

# 人肺癌细胞系 HB-99 的建立及其生物学特征

黄 昀<sup>1</sup> 吴 焱<sup>1</sup> 杨焕杰<sup>1</sup> 张临友<sup>2</sup> 傅松滨<sup>1</sup> 刘权章<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨医科大学医学遗传学教研室, 哈尔滨 150086 2. 哈尔滨医科大学附属第二医院胸外科, 哈尔滨 150086)

**摘 要** 利用一例肺鳞癌手术标本通过原代培养建立了肺癌细胞系命名为 HB-99。该细胞系呈单层贴壁生长, 从相差显微镜和电镜分析具有细胞的多形性, 细胞倍增时间为 24 小时, 克隆形成率 40%, 染色体改变复杂, 众数 63-65。将细胞移植到裸鼠体内而生长的肿块具有与原始病人手术标本相似的组织形态。免疫组织化学分析, 近 100% 的细胞表达角蛋白 17 (CK17), 10% 的细胞表达波形蛋白 (vimentin)。根据该细胞系的生物学特征提示 HB-99 是一新建立的肺鳞癌细胞系。

**关键词** 肺癌 细胞系 生物学特征

中图分类号: Q235, R730.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-977X(2001)02-0103-04

## Establishment and Characterization of Human Lung Carcinoma Cell Line HB-99

HUANG Yun<sup>1</sup>, WU Yan<sup>1</sup>, YANG Huan-jie<sup>1</sup>,  
ZHANG Lin-you<sup>2</sup>, FU Song-bin<sup>2</sup>, LIU Quan-zhang<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086, China;

2. Department of Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

**Abstract** We have established a human lung squamous carcinoma cell line (designated HB-99), by culturing primary tumor sample. The cells of HB-99 derived from resected specimen of a male patient with lung squamous cancer. They grew in monolayers and showed cellular morphology by phase contrast and electronic microscopy. The HB-99 cells had a doubling time of 24 hours and a cloning efficiency of 40%. Chromosomal analysis showed complicated rearrangements with a modal number of 63~65. When hetero-transplanted to nude mice, HB-99 grew to form tumor with the same morphology as the original one from the patient. The results of immunohistochemistry suggested that CK17 expressed in almost all cells while only 5%~10% cells had Vimentin. HB-99 is really a newly established cell line of lung squamous carcinoma.

**Key words** lung carcinoma; cell line; characterization

在我国, 恶性肿瘤占人口死亡原因的第二位, 肺癌的死亡率是 17.54/10 万, 占因肿瘤死亡的第三位 (16.20%)<sup>[1,2]</sup>。对肿瘤的研究已经从肿瘤的发生机制深入到基因治疗的领域。一方面在实验中对材料的需求增多, 而另一方面由于诊断和治疗技术的增

强, 癌症在早期就获得非手术的放、化疗治疗, 使得手术来源的肿瘤块减少。这一矛盾的结果是需要更多的细胞系来进行肿瘤的发展、侵袭、转移等机制的研究。我们于 1999 年自一例肺鳞癌的手术标本取材, 采用原代培养方法建立了一个新的细胞系

收稿日期: 2000-04-03; 修回日期: 2000-06-06

基金项目: 黑龙江省科学技术计划攻关和青年科学技术攻关项目 (G99C20-6-1) 资助

作者简介: 黄昀 (1972-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 医学遗传学。E-mail: huangyun@ems.hrbmu.edu.cn; Tel: 0451-6674798

致谢: 本实验的取材得到哈尔滨医科大学第二附属医院胸外科、临床病理科的协助; 电镜观察由哈尔滨医科大学电镜中心全体同志协助完成, 对以上同志谨表谢忱。

HB-99。根据第二届全国细胞和组织培养专题讨论会通过的人的恶性肿瘤连续性细胞系(株)的建系标准进行初步的生物学特征的鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

手术标本取自哈尔滨医科大学第二临床医学院胸外科 50 岁男性患者。病理诊断:左肺下叶中心型鳞状细胞癌二级。支气管断端(-),左主支气管旁靠上叶侧淋巴结癌转移(+)(图 1)。

### 1.2 方法

1.2.1 原代培养 方法参照文献[3]略加修改。20 天后出现若干个克隆,将最大的克隆挑出,用 0.25% Trypsin 消化传代一次。此后,细胞长至 80% 左右再传代。

1.2.2 分裂指数、生长曲线 分析方法参考文献[4]

1.2.3 平板克隆形成实验 6 孔板每孔( $\Phi 35\text{mm}$ )接种 500-1000 个细胞,为精确实验作 3 个复孔。静止培养 2~3 周,出现肉眼可见的克隆( $\Phi 0.1\sim 0.3\text{mm}$ )或 50 个细胞时停止培养,固定后细胞计数。

1.2.4 染色体制备 常规方法制备染色体[5],G 显带后,根据 ISCN 标准进行核型分析[6]

1.2.5 免疫组化方法 细胞在盖玻片上生长,生长至 80% 时冷丙酮固定,做波形蛋白 vimentin、角蛋白 CK17 为一抗, DAB 染色的免疫组织化学,操作过

程按常规方法略加改进。

1.2.6 裸鼠成瘤实验 在 4~6 周龄裸鼠(BALB/c 遗传背景,SPF 环境下饲养)背部皮下注射  $2 \times 10^6/0.2\text{ml}$  收获的呈指数生长的培养细胞,3 周后观察。

## 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,细胞体小而圆形。细胞铺满瓶底后有重叠现象。呈多角形,大小异型性明显,有多核巨细胞,核浆比例倒置,核内不均匀性,染色质增加,核仁增大、多。有丝分裂相多见。

2.1.2 电镜 透射电镜观察可见细胞外形不规则,细胞体积大,周边有大量的微绒毛或指状突起。核大有畸变,核浆比例失调,核膜有凹陷,核仁明显数目 0~5 个,有双核及多核细胞。可见分裂相,并有多极分裂。细胞间是发育较差的间桥连接,细胞内能见到张力丝(图 2)。

### 2.2 生长情况:

2.2.1 分裂指数(图 3)

分裂指数 = 分裂相细胞数平均值/总细胞数平均值

2.2.2 生长曲线(图 4)

2.2.3 细胞群体倍增时间 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 24 小时。

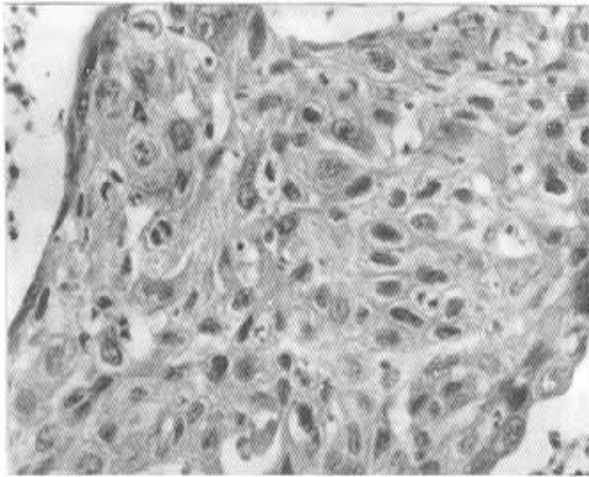


图 1 患者临床病理结果(HE 染色)

Fig.1 Clinic pathology from the patient (HE staining)

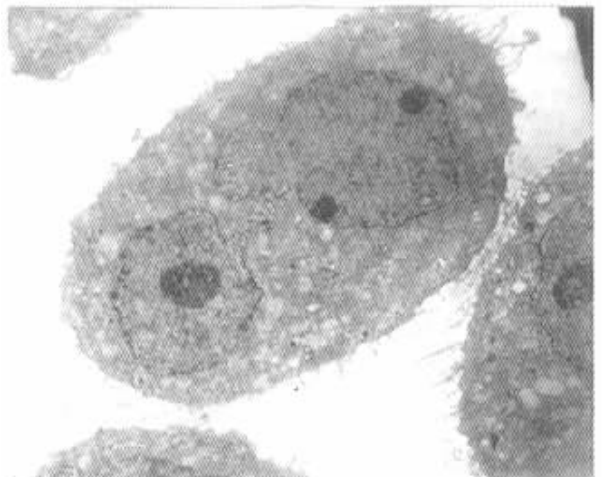


图 2 透射电镜结果

双核,核仁明显,细胞表面有大量绒毛( $\times 5000$ ).  
Fig.2 Result of transmission electron microscope (TEM): double karyons with distinct nucleolus and cell membrane having abundant villi ( $\times 5000$ ).

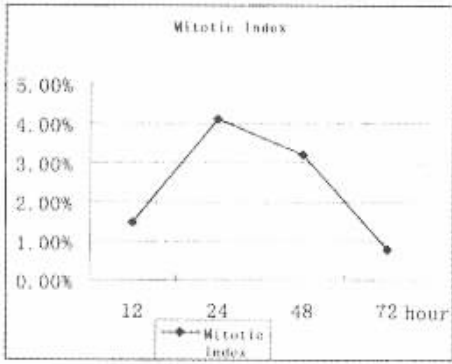


图 3 分裂指数

Fig.3 Mitotic index

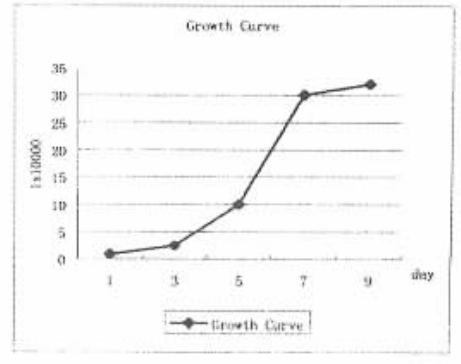


图 4 生长曲线

Fig.4 Growth curve

2.2.2.4 集落形成率 克隆形成率为 35% ~ 40%。  
 克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数 × 100%

### 2.3 染色体分析

2.3.1 染色体众数 显微镜下选择分散好、较完整的第 11 代中期分裂相进行观察,共观察了 100 个分裂相的染色体。染色体数目为 46 ~ 66,众数为 63 ~ 65 (54%)

2.3.2 特殊标记染色体 选择分散良好的第 19 代中期分裂相进行 G 显带染色体分析,根据 ISCN 1985 标准进行分组鉴定: + 1、- 3、- 5、+ 7、+ 9、+

9、+ 13、+ 16、+ 17、+ 17、+ 18、- 19、+ 20、- 21、+ X。另有 12 个 Marker 染色体(图 5)。

### 2.4 免疫组化结果

CK17 在几乎所有的细胞中均有表达, vimentin 在约 10% 的细胞中有表达(图 6,图 7)。

### 2.5 裸鼠成瘤实验

4 ~ 6 周瘤块长至 Φ0.8 ~ 1.0cm 左右的时候,用断颈法将鼠处死。可见多结节状浸润性生长,镜检观察细胞生长旺盛,异型性明显,呈鳞状细胞癌状生长。

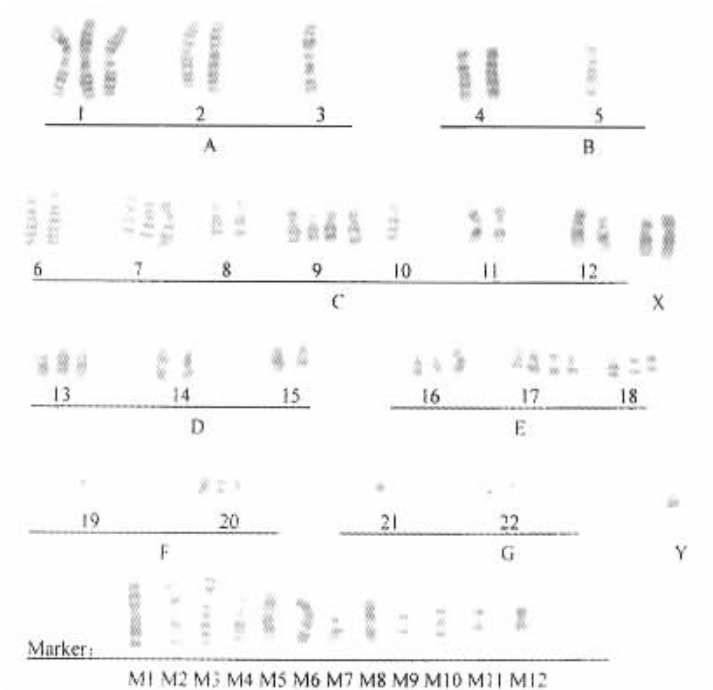


图 5 染色体分析结果(染色体数 64;有 12 条标记染色体)

Fig.5 G-banded Karyotype with a modal number of 64 and 12 marker chromosomes

### 3 讨论

肿瘤对人类的健康影响很大,目前对肿瘤的研究已经从细胞遗传学水平上升到分子遗传学和分子细胞遗传学的水平,人肿瘤细胞系的建立已为肿瘤的研究提供了重要材料。用一对来源相同但转移能力不同的人肺腺癌细胞系 AGZY83-A 和 Anip-973<sup>[7,8]</sup>,已克隆出与肿瘤转移相关的基因<sup>[9]</sup>。

体外培养的细胞系 HB-99 能够长期旺盛增殖,并稳定传代。它的异型性明显,分裂指数高,细胞呈指数生长。染色体数目为亚三倍体,有明显的染色体异常。接触抑制消失可以聚堆生长形成集落。

在组织来源的分析中,波形蛋白 vimentin 在间

质和中胚层起源的组织中表达,如正常或病理性的成纤维细胞、内皮细胞、淋巴细胞和黑色素细胞等。细胞角蛋白 17(CK17)在复层上皮、气管/喉/支气管假复层上皮的基底细胞表达,以及在肿瘤组织中可识别肺、子宫颈和口腔的鳞状上皮癌。

在免疫组织化学分析中,尽管 vimentin 有部分表达,但由于无论何种细胞在体外培养时一般也会出现阳性<sup>[10]</sup>,CK17 的阳性结果说明该细胞具有鳞状上皮的特性。电镜分析发现细胞内存在张力丝亦能证实该细胞的组织来源是鳞状上皮类细胞。

HB-99 的裸鼠成瘤实验显示,生长出的瘤块病理改变与原发肺癌病理具有相同的组织学特点,从而进一步说明是一个肺鳞癌细胞系。

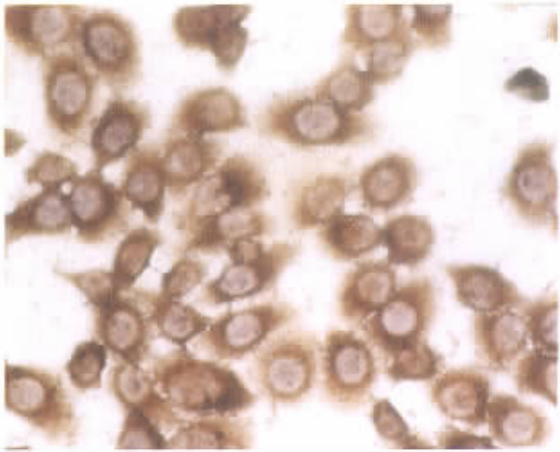


图6 角蛋白 17(CK17)为一抗的免疫组织化学结果  
几乎所有的细胞均有表达

Fig. 6 Almost all the cells expressed CK17 by immunohistochemistry

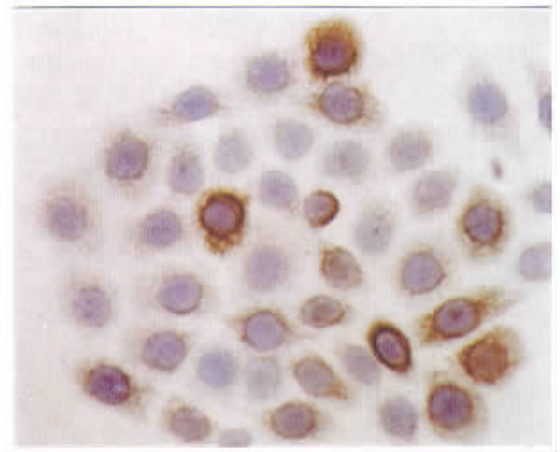


图7 波形蛋白为一抗的免疫组织化学结果  
约 10% 的细胞有表达

Fig. 7 10% cells expressed Vimentin by immunohistochemistry

### 参考文献(References):

- [1] 李连弟,鲁凤珠,张思维. 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(6): 403~407.
- [2] 李连弟,张思维,鲁凤珠. 中国恶性肿瘤死亡谱及分类构成特征研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1997, 19(5): 323~328.
- [3] 鄂征主编. 组织培养和分子生物学技术[M]. 北京出版社, 1997, 92~96.
- [4] 司徒镇强主编. 细胞培养[M]. 北京:世界图书出版公司, 1996, 183~184.
- [5] 刘权章主编. 人类染色体方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1992, 269~271.
- [6] Mitelman F. An international system for human cytogenetic nomenclature

- [M]. S Karger: Basel, 1995.
- [7] 王玉利,王吾茹. 人肺腺癌细胞系的建立及生物学特征[J]. 肿瘤临床, 1985, 1(3): 184~187.
- [8] 王吾茹,潘忠诚,袁孝纯,等. 裸小鼠腹腔内筛选转移人肺腺癌细胞及其生物学特征的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1987, 9(6): 412~415.
- [9] Li Yu, Feng Hui-chen, Yu Chen, et al. Differential Expression of RAB5A in Human Lung Adenocarcinoma Cells with Different Metastasis Potential[J]. Clinical and Experimental Metastasis, 1999, 17: 213~219.
- [10] 宋今丹主编. 医学细胞生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1997, 127.