

连续微量培养液胃癌组织块贴壁培养法

刘国红, 柴玉荣, 朱晓燕, 张钦宪

关键词: 胃癌; 组织块培养; 原代培养

中图分类号: R73-35⁺1 文献标识码: B

文章编号: 1000-8578(2008)02-0147-02

0 引言

目前采用蛋白质组学对胃癌的研究, 多采用胃癌手术, 活检标本或现成的胃癌细胞系。但胃癌组织有许多间质成分, 比如成纤维细胞, 这些都会对胃癌蛋白质组分析产生干扰, 而胃癌细胞系虽然细胞种类单一, 获取容易, 但因传代次数过多, 代数不明, 其蛋白质表达与在体胃癌细胞相比是否发生变异, 均是我们研究胃癌蛋白质组过程中担忧的问题。而胃癌组织原代培养既能反映原始组织细胞特点, 又能排除间质成分的干扰, 是研究胃癌细胞分化、形态及功能异常、浸润性、转移性、遗传特征和临床用药的理想材料。为了更好地研究胃癌蛋白质表达情况, 我们对原有的胃癌组织原代培养方法加以改良, 建立了较成功的培养体系, 以期为后续的胃癌蛋白质组学研究和相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与标本

RPMI1640, 灭活胎牛血清, Hepes, 青霉素, 链霉素, 两性霉素 B, 胰岛素, 25 cm² 培养瓶 (铺被鼠尾胶原); 21 例胃癌组织取自郑州大学一附院手术标本 (2006.04 ~ 2006.12), 病理确诊均为胃癌。

1.2 方法

1.2.1 培养液 RPMI1640 的配制^[1]

生长培养液: 灭活胎牛血清 20%, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μg/ml, Hepes 缓冲液 25 mmol/L, 碳酸氢钠 20 mmol/L, 胰岛素 0.5 U/ml。运输培养液: 不含血清且另加两性霉素 B 2 μg/ml, 其余同

生长培养液。

起始培养液: 不含血清也不加两性霉素, 其余同生长培养液。

1.2.2 胃癌组织块种植 去除胃癌组织附带的脂肪、结缔组织及坏死部分, 在平皿中用运输培养液洗 3 次, 剪碎胃癌组织成 1 mm³ 的小块, 接种于涂有鼠尾胶原的培养瓶中, 先平置于 37 5% CO₂ 培养箱中 3h 左右使组织块边缘干涸, 然后补加微量起始培养液^[2-3], 37 静置培养, 24 h 后换液。

1.2.3 成纤维细胞的去除 采用机械刮除法^[4]。把胶塞剪成三角形插在不锈钢丝末端制成橡胶刮头, 放入试管中高压蒸汽灭菌后备用。上述组织块培养 6 d 后, 将培养瓶置于相差显微镜下观察, 有上皮样细胞生长的组织块用记号笔在瓶外做标记, 换液时未标记的组织块用橡胶刮头刮掉, 有标记的保留并加入培养液继续培养。如有成纤维细胞残留, 可重复刮除。

1.2.4 胃癌细胞的鉴定^[4] 胃癌细胞爬片培养, 常规 HE 染色, PAS 染色。

免疫组化 SP 法检测上皮膜抗原 (EMA) 和癌胚抗原 (CEA)。

2 结果

从培养的第 3 d 起, 部分组织块有上皮样细胞开始向外移行生长, 第 3 d 换了全量生长培养液后, 我们陆续观察到, 有的组织块开始有成纤维细胞向外移行生长, 且一个组织块仅见到一种类型的细胞生长, 要么是上皮样细胞, 要么是成纤维细胞。用橡胶刮头刮除后, 成纤维细胞明显减少, 通过反复刮除成纤

维细胞生长的组织块, 最后不存在成纤维细胞的污染和过度生长, 胃癌细胞纯化、单一。相差显微镜观察及 HE 染色显示细胞异形性明显。PAS 染色阳性, 显示细胞有丰富的多糖 (粘蛋白)。EMA 及 CEA 染色阳性, 表明培养的组织块具有上皮源性和恶性特征。

3 讨论

胃癌组织原代培养在国内外早有尝试, 但培养的成功率较低, 多年来对胃癌的研究往往采用胃癌组织、细胞系或胃癌原代短期培养 (混有非肿瘤细胞^[5]), 而胃癌蛋白质组学研究的兴起使胃癌细胞原代培养迫在眉睫, 为此我们于 2006 年 4 月 ~ 2006 年 12 月对 21 例胃癌组织进行组织块静置干贴壁原代培养, 并在原有培养技术和操作方法的基础上, 不断探索改良, 建立了行之有效的连续微量培养液组织块贴壁培养法。

3.1 胃癌组织的取材和预处理

胃癌组织必须从经病理证实的肿瘤组织中无菌切取, 选择肿瘤块边缘的组织或肿瘤组织与正常组织交界处的组织, 因该处肿瘤细胞的活性、代谢都比较旺盛, 易贴壁生长。取材后立即放入运输培养液中保鲜, 不含血清, 但应加入两性霉素 B 2 μg/ml 以防霉菌污染, 两性霉素 B 能有效抑制霉菌的生长, 但不能在培养液中长期存在, 否则对胃癌细胞的生长不利。我们选择在运输胃癌组织和剪碎组织的过程中用运输培养液。取材后应尽早进行培养, 否则置 4 冰箱过夜, 但不能超过 24 h。

3.2 剪碎组织和组织块种植

去除胃癌组织附带的脂肪、结缔组织及坏死部分, 在平皿中用运输培养液洗 3 次, 移至试管口, 用眼科剪剪碎胃癌组织成 1 mm³ 的小块, 不宜过细, 否则易漂浮。过大则块内细胞长时间得不到营养而死亡。

组织剪碎后, 向试管内加 2 ml 起始培养液, 将组织块及细胞吹打均匀, 吸取适量加于细胞培养瓶的培养面, 并用滴管的尖部拨动组织块至密度适当、分布均匀 (由于起始培养液较少, 所以组织块不能太多, 组织块间距 0.5 cm^[3]), 然后将培养瓶慢慢立起, 吸弃瓶底多余培养

收稿日期: 2007-03-05; 修回日期: 2007-09-17

作者单位: 450052, 郑州大学基础医学院组胚教研室

通讯作者: 张钦宪 E-mail: qxz53@zzu.edu.cn

作者简介: 刘国红 (1972-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事消化系统肿瘤分子生物学研究

液。平置于 37 5% CO₂ 培养箱中 3 h 左右使组织块边缘干涸,然后补加微量起始培养液(刚好能覆盖培养瓶底面即可,否则组织块易漂浮)静置培养。

3.3 培养瓶的取放方法和换液方法

组织块贴壁培养过程中,换液与观察时培养瓶的取放十分重要。必须先将培养瓶缓慢直立后才能取出培养瓶;在放入培养箱和做显微镜观察时,须十分缓慢地将培养瓶放平,确保组织块不受液体的晃动而脱落,绝不能将培养瓶平拿起走动。

为确保组织块尽快贴壁,开始培养液用量较少,但为了保持足够的营养及酸碱平衡,必须 24 h 换液 1 次。换液时培养瓶直立,吸弃全部旧培养液,加入等量新培养液,微量培养液的培养时间,一般要连续 3~7 天或更长,视组织块长出细胞的快慢而定。待组织块周围长出细胞后,换液时才能将培养液增加到常规量或更多,并且应保持 3~5 天的静置培养,以利于细胞的迅速生长。

因为运输用培养液和起始培养液均未加血清,成纤维细胞的生长依赖于血清的存在,所以生长受到抑制,而肿瘤细胞的生长不依赖血清的存在,所以在第 3 天,我们首先观察到有上皮样细胞从某些组织块向外移行生长,而不是成纤

维细胞。到第 3 天换为全量生长培养液,我们陆续观察到,有的组织块开始有成纤维细胞向外移行生长。

3.4 成纤维细胞清除时机和方法的选择

肿瘤细胞对血清的需求比正常细胞低,正常细胞培养不加血清不能生长,肿瘤细胞在低血清/无血清培养基中也能生长,肿瘤细胞对培养环境适应性较大,是因肿瘤细胞有自泌性产生促生长物质之故,但这并不说明肿瘤细胞完全不需要这些成分。因此早期采用微量无血清的起始培养液培养组织块,胃癌细胞和成纤维细胞的生长都会有所减慢。因此在第三天观察到某些组织块有上皮样细胞长出后,我们并不急于清除成纤维细胞,而是换成全量含 20% 胎牛血清的生长培养液继续稳定培养 3 天以上,等有大量组织块都有细胞长出后再开始成纤维细胞清除。采用机械刮除法简单可靠,能从根本上把长出成纤维细胞的组织块及周围的细胞清除掉,避免了成纤维细胞的污染和过度生长现象,使胃癌细胞纯化率达 100%。

本文建立的连续微量培养液组织块贴壁培养法,贴壁生长率明显高于常规组织块贴壁法。常规组织块培养法^[4]经 2~4 小时干涸翻转培养瓶后,大部分又

被浮起,或者组织块虽贴壁较好,但其周围不易长出细胞,可能是组织细胞长时间得不到营养而受到损伤。因此我们采用在整个培养工作中,胃癌组织离开人体后一直不脱离培养液,保证组织活力。其特点是:组织块在营养充足的情况下,长时间不被浮起,给组织块贴壁生长创造了良好的环境;早期无血清培养液的应用抑制了成纤维细胞的快速生长,使上皮样肿瘤细胞的移行生长早于成纤维细胞,并适时清除了成纤维细胞,从而提高了肿瘤细胞培养的成功率。

参考文献:

- [1] [澳]R 费雷纳弗雷雷尼主编,章静波等译.人肿瘤细胞培养[M].第 1 版.北京:化学工业出版社,2006.19-20.
- [2] 马世兴,王峰.连续微量培养液强行细胞贴壁培养法[J].细胞与分子免疫学杂志,1998,14(4):308-309.
- [3] 杨志明.组织工程[M].第 1 版,北京:化学工业出版社,2002.19-21.
- [4] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版西安公司,2004.72-73,83,189-196.
- [5] 许洪伟,秦成勇,朱菊人,等.人胃癌原代细胞短期培养与纯化培养体外药敏实验[J].中国癌症杂志,2003,12(3):51-54.

[编辑:周永红;校对:马福元]

(上接第 129 页)

3%~5%^[9]。从病理学角度分析重度不典型增生与原位癌是同义语。WHO 肿瘤新分类标准提出的 HIN,其可逆性很小,临床处理原则是内镜或手术切除。新的诊断标准实质是对肿瘤发病和诊断的认识更超前了一步,因此将 HIN 与经典的重复癌诊断综合分析应当说是合理的。相信随着早诊技术的进一步普及和提高,这个认识会得到共识。

参考文献:

- [1] Hamiton SR, Aaltonen LA. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of the Digestive System[M]. The first edition. France:2000. 11-19, 32-36
- [2] 俞孝庭.肿瘤病理学基础[M].上海:上海科学技术出版社,1986.106-116.

- [3] 郑国梁,王心田,郭玉林.食管多发癌及上消化道重复癌[J].中华肿瘤杂志,1980,2(2):112-114.
- [4] 吴明利,王士杰,王顺平,等.上消化道重复癌 125 例分析[J].中国内镜,2000,6(1):56-57.
- [5] Kumagai Y, Kawano T, Nakajima Y, et al. Multiple primary cancers associated with esophageal carcinoma[J]. Surg Today 2001,31(10):872-876.
- [6] 张思维,陈万青,孔令芝,等.中国部分市县 1998-2002 年恶性肿瘤的发病与死亡[J].中国肿瘤临床,2006,15(7):430-448.
- [7] 张立玮,温登瑰,王士杰,等.食管癌高发区贲门癌、胃癌流行强度分析及其对内镜筛查的启示[J].肿瘤防治研究,2005,32(12):656-659.
- [8] Schreubl H, Vonlampe B, Faiss S, et al. Screening for oesophageal neoplasia in patients with head and neck cancer[J]. Br J Cancer. 2002,86(2):239-243.
- [9] 王国清,乔友林.癌前病变-控制食管癌发展的关键[J].肿瘤研究与临床,2003,15(1):3-4.

[编辑:贺文;校对:刘红武]