

生物实验室系列

WILEY

人肿瘤细胞培养

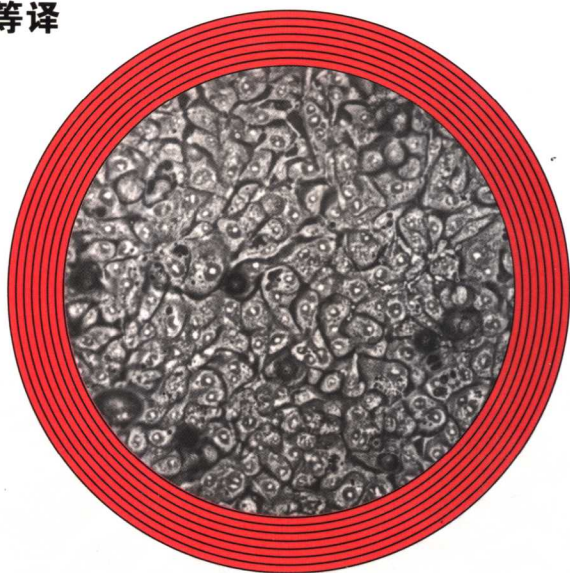
Culture of Human Tumor Cells

[奥] R. 弗雷纳 (Roswitha Pfragner)

主编

[英] R. I. 弗雷谢尼 (R. Ian Freshney)

章静波 陈实平 刘玉琴 等译



Chemical Industry Press



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

人肿瘤细胞培养

[奥] R. 弗雷纳 主编
[英] R. I. 弗雷谢尼

章静波 陈实平 刘玉琴 等译



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

图书在版编目(CIP)数据

人肿瘤细胞培养/[奥]弗雷纳(Pfragner, R.),
[英]弗雷谢尼(Freshney, R. I.)主编;章静波等
译. —北京:化学工业出版社, 2006. 4

(生物实验室系列)

书名原文: Culture of Human Tumor Cells

ISBN 7-5025-8331-9

I. 人… II. ①弗…②弗…③章… III. 人体-肿瘤-
细胞培养 IV. R730.21

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第014224号

Culture of Human Tumor Cells/Edited by Roswitha Pfragner, R. Ian Freshney

ISBN 0-471-43853-7

Copyright©2004 by John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by John Wiley &
Sons, Inc.

本书中文简体字版由 John Wiley & Sons 出版公司授权化学工业出版社独家出版发行。
未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号:01-2005-2463

生物实验室系列

人肿瘤细胞培养

[奥] R. 弗雷纳 主编

[英] R. I. 弗雷谢尼

章静波 陈实平 刘玉琴 等译

责任编辑:郎红旗 孟嘉 李丽

责任校对:顾淑云 徐贞珍

封面设计:关飞

*

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里3号 邮政编码 100029)

购书咨询:(010)64982530

(010)64918013

购书传真:(010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 23 1/4 字数 440 千字

2006年5月第1版 2006年5月北京第1次印刷

ISBN 7-5025-8331-9

定价:49.00元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责退换

参译人员名单

译者（按章节排序）：

章静波	中国医学科学院基础医学研究所
陈实平	中国医学科学院基础医学研究所
刘玉琴	中国医学科学院基础医学研究所
蒋毅	中国医学科学院基础医学研究所
王艳梅	中国医学科学院基础医学研究所
卞晓翠	中国医学科学院基础医学研究所
王冬	中国医学科学院基础医学研究所
赵永娟	中国医学科学院基础医学研究所
闫慧	中国医学科学院基础医学研究所
陈曦	北京大学人民医院
王惠	中国医学科学院基础医学研究所
王艾琳	北华大学医学院
张钦宪	郑州大学医学院

学术秘书：

王惠	中国医学科学院基础医学研究所
----	----------------

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展的实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化工出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。

而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

译者的话

经常有人问我们，人类何时可以攻克肿瘤？

这真是一个可以难倒所有医生和专家的问题。我相信没有哪一位肿瘤学研究的权威可以确切地回答，因为有关肿瘤迄今仍存在许许多多的疑团未被人们揭开。只有这些疑团被人们逐一揭开了，人们才能胸有成竹，回答正确。

关于肿瘤的本质，专家们一致认为肿瘤是多基因、多种环境因素相互作用导致的一种异质性疾病。那么一个刨根问底的人便会问“多基因”是多少基因？多种环境因素都是些什么因素？均在多基因/多因素作用下为什么又会呈异质性（细胞性质不均一之意）？我猜想多数专家对这些连珠炮似的问题都会苦笑置之，因为唯有苦笑而已。

诚然，医生或专家们兴许也会这样回答这个最基本的问题：迄今人们已经知道许多癌基因、抑癌基因与肿瘤发生有关，也已揭示环境中许多生物学的、化学的甚至物理学的因素可以导致正常细胞发生癌变，只有待到人类揭示出细胞基因组中所有 DNA 序列以及大约 3.5 万个基因的功能及其突变后的意义之日，才是人类彻底攻克肿瘤之时。

揭示 3.5 万个基因序列及其功能和突变，这是后基因组时代的最根本的任务。毫无疑问，细胞培养，尤其是人肿瘤细胞培养在这一艰巨任务中起着举足轻重的作用，因为只有人们获得较“纯”的癌细胞系，不同种类的癌细胞，以及处于不同发展阶段的癌细胞，才能与正常细胞作比较，揭示癌变的本质所在。而这些癌细胞的获得及研究唯有通过细胞培养方可进行。

虽然我国早在 20 世纪 30 年代就已经引进细胞培养技术，到了 50 年代肿瘤细胞培养已较普遍地在全国各地开展，但是在肿瘤细胞培养的理论研究、方法学探讨以及结合临床的实际应用等方面，迄今还很缺乏系统性及完整性。

在人肿瘤细胞培养方面，国外已有多部著作，已介绍到国内的较重要的有：1975 年 Jorger Fogh 主编的《体外的人肿瘤细胞》（*Human Tumor Cells in vitro*）和 1979 年大星章一主编的《人癌细胞》（王永潮、吴政安、李申德译，科学出版社）。这些都为肿瘤研究提供了不可多得的资料和经验。如今在 21 世纪初，由 Roswitha Pfragner 和 R. Ian Freshney 主编的《人肿瘤细胞培养》（*Cul-*

ture of Human Tumor Cells) 问世了, 该书详细介绍了人肺癌、胃癌、结肠直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肌上皮瘤、鳞癌、黑色素瘤、淋巴瘤、胶质瘤及神经内分泌肿瘤等细胞培养的基本原理、细胞培养操作步骤、应用以及今后的研究方向, 对于这些资料的详细介绍, 读者可参考阅读本书的原序及各章内容, 于此不再赘述。我们相信该书对于我国肿瘤细胞培养研究有较大的推动作用, 尤其所介绍的技术方法有利于我们少走弯路而且可建立起我国自己的肿瘤细胞系, 因此我们将其翻译介绍给国内同行。必须指出的是, 该书虽然包括众多常见的肿瘤, 但仍有不少肿瘤未能写进去, 尤其是我国高发的食管癌、鼻咽癌等, 这固然不利于我们建立这些肿瘤细胞系, 但是从探索的角度来说不是更可以启发我们自己的创造性吗? 我真诚地希望我国学者在这几种肿瘤的细胞培养方面取得更多的经验, 同时介绍到国际同行中去。

本书的译者包括中国医学科学院基础医学研究所、郑州大学医学院、北华大学医学院众多的专家, 他(她)们在细胞培养方面积累了较多的经验, 译作完全可以反映出原著的本义。相信该译本对于我国从事肿瘤细胞培养的专家、技术人员不无裨益。诚然, 出于技术、文字表达等诸多原因, 译作也可能不尽人意, 亟盼读者在阅读使用时一一予以指出, 以便在适当的时间, 以适当的方式予以订正, 在此我们谨预先表示感谢。

总编辑 李波 编委会

2006年1月

本书的译者包括中国医学科学院基础医学研究所、郑州大学医学院、北华大学医学院众多的专家, 他(她)们在细胞培养方面积累了较多的经验, 译作完全可以反映出原著的本义。相信该译本对于我国从事肿瘤细胞培养的专家、技术人员不无裨益。诚然, 出于技术、文字表达等诸多原因, 译作也可能不尽人意, 亟盼读者在阅读使用时一一予以指出, 以便在适当的时间, 以适当的方式予以订正, 在此我们谨预先表示感谢。

总编辑 李波 编委会

本书的译者包括中国医学科学院基础医学研究所、郑州大学医学院、北华大学医学院众多的专家, 他(她)们在细胞培养方面积累了较多的经验, 译作完全可以反映出原著的本义。相信该译本对于我国从事肿瘤细胞培养的专家、技术人员不无裨益。诚然, 出于技术、文字表达等诸多原因, 译作也可能不尽人意, 亟盼读者在阅读使用时一一予以指出, 以便在适当的时间, 以适当的方式予以订正, 在此我们谨预先表示感谢。

本书的译者包括中国医学科学院基础医学研究所、郑州大学医学院、北华大学医学院众多的专家, 他(她)们在细胞培养方面积累了较多的经验, 译作完全可以反映出原著的本义。相信该译本对于我国从事肿瘤细胞培养的专家、技术人员不无裨益。诚然, 出于技术、文字表达等诸多原因, 译作也可能不尽人意, 亟盼读者在阅读使用时一一予以指出, 以便在适当的时间, 以适当的方式予以订正, 在此我们谨预先表示感谢。

本书的译者包括中国医学科学院基础医学研究所、郑州大学医学院、北华大学医学院众多的专家, 他(她)们在细胞培养方面积累了较多的经验, 译作完全可以反映出原著的本义。相信该译本对于我国从事肿瘤细胞培养的专家、技术人员不无裨益。诚然, 出于技术、文字表达等诸多原因, 译作也可能不尽人意, 亟盼读者在阅读使用时一一予以指出, 以便在适当的时间, 以适当的方式予以订正, 在此我们谨预先表示感谢。

本书的译者包括中国医学科学院基础医学研究所、郑州大学医学院、北华大学医学院众多的专家, 他(她)们在细胞培养方面积累了较多的经验, 译作完全可以反映出原著的本义。相信该译本对于我国从事肿瘤细胞培养的专家、技术人员不无裨益。诚然, 出于技术、文字表达等诸多原因, 译作也可能不尽人意, 亟盼读者在阅读使用时一一予以指出, 以便在适当的时间, 以适当的方式予以订正, 在此我们谨预先表示感谢。

本书的译者包括中国医学科学院基础医学研究所、郑州大学医学院、北华大学医学院众多的专家, 他(她)们在细胞培养方面积累了较多的经验, 译作完全可以反映出原著的本义。相信该译本对于我国从事肿瘤细胞培养的专家、技术人员不无裨益。诚然, 出于技术、文字表达等诸多原因, 译作也可能不尽人意, 亟盼读者在阅读使用时一一予以指出, 以便在适当的时间, 以适当的方式予以订正, 在此我们谨预先表示感谢。

本书的译者包括中国医学科学院基础医学研究所、郑州大学医学院、北华大学医学院众多的专家, 他(她)们在细胞培养方面积累了较多的经验, 译作完全可以反映出原著的本义。相信该译本对于我国从事肿瘤细胞培养的专家、技术人员不无裨益。诚然, 出于技术、文字表达等诸多原因, 译作也可能不尽人意, 亟盼读者在阅读使用时一一予以指出, 以便在适当的时间, 以适当的方式予以订正, 在此我们谨预先表示感谢。

本书的译者包括中国医学科学院基础医学研究所、郑州大学医学院、北华大学医学院众多的专家, 他(她)们在细胞培养方面积累了较多的经验, 译作完全可以反映出原著的本义。相信该译本对于我国从事肿瘤细胞培养的专家、技术人员不无裨益。诚然, 出于技术、文字表达等诸多原因, 译作也可能不尽人意, 亟盼读者在阅读使用时一一予以指出, 以便在适当的时间, 以适当的方式予以订正, 在此我们谨预先表示感谢。

前 言

“特殊细胞培养系列”(Culture of Specialized Cells Series)共有6册,这是其中之一。和其他6册一样,本书旨在为特殊细胞类型的培养提供切实的帮助。一如既往,本书的目标是提供作者所在实验室经过试行的和已建立的方法,这些方法还与其他方法进行了比较,并补充了有关应用的信息,其中有些是作者从自己研究中新创建的。

本书重点在于肿瘤细胞,提供了详尽的、一步一步的操作方案,并列出了必需的试剂以及试剂和溶液的制备步骤。为了避免不必要的重复,在正文的有关描述之后不给出供应商名录,但在每章之末的“材料来源”一览表中有这些信息,并在本书附录中提供详细的供应商名录。第一次引用的缩写词有其解释,但在本书开始有全部的缩写词表[●]。我们沿用本系列早期版本中的一些常规用语,如组织培养级的用水不论其制备的方法如何,统称为UPW(超纯水之意);缩写词PB-SA指的是无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的Dulbecco磷酸盐缓冲液,基于这一概念,缩写词PBS则表示完全配方缓冲液。

编者意识到在本书中并未能涵盖其他多种类型的肿瘤——欲达此目的,非得有数卷不可。编者只能集中于人肿瘤,以它们作为与基因表达和生长调控异常以及潜在治疗模式研究的最为相关的模型。编者并不想进行全面阐述,而只是提供最常见肿瘤类型的操作方案,以期可满足绝大多数相关人员的需要,此外,只需要做小小的变动,这些方案就可以成为其他肿瘤细胞培养方法的操作基础。读者也可参考本系列已出版的其他书,如R. I. Freshney和M. G. Freshney(2003)主编的《上皮细胞培养》(第2版),该书介绍了数种不同类型正常上皮细胞的操作方案;还可参考John R. W. Masters和Bernard Palsson主编的由Dordrecht, Kluwer Academic Publishers出版的《人细胞培养》第1卷和第2卷(1999),其中有有关培养的人肿瘤细胞系较全面的评述。

我们感激所有的撰稿人,他们为本书提供了自己的专业知识,花费了宝贵的时间来准备这些详尽的操作方案,并对他们各自研究领域其他人的工作进行了综述。

Roswitha Pfragner

R. Ian Freshney

(章静波 译)

● 译本将“缩写词表”置于书后。——译者注

原著作者名录

Mary L. Alpaugh, Department of Pathology and Revlon/UCLA Breast Center, UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA

Sanford H. Barsky, Department of Pathology and Revlon/UCLA Breast Center, UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA

Annemarie Behmel, Department of Medical Biology and Human Genetics, Medical University Graz, Graz, Austria

Isabella J. Berry, Beatson Institute for Cancer Research, Bearsden, Glasgow, Scotland

Robert K. Bright, Department of Microbiology and Immunology, Southwest Cancer Center, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock, TX

Julie E. Burns, YCR Cancer Research Unit, Department of Biology, University of York, York, UK

Deborah Burt, CRC Department of Immunology, Paterson Institute for Cancer Research, Christie Hospital NHS Trust, Manchester, UK

Louise J. Clark, Southern General Hospital, Glasgow, Scotland, UK

Lesley W. Coggins, Q-One Biotech Ltd., Todd Campus, West of Scotland Science Park, Glasgow, G20 OXA, Scotland, UK

John L. Darling, Division of Biomedical Science, School of Applied Sciences, University of Wolverhampton, Wolverhampton, UK

Hans G. Drexler, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany

Kirsten G. Edington, Beatson Institute for Cancer Research, Bearsden, Glasgow, Scotland

Vivian X. Fu, Department of Surgery, Section of Urology, University of Wisconsin-Madison Medical School, Madison, WI

Ruth Halaban, Department of Dermatology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT

Haruo Iguchi, Division of Biochemistry, National Kyusyu Cancer Research Institute, Fukuoka, Japan

Elisabeth Ingolic, Research Institute for Electron Microscopy, Technical University Graz, Graz, Austria

David F. Jarrard, Department of Surgery, Section of Urology, University of Wisconsin-Madison Medical School, Madison, WI

Hee-Sung Kim, National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi, Korea

Akira Kono, Transgenic Inc., Chvougai, Kumamoto, Japan

Ja-Lok Ku, Laboratory of Cell Biology, Korean Cell Line Bank, Cancer Research Center and Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Jennifer D. Lewis, Laboratory of Prostate Cancer Biology, Robert W. Franz Cancer Research Center, Earle A. Chiles Research Institute, Portland, OR

Roy Mitchell, Beatson Institute for Cancer Research, Bearsden, Glasgow, Scotland

Kazuhiro Mizumoto, Department of Surgery and Oncology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Maedashi, Fukuoka, Japan

Margaret O'Prey, Beatson Institute for Cancer Research, Bearsden, Glasgow, Scotland

Jae-Gahb Park, Laboratory of Cell Biology, Korean Cell Line Bank, Cancer Research Center and Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea; and National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi, Korea

So-Yeon Park, National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi, Korea

E. Kenneth Parkinson, Beatson Institute for Cancer Research,
Bearsden, Glasgow, Scotland

Roswitha Pfragner, Department of Pathophysiology, Medical Uni-
versity Graz, Graz, Austria

Catherine A. Reznikoff, Department of Surgery, Section of Urology,
University of Wisconsin-Madison Medical School, Madison, WI

Gerry Robertson, Department of Plastic Surgery, Canniesburn Hos-
pital, Bearsden, Glasgow, Scotland

Michael J. Rutten, Department of Surgery, Oregon Health Sciences
University, Portland, OR

Steven R. Schwarze, Department of Surgery, Section of Urology,
University of Wisconsin-Madison Medical School, Madison, WI

Masaki Shono, Department of Surgery and Oncology, Graduate
School of Medical Sciences, Kyushu University, Maedashi, Fukuoka,
Japan

David Soutar, Department of Plastic Surgery, Canniesburn Hospital,
Bearsden, Glasgow, Scotland

Valerie Speirs, Molecular Medicine Unit, University of Leeds, Clinical
Sciences Building, St. James's University Hospital, Leeds, UK

Peter Stern, CRC Department of Immunology, Paterson Institute for
Cancer Research, Christie Hospital NHS Trust, Manchester, UK

Solchi Takiguchi, Division of Biochemistry, National Kyusyu Cancer
Center Research Institute, Notame, Fukuoka, Japan

Catherine West, Experimental Radiation Oncology, Paterson Institute
for Cancer Research, Christie Hospital NHS Trust, Manchester, UK

Robert H. Whitehead, Novel Cell Line Development Facility,
Vanderbilt University, Nashville, TN

Anne P. Wilson, Woodbine Terrace, Stanton, Near Ashbourne,
Derbyshire, UK

Gerhard H. Wirnsberger, Department of Internal Medicine, Medical University Graz, Graz, Austria

Reen Wu, Center for Comparative Respiratory Biology and Medicine, Schools of Medicine and Veterinary Medicine, University of California at Davis, Davis, CA

目 录

第 1 章 培养中的人肺肿瘤细胞的生长	1
1 引言	1
1.1 细胞培养及肺癌发生	1
1.2 肺癌细胞生长所需的生长因子和激素	2
2 培养基及试剂的配制	4
2.1 HITES 基础培养基的配制	5
2.2 C 培养基和 C 改良培养基的配制	6
3 安全提示	7
4 操作步骤	7
4.1 取材及运送	7
方案 1.1 肺肿瘤标本的处理	7
4.2 细胞分离	7
方案 1.2 机械研磨法从肺肿瘤组织收集细胞	8
方案 1.3 用胶原酶解离肺肿瘤组织	8
4.3 细胞培养的条件	9
方案 1.4 SCLC 细胞的培养	9
方案 1.5 来源于腺癌和大细胞癌的肿瘤细胞的培养	10
方案 1.6 肺癌细胞的克隆化培养	11
4.4 致瘤性及分化功能的分析	12
4.5 其他方法	12
5 讨论	13
致谢	14
材料来源	14
参考文献	15

第 2 章 正常及恶性胃上皮的培养	17
--------------------------	----

1 引言	17
-------------	----

1.1	胃癌	17
1.2	正常胃上皮	18
2	胃癌组织原代培养的准备	19
2.1	生长培养基	19
2.2	起始培养基	19
2.3	肿瘤标本的预处理	19
3	胃癌细胞的原代培养	19
3.1	实体瘤的培养程序	19
	方案 2.1 实体胃癌细胞原代培养的准备	20
3.2	腹水培养程序	21
	方案 2.2 密度梯度离心从腹水中分离胃癌细胞	21
4	癌细胞的富集	21
4.1	悬浮细胞团	22
	方案 2.3 移出细胞团, 富集癌细胞	22
4.2	黏附性集落	22
	方案 2.4 用机械法使细胞聚集体脱壁富集胃癌细胞	22
	方案 2.5 刮除法富集胃癌细胞	23
	方案 2.6 分步消化法富集胃癌细胞	24
5	癌来源细胞的扩增和保存	24
5.1	漂浮细胞聚集体	25
5.2	紧密聚集的细胞团	25
	方案 2.7 分散细胞聚集体, 传代培养胃癌细胞	25
5.3	贴壁细胞	26
	方案 2.8 贴壁胃癌细胞的传代培养	27
5.4	含有贴壁细胞和悬浮细胞亚群的培养物	27
	方案 2.9 混合有悬浮胃癌细胞亚群和贴壁胃癌细胞亚群的传代培养	27
6	培养的胃癌细胞系的代表性特征	28
7	国际细胞库中的胃癌细胞系	30
8	正常胃上皮细胞	30
8.1	设备、试剂、培养基制备	30
8.2	组织的获取及安全	34
8.3	人体胃黏膜细胞分离和培养	35
	方案 2.10 用胶原酶消化和 Percoll 分离细胞的方法原代培养人胃黏膜上皮细胞	35
	方案 2.11 利用胶原酶/离散蛋白酶消化, 在胶原上接种原代培养人胃黏膜上皮细胞	36
	方案 2.12 利用胶原酶、链霉菌蛋白酶、透明质酸酶原代培养胃黏膜上皮细胞	37

8.4 人胚胎胃细胞的分离和培养	39
方案 2.13 人胚胎胃细胞的培养	39
8.5 人胃窦细胞的分离和培养	39
方案 2.14 人胃窦细胞的分离和培养	39
8.6 胃黏膜细胞培养物的鉴定	41
方案 2.15 体外胃上皮细胞生长测定	41
方案 2.16 PAS 细胞化学鉴定黏蛋白	42
方案 2.17 胃细胞黏液的免疫组织化学	42
方案 2.18 通过细胞角蛋白染色确认胃细胞	43
方案 2.19 用抗胃蛋白酶-II 和胃 H^+/K^+ -ATP 酶免疫荧光鉴定胃细胞 类型	43
方案 2.20 胃上皮培养物的光镜观察	44
方案 2.21 胃上皮培养物的电镜观察	45
8.7 正常胃上皮培养物的主要应用	46
致谢	46
材料来源	47
参考文献	48
 第 3 章 结肠癌细胞系的建立	 51
1 引言	51
2 培养基及试剂的配制	52
2.1 培养基	52
2.2 消化酶	53
2.3 消毒液	53
2.4 包被胶原	54
方案 3.1 包被 I 型胶原用于结肠癌细胞的培养	54
3 用肿瘤活检标本建立细胞系	54
3.1 原代培养	55
方案 3.2 结肠癌肿瘤组织的原代培养	55
3.2 传代培养	56
3.3 细胞的冷冻保存	56
3.4 特性鉴定	57
4 取材自腹水的细胞培养	58
方案 3.3 来自腹水的结肠癌细胞的培养	58
5 其他方法	58
5.1 饲养层细胞	58
5.2 异种移植	59
5.3 取材自遗传综合征患者的结肠癌细胞的培养	59

6 供应商	59
6.1 培养用塑料器皿	59
6.2 培养基	59
材料来源	59
参考文献	60

第4章 胰腺癌来源的培养细胞：基因改变的研究及在实验性胰腺癌转移模型中的应用

1 引言	63
2 细胞系的建立	64
2.1 肿瘤组织的来源	64
2.2 原代培养	64
方案 4.1 胰腺肿瘤组织的原代培养	64
方案 4.2 来源于腹水的胰腺肿瘤细胞的原代培养	66
3 肝转移实验	67
方案 4.3 裸鼠异种移植肿瘤转移实验	67
3.1 肿瘤转移分析结果	68
4 人胰腺癌原位移植模型	69
4.1 手术过程	69
方案 4.4 胰腺癌细胞系的原位移植	69
4.2 裸鼠胰腺癌细胞原位移植后的自然病程	69
4.3 移植肿瘤的肉眼观察	70
4.4 移植肿瘤的显微观察	70
5 基因改变	71
5.1 Ki-ras 基因突变（密码子 12）	71
5.2 p53 基因突变	71
5.3 CDKN2 A 基因的改变	71
5.4 基因研究的结果	72
材料来源	73
参考文献	74

第5章 体外膀胱癌培养的建立和鉴定

1 引言	75
1.1 背景	75
1.2 病理学	75
1.3 方法原理	76
2 培养基和试剂的准备	77
2.1 培养基和盐溶液	77