

# 成人宫颈上皮细胞的原代培养及鉴定\*

曹颖 金哲<sup>△</sup> 于妍妍 徐翠

(北京中医药大学东方医院 北京 100078)

**摘要** 目的 探索采用无血清培养基原代培养成人宫颈上皮细胞的方法。方法 以成人的宫颈上皮组织为研究对象,采用胰蛋白酶-EDTA 消化法获得宫颈上皮细胞悬液,于上皮细胞专用无血清培养基中培养,采用免疫细胞化学法测定细胞中角蛋白及波形蛋白的表达,对细胞纯度进行鉴定。结果 原代培养 10-15 天细胞融合率达 60%,传代至 4-6 代,细胞出现生长衰退。早期细胞生长状态良好,细胞纯度在 90%以上。结论 采用酶消化法及 K-SFM 无血清培养基培养可获得纯度高的成人宫颈上皮细胞。

**关键词** 宫颈上皮细胞 原代培养 无血清培养基

中图分类号 R711.74 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)02-204-03

## Primary Culture and Identification of Adult Cervical Epithelial Cells\*

CAO Ying, JIN Zhe<sup>△</sup>, YU Yan-yan, XU Cui

(Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100078, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the primary culture method of adult cervical epithelial cells using serum-free keratinocyte medium. **Methods:** Adult cervical epithelial tissue pieces was obtained and digested in trypsin-EDTA to dissociate the cells and the single cell suspension was got. The cells were cultured in serum-free keratinocyte medium. The expression of keratin and vimentin was assayed by immunohistochemical staining method respectively to identify the cell purity. **Results:** The primary cells reach about 60% until 10 to 15 days following isolation and setup, the cells usually senesced at passage 4 to 6. The early passages cells grew well, cell purity was at least 90%. **Conclusion:** High purity rate adult cervical epithelial cells can be obtained by this kind of primary culture method.

**Key words:** Cervical epithelial cell; Primary culture; Serum-free medium

**Chinese Library Classification(CLC):** R711.74 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2012)02-204-03

### 前言

宫颈癌是发展中国家女性生殖系统发病率最高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,宫颈上皮细胞内高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的持续感染是导致宫颈癌发生的必要条件<sup>[2]</sup>。HPV DNA 逐渐整合进入感染细胞的宿主 DNA,是引起宫颈上皮细胞恶变的主要诱因之一<sup>[3]</sup>。目前常见的宫颈癌细胞系如 SiHa、HeLa、Caski 等,HPV DNA 均处于整合状态,难以反映 HPV 感染初期至中期的细胞变化。研究正常宫颈上皮细胞及携带 HPV 感染的宫颈上皮细胞的原代培养,有利于更好的了解 HPV 感染宫颈上皮细胞的病理改变,并为研究治疗 HPV 感染的药物提供实验基础。纵观国内外相关文献报道,美国西北大学的 CIN-612<sup>[4]</sup>及英国剑桥大学的 W12<sup>[5]</sup>是研究最为成熟的两种带毒细胞株,此两株细胞为人类认识 HPV 病毒感染早期及中期的生物学特性做出了很大贡献,但随着细胞传代次数的增加,游离的病毒质粒逐渐整合到宿主 DNA<sup>[6]</sup>,早期细胞愈发珍贵,普通研究者很难得到。国内学者<sup>[7,8]</sup>多通过培养胎儿宫颈上皮细胞并转染 HPV DNA 片段的方法,诱导永生化的宫颈上皮细胞系,在此基础上研究 HPV 感染的生物学特性,但由于细胞来源于实验室,与自然感染状态的差别尚有待商榷。宫颈上皮

细胞原代培养的难点在于(1)上皮细胞中多混杂成纤维细胞,在传统的血清培养中,成纤维细胞生长能力较上皮细胞更强,通过差速贴壁等方法难以去除,且随着传代次数增加,成纤维细胞的比例提高。(2)原代培养细胞,传代能力有限,能够通过生长危象多次传代的细胞少之又少。本文将介绍一种简便、易行的成人宫颈上皮细胞培养方法,希望通过我们的抛砖引玉,为各位同道的研究提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂、仪器

上皮细胞培养无血清培养基(Serum-free keratinocyte medium, K-SFM, Invitrogen10724),0.25%胰酶-0.02%EDTA, D-PBS(Invitrogen21600-010),胎牛血清(Gibco),dispase 酶(sigmaD4693),小鼠抗人细胞角蛋白抗体 CK(AE1/AE3, ZM-0069),小鼠抗人波形蛋白抗体(ZM-0260),通用二步法二抗(PV-9000),DAB 显色试剂盒(ZLI-9017),枸橼酸盐,封闭用进口羊血清,CO2 培养箱,离心机(雷勃尔),倒置相差显微镜,图像分析系统 Olympus-BX60。

#### 1.2 成人宫颈组织来源

取自北京中医药大学东方医院妇科因子宫肌瘤、子宫腺肌

\* 基金项目 国家自然科学基金面上项目(30873278)

作者简介 曹颖(1983-),女,博士研究生,主要研究方向:中西医结合防治宫颈疾病。Email: xouny02@163.com

<sup>△</sup>通讯作者 金哲 教授,主任医师,博士生导师。E-mail: jinzhe1954@sohu.com

(收稿日期 2011-09-09 接受日期 2011-10-03)

症行全子宫切除术的患者,年龄 40-45 岁,共 4 例,因宫颈 TCT 异常,HPV DNA 阳性行阴道镜活检的患者,年龄 24-35 岁,共 5 例。

### 1.3 细胞培养

采用胰蛋白酶消化法及 dispase 酶联合胰蛋白酶消化法。

1.3.1 组织取材 术中取下大小约为  $0.5 \times 1$  cm 组织,用含 100 U/ml 青霉素及 100  $\mu$ g/ml 链霉素的预冷 D-PBS 冲洗两次,置于预冷的 K-SFM 培养基中,1 小时内低温运送至实验室。

1.3.2 胰蛋白酶法消化 经含 100 U/ml 青霉素及 100  $\mu$ g/ml 链霉素的预冷 D-PBS 冲洗三次后,加入 0.25 %胰酶-0.02 %ED-TA,用眼科剪将组织块剪碎,37  $^{\circ}$ C 消化,每隔 2 分钟吹打消化液数次,反复 3 次后,倒置显微镜下观察游离细胞数,将消化液吸出,经 200 目细胞筛过滤后移入无菌离心管中,终止消化。为得到尽可能多的细胞,可加入新的消化液再次消化剩余组织块。将所得细胞悬液 300 g 离心 5 分钟,弃上清,加入适当 K-SFM 培养基计数,调整细胞浓度为  $6 \times 10^5$  /ml,接种于培养瓶中,5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}$ C 培养箱培养。

1.3.3 diaspase 酶联合胰蛋白酶消化法 经含 100 U/ml 青霉素及 100  $\mu$ g/ml 链霉素的预冷 D-PBS 冲洗三次后,加入 2.5 U/ml 的 diaspase 酶溶液 4  $^{\circ}$ C 消化 18 小时。经 dispase 酶消化后,宫颈组织的上皮层与真皮层界限明显,可用眼科镊沿分界撕开,分离两层组织,灰白色组织为上皮层,白色组织为真皮层。取上皮组织,用眼科剪剪碎,采用胰蛋白酶消化法继续消化,方法同 1.3.2 所述。

1.3.4 换液与传代 原代细胞于培养 48 小时后换液,约 10-15 天可第一次传代,以后每 5 天传代一次,-70  $^{\circ}$ C 冰箱冻存留种。细胞可传代 4-6 次。

### 1.4 细胞鉴定

采用免疫细胞化学染色法。将盖玻片经 100  $\mu$ g/ml 多聚赖氨酸包被后置于 24 孔板中,每孔接种细胞为  $5 \times 10^4$  个,培养 4 天后,细胞融合至约 70%。PBS 冲洗 2 次,加入 4%多聚甲醛 4  $^{\circ}$ C 固定 20 分钟,PBS 冲洗 2 次,3% $\text{H}_2\text{O}_2$  室温孵育 10 分钟,微波抗原修复,羊血清室温封闭 10 分钟,分别滴加小鼠抗人细胞角蛋白抗体、小鼠抗人波形蛋白抗体(稀释浓度 1:100),以 PBS 为阴性对照,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,按二抗试剂盒说明操作滴加二抗,DAB 显色,自来水漂洗终止染色,中性树胶封片,Olympus-BX60 图像分析系统照相。

## 2 结果

### 2.1 细胞生长状态

原代细胞经 24 小时培养后仅少部分贴壁,呈集落样生长,48 小时后部分生长密集的细胞集落呈“铺路石”样,混有少量梭形成纤维细胞。由于 K-SFM 培养基更适合上皮细胞生长,故细胞培养过程中,成纤维细胞未见明显增多。Diaspase 酶联合胰蛋白酶消化法在一定程度上去除了真皮层,细胞中混杂成纤维细胞的比例更少。细胞传至 4-6 代后,生长趋于缓慢,传代后细胞贴壁数量减少,培养后细胞未见明显扩增。

### 2.2 细胞鉴定

免疫细胞化学结果显示,细胞角蛋白阳性率、波形蛋白阴性率均达 90% 以上,证明所培养细胞为上皮源性,即宫颈上皮

细胞。

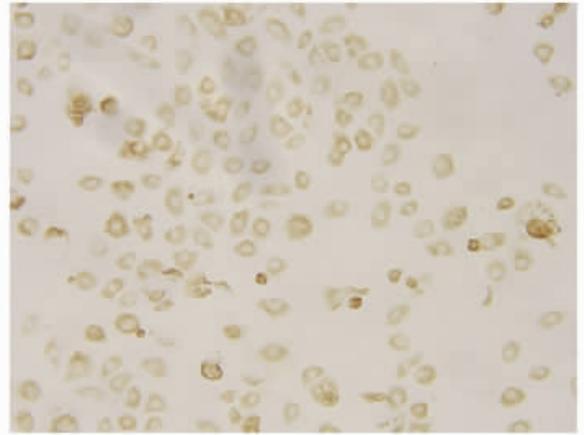


图1 角蛋白阳性的宫颈上皮细胞(200 $\times$ )

Fig.1 Keratin positive of cervical epithelial cells(200 $\times$ )

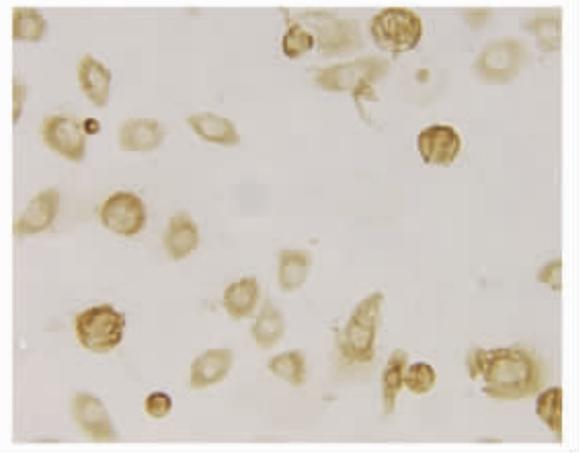


图2 角蛋白阳性的宫颈上皮细胞(400 $\times$ )

Fig.2 Keratin positive of cervical epithelial cells(400 $\times$ )

## 3 讨论

在细胞培养条件下,角质细胞需要成纤维细胞的支持才能形成克隆,故最初的宫颈上皮细胞培养,需借助丝裂霉素处理或钴源照射后的小鼠成纤维细胞--3T3 细胞作为滋养层。直到 Rheinwald JG 和 Green H 等发现表皮生长因子(EGF)和霍乱毒素在角质细胞培养中的作用之后<sup>[9]</sup>,角质细胞才能够在体外被分离、培养。目前通用的宫颈上皮细胞培养方法有两种:(1)使用添加了氢化可的松及霍乱毒素的 DMEM 培养基,借助 3T3 细胞饲养层,培养宫颈上皮细胞。这种方法的优点是细胞贴壁及生长较快,并可促进细胞分化。(2)使用本文所述角质细胞专用无血清培养基如 K-SFM 或 KGM<sup>[10]</sup>。本种方法的优点在于排除了成纤维细胞对上皮细胞的干扰,培养基成分单纯,便于细胞分子机制及药理学研究,缺点是细胞贴壁及生长较慢,在不借助其他生长介质的条件下,细胞多呈单层生长,处于低分化状态<sup>[11]</sup>。此外借助气液界面培养的方法如胶原筏法,上皮细胞也可以高度分化,生长为复层,类似人类表皮的结构<sup>[12,13]</sup>,从而有利于 HPV 病毒的扩增<sup>[4]</sup>。

Marilia MQ 等研究表明, 培养基中较低的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 有利于角质上皮细胞的生长<sup>[13]</sup>, 本研究所用 K-SFM 培养基中的  $\text{Ca}^{2+}$  含量为 0.09 mM; 且实验中使用不含钙、镁离子的 D-PBS 作为冲洗缓冲液, 以排除外源性  $\text{Ca}^{2+}$  的干扰。

本研究在宫颈 HPV DNA 阳性患者宫颈取材时, 选择阴道镜下诊断为宫颈上皮内瘤变处取材, 并于培养至第 2 代时采用凯普导流杂交 HPV DNA 检测法检测是否存在高危型 HPV 感染, 试图培养携带 HPV 感染的宫颈上皮细胞, 但无一例发现 HPV 感染, 考虑其原因可能与取材例数较少, 未取到感染病毒的组织有关。

本研究是对成人宫颈上皮细胞原代培养方法的初步探索, 通过采用无血清培养基培养可得到大量、纯度高的成人宫颈上皮细胞, 操作简单, 重复性好, 为培养自然携带 HPV 感染的宫颈上皮细胞奠定了实践基础。自然感染 HPV 的宫颈上皮细胞系的建立将为研究 HPV 感染的自然史及治疗 HPV 感染的药物提供有力的工作基础, 具有广阔的应用前景。在今后的研究中, 我们将在增加带毒组织取材的准确性的基础上, 采用无血清培养基联合胶原筏的培养方法, 为建立自然感染 HPV 宫颈上皮细胞系而努力。

#### 参考文献(References)

- [1] Ahmedin Jemal, Freddie Bray, Melissa M. Center, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61 (2): 69-90
- [2] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. J Pathol, 1999, 189(1):12-19
- [3] Saewha Jeon, B. Lynn Allen-Hoffmann, Paul F. Lambert. Integration of Human Papillomavirus Type 16 into the Human Genome Correlates with a Selective Growth Advantage of Cells [J]. J. Virol., 1995, 69(5):2989-2997
- [4] Mary A. Edell, John B. Hudson, Todd R. Golub, et al. Amplification of Human Papillomavirus Genomes In Vitro Is Dependent on Epithelial Differentiation[J]. J Virol, 1991, 65(5), 2254-2260
- [5] Stanley MA, Browne HM, Appleby M, et al. Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line [J]. Int J Cancer, 1989,43(4):672-676
- [6] William Alazawi, Mark Pett, Barbara Arch, et al. Changes in Cervical Keratinocyte Gene Expression Associated with Integration of Human Papillomavirus 16[J]. Cancer Res, 2002,62(23):6959-6965
- [7] 曹泽毅,赵健,廖秦平,等.人乳头状瘤病毒 16 型 E6、E7 基因诱导的人子宫颈永生上皮细胞系的建立及其生物学特性的鉴定[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(7): 486-488  
Cao Ze-yi, Zhao Jian, Liao Qin-ping, et al. Immortalization of human embryonic cervical epithelial cells induced by E6, E7 genes of human papillomavirus 16 [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2004,39 (7): 486-488
- [8] 赵超,白丽霞,屠铮,等. 人乳头状瘤病毒 16 型 E6、E7 基因转染的人宫颈上皮永生细胞系的建立及鉴定 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2006,7(4):278-282  
Zhao Chao, Bai Li-xia, Tu Zhe, et al. Immortalization of human embryonic cervical epithelial cells by transfection of E6, E7 genes of human papillomavirus 16 [J]. Chin J Clin Obstet Gynecol, 2006,7(4): 278-282
- [9] Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human keratinocytes [J]. Nature, 1977, 265(5593): 421-424
- [10] R. Ian Freshney, Mary G. Freshney. Culture of epithelial cells [M]. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2002.137-169
- [11] Coolen NA, Verkerk M, Reijnen L, et al. Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells [J]. Cell Transplant, 2007, 16(6):649-661
- [12] 克莱尔·怀斯. 上皮细胞培养指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 129-133  
Clare Wise. Epithelial Cell Culture Protocols [M]. Beijing: Science Press, 2005:129-133
- [13] Marilia MO, Takashi H, Tatsuo S, et al. The Establishment of Optimum Culture Condition for Keratinocytes from Human Adult Skin, and an Attempt to Graft Cultured Epidermal Sheets onto Athymic Mice[J]. Kcio J Med, 1990,39(1): 14-20