

一种改良宫颈鳞癌原代培养方法的建立

杨红杰¹ 吴宜林² 李忻琳¹ 郑素娟³

(1 广西柳州市妇幼保健院 广西 柳州 545007 2 中南大学湘雅二医院 湖南 长沙 410011 ;

3 河南省登封市人民医院妇产科 河南 登封 452470)

摘要 目的 探讨不同培养条件对宫颈鳞癌原代培养的可行性。方法 取确诊为宫颈鳞癌患者的活检或手术标本,通过对消化时间及重悬液量进行改良原代细胞培养,观察鳞癌细胞生长状况,并比较其与传统消化法的细胞生长率,免疫组化进行细胞鉴定。结果 消化时间为3小时,重悬液量为1ml时细胞生长率最高。改良法24小时细胞生长率为61.54%,传统消化法24小时细胞生长率为7.69% ($\chi^2=5.14$, $P<0.05$)。活检标本细胞生长率80%,手术标本3例无一例细胞生长。结论 采用消化时间为3小时,重悬液量为1ml成功建立了宫颈鳞癌原代培养方法,活检标本较手术标本更易培养成功。

关键词 原代培养; 宫颈癌; 改良法

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)11-2107-03

Establishment of Modified Method for Primary Culture of Uterine Cervix Carcinoma

YANG Hong-jie¹, WU Yi Lin², LI Xin-lin¹, ZHENG Su-juan³

(1 Maternal and Child Health care Hospital, Lliuzhou, 545007, China; 2 The second Xiang-Yan hospital, Central South University, Changsha, 410011, China; 3 Dengfeng People Hospital, Dengfeng, 452470, China)

ABSTRACT Objective: To study the possibility of modified method for primary culture of uterine cervix carcinoma. **Method:** Cervix carcinoma specimens were obtained from patients underwent biopsy or operation, then the primary culture were performed which differ from traditional method in digestion time and resuspension fluid quantity. The cell growth rate were compared between modified and traditional method, also the cell were identified by immunocytochemistry. **Results:** At 3 hours of digestion time and 1 ml of resuspension fluid, the higher cell growth rate can achieved in modified method (61.54%), which was statistical significance when compared with traditional method (7.69%; $\chi^2=5.14$, $P<0.05$). However, either of the two method, no cell growth was observed in operative specimens. **Conclusions:** A modified method of primary culture in cervix carcinoma can be established at 3 hours of digestion time and 1ml resuspension fluid quantity, especially for biopsy specimens.

Key words: Primary culture; Cervix carcinoma; Modified method

Chinese Library Classification (CLC): R-332, R322.61 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2107-03

前言

细胞培养技术已广泛应用于各类实验研究中^[1-2]。原代培养的肿瘤细胞接近和反映体内生长特性,适合于多个领域的研究。然而实体肿瘤的原代培养所需时间长、细胞生长率低、实验条件要求高限制了其在肿瘤研究中的应用^[3-4]。利用原代肿瘤细胞悬液进行药物敏感实验的方法肿瘤细胞在体外生存期短且并非纯化的肿瘤细胞,无法排除肿瘤间质细胞及血细胞的干扰,实验误差大,其临床应用受到限制^[5]。各种不同的肿瘤细胞原代培养方法成功率差异较大。传统的实体肿瘤原代细胞培养主要是组织块法及酶消化法。组织块法具有:并非所有的组织块均可长出肿瘤细胞,组织块中常首先爬出成纤维细胞,且成纤维细胞包绕组织块后致肿瘤细胞难以爬出而培养失败,容易污染;所需时间长,一般需要一周左右的时间细胞才能慢慢爬出等缺点^[6]。胶原酶消化法消化时间难于控制,成本较组织块法

高,需加入多种细胞生长因子如表皮生长因子等缺点。本文从改变消化时间及重悬液量的方法进行改良,成功的建立了宫颈鳞癌原代培养方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI1640、HEPES、I型胶原酶购自Gibco公司。胰岛素、青霉素、链霉素购自华北制药有限公司。CK-19、Vimentin抗体、SABC免疫组化试剂盒购自北京中山生物科技有限公司。硫酸庆大霉素购自江西制药有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 取材 2007年7月-2008年4月间中南大学湘雅二医院妇产科确诊的宫颈癌患者,取材前经伦理委员会同意并签署患者知情同意书,活检标本取材前常规络合碘消毒外阴,0.1%新洁尔灭消毒阴道、宫颈,取材后标本立即置硫酸庆大霉素溶液中漂洗一遍,去除血块及表面坏死组织后置无菌含高浓度(1000 u/ml)双抗的RPMI1640中。手术标本于离体后20分-1小时内于无菌状况下取材,取材后经无菌生理盐水冲洗后立即

作者简介 杨红杰(1981-)女,硕士,主治医师,主要研究方向:妇科肿瘤。电话:13768866716 E-mail: yanghongjie.1119@163.com
(收稿日期: 2010-12-15 接受日期: 2011-01-12)

置无菌含高浓度双抗的 RPMI1640 中。并于 2 小时内进行分离培养。

1.2.2 消化及培养 将标本置超净工作台内，去除脂肪和血管，用含高浓度双抗的 PBS 液漂洗 2-3 遍，以眼科剪剪碎呈糊状，再次加入含高浓度双抗的 PBS 液浸泡 5-10 min，弃上清后，加入约 5 ml 胶原酶 I 型(1 mg/ml) 进行消化，分别消化 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、8 小时、24 小时，每组 3 例，消化后将组织分成三等份分别重悬于 1ml、2 ml、5 ml 培养基 /50 ml 培养瓶中接种，观察消化时间及重悬培养基量对细胞生长率的影响。

1.2.3 形态学观察及免疫细胞化学染色 取消化 3 h 时组织约 0.5 ml，加入 PBS 液，用吸管尽量吹散粘稠组织呈碎片状、离心 1000 转 5 min，弃上清，加入少量完全培养基(20 %胎牛血清，青霉素 100 U/ml，链霉素 10 0 U/ml)，40 ml 培养瓶 1 ml/ 瓶，250 ml 培养瓶 2 ml/ 瓶，以液体不流动，恰巧湿润组织为准，每瓶接种组织量不宜太大，以刚好松散铺满瓶底为准，接种后第一天补加少量完全培养基并观察照相。剩余组织加 5 ml I 型胶原酶(0.25mg/ml)消化液继续消化过夜。第二天收集细胞以 10⁷/瓶密度接种，补加培养基至 5 ml/ 瓶，静止培养。原代细胞贴壁后相差显微镜下观察并照相，肿瘤细胞贴壁后呈多边形，成纤维细胞则伸展为栅栏状。

常规细胞爬片后弃去培养皿中的培养液，PBS 漂洗 2 次，10 %中性甲醛固定 1 h，0.1 M 的 PBS 液漂洗，3 %H₂O₂- 甲醇液浸泡 10 min 消除内源性过氧化物酶，PBS 洗涤 2 min× 3 次，5 %牛血清白蛋白封闭 10 min，加入鼠抗人波状蛋白及角蛋白 ck19 抗体工作液(1 :100)，湿盒内孵育 1 h，PBS 洗涤，滴加生物素化羊抗鼠二抗，孵育 10 min，滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液，孵育 10 min，常规行 DAB 显色、复染、脱水、透明、封片。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件分析计数资料采用配对四格表资料校正 χ^2 检验， $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 不同消化时间及重悬液量的原代细胞生长率

经过 3 小时的消化组织消化为絮状，有较多粘液相连，此时镜下可见细胞较为松散，由粘液相互粘附，质稀薄，亦有小组织块与粘液相连，此时即可终止消化，用吸管尽量将组织吹散，使其分散成碎片状，后加 1 ml 培养基接种入培养瓶，此种方法细胞生长率最高(见表 1)，应用这种方法进行培养的原代细胞经过 3 周生长可爬满培养瓶底。

表 1 不同消化时间及重悬液量的原代细胞生长率(%)

Table 1 Primary cell growth rate(%) in different digestion time and resuspension fluid quantity

Digestion time(hours)	n	Primary cell growth rate(%) in different resuspension fluid		
		1ml	2 ml	5 ml
1	3	0	0	0
2	3	33.3	0	0
3	3	100.0	0	0
4	3	66.7	0	0
8	3	33.3	33.3	33.3
24	3	33.3	33.3	0

2.2 两种原代培养方法的细胞生长率比较

对 13 例标本分别用短时间胶原酶消化法及胶原酶过夜消化进行原代培养，短时间胶原酶消化法 8 例有细胞生长，而过夜消化法仅有一例培养成功。两者比较有显著性差异($\chi^2=5.14$ ， $P<0.05$)。

2.3 活检标本及手术标本细胞生长率的比较

13 例标本中其中 10 例系活检标本其中 8 例培养成功，3 例为手术标本无一例培养成功。

2.4 形态学观察

2.4.1 相差显微镜观察

传统胶原酶过夜消化后细胞均分离为单个，大小不等，包浆透亮，状态良好(图 1A)，培养 2 天后呈小簇状贴壁生长，肿瘤细胞及成纤维细胞辨别不清，未贴壁细胞折光增强、少数萎缩、胞浆浑浊，呈现凋亡状态(图 1B)。继续培养至 21 天，细胞可爬满培养瓶底，此时肿瘤细胞及成纤维细胞混杂存在，无明显分区(图 1C)。

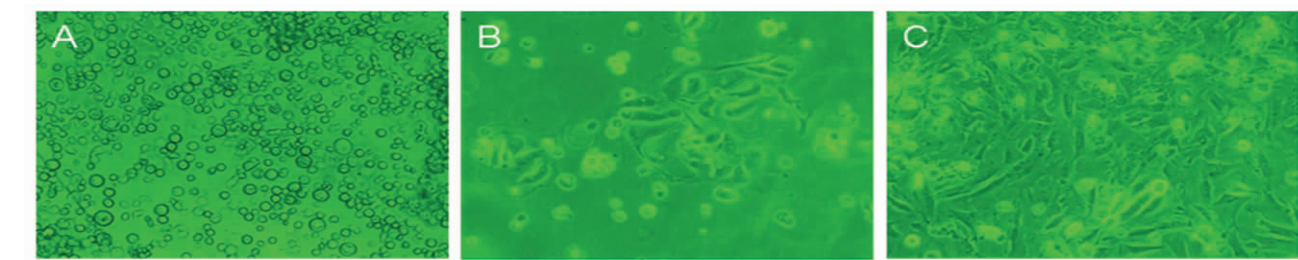


图 1 传统法培养的宫颈癌细胞(200×)

注：A 原代培养第 1 天，B 原代培养 2 天，C 原代培养 21 天

Fig.1 Traditional culture of cervix carcinoma cell(200×)

Note: A 1 day primary culture, B 2 days primary culture, C 21 days primary culture

改良法接种后 24 小时即可见到松散组织内部及边缘较多量细胞贴壁并开始增殖(如图 2A),成纤维细胞少或无、散在分布,待培养至 20 余天左右时,细胞可长满培养瓶的底部,呈不

规则铺路石样,局部细胞有融合及重叠生长,此时成纤维细胞也生长迅速,与肿瘤细胞分区明显(如图 2B-D)。

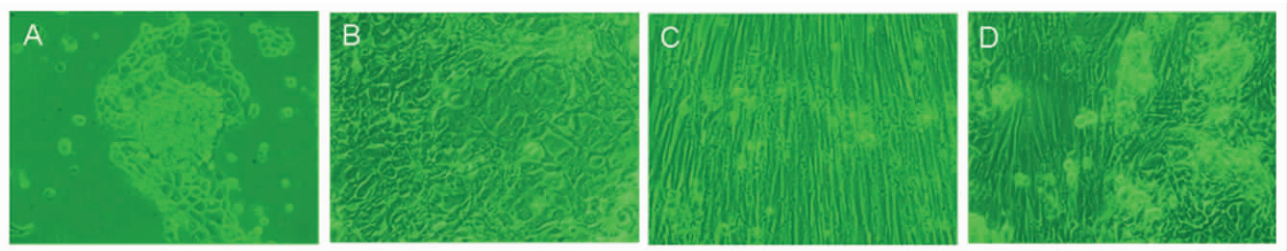


图 2 改良法培养的宫颈癌细胞(200×)

注:A 原代培养第 2 天,B 原代培养 21 天(肿瘤细胞),C 原代培养 21 天(成纤维细胞),D 原代培养 21 天(左 成纤维细胞;右 肿瘤细胞)

Fig.2 Modified culture of cervix carcinoma cell(200×)

Note: A 2 days primary culture, B 21 days primary culture(carcinoma cell), C 21 days primary culture(fibroblast cells), D 21 days primary culture(left fibroblast cell, right carcinoma cells).

2.4.2 免疫细胞化学鉴定

上皮细胞角蛋白 ck19 染色阳性而波状蛋白染色阴性(见图 3A),成纤维细胞波状蛋白染色阳性而角蛋白染色阴性(见图 3B)。

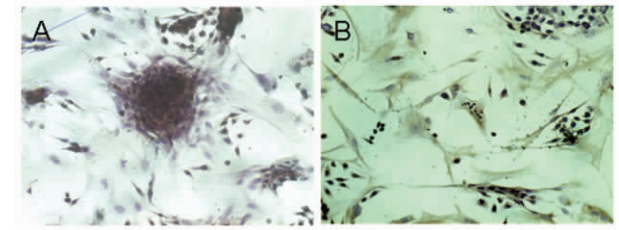


图 3 宫颈癌原代细胞免疫细胞化学染色(200×)

注:A CK19 B 波状蛋白

Fig.3 Immunocytochemistry of primary cervix carcinoma cell(200×)

Note :A CK19 B vimentin

3 讨论

原代细胞培养多采用手术标本进行。本研究利用活检标本进行细胞的原代培养,虽然组织量较少,但成功率较高,而手术标本 3 例无一例培养成功。推测可能与:①临床分期:手术患者临床分期早,所取组织少且含有较多量正常组织;②手术过程中器官离体时间长,血供终止后肿瘤组织缺血时间长,导致细胞活力降低有关。

我们经过实验发现利用改良法进行原代细胞培养成功率明显增高,考虑改良法的优点在于:将组织消化为絮状后即终止消化,减轻了消化液对肿瘤细胞的损伤,同时去除了大量的成纤维细胞,细胞接种时加极少量培养基接种入培养瓶,使消化分离的细胞依靠粘液样物(其内含大量未完全分散细胞)与培养瓶壁紧密接触,可以促使其贴壁,又可维持组织湿润细胞存活。而应用传统消化法所得细胞为单个细胞,缺乏促使细胞贴壁的粘液成分,细胞不宜成活,生长率低。

原代肿瘤培养在肿瘤研究中占有重要地位,但因其细胞生长率低,在体外难以成活使其广泛应用受到限制。传统消化法由于细胞生长率低,较适用于其他不需要细胞长期存活的实验研究中,如肿瘤药物敏感性试验^[7-8],原代肿瘤细胞三维培养模型的建立^[9-10]等,应用本改良法对宫颈活检标本进行原代培养,成功率高、实验条件要求低、适合在普通实验室开展。

参考文献(References)

[1] Lee MY, Chou CY, Tang MJ, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation [J]. Clin Cancer Res, 2008(15): 4743-4750

[2] Ridky TW, Chow JM, Wong DJ, et al. Invasive three-dimensional organotypic neoplasia from multiple normal human epithelia [J]. Nat Med, 2010(12): 1450-1455

[3] 易伟,牛洪泉,陶胜忠,等.人脑胶质瘤细胞的原代培养及生长活性观察[J].中华神经外科疾病研究杂志. 2005 4(3): 245-247

Yi Wei, Niu Hong-quan, Tao Sheng-zhong, et al. Characterization and growth activity observation of primary human gliomas cell culture [J]. Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research, 2005 4 (3): 245-247

[4] 王金渊,王斌全,张海利.喉鳞状细胞癌细胞的原代培养[J].临床耳鼻喉科杂志, 2005,19(2):123-126

Wang Jin-yuan, Wang Bin-quan, Zhang Hai-li. A study on primary culture in vitro of twenty-one laryngeal squamous carcinoma tissues [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology, 2005 19(3): 123-126

[5] 刘敏,王朝晖,李玲.癌细胞原代培养对化疗药物敏感性的探讨[J].中国微生态学杂志, 2008,(3):241-242,245

Liu Min, Wang zhao-hui, Li Ling. Chemosensitivity to primary cultured cancer cells [J]. Chinese Journal of Microecology, 2008, (3): 241-242,245

[6] 葛圣雷,朱纲华,陈主初,等.鼻咽癌原代培养细胞分泌性蛋白图谱的初步研究[J].现代生物医学进展,2007, 7(8):1200-1204

Ge Sheng-lei, Zhu Gang-hua, Chen Zhu-chu, et al. Preliminary Study of the Cell-secreted Proteomes of Nasopharyngeal Carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007,7(8):1200-1204

[7] Zhang Y, Qu X, H u X. Reversal of P-glycoprotein-mediated multi-drug resistance by the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in human gastric adenocarcinoma cells [J].Journal of Pathology,2009,218(2):248-255

[8] Kobayashi H. Collagen gel droplet culture method to examine in vitro chemosensitivity [J]. Methods Mol Med, 2005,110:59-67

[9] Burgué s JP, Gó mez LJ, Pontones L, et.al. A Chemosensitivity Test for Superficial Bladder Cancer Based on Three-Dimensional Culture of Tumour Spheroids [J]. European Urology, 2007,51(4):962-969

[10] Becker JL andBlanchard DK. Characterization of Primary Breast Carcinomas Grown in Three-Dimensional Cultures [J]. Journal of Surgical Research, 2007, 142(2):256-262