

# 中国人类遗传资源 实体瘤永生细胞系建立技术规程

Technical Specification for Establishing Solid Tumors  
Cell lines of Chinese Genetic Resources

(讨论稿)

中国人类遗传资源平台项目组

2007年5月

## 前 言

细胞培养技术是生命科学研究的基础，也是当今细胞工程乃至基因工程的应用基础。目前细胞培养技术已广泛应用于肿瘤学领域，肿瘤细胞培养是研究肿瘤细胞的生物学特性、肿瘤发生发展机制和抗肿瘤药物敏感性等的重要技术。建立连续性肿瘤细胞系为各种肿瘤研究提供良好材料。实体瘤细胞系是特殊的肿瘤细胞系，其建立有自身的特点，为规范实体瘤连续性细胞系建立标准，特制订《实体瘤连续性细胞系建立技术规程》。

本规程根据目前的研究积累并参考国际相关做法，结合在第二届全国细胞和组织培养专题讨论会上通过的《人的恶性肿瘤连续性细胞系（株）的建系（株）标准》及国外相关领域技术规程，特制定一个从实体瘤细胞的取材、培养方法、成纤维细胞的排除和质量监控等方面的全国统一规程。该规程的制定从技术标准和安全标准方面提出了原则性要求。适用于肿瘤相关研究，主要涉及基础研究、临床诊治和公共卫生预防的三个方面，因此在临床医院、研究单位、医学院校和国际交流中应按本技术规程执行。

# 目次

1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 规范性技术要素 .....	3
4.1 实验设置、设备 .....	3
4.2 细胞培养用液.....	4
4.3 实体瘤细胞的取材.....	4
4.4 实体瘤细胞的培养.....	5
4.5 成纤维细胞的排除.....	9
4.6 细胞的克隆化.....	12
4.7 提高肿瘤细胞培养存活率和生长率措施.....	15
4.8 在实体瘤细胞培养中应注意的问题.....	16
5 培养肿瘤细胞的生物学特性的检测 .....	18
6 质量监控 .....	19
附录 A (资料性附录) 胰蛋白酶和胶原酶的生物学特点 .....	21
附录 B (资料性附录) 肿瘤细胞培养的生物学特性 .....	24
附录 C (规范性附录) 人类恶性肿瘤连续性细胞系(株)的建系(株)标准 ..	28
附录 D (资料性附录) 传代细胞的建系和维持 .....	33
参考文献 .....	34

# 实体瘤细胞系建立技术规程

## 1 范围

本规程规定建立实体瘤连续性细胞系的技术标准和安全标准。

本规程适用于在我国建立实体瘤连续性细胞系，确定实体瘤细胞的取材、实体瘤连续性细胞系的培养方法、成纤维细胞的排除和质量监控等方面的标准操作和一般原则。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规程的引用而成为本规程的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规程，然而，鼓励根据本规程达成协议的各方研究是否可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规程。

GB/T 1.1-2000 标准的结构和编写规则

ICD-10 WHO 国际疾病分类编码

ICD-10 中国修订版

GB 19489—2004 实验室生物安全通用要求

《遗传资源的共享原则》

《赫尔辛基宣言》

《液氮库的管理办法》

美国 人遗传学细胞库从人群中采集样品、存储及研究的政策（Policy for the Responsible Collection, Storage, and Research Use of Samples from Named Populations for the NIGMS Human Genetic Cell Repository）

英国 国家菌种保藏中心（the United Kingdom National Culture Collection, UKNCC）菌种保藏质量手册

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本规程。

### 3.1 实体瘤 solid tumor

机体在各种致癌因素作用下，局部组织的细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控，导致异常增生而形成的新生物，这种新生物常形成局部肿块，即呈实体肿块状生长。

### 3.2 细胞培养 cell culture

是指单个细胞或细胞群在体外条件下的培养技术。即无菌条件下，从机体中取出小块组织或细胞，模拟机体内正常生理状态下生存的基本条件，使之能在培养器皿中继续生存、生长、甚至增殖的一种方法。

### 3.3 单层细胞 single layer cell

分散呈圆球形的细胞一经贴壁就迅速铺展并开始有丝分裂，逐渐形成致密的细胞单层，称为单层细胞。

### 3.4 原代培养 primary culture

直接从体内获取的组织或细胞进行首次培养即原代培养。

### 3.5 次代培养 subculture

原代培养的细胞传至 5~10 代以内通常称为次代培养。

### 3.6 传代培养 serial subculture

当原代细胞经增殖达到一定密度后，将细胞分散，从一个培养器皿以一定比例移到另一个或几个容器中的扩大培养，为传代培养。传一次习惯上称为一代。

### 3.7 细胞系 cell line

原代细胞经首次传代成功后的细胞，称为细胞系。

### 3.8 有限细胞系 finite cell line

细胞系不能继续传代或传代次数有限，则称为有限细胞系。

### 3.9 Hayflick 界限 Hayflick limitation

细胞（至少培养细胞）不是不死的，而是有一定的寿命，它们的增殖能力不是无限的，而是有一定的界限，即 Hayflick 界限。

### 3.10 连续性细胞系 continuous cell line

细胞发生遗传突变后，在培养条件下可以无限制地传代下去而不凋亡，称为

连续性细胞系。

### 3.11 细胞株 cell strain

从一个经过生物学鉴定的细胞系中用单细胞分离培养或通过筛选的方法由单细胞增殖形成具有特殊性质或标志物的细胞群，称为细胞株。细胞株的特殊性质或标志必须在整个培养期间始终存在。

## 4 规范性技术要素

### 4.1 实验设置、设备

#### 4.1.1 无菌工作区

条件较好的实验室可以设置无菌操作室，划分为更衣间、缓冲间和操作间三部分。操作间为密闭式，一般的空气消毒采用紫外线灯、无臭氧紫外线消毒器或电子消毒灭菌器。

#### 4.1.2 超净工作台

超净工作台为培养工作提供了良好的无菌操作环境。即使在不装备单独的无菌操作室，只要安装了超净工作台，也能基本上满足细胞培养国内工作的需要。

#### 4.1.3 实验设备

##### 4.1.3.1 倒置显微镜

用于观察细胞的生长情况并观察有无污染。

##### 4.1.3.2 培养箱

一般常用CO<sub>2</sub>培养箱，提供5%CO<sub>2</sub>浓度，保持培养液的pH稳定，适用于开放或半开放培养。

##### 4.1.3.3 冰箱

用以短期或长期储存培养时所需的各种试剂。

##### 4.1.3.4 离心机及天平

适用于细胞洗涤、收集和制备细胞悬液等工作。一般可常规配置4 000 rpm的国产台式离心机。天平适用于称量药品和离心时的配平。

##### 4.1.3.5 消毒器

常用高压蒸汽消毒器。

## 4.2 细胞培养用液

### 4.2.1 平衡盐溶液

平衡盐溶液是组织细胞培养时常用的基本液体，可以维持细胞的渗透压、调节 pH 值以及提供细胞生存所需的无机离子成分，常用于细胞、组织的洗涤。常用 PBS、Hanks 液体。

### 4.2.2 消化液

常用的消化液为胰蛋白酶、EDTA 以及胶原酶。胰蛋白酶的浓度为 0.25%；EDTA 为 0.02%；胶原酶为 200 U/mL。消化液的配制方法参见《分子克隆实验指南》，胰蛋白酶和胶原酶的生物学特点参见附录 A。

### 4.2.3 细胞培养液

细胞培养液是细胞赖以在体外生长、增殖、分化的重要因素。实体瘤细胞对培养液的要求不如正常细胞严格，一般常用 RPMI-1640、DMEM、Mc-Coy5A 和 MEM 等培养液用于肿瘤细胞培养。可以根据相关文献或实验需要进行选择，常用的培养液的成分以及配制方法可参见《细胞培养》。

实体瘤细胞对血清的需求比正常细胞低，10%的血清浓度即可。在原代培养时最好加入生长因子或原患者血清(1%~2%)则更有利于细胞培养成功。实体瘤细胞对培养环境适应性较大，是由于肿瘤细胞通过自泌（autocrine）产生促生长因子促进实体瘤细胞的生长。不同组织来源的细胞需要不同的生长因子，有的还需特异性生长因子（如乳腺癌细胞）。

## 4.3 实体瘤细胞的取材

### 4.3.1 取材部位

人实体瘤细胞培养所用材料一般取自术后或活检瘤组织，通常取原发灶或转移灶。取材部位非常重要，体积较大的肿瘤组织中有退变或坏死区，取材时尽量避免用退变组织，要挑选活力较好的部位。

可取癌性转移淋巴结或胸、腹水。

### 4.3.2 取材的基本要求和注意事项

——应取未经任何治疗的标本进行培养。取材应注意组织类型、分化程度、年龄

等因素，一般来讲，胚胎组织较成熟个体组织容易培养，分化低的较分化高的组织容易生长，取材时应尽量选用易培养的组织进行培养

——所取材料要新鲜和保鲜。一般认为材料越新鲜，培养成功的机会越多。

——仔细去除所取样本上的血液（血块）、脂肪、神经组织、坏死组织及结缔组织。

——取材后，尽早浸入无血清培养液保鲜，在 4~6 h 内能尽快将组织块解离、培养；若不能即时培养，应将组织浸泡于培养液内，于 4℃ 存放。若所取组织块较大，应及时清除表面血块、坏死组织、脂肪和结缔组织后，将其切成 1 cm<sup>3</sup> 以下的小块后置于培养液内 4℃ 存放，但时间不宜超过 12 h。对于已切碎的实体瘤组织或淋巴组织应加入含 10% 二甲基亚砷（DMSO）培养液，按细胞冻存方式于液氮中冷冻保存。但是冻存后的组织培养成功率降低。

——取材及操作保持无菌。所取取材过程应在无菌条件下进行。尽可能避开溃疡或坏死部位，从实体瘤组织深部取材并尽可能去除溃疡及坏死组织，避免细菌、霉菌污染。对有可能被霉菌或细菌污染的实体瘤组织，如口腔、消化道、呼吸道及生殖道等与外界交通的部位，应在培养前将所取组织放入含二性霉素 B 2 μg/ml、青霉素 200~1000 U/ml、链霉素 500 μg/ml 的培养液中浸泡 10~20 min，再用 PBS 或无血清培养液反复冲洗 2~3 次，确保所取材料无菌再作培养。所取材料应避免接触影响细胞培养的有毒有害的化学物质，如碘、汞等。

——取材和原代培养操作过程中，要用锋利的器械如手术刀切碎组织，尽可能减少对细胞的机械损伤。切碎组织时应避免组织干燥，可在含少量培养液的器皿中进行。

——当胸、腹水中存在较多瘤细胞时，可通过离心收集瘤细胞。在无菌条件下抽取体腔液，无需加抗凝剂，直接以 500~1 200 rpm 的低转速离心 5~10 min 收集细胞。不要久置或在冰中冷却，应及早培养。

——对组织的来源、部位、包括供体的一般情况要做详细的记录，以备建系资料查询。

#### 4.4 实体瘤细胞的培养

#### 4.4.1 原理

实体瘤组织是由紧密结合的多种细胞和纤维成分组成,不利于各个细胞在体外培养中生长繁殖,即使采用  $1\text{ mm}^3$  的组织块,也仅有少量处于周边的细胞可能生存和生长。若要获得大量生长良好的细胞,必将组织块充分分散,使细胞解离形成细胞悬液。实体瘤细胞的培养方法很多,主要有组织块培养法、酶消化法、钽网法、脱落细胞法等,目前最常用的方法是组织块培养法和酶消化法。

#### 4.4.2 操作方法

##### 4.4.2.1 组织块培养法

组织块培养是常用、简便易行和成功率较高的原代培养方法,也是早期采用培养细胞的方法,故以往称组织培养。

##### 4.4.2.1.1 培养器皿准备

预先在培养的平皿或培养瓶底壁涂一薄层血清或鼠尾胶原,以利于组织块黏附。

##### 4.4.2.1.2 切碎组织

按照前述原则方法取材,充分去除血液、脂肪、结缔组织及坏死部分,在平皿中用PBS或Hanks液清洗2~3次,将组织切成  $1\text{ mm}^3$  小块。在平皿中加入少量培养液使组织保持湿润。

##### 4.4.2.1.3 接种

将组织小块均匀涂布于瓶壁,每小块间距  $0.2\text{ cm}\sim 0.5\text{ cm}$ ,一般在  $25\text{ mL}$  培养瓶(底面积为  $17.5\text{ cm}^2$ )可接种20~30小块为宜,小块放置后,轻轻翻转培养瓶,使瓶底朝上,然后于瓶内加入适量培养液盖好瓶塞,将瓶倾斜放置在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  的恒温培养箱内。若是使用平皿,则加入少量培养液使组织保持湿润,静置培养使组织块贴附。

##### 4.4.2.1.4 培养

培养2~4 h待小块贴附后,将培养瓶缓慢翻转平放,静置培养,动作要轻,严禁摇动和来回振荡,以防由于冲力而使小块漂起而造成培养失败。开始培养时培养液不宜多,以保持组织块湿润即可,培养24 h后再补液,培养初期移动和

观察时要轻拿轻放，开始几天尽量不去搬动，以利贴壁和生长，培养 3~5 d 时换液，一方面补充营养，一方面去除代谢产物和漂浮小块所产生的毒性作用。

#### 4.4.2.1.5 观察

部分种类的组织细胞在小块贴壁 24 h 后，组织块周边的细胞能沿瓶壁从组织块四周游出，然后逐渐延伸，长成肉眼可以观察到的生长晕，5~7 d 后组织块中央的组织细胞逐渐坏死脱落和发生漂浮，此漂浮小块可随换液而弃去，由组织块周围延伸的贴壁细胞也逐渐形成层片，可在显微镜下观察形态，去除成纤维细胞和用于实验研究。

#### 4.4.2.2 消化培养法

消化培养法是把组织剪切成较小团块（或糊状），应用酶（胰蛋白酶或胶原酶）的生化作用和非酶（EDTA）的化学作用进一步使细胞间连接结构松动，将妨碍细胞生长的细胞间质（包括基质、纤维等）去除，使团块分散，由块状变成絮状，再用用吸管吹打使细胞团块得以较充分的分散，制成少量细胞群团和大量单个细胞的细胞悬液，接种培养后细胞容易贴壁生长。

##### 4.4.2.2.1 酶消化法

酶消化法常采用胰蛋白酶或胶原酶，胰蛋白酶和胶原酶的生物学特点见附录 A。其分离方法如下：

1) 切碎组织。按照前述原则方法取材，充分去除血液、脂肪、结缔组织及坏死部分，在平皿中用 PBS 或 Hanks 液清洗 2~3 次，将组织切成 1~2 mm 左右，用 PBS 或 Hanks 液清洗 2~3 次以除去血液和脂肪组织。

2) 消化。可以采用下述方法将组织块消化成单细胞。

——冷消化过夜。在切碎的组织中加入 0.25%新鲜配置的胰蛋白酶或 200 U/mL 胶原酶，摇匀后放 4℃ 过夜（中间可轻摇 1~2 次），次日再用 PBS 或 Hanks 液洗涤，低转速离心后弃去上清液，共洗 2~3 次。加入少量培养液吹打、分散细胞，细胞计数后按适当的浓度分瓶培养。

——多次热消化。在组织块中加入 0.25%新鲜配置的胰蛋白酶或 200 U/mL 胶原酶 37℃ 水浴中消化 15~20 min（中间可轻摇 1~2 次），然后经洗涤后用培养液分

散制成细胞悬液，按合适的浓度分瓶培养，未彻底消化的小组织块按上述方法重复操作，再提取消化细胞。

——先热消化后冷消化。将组织块先用胰蛋白酶或胶原酶于 37℃ 水浴中消化 20 min，经洗涤后用培养液分散制成细胞悬液，未彻底消化的小组织块经洗涤后用胰蛋白酶或胶原酶于 4℃ 下过夜，次日再提取细胞分散成细胞悬液，分瓶培养。

3) 细胞培养。细胞以  $5 \times 10^8 \sim 10 \times 10^8$  /L 细胞浓度，在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 全培养液中于 37℃，5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱内培养。

#### 4.4.2.2.2 非酶消化法（EDTA 消化法）

EDTA 是一种非酶促的螯合剂，全名为乙烯二胺四乙酸。用 PBS 配成 0.02% 的工作液，对上皮组织分散效果良好。EDTA 与细胞上的钙、镁离子结合形成螯合物使细胞变圆、分散或使贴壁细胞从瓶壁上脱离，缺点是细胞易裂解或贴壁细胞从瓶壁上脱离时呈片状，有团块，常不单独使用，但可与胰蛋白酶混合使用（1:1 或 2:1），不仅利于细胞脱壁又利于细胞分散，降低胰酶的用量和毒性作用。其分离方法如下。

1) 切碎组织。按照前述原则方法取材并切碎组织。

2) 消化。加入消化液（EDTA 或 EDTA 与胰蛋白酶的混和消化液）于 37℃ 水浴中作用适当时间（中间可轻摇 1~2 次），若组织块膨松呈絮状即可终止消化，若变化不大可更换一次消化液，继续消化直至膨松絮状为止。

3) 漂洗。采用自然沉降或低速离心法尽量弃去消化液。将含有钙、镁离子的培养液沿瓶壁缓缓加入中止消化反应，漂洗 2~3 次后，加入完全培养液。

4) 机械分散。吸管轻轻吹打使细胞充分散成细胞悬液。

5) 细胞培养。按前述方法进行细胞培养。

#### 4.4.2.2.3 注意事项

——在加消化液之前组织块必须经过充分漂洗。一般漂洗 2~3 次以除去组织中的钙、镁离子和血清对胰蛋白酶和 EDTA 的抑制作用。

——胰蛋白酶浓度不宜过高，作用时间不能太长，可以采取多次消化法以避免对细胞的毒性作用。

——消化后的细胞要尽量弃去消化液并经过充分漂洗，以避免消化液对细胞的毒性作用，而且动作要轻柔，以避免细胞的丢失和破损。

——细胞接种时浓度要稍大一些，至少为  $5 \times 10^8/L$ ，培养液可用Eagle(MEM)、DMEM或RPMI-1640 培养，胎牛血清浓度为 10%~20%。在培养的初始 2 d中尽量减少振荡，以防止刚贴壁的细胞发生脱落，漂浮。

#### 4.4.2.3 钽网培养法

在一张面积约为  $1 \text{ cm}^2$ 的钽网上放入一块或几块上述切碎的实体瘤组织块 ( $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ 大小)，用镊子轻压，使其粘于网上，再把钽网放入培养皿中，使网下的组织块与皿壁紧紧接触，于  $37^\circ\text{C}$ ，5% $\text{CO}_2$ 的恒温培养箱内培养，每隔 2~3 d换液，5 d后可见有上皮细胞从网上移出，并能在相当于肿瘤组织部位形成纯净的单层上皮细胞。

#### 4.4.2.4 脱落细胞培养法

按照前述原则方法取材去除脂肪和结缔组织，组织块清洗 2~3 次后，用刀片将实体瘤组织切成细薄片，在切割的同时有许多单细胞脱落，脱落的细胞经洗涤后，加入完全培养液进行培养。但此种方法取得的细胞量相对较少，培养不易取得成功。

### 4.5 成纤维细胞的排除

#### 4.5.1 目的

在实体瘤的原代培养过程中，常在培养物中混有正常成纤维细胞。这些成纤维细胞，由于它比肿瘤细胞生长快，最终能抑制肿瘤细胞的生长。因此，尽早排除成纤维细胞，已成为实体瘤细胞长期培养建系的关键。

#### 4.5.2 操作方法

##### 4.5.2.1 机械刮除法

###### 4.5.2.1.1 原理

原代培养的肿瘤细胞，肿瘤上皮细胞和成纤维细胞分区成片混杂生长，每种细胞都以小片或区域性分布的方式生长在瓶壁上。可采用机械的方法去除不需要的细胞区域而保留需要的细胞区域。

#### 4.5.2.1.2 方法

- 1) 标记。镜下观察，用标记笔在培养瓶皿的背面圈下生长肿瘤细胞的部位。
- 2) 刮除。弃掉培养液，把无菌细胞刮伸入瓶皿中，肉眼或显微镜观察下，刮除无标记空间中的大量的成纤维细胞，使被刮除细胞悬浮。注意不要伤及所需细胞。
- 3) 清洗。推刮后用 PBS 或 Hanks 液冲洗 1~2 次，清除被刮掉的细胞。
- 4) 培养。注入培养液继续培养，如发现仍有成纤维细胞残留，可重复刮除至完全除掉为止。

#### 4.5.2.2 反复贴壁法

##### 4.5.2.2.1 原理

成纤维细胞与上皮细胞相比，其贴壁过程快。大部分成纤维细胞能在大约 10~30 min 的短时间内完成附着过程（但不一定完全伸展），而大部分上皮细胞在短时间内不能附着或附着不稳定，稍加振荡即浮起，利用此差别可以纯化细胞。在反复贴壁法中结合使用不加血清的培养液，使上皮细胞的贴壁速度更慢，把含有两类细胞的细胞悬液反复贴壁，使两类细胞相互分离。操作方法与传代培养相同。

##### 4.5.2.2.2 方法

- 1) 待细胞生长达一定数量后，弃去旧培养液并用 PBS 冲洗后，加入 0.25% 的胰蛋白酶进行消化，并加入不含血清的培养液，吹打制成细胞悬液。
- 2) 取三个培养瓶分别编号为 A、B、C。首先把悬液接种入 A 瓶，置细胞培养箱中静止培养 5~20 min 后，轻轻倾斜培养瓶，让液体集中瓶角后慢慢吸出全部培养液和细胞悬液，再接种入 B 培养瓶中；然后向 A 瓶中补充含血清的完全培养液培养箱中继续培养。
- 3) B 培养瓶中的细胞静置 5~20 min 后，接处理 A 瓶的方法，把 B 瓶中的培养液和细胞悬液吸出并注入 C 瓶中，再向 B 瓶补加含血清的完全培养液。C 瓶补加含血清的全培养液(血清浓度为 10%)。
- 4) 三个瓶一并在培养箱中继续培养。如操作成功，次日观察可见 A 瓶中主

要为成纤维细胞，B 瓶中两类细胞相杂，C 瓶中主要为肿瘤细胞。必要时可反复处理多次直至肿瘤细胞纯化为止。

#### 4.5.2.3 胶原酶消化法

##### 4.5.2.3.1 原理

本方法利用成纤维细胞对胶原酶比肿瘤细胞较为敏感的特点，通过消化进行选择。

##### 4.5.2.3.2 方法

1) 可用 0.5 mg/ml 的胶原酶消化处理，边消化边在倒置显微镜下窥视，当发现成纤维细胞被除掉后，立即终止消化

2) 用 PBS 清洗处理后，更换新培养液继续培养，可获较为纯净的肿瘤细胞。如成纤维细胞未被除净，可再次重复处理。

##### 4.5.2.4 消化排除法

此方法曾用于乳腺癌细胞的培养。

1) 用 1:1 混和的 0.5%胰蛋白酶和 0.02%EDTA 消化液漂洗培养细胞一次，然后换成新的消化液继续消化，并在倒置显微镜下观察并不时摇动培养瓶，直至有半数细胞开始脱落时，立即停止消化；

2) 把消化液吸入离心管中离心后弃去上清液，加入培养液制成细胞悬液于另一瓶中进行培养；向原瓶内也补加新的培养液继续培养。鉴于成纤维细胞比肿瘤细胞先脱落的特点，用此方法处理后成纤维细胞易先脱落。经过几次反复处理就能去除成纤维细胞，原瓶主要是肿瘤细胞。

##### 4.5.2.5 密度梯度离心法

用泛影葡胺和聚蔗糖制备成比重 1.025~1.085 的密度梯度分离液，加入细胞悬液后，在 23℃中 800 g 离心 10 min。在比重 1.025~1.050 层为成纤维细胞，在比重 1.050~1.085 层为上皮细胞，将经过分离收集的上皮细胞经清洗 3 次后进行培养，可获纯净的肿瘤细胞。

最近有人用聚丙烯酰胺或 SOD 抑制成纤维细胞的生长，这些方法都需进行预试验取得必要经验，找出适合的条件，才能获得好的结果。

## 4.6 细胞的克隆化

### 4.6.1 原理

细胞克隆技术又称单个细胞分离培养技术，即从细胞群体中分离出一个细胞，并使其在体外培养体系中能繁殖成新的细胞群体，这种由单个细胞所形成的细胞群（或集落）称为一个克隆，这种纯化后的细胞群体称为细胞株。细胞株当中每个细胞的遗传特征和生物学特性极为相似和一致，有利于对不同群体细胞的形态和功能进行比较和研究。若该细胞株只是一般传代、无一系列实验鉴定指标，则为一般细胞株。若有一系列实验指标资料的，则称为限定性细胞株，如由幼地鼠肾细胞系（BHK21）第13孔的单个细胞形成的细胞株称BHK-21C-13（C-13代表第13个克隆），其形态规则，特性稳定，便于研究。细胞克隆的方法有多种，比较常用的是有限稀释法。

### 4.6.2 操作方法

#### 4.6.2.1 毛细管法

将一定量的细胞悬液（如 $10^5$ /mL或更低）稀释至 $1 \times 10^1$ /mL，取10 mL稀释的细胞悬液，用直径为0.5 mm，长为8 mm的毛细玻璃管若干（30~50只），在负压作用下，使悬液吸入各毛细管中，在倒置显微镜下检查出每管只进入一个细胞的毛细管，然后放入适应性培养液或有饲养层细胞的培养瓶（或培养板）内，在细胞培养箱中培养，由一个细胞在毛细管繁殖后，并向管外扩展，而形成单个克隆的细胞群体。

#### 4.6.2.2 有限稀释法

##### 4.6.2.2.1 目的

有限稀释法采用梯变倍数稀释的原则，将稀释的细胞悬液接种于96孔培养板中培养一定时间，孔中可出现单个细胞克隆。本法不需特殊设备，操作简单快速，适合大批量克隆化培养。广泛应用于异质性细胞系的克隆化培养、诱导和分离耐药性或高转移性、或突变细胞株以及单克隆抗体杂交瘤细胞株的克隆筛选中。

##### 4.6.2.2.2 方法

1) 取对数生长期的细胞制成悬液，经台盼蓝染色细胞计数，测定活细胞数及浓度（细胞存活率及单个细胞百分率应高于 90%以上）。

2) 将细胞悬液在试管中稀释，用培养液将细胞稀释至 50 个细胞/mL、10 个细胞/mL、5 个细胞/mL，将 3 种稀释度的细胞分别接种于 96 孔板中（每孔为 0.1 mL）进行细胞培养。

3) 24 h 后在倒置显微镜下观察培养板各孔中的细胞数，挑选只含一个细胞的孔，做好标记并补加 0.1 mL 培养液继续培养。

4) 培养期间，视 pH 值的变化换液或补加培养液，一周左右，孔中有明显克隆出现，待长至孔底面的 1/3~1/2 时，可用消化法将 96 孔中的单一克隆的细胞分别移至 24 孔板中进行扩大培养。

#### 4.6.2.3 平皿克隆分离法

在平皿内将单个细胞形成克隆并进行分离培养的方法。

将对数生长期细胞制备单个细胞悬液，经细胞计数并用培养液调整细胞浓度，使 5 mL 培养液内含有 50~200 个细胞（细胞存活率及单个细胞百分率应大于 90%以上）。

将上述细胞悬液迅速移入 60 mm 平皿中培养 1 周或更长。若有明显的克隆形成时方可进行克隆分离。

##### ——套环法

在倒置显微镜下观察克隆形成的情况，标记单个克隆的边界，吸干培养液，用涂有少量无菌硅脂的无菌金属套环，套住标记的克隆，在套环内滴加少量 0.25% 胰蛋白酶，待细胞脱离时，用微量加样器的尖头轻轻吹打，使细胞分散后，转入 24 孔板中扩大培养。

##### ——玻片法

在接种细胞悬液前，预先在 60 mm 平皿中放入无菌小玻片，加入细胞悬液，培养一定时间后，在倒置显微镜下标记出含一个克隆的玻片，然后用无菌镊子取出标记玻片移入 24 孔培养板中扩大培养。

#### 4.6.2.4 软琼脂克隆分离法（适用于恶性程度高的贴壁细胞）

#### 4.6.2.4.1 细胞稀释

将处于对数生长期的细胞制成单个细胞悬液并计数活细胞。调整细胞浓度至  $1 \times 10^6/L$ ，然后根据实验要求再作梯度倍稀释。通常以  $1 \sim 5 \times 10^4/L$  为佳。

#### 4.6.2.4.2 制备底层琼脂

取 5% 琼脂置沸水中，使琼脂完全溶化，取出一份 5% 琼脂，移入小烧杯中，待冷至  $50^\circ\text{C}$ ，迅速加入 9 份预温  $37^\circ\text{C}$  的新鲜培养液，混匀后立即注入培养皿中即成为 0.5% 底层琼脂，置室温使琼脂凝固备用。

#### 4.6.2.4.3 制备上层琼脂

取  $37^\circ\text{C}$  保温的、不同浓度的细胞悬液 9.4 mL，移入无菌小烧杯中，加入  $50^\circ\text{C}$  5% 琼脂 0.6 mL 迅速混匀，即配成 0.3% 琼脂培养液，立即浇入铺有底层琼脂培养皿板中，置室温使琼脂凝固。

#### 4.6.2.4.4 克隆形成

将培养皿中的细胞培养 1~2 周或 2 周以上。若需培养较长时间，可补加含琼脂的培养液 0.8 mL/孔，待有明显集落形成为止。

#### 4.6.2.4.5 挑取克隆并培养

在倒置显微镜下观察并挑取直径大于  $75\mu\text{m}$  或含有 50 个细胞以上的细胞克隆，转入 24 孔培养板中扩大培养。

#### 4.6.2.5 单细胞显微操作法

借助显微操纵器，在显微镜直视下将单个细胞逐个吸出，移入含有饲养层细胞的培养板中进行培养。本法准确性好，如无显微操纵器可自制毛细吸管替代。

##### 4.6.2.5.1 饲养层细胞的制备

单个细胞在极低密度下生长非常缓慢，甚至难以增殖，为了促进克隆细胞的生长繁殖，常采用饲养层细胞。

1) 用 0.25% 胰蛋白酶消化单层贴壁生长的 NIH/3T3 细胞，调整细胞浓度为  $10^8$  细胞/L，在 96 孔板中每孔加入 0.1 mL 细胞悬液进行培养至单层。

2) 将已形成单层细胞的培养板板，用  $^{60}\text{Co}$  的  $\gamma$  线以 4000~6000 拉得辐射或在培养液中加入丝裂霉素（终浓度 6-10 mol/L）作用 16 h，使细胞丧失有丝分裂

能力但仍可短期存活。饲养层细胞有代谢功能，不仅可维持pH而且还可为克隆细胞提供必要的养分及刺激生长的因子。饲养细胞处理后需更换新鲜培养液。

#### 4.6.2.5.2 制备单个细胞悬液

按照如上方法，将细胞悬液稀释至  $10^3/L$  的浓度。

#### 4.6.2.5.3 分离单个细胞

其方法多样，可根据实验条件决定。

——毛细管吸入法。同上述毛细管法，在显微镜下将只有一个细胞的毛细管取出。

——微滴法。将经稀释后单个细胞悬液，用无菌 1 mL 注射器或微量加样器逐滴加在平皿中制成散滴，在倒置显微镜下挑选并取出单细胞的液滴。

——液体石蜡法。将稀释后的单个细胞悬液，用无菌的 1mL 注射器逐滴加入充满无菌液体石蜡的平皿底部，在倒置显微镜下挑选并取出单细胞的液滴。

——玻璃小球附着法。将稀释后的单个细胞悬液加入表面涂有无菌凡士林石蜡的小玻璃珠的平皿中，混匀后，在倒置显微镜下挑选玻璃珠表面只粘附一个细胞的玻璃珠，用镊子仔细取出。

#### 4.6.2.5.4 挑取克隆并培养

将采用上述方法分离出的单个细胞，放入预先制备饲养层细胞的 96 孔培养板中进行培养 1~2 周或更长时间。待细胞克隆明显，细胞覆盖孔底  $1/3 \sim 1/2$  时，即可将细胞转入 24 孔培养板中扩大培养。

### 4.7 提高肿瘤细胞培养存活率和生长率措施

#### 4.7.1 细胞生长不良

根据人们的经验，肿瘤细胞在体外不易培养，建立能传代的肿瘤细胞系更为困难。当肿瘤组织或细胞原代接种培养后，常出现以下几种情况：

——游出或移动；有细胞移动和游出，但无细胞增殖、长时间处于停滞状态以致难以传代；

——有细胞增殖，但传若干代后停止生长或衰退死亡；

——传数代后细胞增殖缓慢，经过一段停滞期后，才又呈旺盛生长状态，形成稳定生长的肿瘤传代细胞系。

以上现象说明肿瘤细胞对体外生存条件有较高的要求，并需经过对新环境的适应才能生长，因此欲获得好的培养效果，不能局限于一般培养法，必须采用一些特殊的措施。

#### 4.7.2 实施措施

##### 4.7.2.1 适宜底物

把经过纯化的细胞接种在不同的底物上，如鼠尾胶原底层、饲细胞层等。

##### 4.7.2.2 生长因子

应用促细胞生长因子。向培养液中增加一种或几种促细胞生长因子。根据细胞种类不同选用不同的促生长物，常用有胰岛素、氢化可的松、雌激素以及各种生长因子。

##### 4.7.2.3 动物体媒介

###### 4.7.2.3.1 简介

为提高肿瘤细胞对体外培养环境的适应力和增加有活力肿瘤细胞的数量，可采用动物体转嫁接种成瘤后，再从动物体内取出进行培养，即能提高体外培养的成功率。受体动物以裸鼠最好，通过裸鼠媒介接种，可使有活力的肿瘤细胞数量增多，细胞培养易于成功。

###### 4.7.2.3.2 方法

1) 瘤块接种。按照前述原则方法取材，充分去除血液、脂肪、结缔组织及坏死部分并用PBS或Hanks液清洗，切成1~3 mm<sup>3</sup>小块，用穿刺针头吸组织小块，用酒精棉球擦拭动物腹部后，直接刺入皮下，注入瘤块。

2) 饲养观察。待受体动物皮下肿瘤生长达较大体积后，手术剥离、取出肿瘤组织。

3) 肿瘤细胞培养。按照前述原则方法进行实体瘤细胞的培养并去除成纤维细胞，建立实体瘤细胞系。

4) 裸鼠体内传代。为防止失败，仍取部分瘤组织继续在裸鼠体内传代。

#### 4.8 在实体瘤细胞培养中应注意的问题

##### 4.8.1 在原代培养时应注意的问题

——培养材料应取自肿瘤细胞集中、活力较好的部分，取材后应立即培养并存放于培养液中；

——取材和培养过程中要防止细菌和霉菌污染；

——培养物中混有的成纤维细胞要尽快清除；

——肿瘤组织中若有淋巴细胞浸润，应采用密度离心法将淋巴细胞清除，否则肿瘤细胞会被杀死；

——实验要防止其他细胞株的交叉污染。

#### 4.8.2 原代细胞培养的首次传代

对原代培养的细胞进行首次传代是建立连续性细胞系的操作关键，应注意：

——细胞生长密度不高时，或未能达到覆盖整个瓶底时不能急于传代；

——原代培养的贴壁细胞多为混杂细胞，形态各异，往往是上皮样细胞和成纤维样细胞并存，采用胰蛋白酶消化时要掌握好消化时间，因成纤维细胞易于脱壁，上皮细胞不易脱壁，因此，可根据需要选用适当的消化时间及时中止消化。在早期传代时，其消化时间比一般已建系的细胞相对长一些；

——吹打已消化的细胞不能在悬液中形成大量泡沫，以尽可能减少对细胞的机械损伤；

——首次传代时细胞接种的密度要大，以利于细胞的生存和繁殖。如果消化分离的细胞悬液有组织块，也一并传入到培养瓶，尽量减少细胞损失；

——首次传代培养时的 pH 不能高，宁可偏低一些使液体偏酸。

#### 4.8.3 在传代培养时应注意的问题

——当癌细胞没有生长到足够的量时，应耐心等待，坚持采取换液方式来更新营养成分以满足细胞继续生长繁殖的需要，不要急于传代；

——癌细胞经常重叠生长，如果混有成纤维细胞，应在传代时采用消化消除法及反复贴壁法加以清除，分离出肿瘤细胞进行传代培养；

——在传到 10 代前细胞生长繁殖极不稳定，传代要小心，该合并培养时还得合并，千万不能传代。要确定适合该细胞的培养方法；

——在早期传代时要适当提高接种浓度；

——对于增殖能力极低的细胞，应放入饲养层中培养，并加入一些促生长物质，如胰岛素、氢化考的松、雌激素、EGF、转铁蛋白等因子；

——消除成纤维细胞始终为癌细胞培养中的重要条件，一旦发现应尽早尽快按上述介绍的方法加以清除；

——详细记录传代次数。

## 5 培养肿瘤细胞的生物学特性的检测

体外培养的肿瘤细胞一旦生长成形态上单一的细胞群体或细胞系(或株)后，不论用于实验研究还是建立细胞系都需要进行一系列的细胞生物学特性鉴定，主要目的在于证明：①培养的细胞是否来源于原体内具有恶性特征的细胞，而非正常细胞或其它细胞；②肿瘤组织类型；③肿瘤细胞的生物学特性。检测的生物学特性项目数量无明确规定，一般根据需要做以下的常规项目。

### 5.1 组织起源

培养材料起源于哪个胚层、哪个器官的何种组织，供体患者的详细资料和疾病类型，必要时提供病理诊断鉴定资料。可以利用中间纤维的单克隆抗体进行免疫组织化学分析，辅助鉴别细胞的来源。

### 5.2 形态观察

观察细胞的一般形态，如细胞形状，核浆比例，染色质和核仁大小及多少，以及细胞骨架的排列状态等。

培养的肿瘤细胞一般呈多角形，大小异型性明显，核浆比例倒置，有无丰富的三极或多极有丝分裂，核仁清晰多个，微管、微丝排列紊乱。

### 5.3 细胞生长增殖

检测细胞生长曲线、细胞分裂指数、细胞倍增时间及细胞周期时间。

肿瘤细胞失去正常的接触抑制，呈多层生长，生长旺盛，细胞倍增时间缩短，饱和密度大，分裂指数较高，具无限增殖能力，细胞浸润能力较强等。

### 5.4 软琼脂培养

检测肿瘤细胞的集落形成能力。

肿瘤细胞在低密度下仍具有高度存活率，并在软琼脂中形成集落。

## 5.5 细胞核型分析

检测实体瘤核型特点，染色体数量，有无标记染色体，染色体带型等。

肿瘤细胞染色体数目和结构异常，大多为异倍体，多倍体，并有异常的标记染色体。

## 5.6 异体动物致瘤试验

向异体动物体内（皮下）接种细胞悬液，观察实体瘤细胞的成瘤能力。

一般选取裸鼠做成瘤试验。裸鼠背部皮下接种  $1 \times 10^9 \sim 20 \times 10^9/L$  肿瘤细胞能生长形成实体瘤，其组织学形态与原发瘤相似。

## 5.7 凝集试验

检测实体瘤细胞的凝集能力。

肿瘤细胞的凝集力增强。

## 5.8 组织化学成分分析

肿瘤细胞中脱氧核糖核酸、酸性磷酸酶和磷脂增多，碱性磷酸酶下降，乳酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶活性也改变。

## 5.9 其他生物学特性检测

上述项目外，根据需要还可做同位素标记、荧光显微镜观察等。

# 6 质量监控

## 6.1 一般职责

对日常的质量进行监督和管理、数据复核，对疑难样本进行解答。定期做质量控制动态书面报告。接受上级专家委员会的监督、指导。

## 6.2 细胞系(株)污染情况监控

检测细胞系有无真菌、支原体、原虫和病毒等的污染。

## 6.3 细胞系(株)交叉污染的监控

### 6.3.1 细胞遗传学

检测人 Y 染色体，染色体 Q 带、G 带核型分析。

### 6.3.2 免疫学方法

抗原抗体体外反应鉴定细胞种属特异的人类细胞 HLA 或免疫细胞 CD 抗原。

### 6.3.3 生物化学检测

同功酶谱测定细胞系(株)的种特性及多态性酶的表型组合,可以鉴定不同基因型的人类细胞系。

为了防止和避免细胞系间的交叉,应将器材、实验室、培养液分线操作,切勿同时操作两种以上细胞。每传5代后,应进行细胞冻存。细胞库应首先建立检查细胞交叉污染的方法,一旦发现有交叉污染,应立即清理废除细胞,并发公告。

## 附录 A (资料性附录)

### 胰蛋白酶和胶原酶的生物学特点

#### A.1 胰蛋白酶

胰蛋白酶 (trypsin) (简称胰酶) 是广泛应用的消化剂, 对蛋白质有水解作用, 主要作用于赖氨酸或精氨酸相连接的肽键。使细胞间质中的蛋白质水解而使细胞分散。不同公司的蛋白酶中由于产品的活力和纯度不同, 对细胞的消化能力也不同。胰蛋白酶对细胞的作用, 取决于细胞类型、酶的活力、配制的浓度、消化的温度、无机盐离子、pH 以及消化时间的长短等。

①细胞类型 胰蛋白酶适于消化细胞间质较少的软组织, 能有效地分离肝、肾、甲状腺、羊膜、胚胎组织、上皮组织等。而对含结缔组织较丰富的组织, 如乳腺、滑膜、子宫、纤维肉瘤、肿瘤组织等就无效, 但若与胶原酶合用, 就能增加其对组织的分离作用。

②酶的活力 该酶为粉剂, 保藏时要防潮, 室内温度不宜过高, 保存时间不能太长, 若粉剂结团块, 说明该部分受潮或失效。

酶使用时需新鲜配制, 保存在低温冰箱中, 消化时的 pH 和温度都要适宜, 否则会影响活力, 细胞的分散直接与酶的活力有关。

③酶的浓度 胰蛋白酶一般采用的浓度为 0.1%~0.25% (活力 1: 200 或 1: 250), 但遇到难消化的组织时, 浓度可适当提高, 消化时间适当延长。浓度高对细胞有毒性, 而较低浓度的胰蛋白酶在培养液中可促进细胞的增殖, 若培养液中加入血清, 其少量胰蛋白酶可被血清中抗胰蛋白酶因子所清除。

④温度 一般认为胰蛋白酶在 56℃ 时活性最强, 但由于对细胞有损害而不能被采用, 常使用的温度为 37℃, 通常在 37℃ 进行消化比室温作用快。

⑤pH pH8~pH9 是胰蛋白酶活力适宜范围, 但随碱性的增加其活力也随之减少, 活性强分散快, 细胞也容易被消化下来, 消化分离细胞时 pH 只能选用 7.6~8.0 之间, 否则对细胞有损伤。

⑥无机盐离子 若用含有钙和镁的盐类溶液来配制胰蛋白酶时，可以发生抑制胰蛋白的消化作用。因此，在配制时应采用无钙、镁离子的 PBS 配制。

⑦消化时间 如果细胞消化时间过长，可以损害细胞的呼吸酶，从而影响细胞的代谢，一般消化时间为 20 min 为宜，冷消化时使用低浓度消化液，于 4℃ 过夜也可。

## A.2 胶原酶

胶原酶 (collagenase) 是一种从细菌中提取出来的酶，对胶原有很强的消化作用。适于消化纤维性组织、上皮组织以及肿瘤组织，它对细胞间质有较好的消化作用，对细胞本身影响不大，可使细胞与胶原成分脱离而不受伤害。该酶分离效果好，即使有钙、镁离子存在仍有活性，故可用 PBS 和含血清的培养液配制，即操作简便又可提高细胞成活率，最终浓度 200 U/mL 或 0.1~0.3 mg/mL。此酶消化作用缓和，无需机械振荡，但胶原酶价格较高，大量使用将增加实验成本。

经过胶原酶消化后的上皮组织，由于上皮细胞对酶有耐受性，可能有一些上皮细胞团块尚未被完全消化开。成小团块的上皮细胞比分散的单个上皮细胞更易生长，因此不必要再进一步消化处理。

## A.3 胰蛋白酶和胶原酶的生物学活性区别

胰蛋白酶和胶原酶的生物学活性 (表 1) 和在不同浓度下消化各种组织小块所需的时间有明显差异 (表 2)。

鉴于两者生物学特点的不同以及两者价格不等，有人采用胶原酶与胰蛋白酶并用，同时还可加透明质酸酶 (对细胞表面糖基有作用)，采用两者的联合消化作用，对分散肿瘤组织非常有效。

表 1: 胰蛋白酶和胶原酶生物活性的差别

项 目	胰蛋白酶	胶原酶
消化特性	适用于消化软组织	适用于消化纤维多的组织
用 量	0.01%~0.5%	0.1~0.3mg/mL(200u/mL)
消化时间	0.5~2 h (小块)	1~12 h

pH	8~9	6.5~7.0
作用强度	强烈	缓和
细胞影响	时间过长有影响	无大影响
血清、钙、镁离子	有影响	无影响

表 2: 胰蛋白酶和胶原酶在不同温度下消化组织块所需时间 (h) (0.5~1cm<sup>3</sup>)

酶 种 类	较 硬 组 织			软 组 织		
	4℃	室 温	37℃	4℃	室 温	37℃
胰蛋白酶(0.25%)	24~48	1~6	1~2	12~24	1~2	0.5~1
胶原酶(200 U/mL)	24	6	6.5	12	3	0.25
两者联合(1: 1)	12~46	12~24	4~12	12~24	6~12	1~2

## 附录 B (资料性附录)

### 肿瘤细胞培养的生物学特性

肿瘤细胞与体内正常细胞相比，不论在体内或在体外，在形态、生长增值、遗传性状等方面都有显著的不同。生长在体内的肿瘤细胞和在体外培养的肿瘤细胞，其差异较小但并非完全相同。培养中的肿瘤细胞具以下突出特点。

#### B.1 形态和性状

在光学显微镜观察，大多数肿瘤细胞，形态不规则。与二倍体细胞相比细胞界限清晰，伸展较差，核膜、核仁轮廓明显，核仁多、核浆和核糖体颗粒丰富。电镜观察肿瘤细胞表面的微绒毛多而细密，微丝走行不如正常细胞规则，这与肿瘤细胞具有不定向运动和锚着不依赖性有关。

#### B.2 生长增殖

肿瘤细胞在体内具有不受控增殖性，在体外培养中仍如此。正常二倍体细胞在体外培养中不加血清不能增殖，因为血清中含有细胞增殖生长的因子；而肿瘤细胞对营养要求不高，在无血清或低血清中（2%~5%）仍能生长。

已证明肿瘤细胞有自泌或内分泌性产生促增殖因子能力。正常细胞发生转化后，出现能在低血清培养液中生长的现象，已成为检测细胞恶变的一个指标。肿瘤细胞或培养中发生恶性转化后的单个细胞在软琼脂中培养时，能形成集落（克隆）的能力比正常细胞强。肿瘤细胞生长方向性消失，接触抑制消除，增殖数量增多时细胞可呈多层重叠生长，细胞饱和密度大，有丰富的三极有丝分裂，分裂指数高，细胞倍增周期短。能相互重叠向三维空间发展，形成堆积物。

#### B.3 永生性

永生性也称不死性。在体外培养中表现为细胞可无限传代而不凋亡（apoptosis）。体外培养的肿瘤细胞系（株）都表现有这种性状，但由于体内肿瘤细胞终将杀死宿主并同归于尽，从而难以证明这一性状的存在。

从近年建立细胞系(株)的过程说明,多数肿瘤细胞在体外培养时并不容易获得成功。肿瘤细胞在最初生长增殖时并不旺盛,经过纯化成单一的肿瘤细胞后,也大多增殖若干代后,便出现类似二倍体细胞培养中的停滞期,过此阶段后才获得永生性,顺利传代生长下去。说明体外肿瘤细胞的永生性有可能是体外培养后获得的。体外培养的许多细胞系,如 NIH3T3、Rat-1 10T1/2 等均具有永生性而无恶性证明,永生性可能是细胞恶性变的某一阶段,至少在体外是如此。

#### **B.4 浸润性**

浸润性是肿瘤细胞扩张性的增殖行为,培养肿瘤细胞仍持有这种性状。当与正常组织混合培养时,能浸润入其它组织细胞中,甚至能穿透人工隔膜。

#### **B.5 异质性**

所有肿瘤都是由有增殖能力、遗传性、起源、周期状态等性状不同的细胞组成,属于异质性。异质性构成同一肿瘤内细胞的活力有差别的瘤组织;处于瘤体周边区的细胞获得血液供应多,增殖旺盛,中心区有的细胞衰老退化,有的处于周期阻滞状态,那些呈活跃增殖状态的细胞称干细胞(stem cell)、只有这些干细胞才是支持肿瘤生长的成分。肿瘤干细胞培养时易于生长增殖,有干细胞系和数个亚系组成。

#### **B.6 细胞遗传学**

大多数肿瘤细胞有遗传学改变,如失去二倍体核型、呈异倍体或多倍体等。肿瘤细胞群常由多个细胞群组成,有干细胞系和数个亚系,并不断进行着适应性演变。常有标记染色体出现。

#### **B.7 其它**

肿瘤细胞在体外不易生长的原因可能由于:①依赖性:肿瘤细胞虽有较强克隆生长力,但仍有一定的群体性或与其它细胞相依存关系,如肿瘤细胞之间或肿瘤细胞与基质成纤维细胞的依赖关系。体外分散培养和排除成纤维细胞后也会同时消除或减弱这些依存关系,可能影响肿瘤细胞增殖生长的活性;②肿瘤细胞的

自泌也会因分散培养而被稀释，达不到肿瘤生长的需求，降低肿瘤细胞的生长增殖力；③并非所有肿瘤细胞都有强的生长活力和长的生存期，只有干细胞才有强的增殖生长能力，但这些细胞数量很少；④离体培养肿瘤细胞可能需求与体内相似的特殊生存条件。

**表 1 区别正常成纤维细胞与恶性肿瘤细胞的常用指标**

指 标	正常成纤维细胞	恶性肿瘤细胞
形 态	棱形或多角形，伸展良好，折光较弱，核浆比例小，嗜碱性弱，核仁较少较小，多核巨细胞少见	多角形或细长形，伸展较差，折光强，核浆比例大，嗜碱性强，核仁多、大，常见多核巨细胞
生长特性	排列有方向性，单层生长，有接触抑制，饱和密度低	方向性消失，多层重叠生长，接触抑制消失，饱和密度高
粘 附 性	细胞间粘附性强，紧贴壁生长	细胞间粘附性弱，易脱落
血清的要求	必须有血清	无需血清能生长
在半固体琼脂中生长能力	不能生长	能生长，形成集落
电子显微镜观察	核蛋白体较少，微丝微管有规则排列	核蛋白体丰富，微丝微管消失
细胞膜对低分子物质透 性	低	高
粘多糖的合成和分泌腺苷 酸	多	少
环化酶活性	高	低
细胞内 CAMP 浓度		
对松孢菌素的反应	不刺激核分裂，或至多形成双核细胞	核持续分裂，形成多核巨细胞

---

致瘤试验

不能形成肿瘤

能形成肿瘤

---

## 附录 C

### (规范性附录)

#### 人类恶性肿瘤连续性细胞系(株)的建系(株)标准

当一个细胞系(或株)建立后,专家鉴定可有可无,按国际惯例,只要认真研究,记录完整,资料 and 结果确切,就可在有关杂志上或刊物上报道细胞的各次实验指标。

##### C.1 美国菌种保藏中心(ATCC)入库细胞的基本要求:

1. 培养简历 组织来源日期、物种、组织来源、性别、年龄、供体正常或异常健康状态,细胞已传代数等。
2. 冻存液 培养液和保护剂名称。
3. 细胞活力 冻融前后细胞接种存活率和生长特性(生长繁殖曲线,分裂指数等)。
4. 培养液 培养液种类和名称、血清来源及浓度。
5. 细胞形态 类型,如上皮或成纤维细胞等。
6. 核型 二倍体或多倍体,标记染色体有或无。
7. 无污染情况 包括细胞、真菌、支原体、原虫和病毒等。
8. 物种检测 检测同功酶,主要为 G6PD 和 LDH,以证明细胞有无交叉污染。
9. 免疫检测 一、两种血清学检测。
10. 细胞建立者 建立者姓名、检测者姓名。

##### C.2 中国人的恶性肿瘤连续性细胞系(株)的建系(株)标准

该标准在第二届全国细胞和组织培养专题讨论会上通过。

###### C.2.1 实体瘤细胞系的共同特征

肿瘤细胞能在体外培养半年以上(或 20 代以上),生长稳定,保持细胞特性,能连续传代的,可称为连续性细胞系(株)。要具备如下原始资料:

- 1、培养细胞的组织来源











