细胞多呈多角形, 少数为梭形或圆形

Fig 1 Most cells were polygonal and a few were spindle or round ($\times 200$)

2.1.2 电镜 扫描电镜显示细胞表面有皱褶, 周边有微绒毛或指状突起。透射电镜显示细胞外形不规则, 核大有畸变, 核质比例增大, 核膜有凹陷, 有多个核仁, 胞质内有丰富的游离核糖体、线粒体、内质网、溶酶体等细胞器, 清晰可见, 细胞表面有微绒毛(图 2), 可见细胞间紧密连接。

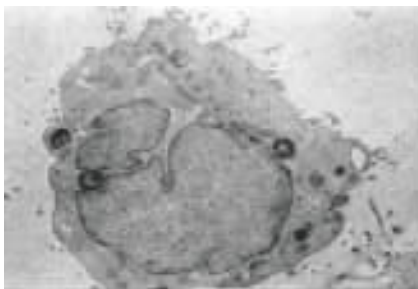


图 2 细胞表面可见微绒毛

Fig 2 Microvilli on cell surface (TEM, $\times 10\ 000$)

2.2 生长情况 生长曲线见图 3。在生长曲线的对数生长期取细胞数成倍生长的两个点作垂直线测定时间, 细胞群体倍增时间为 24.8 h。分裂指数在培养 3 d 细胞达最高峰, 为 49%。克隆形成率为 42%。

2.3 染色体分析 在显微镜下选择分散良好且比较完整的第 12 代中期分裂象进行观察, 计数 100 个分裂象的染色体数目。观察到染色体数目主要分布于 57~66, 染色体众数为 60~68, 多为亚三倍体。

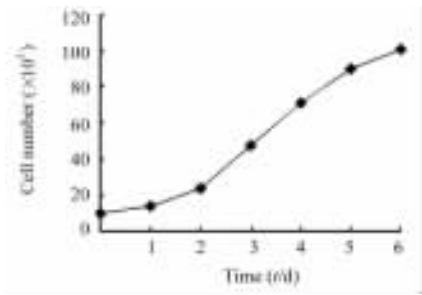


图 3 细胞生长曲线图

Fig 3 Growth curve of cell line CHLC-1

2.4 异种移植 接种 15 只裸鼠 10 d 后在接种处见长出黄豆大小的肿块, 质软, 呈圆形结节状, 裸鼠 4 周时的成瘤性见图 4。病理组织学检查可见癌细胞生长旺盛呈片状, 核分裂象多, 细胞核不均匀增大(图 5), 与该患者原肿瘤标本病理结果基本一致。

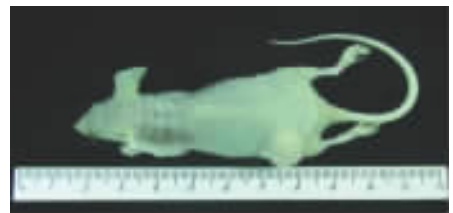


图 4 裸鼠细胞接种后形成的皮下瘤结节

Fig 4 Tumorigenicity test of CHLC-1 in nude mice showing a formed tumor

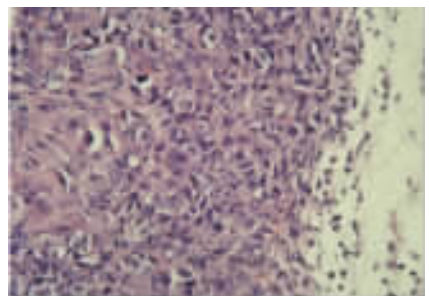


图 5 移植瘤细胞生长旺盛

Fig 5 Vigorous growth of transplanted tumor cells (H-E, $\times 400$)

3 讨论

应用体外建立的肿瘤细胞系进行研究, 对揭示肿瘤发病机制, 寻找诊断肿瘤的有效指标和探索实验性的治疗方案都能提供十分有价值的参考资料。然而, 成功建立一个原发肿瘤的永生细胞系是很困难的。统计结果显示, 在肺癌中建立原发肿瘤细胞系的成功率仅为 3%^[6]。

本实验应用组织块法获得肺鳞癌原代细胞, 为建立细胞系奠定基础。本研究显示我们所建 CHLC-1 细胞系具有典型的恶性上皮细胞形态特点; 裸鼠经接种细胞后产生移植

瘤,其组织病理学特征与原发肿瘤特征一致;经长期传代培养其形态学、细胞动力学及染色体众数等指标无显著改变,表明该细胞系生长稳定,符合一般体外培养细胞系标准。

人肺鳞癌细胞系 CHLH-1 的建立可为深入研究肺鳞癌的发病机制、生物学行为提供细胞学实验模型,并为进一步开展分子生物学、免疫学及临床诊断、治疗等研究提供有利条件。

[参考文献]

- [1] 李连弟, 兽凤珠, 张思维, 等. 1990~1992年中国恶性肿瘤死亡流行分布情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 1996, 18: 403-405.
- [2] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics.

2002[J]. C A Cancer J Clin, 2005, 55: 74-78.

- [3] 周清华. 肺癌新理论与新技术进展[M]. 成都: 四川大学出版社, 2003: 31-65.
- [4] 鄂征. 组织培养和分子生物学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1997: 92-96.
- [5] 司徒镇强. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版公司, 1996: 183-184.
- [6] Park J G, Frucht H, Larocca R V, et al. Characteristic of cell-lines established from human gastric carcinomas[J]. Cancer Res, 1990, 50: 2773-2780.

[收稿日期] 2007-03-09

[修回日期] 2007-10-31

[本文编辑] 尹茶

· 个案报告 ·

精索多形性恶性纤维组织细胞瘤一例报告

Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma of spermatic cord: a case report

卞琦, 杨林军, 傅国平, 任媛媛, 张颖一, 李平*

(第二军医大学长海医院肿瘤科, 上海 200433)

[关键词] 精索; 组织细胞瘤, 纤维; 病例报告

[中图分类号] R 730.262

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2007)12-1377-01

1 临床资料 患者,男,62岁。因“左下腹部胀痛不适4年余,加重1d”于2007年7月14日入院。查体:左腹股沟下部可触及约3cm×3cm肿物,实性,平卧后包块不消失,表面光滑,质中,轻度压痛。盆腔CT提示:左侧阴囊肿块,考虑起源于左侧附睾,左侧精索及阴茎海绵体受累及。穿刺活检提示:左侧睾丸外侧恶性肿瘤。充分术前准备后,于2007年7月17日行肿物切除术,术中在阴囊左侧外上方腹股沟内侧左侧精索残端寻及肿瘤,呈浸润性生长,与周围组织粘连,内下侧与阴茎及尿道海绵体严重粘连,完整分离出肿瘤,外可见包膜,大小约4cm×3.5cm。术后病理报告:(左腹股沟区)肉瘤,倾向于未分化高级别多形性肉瘤/多形性恶性纤维组织细胞瘤。免疫组化:波形蛋白VI(+),肌动蛋白结合蛋白CALP(±),巨噬细胞标志CD68(-),De(-),横纹肌核蛋白MyoD1(-),溶酶体酶Lyso(-),平滑肌肌动蛋白SMA(-),S-100(-),Ki-67(++).患者术后恢复良好。

2 讨论 恶性纤维组织细胞瘤(malignant fibrous histiocytoma, MFH)是一种间叶源性恶性肿瘤,在软组织恶性肿瘤中发病率居首位,可发生于任何部位,好发于肢体近端的深部、腹膜后和躯干,内脏少见。恶性程度高,易发生扩散、转移。目前认为,MFH是一种定义不明确的组织细胞形态分化。最新版WHO分类将其与未分化多形性肉瘤视为同义词,成为一种排除性诊断,占成人肉瘤的5%以下。多形性MFH为MFH中少数未分化高级别多形性肉瘤。其病理诊断是经充分取材和谨慎使用各种辅助检查手段之后,作出的一种排除性诊断,目前的技术水平尚不能确定其分化方向。目前普遍认为所谓多形性MFH的形态结构可见于多种低分化恶性肿瘤,而且这些肿瘤没有真性组织细胞性分化的证据。当有纤维母细胞性或肌纤维母细胞性分化的多形性肉瘤的诊断标准能够确定时,

多形性MFH这一名称可能会完全消失。

本研究中的原发性精索多形性恶性纤维组织细胞瘤非常少见,其发生年龄与其他部位类似,常发生于40岁以上的成年人。病变大多数位于深部(筋膜下方)软组织,而<10%的病变原发于皮下组织。约有58%的精索多形性MFH患者发现时即伴有卫星病灶^[1]。大体病理检查,多为局限性、膨胀性生长的肿物,可有假包膜。肿瘤切面表现多样,可有白色纤维区域或肉质感区,并可混合有坏死、出血和黏液变区。主要治疗是以根治性睾丸切除术为主的综合治疗。如果术中可见卫星灶,则提示预后不良;术后的局部复发率30%~40%,远处转移率39%~78%^[1],常见的转移部位为肺和肠系膜。因此,对于精索恶性纤维组织细胞瘤的患者提倡给予腹膜后淋巴结清扫^[2]。手术切除联合局部放疗可以减少局部复发率^[1]。精索多形性MFH生存期较长,局部淋巴结转移少见^[2];2年生率可达100%^[1],对于根治术后的患者,术后辅助化疗的必要性及有效性仍在进一步探讨中。希望通过对该病例的回顾和复习,能够对该疾病的诊治有所借鉴。

[参考文献]

- [1] de Bruin M J, Pelger R C, Meijer W S, et al. Malignant fibrous histiocytoma of the spermatic cord[J]. J Urol, 1989, 142: 131-133.
- [2] Merimsky O, Terrier P, Bonvalot S, et al. Spermatic cord sarcoma in adults[J]. Acta Oncol, 1999, 38: 635-638.

[收稿日期] 2007-09-05

[修回日期] 2007-12-10

[本文编辑] 贾泽军

[作者简介] 卞琦, 硕士生. E-mail: bytoug@163.com

* Corresponding author. E-mail: liping1965@163.com