



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116836928 A

(43) 申请公布日 2023.10.03

(21) 申请号 202211265731.X

(22) 申请日 2022.10.10

(71) 申请人 浙江基石精准医学有限公司

地址 311100 浙江省杭州市余杭区五常街  
道文二西路952-1号431室(九橙西溪  
创投中心)

(72) 发明人 路威 张鑫鑫 孙志学

(51) Int.Cl.

C12N 5/09 (2010.01)

G01N 1/30 (2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

### (54) 发明名称

一种利用源于患者的肿瘤样细胞簇 (patient-derived tumor-like cell cluster, PTC) 构建妇科恶性肿瘤细胞系的原代细胞培养方法

### (57) 摘要

本发明提供了一种利用源于患者的肿瘤样细胞簇 (patient-derived tumor-like cell cluster, PTC) 构建妇科恶性肿瘤细胞系的原代细胞培养方法。PTC是原发性上皮细胞、间质细胞、成纤维细胞、免疫细胞和肿瘤细胞自组装并且增殖的结果,分裂时间短(3-6天),异质性高。利用PTC构建妇科恶性肿瘤细胞系,在保留细胞系的特性及增殖能力的同时,可提高细胞系培养成功率,降低细菌污染,缩短培养时间。

1. 一种利用源于患者的肿瘤样细胞簇(patient-derived tumor-like cell cluster, PTC) 构建妇科恶性肿瘤细胞系的原代细胞培养方法, 其中, 所述妇科恶性肿瘤细胞系培养方法仅包括利用PTC进行构建, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤一、收集源于妇科恶性肿瘤患者的可供实验标本, 构建PTC模型;

步骤二、基于PTC模型构建妇科恶性肿瘤细胞系;

步骤三、鉴定所培养细胞系为上皮来源妇科恶性肿瘤细胞系。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 在所述步骤一中的妇科恶性肿瘤, 包括但不限于卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、绒毛膜癌和其他恶性罕见妇科肿瘤; 在所述步骤一中的可供实验标本, 其特征在于, 包括但不限于手术组织、穿刺组织或者胸腹水。

3. 根据权利要求1所述的PTC构建方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤一、利用物理剪切或酶消化, 将源于妇科恶性肿瘤患者的实验标本分散形成单个细胞;

步骤二、在妇科恶性肿瘤培养基中, 上皮细胞、间质细胞、成纤维细胞、免疫细胞和肿瘤细胞自组装形成微球, 获得PTC模型。

4. 根据权利要求1所述的鉴定培养的妇科恶性肿瘤细胞系, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤一、利用多聚甲醛固定妇科恶性肿瘤细胞;

步骤二、利用苏木素对细胞核进行染色;

步骤三、利用伊红对细胞质进行染色;

步骤四、利用不同浓度梯度乙醇脱水;

步骤五、封片镜检。

5. 根据权利要求3所述的妇科恶性肿瘤培养基, 其特征在于, 以Advanced DMEM (dulbecco's modified eagle medium) 培养基为基底, 另添加成分包括1mM氢离子缓冲剂(HEPES)、1×GlutaMAX、100U/mL青霉素-链霉素、1×B27、1×胰岛素-转铁蛋白-硒-氨基乙醇(ITS-X)、1×非必需氨基酸、40ng/mL表皮细胞生长因子(EGF)、20ng/mL成纤维细胞生长因子(FGF-basic)、10 $\mu$ M ROCK抑制剂(Y-27632-07)、30ng/mL肝细胞生长因子(HGF)、100nM黄体酮和10nM  $\beta$ -雌二醇。

6. 根据权利要求4步骤四所述的不同浓度梯度乙醇, 其特征在于, 包括75%乙醇、90%乙醇和100%乙醇。

## 一种利用源于患者的肿瘤样细胞簇(patient-derived tumor-like cell cluster,PTC)构建妇科恶性肿瘤细胞系的原代细胞培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种妇科恶性肿瘤细胞系的原代细胞培养。

### 背景技术

[0002] 原代细胞培养是构建妇科恶性肿瘤细胞系的常用方法。原代细胞培养方法包括组织块培养法、消化培养法以及细胞培养法。组织块培养法,旨在将肿瘤组织分散成团块或碎片后置于涂有胶原薄层的培养皿中,直接处于恒温培养箱中培养,细胞从组织块爬出进行贴壁生长。然而,组织块培养法耗时较长,并且成纤维细胞由于较强的适应能力会早于肿瘤细胞游离出组织块,在组织周围环绕导致肿瘤细胞无法爬出,从而造成培养失败。消化培养法主要依赖于胶原酶(I/II)、透明质酸酶或胰蛋白酶等酶液对组织块进行消化培养。此外,通过酶解法获得的细胞粘连较少并且细胞膜完整,有利于传代培养的进行。然而,消化培养法不易去除悬浮液中除肿瘤细胞以外的杂质细胞,且由于酶消时间难以控制而导致操作失败。细胞培养法需通过物理或酶解使组织块分散形成单个细胞再进行培养,此种方法可保留细胞活力,便于对细胞各项指标开展实时监测。以上几种方法由于存在条件难以掌握、结果无法准确判读、无法避免细菌污染和耗时较长等问题,培养成功率较低。因此,利用PTC技术构建妇科恶性肿瘤细胞系,可为原代细胞培养困难等问题提供一个解决路径。

[0003] PTC是一项新启的构建肿瘤体外模型的技术。PTC是原发性上皮细胞、间质细胞、成纤维细胞、免疫细胞和肿瘤细胞自组装和增殖的结果,通过获取患者体内微小肿瘤组织,在体外自组装形成肿瘤微球。PTC自组装周期短,3-6天可完成细胞与细胞之间的自聚过程。本发明以PTC技术为基础,利用PTC构建人源妇科恶性肿瘤细胞系,可在减少细菌污染的同时缩短时间成本,保留妇科恶性肿瘤细胞系的特性及增殖能力。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种利用PTC构建妇科恶性肿瘤细胞系的原代细胞培养方法,该方法能缩短细胞系的培养时间,提高细胞系的培养成功率。

[0005] 本发明的技术方案:

[0006] 步骤一,构建源于妇科恶性肿瘤患者的PTC模型

[0007] 步骤二,基于PTC模型构建妇科恶性肿瘤细胞系

[0008] 步骤三,鉴定所培养细胞系为上皮来源妇科恶性肿瘤细胞系。

[0009] 进一步地,步骤一中构建妇科恶性肿瘤PTC的具体方法包括如下步骤:

[0010] I.1将新鲜的源于妇科恶性肿瘤患者的实体标本使用消毒的医用剪剪碎成肉糜状,加入消化液重悬,37℃进行消化;

[0011] 1.2消化终止后,用40μm过滤网过滤悬液,收集滤液,获得妇科恶性肿瘤原代细胞;或将新鲜的胸腹水标本离心沉降肿瘤细胞,重悬,获得妇科恶性肿瘤原代细胞;

[0012] 1.3离心步骤1.2中的滤液,弃上清,用妇科恶性肿瘤PTC专用培养基重悬沉淀,接种到低吸附孔板中,获得源于妇科恶性肿瘤患者的PTC模型。

[0013] 进一步地,步骤二中基于PTC模型构建妇科恶性肿瘤细胞系的具体方法包括如下步骤:

[0014] 1.1过滤、离心收集直径超过40 $\mu$ m的微肿瘤PTC,并用100 $\mu$ L的PTC培养基进行重悬;

[0015] 1.2将妇科恶性肿瘤PTC置于贴壁专用培养基,2-3天后获得妇科恶性肿瘤细胞系。

[0016] 进一步地,步骤三中鉴定所培养细胞系为上皮来源妇科恶性肿瘤细胞系的具体方法包括如下步骤:

[0017] 1.1取少量妇科恶性肿瘤贴壁细胞重悬于PTC专用培养基,加入4%多聚甲醛固定1h;

[0018] 1.2将细胞悬液调至适宜密度,离心甩片;

[0019] 1.3利用1%triton-100溶液透化10min,自来水清洗;

[0020] 1.4滴加苏木素,对细胞核进行染色15s,自来水清洗;

[0021] 1.5滴加1%盐酸乙醇分化4s,自来水清洗;

[0022] 1.6滴加伊红,对细胞质进行染色10s,自来水清洗;

[0023] 1.7将染色片子依次放入75%-90%-100%-100%乙醇中,每上下提取7-8次后转入下一浓度乙醇,每次提取时间相同;

[0024] 1.8利用二甲苯溶液对片子进行透明化处理10min;

[0025] 1.9滴加树脂封片,镜检。

## 附图说明

[0026] 图1.妇科恶性肿瘤PTC模型

[0027] 图2.基于PTC模型构建的妇科恶性肿瘤细胞系

[0028] 图3.经HE染色鉴定的上皮来源妇科恶性肿瘤细胞系

## 具体实施方式

[0029] 下面将对本发明的技术方案作进一步说明,但本发明并不仅限于此。

[0030] 实施例1

[0031] 收集黄豆粒大小、重为0.1g的卵巢癌患者术后组织标本,利用物理剪切和酶消化,将手术组织块分散形成单个细胞,重悬于妇科恶性肿瘤培养基,并以 $10^5/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种于低吸附表面培养皿,37 $^{\circ}\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ 条件下进行培养。每2-3天更换一次培养基。对获得的PTC模型进行筛选,置于特定配比的培养液中贴壁培养,获得卵巢癌细胞系。利用多聚甲醛固定卵巢癌细胞,利用苏木素对细胞核进行染色,利用伊红对细胞质进行染色,利用不同浓度梯度乙醇脱水,封片镜检,验证所得卵巢癌细胞系为上皮恶性来源。

[0032] 实施例2

[0033] 收集2-3条宫颈癌患者穿刺组织标本,利用物理剪切和酶消化,将穿刺组织分散形成单个细胞,重悬于妇科恶性肿瘤培养基,并以 $10^5/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种于低吸附表面培养皿,37 $^{\circ}\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ 条件下进行培养。每2-3天更换一次培养基。对获得的PTC模型进行筛选,置于培养液中贴壁培养,获得宫颈癌细胞系。利用多聚甲醛固定宫颈癌细胞,利用苏木素对细

胞核进行染色,利用伊红对细胞质进行染色,利用不同浓度梯度乙醇脱水,封片镜检,验证所得宫颈癌细胞系为上皮恶性来源。

[0034] 实施例3

[0035] 收集50-100mL子宫内膜癌腹水标本,离心获得单个细胞,重悬于妇科恶性肿瘤培养基,并以 $10^5/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种于低吸附表面培养皿,37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下进行培养。每2-3天更换一次培养基。对获得的PTC模型进行筛选,置于培养液中贴壁培养,获得子宫内膜癌细胞系。利用多聚甲醛固定子宫内膜癌细胞,利用苏木素对细胞核进行染色,利用伊红对细胞质进行染色,利用不同浓度梯度乙醇脱水,封片镜检,验证所得子宫内膜癌细胞系为上皮恶性来源。

[0036] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

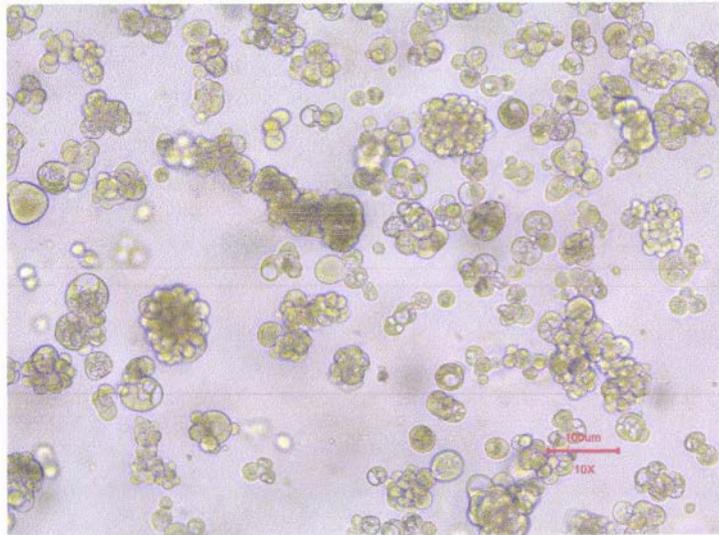


图1

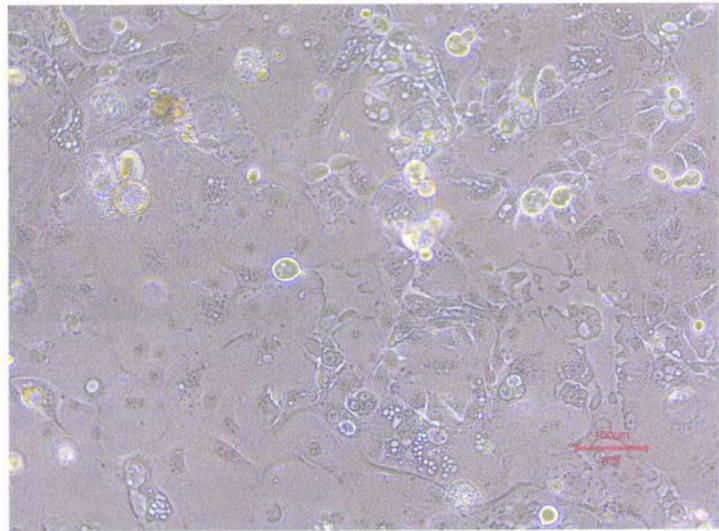


图2

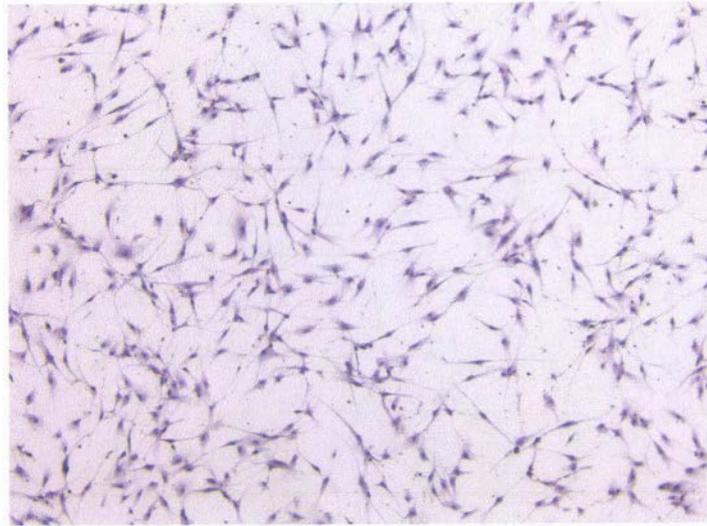


图3