

技术与方法

人正常食管鳞状上皮不同原代培养方法的比较

何晓琳¹ 李月红^{1*} 张祥宏¹ 严霞² 王俊灵²¹河北医科大学第二医院病理科, 石家庄 050000; ²河北医科大学病理研究室, 石家庄 050017)

摘要 该研究通过比较人正常食管鳞状上皮不同的原代培养方法, 以期为不同的实验目的提供不同的培养方法。实验用到的正常食管粘膜上皮来源于食管癌患者手术切除的标本, 采用组织块法和酶消化法, 分别用DMEM/F12混合培养基和K-SFM无血清培养基进行培养。通过直接观察、细胞形态学观察和免疫细胞化学方法观察细胞的生长情况、细胞形态学特征及鉴定所得到的细胞, 比较不同方法与不同培养基组合中原代培养细胞的生长状况。用组织块法, 在DMEM/F12混合培养基中人正常食管上皮细胞生长较好, 细胞融合较快, 成纤维细胞污染较少, 15~17天上皮细胞铺满瓶底的70%~80%, 获得的细胞数量大, 但细胞传代后成纤维细胞污染严重。用酶消化法, 在K-SFM无血清培养基中人正常食管上皮细胞生长好, 细胞融合快, 成纤维细胞污染基本消除, 细胞纯度高, 10~12天细胞便可以铺满瓶底的70%~80%, 这种方法培养的细胞可以冻存、复苏和传代。其余各种培养方法所得细胞无论在生长状态、培养周期、成纤维细胞污染和传代方面均较前两种方法差。以上各种方法培养的细胞经免疫细胞化学染色鉴定证实细胞呈广谱细胞角蛋白阳性, 确定是食管上皮来源的细胞。酶消化法加K-SFM无血清培养基是本实验获得的原代培养食管上皮细胞的最好方法, 但是费用相对较高。组织块法加DMEM/F12混合培养基价格低廉, 但周期较前者稍长且不能用于传代。两者均是适合广泛应用的正常食管上皮细胞培养方法, 可以根据不同需要选择不同方法。

关键词 食管; 上皮细胞; 原代培养

食管癌是发生在食管上皮组织的恶性肿瘤, 占所有恶性肿瘤的2%。全世界每年约有22万人死于食管癌, 我国是食管癌高发区, 食管癌正严重威胁着人类的生命。近年来, 食管癌发病机制的研究成为国内外的研究热点, 然而阻碍研究进行的一个重要原因是至今仍未探索到一个适于广泛应用的培养方法。目前, 国内外可供应用的正常食管细胞株很少, 性状不稳定, 容易发生恶性转化, 有关体外正常食管鳞状上皮细胞培养方法的研究更少, 细胞来源的缺乏严重制约了后续的研究工作。因此, 本实验对不同的培养方法进行比较, 以期为不同的研究目的提供不同的培养方法, 为进一步研究食管癌的发病机制提供可靠的细胞来源。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和材料

DMEM、F12、K-SFM无血清培养基、1640(美国Gibco公司), 胰岛素(Sigma公司)、表皮生长因子

(EGF, TOYOBO公司)均经抽滤除菌处理。青霉素、链霉素(华北制药厂), 人细胞角蛋白抗体(迈新生物试剂公司), DAB(中山金桥), 胎牛血清(美国Gibco公司), OLYMPUS倒置相差显微镜。

DMEM/F12混合培养基: 将DMEM与F12按等比例混合制备成为1:1混合培养基, 加入5 mg/L胰岛素、5 μg/L EGF、200 U/ml青霉素、200 μg/ml链霉素及15%胎牛血清。

1.2 人正常食管上皮细胞的来源

食管鳞状上皮取自河北医科大学第四医院2009年3月—2010年9月食管癌手术标本。在无菌条件下取食管癌患者手术切除下来的一段正常食管粘膜, 要求距离病变位置3 cm以上, 放入含有200 U/ml青霉素、200 μg/ml链霉素的1640培养基中, 立即带回实验室。

收稿日期: 2011-01-08 接受日期: 2011-03-14

河北省自然科学基金(No.C2005000763)资助项目

*通讯作者: Tel: 0311-86265561, E-mail: liyuehong1993@tom.com

1.3 培养方法

1.3.1 组织块加DMEM/F12混合培养基法 在无菌条件下,将食管粘膜组织用含有200 U/ml青霉素、200 µg/ml链霉素的PBS溶液反复冲洗。置于1640培养基中,尽量剪除粘膜下血管和结缔组织,将粘膜剪成2 mm²大小。在25 cm²培养瓶底部涂布胎牛血清,并且放入温箱中稍晾干,将剪好的粘膜贴于培养瓶内,粘膜面朝上,粘膜下层朝下,每瓶9块,每个组织块相隔1 cm,然后加入DMEM/F12混合培养基使组织块湿润,放入37 °C 5%CO₂的培养箱培养,培养瓶倒置8 h~10 h后翻正继续培养,48 h内将瓶中的培养基加到2 ml,以后每2~3天换液一次。

1.3.2 组织块加K-SFM无血清培养基法 在无菌条件下,将食管粘膜组织用含有200 U/ml青霉素、200 µg/ml链霉素的PBS溶液反复冲洗。置于1640培养基中,尽量剪除粘膜下血管和结缔组织,将粘膜剪成2 mm²大小。在25 cm²培养瓶底部涂布胎牛血清,并且放入温箱中稍晾干,将剪好的粘膜贴于培养瓶内,粘膜面朝上,粘膜下层朝下,每瓶9块,每个组织块相隔1 cm,然后加入K-SFM无血清培养基使组织块湿润,放入37 °C 5%CO₂的培养箱培养,培养瓶倒置8 h~10 h后翻正继续培养,48 h内将瓶中的培养基加到2 ml,以后每2~3天换液一次。

1.3.3 酶消化加K-SFM无血清培养基法 在无菌条件下,将食管粘膜组织用含有200 U/ml青霉素、200 µg/ml链霉素的PBS溶液反复冲洗至无血迹为止,剪除粘膜下层多余的血管和结缔组织,置于25 g/L中性蛋白酶(Dispase)中消化24 h,用眼科镊将粘膜层撕下,放入25 g/L胰酶中,37 °C消化20~30 min,其后加入等量含10%胎牛血清的1640培养基终止消化,吹打成单细胞悬液,以1 500 r/min离心5 min,再用PBS溶液清洗2次后,加入K-SFM无血清培养基,按(0.1~1.0)×10⁶个/cm²接种于25 cm²培养瓶,放入37 °C 5%CO₂的培养箱培养。待细胞贴壁后首次换液,以后每2~3天换液一次。

1.3.4 酶消化加DMEM/F12混合培养基法 在无菌条件下,将食管粘膜组织用含有200 U/ml青霉素、200 µg/ml链霉素的PBS溶液反复冲洗至无血迹为止,剪除粘膜下层多余的血管和结缔组织,置于25 g/L中性蛋白酶(Dispase)中消化24 h,用眼科镊将粘膜层撕下,放入25 g/L胰酶中,37 °C消化20~30 min,其后,加入等量含10%胎牛血清的1640培养基终止消

化,吹打成单细胞悬液,以1 500 r/min离心5min,再用PBS溶液清洗2次后,加入DMEM/F12混合培养基,按(0.1~1.0)×10⁶个/cm²接种于25 cm²培养瓶,放入37 °C 5%CO₂的培养箱培养。待细胞贴壁后首次换液,每2~3天换液一次。

1.3.5 组织块与酶消化联合加K-SFM无血清培养基法 在无菌条件下,将食管粘膜组织用含有200 U/ml青霉素、200 µg/ml链霉素的PBS溶液反复冲洗至无血迹为止,剪除粘膜下多余的血管和结缔组织,置于25 g/L中性蛋白酶(Dispase)中消化24 h,用眼科镊将粘膜层撕下,将粘膜剪成2 mm²大小。在25 cm²培养瓶底部涂布胎牛血清,并且放入温箱中稍晾干,将剪好的粘膜贴于培养瓶内,粘膜面均朝上,每瓶9块,每个粘膜间相隔1 cm,然后加入K-SFM无血清培养基使粘膜块湿润,放入37 °C 5%CO₂的培养箱中,培养瓶倒置8 h~10 h后翻正继续培养,48 h内将瓶中的培养基加到2 ml,每2~3天换液一次。

1.3.6 显微剥离酶消化加DMEM/F12混合培养基法 于食管黏膜面直接采用显微剥离获得菲薄黏膜上皮,移入青霉素小瓶中,用眼科剪剪碎,放入25 g/L胰酶中,37 °C消化20~30 min,其后加入等量含10%胎牛血清的1640培养基终止消化,吹打成单细胞悬液,以1 500 r/min离心5 min,再用PBS溶液清洗2次后,按(0.1~1.0)×10⁶个/cm²接种于25 cm²培养瓶,放入37 °C 5%CO₂的培养箱培养。

1.4 观察指标

1.4.1 细胞学观察 倒置显微镜每日观察细胞的形态和生长情况。

1.4.2 免疫组织化学染色 将盖玻片取出,生理盐水清洗后用4%多聚甲醛固定20 min,蒸馏水洗涤5 min,3%过氧化氢、胰酶消化修复及血清封闭,滴加角蛋白抗体,37 °C孵育2 h,分别加入二抗和三抗,PBS溶液冲洗,DAB显色,苏木素复染,透明封片,显微镜下观察切片。

2 结果

2.1 细胞学观察结果

2.1.1 组织块加DMEM/F12混合培养基法 组织块在4~5天后有细胞爬出,细胞成圆形、卵圆形或多角形,细胞体积较小,胞质透亮,细胞核不清。随后细胞生长加快,可在组织块周围观察到典型的上皮晕,细胞融合后形成典型的“铺路石”状排列(图

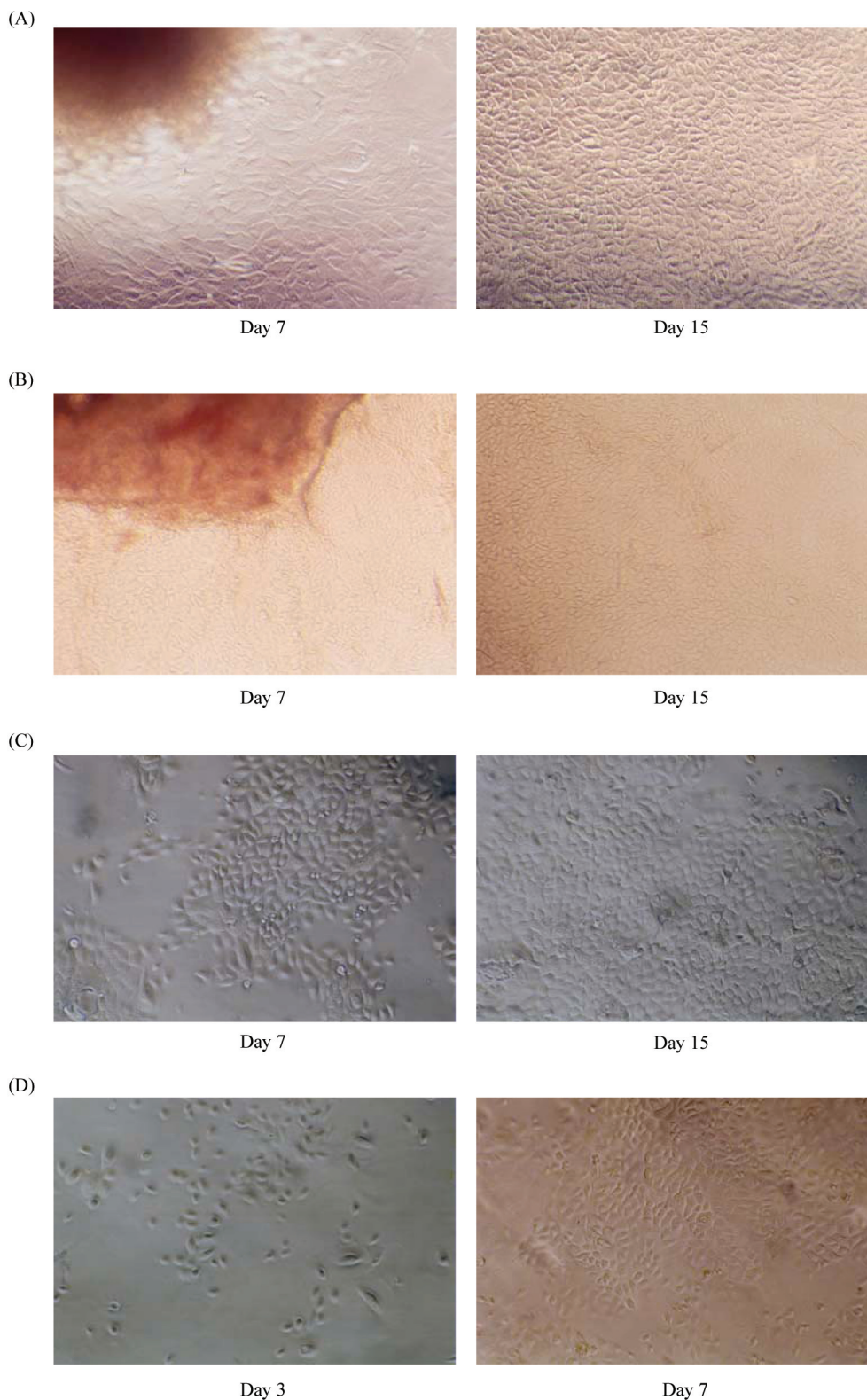


图1 不同培养方法下的细胞形态

A: 组织块加DMEM/F12混合培养基细胞形态(200×); B: 组织块加K-SFM无血清培养基细胞形态(100×); C: 酶消化加K-SFM无血清培养基原代细胞形态(200×); D: 酶消化加K-SFM无血清培养基第二代细胞形态(200×)。

Fig.1 Cell appearances of different culture methods

A: the appearance of typical slabstone in tissue explant method with DMEM/F12 mixed medium(200×); B: the appearance of typical slabstone in tissue explant method with the serum-free medium K-SFM(100×); C: cells of the first generation using enzyme digestion method with the serum-free medium K-SFM(200×); D: fibroblasts pollution in enzyme digestion method with DMEM/F12 mixed medium(200×).

1A), 其中, 可见少量的梭形成纤维细胞, 15~17天上皮细胞长到瓶底的70%~80%。将原代细胞进行传代, 组织块可以被迁移到另一培养瓶中继续培养。结果发现: 随着培养时间的延长, 原代培养的上皮细胞相互连接, 细胞体积逐渐增大, 细胞核明显, 细胞边缘清晰, 增殖能力下降, 成纤维细胞污染逐渐增加, 局部可以出现成纤维细胞连接成网, 包绕上皮细胞, 影响细胞的生长, 甚至出现局部上皮细胞的死亡。21天后上皮细胞基本不再生长, 出现老化现象。迁移到新培养瓶中的组织, 2~3天后可有上皮细胞长出, 5~7天形成肉眼可见的上皮晕, 细胞形态良好, 增殖稳定, 融合较快, 可继续迁移直到组织块细胞全部爬出为止。传代的上皮细胞贴壁数少, 成纤维细胞污染较严重, 由于成纤维细胞的贴壁和生长速度远远快于上皮细胞, 因此, 成纤维细胞的生长严重阻碍了上皮细胞的生长, 不能继续培养。此方法培养人正常食管上皮细胞的长出率为60%~80%(生长出细胞的组织块除以所有接种的组织块)。

2.1.2 组织块加K-SFM无血清培养基法 细胞生长周期较组织块加DMEM/F12混合培养基法有所减短, 组织块在2~3天后可有上皮细胞长出, 5~7天形成肉眼可见的上皮晕, 14~15天细胞长到瓶底的70%~80%, 细胞成圆形、卵圆形或多角形, 细胞体积较小, 胞质透亮, 细胞核不清, 细胞融合后呈典型的“铺路石”状排列(图1B)。由于组织块法无法将粘膜下层彻底剔除干净, 因此, 本方法仍无法消除成纤维细胞的污染, 且随着培养时间的延长, 成纤维细胞的污染逐渐加重。细胞传代和组织块迁移情况与组织块加DMEM/F12混合培养基法相同。

2.1.3 酶消化加K-SFM无血清培养基法 经酶消化的单细胞悬液接种到玻璃培养瓶后, 加入K-SFM无血清培养基, 1~2天单细胞聚集成细胞团, 3~4天开始贴壁, 细胞成圆形、椭圆形或多边形, 体积较大, 轮廓不清, 胞浆透明, 胞核大而清, 细胞融合后, 排列紧密, 呈典型的“铺路石”状排列(图1C)。成纤维细胞污染少, 而且随着时间的延长, 成纤维细胞逐渐减少, 最后基本消失。10~12天细胞可以生长至瓶底的70%~80%, 可以传代, 第二代细胞2~3天贴壁, 7天左右细胞即可融合成片, 细胞多呈圆形或卵圆形, 细胞融合后呈“铺路石”状排列(图1D), 细胞状态好, 予以冻存, 细胞复苏后, 细胞存活率为50%左右。本实验传到第三代, 细胞状态较好。

本实验也尝试将细胞接种到一次性塑料培养皿中, 结果发现: 细胞接种于塑料培养皿比玻璃培养瓶更容易贴壁, 而且单细胞悬液并未经过聚集成细胞团的过程而直接贴壁, 2~3天就开始贴壁, 细胞形态与接种于培养瓶的细胞相同。

2.1.4 酶消化加DMEM/F12混合培养基法 经酶消化的单细胞悬液接种到培养瓶后, 加入DMEM/F12混合培养基, 1~2天后就有成纤维细胞贴壁, 由于DMEM/F12混合培养基不能完全抑制成纤维细胞, 成纤维细胞贴壁和生长速度要远远快于人正常食管

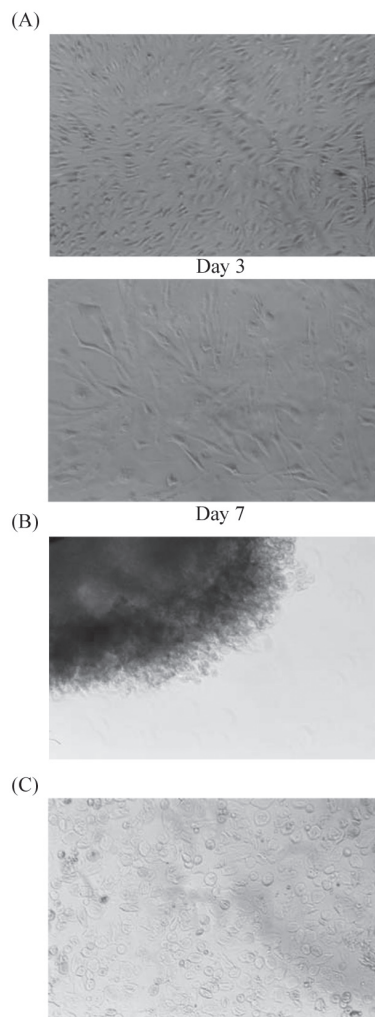


图2 不同培养法的细胞污染和生长状况(200×)

A: 酶消化加DMEM/F12混合培养基法中成纤维细胞的污染; B: 组织块与酶消化联合加K-SFM无血清培养基法组织块未见生长; C: 显微剥离酶消化加DMEM/F12混合培养基法的成熟上皮细胞。

Fig.2 The pollution and growth conditions of cells in different culture methods (200×)

A: fibroblasts pollution in enzyme digestion method with DMEM/F12 mixed medium; B: combined method of tissue explant and enzymatic digestion; C: mature epithelial cells of enzyme digestion with microscopic dissection method.

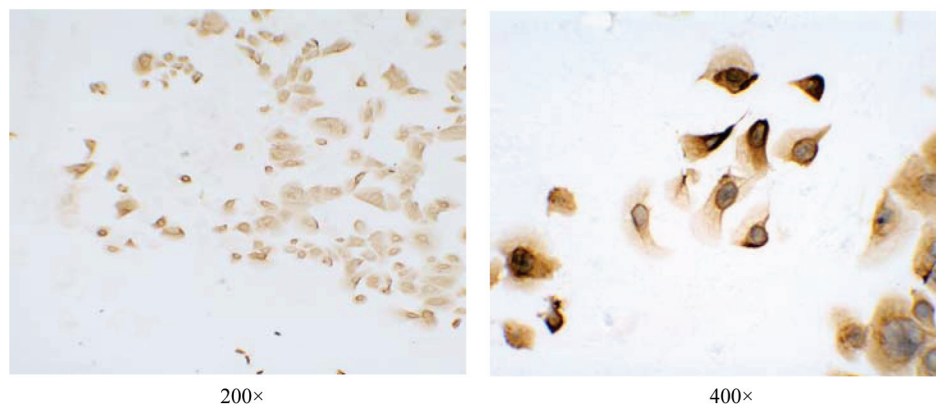


图3 广谱细胞角蛋白免疫细胞化学结果

Fig.3 The results of immunocytochemistry of CKPan

上皮细胞, 因此, 成纤维细胞严重抑制了上皮细胞的生长(图2A)。

2.1.5 组织块与酶消化联合加K-SFM无血清培养基法 本实验试图将组织块法和酶消化法联合使用以期探索一种新的培养方法。观察发现: 粘膜培养到第16天仍未见细胞爬出(图2B), 实验被迫中止。

2.1.6 显微剥离酶消化加DMEM/F12混合培养基法 于食管黏膜面直接采用显微剥离获得菲薄黏膜上皮, 结果发现: 人的食管粘膜上皮层和固有层连接非常紧密, 即便在显微镜下也很难清楚区分, 导致剥离下来的几乎都是表层的成熟上皮细胞(图2C), 底层的基底细胞很难完整的剥离, 所以这种方法贴壁细胞少, 难以获得大量的食管上皮细胞。

2.2 免疫细胞化学染色结果

各组爬片细胞用广谱细胞角蛋白染色后, 胞浆和胞膜出现棕黄色颗粒者为阳性细胞(图3)。镜下可见大量阳性染色细胞, 证明培养的细胞是食管上皮细胞。

3 讨论

目前, 国内外报道成功的正常食管上皮细胞的培养方法主要有组织块法和酶消化法^[1-8], 常用的培养基有1640培养基、DMEM培养基、DMEM/F12混合培养和K-SFM无血清培养基, 本实验将这些方法一一加以比较。经过反复实验我们体会到, 不同方法的注意事项如下:

组织块法: (1)新鲜组织一定要反复冲洗干净, 否则会有细菌或真菌污染。(2)粘膜下血管和结缔组织要尽可能剪干净, 否则成纤维细胞污染会很严重。

(3)培养瓶底涂布血清不要太多, 以血清没有聚集残留为好, 等血清稍干时再铺组织, 以增加血清的粘性。(4)粘膜面朝上, 粘膜下层朝下, 以保证细胞能正常爬出。(5)培养瓶放入培养箱后先倒置8 h~10 h后再翻正继续培养, 可以增加组织块的贴壁效率。(6)翻瓶时动作要轻柔, 避免组织块被冲起。(7)首次换液时间不要太早, 等组织贴壁牢固后再换液。(8)前两周期换液时, 漂起的组织不要丢掉, 有再贴壁的可能。(9)可以测细胞的生长曲线, 在细胞的对数生长期进行后续实验, 在细胞生长状态下降时要及时收细胞, 比如: 细胞体积增大、细胞核明显、细胞边缘清晰、增殖能力下降等。(10)人正常食管上皮细胞贴壁很牢, 收细胞时可以联合使用胰酶和EDTA。

消化法: (1)新鲜组织一定要反复冲洗干净, 否则会有细菌或真菌污染。(2)可以将组织块剪成小块, 分别放在青霉素小瓶或EP管中, 增加组织块和酶的接触。(3)可以适当增加分离酶的浓度或延长消化时间, 使上皮层和固有层充分分离。(4)剥离上皮层时不要用力太猛, 否则会破坏上皮层的完整性。(5)胰酶消化时间不要过长, 避免破坏细胞的完整性。(6)中止消化离心时转速不要太快, 时间不能过长, 否则会破坏细胞的完整性。(7)离心后反复吹打, 确保成为单细胞悬液, 以增强细胞的贴壁性。(8)接种密度一定要大, 否则贴壁细胞会很少。(9)确保基底细胞都贴壁后再首次换液, 可以先半量换液。(10)细胞生长状态好, 成纤维细胞污染少的情况下才能尝试传代。(11)如果条件允许, 可以使用一次性塑料培养瓶或培养皿。

如何消除成纤维细胞的污染是所有原代培养

方法共同面临的问题, 本实验通过各种方法的比较, 探索到酶消化加K-SFM无血清培养基法是一种可以消除成纤维细胞的培养方法。K-SFM无血清培养基本身就可以抑制成纤维细胞生长, 本实验又根据成纤维细胞和正常食管上皮细胞贴壁时间和消化时间的不同, 使用差时贴壁法、差时消化法、反复贴壁法、机械划除法, 更加有效地消除了成纤维细胞的污染, 而且随着培养时间的延长, 成纤维细胞越来越少, 达到了消除成纤维细胞的目的。

综上所述, 本实验得出以下结论: (1)组织块法: 组织块法最大的优点是省组织, 较少的组织就能获得大量的细胞, 本实验选用DMEM/F12混合培养基, 较低的血清浓度可以抑制成纤维细胞的污染, 使得细胞纯度较高, 细胞生长状态较好, 可以应用于大量的实验研究, 而且DMEM/F12混合培养基相对于K-SFM无血清培养基大大降低了实验成本。但是, 组织块法的培养周期相对较长, 传代效果不好。(2)酶消化法: K-SFM无血清培养基可以有效地消除成纤维细胞, 随着培养时间的延长, 成纤维细胞越来越少, 上皮细胞的纯度大大提高, 进而可以冻存、传代, 获得更多细胞, 满足精密实验的需要。酶消化法的培养周期相对较短, 可以在短时间内获得较多的细胞。但是, 酶消化法所用的试剂价格昂贵, 原代培养时所需组织量较大, 需要有充足的组织来源。因此, 对于不同的实验目的可以选择不同的实验方法, 对细胞纯度要求高或需要传代的实验, 比如: 组织工程、基因工程中所用到的精密实验, 可以选用酶消化加K-SFM无血清培养基法。对于需要大量细胞或

要降低成本的实验, 比如: 普通的生化实验、免疫细胞化学染色实验, 可以选用组织块法加DMEM/F12混合培养基。组织块法加DMEM/F12混合培养基和酶消化加K-SFM无血清培养基法是两种相对比较成熟的人食管上皮原代培养方法, 都能获得纯度较高的细胞, 适合应用和推广。

参考文献 (References)

- 1 孙巍, 李月红, 张祥宏, 严霞, 曹富民, 王俊灵, 等。成人食管上皮细胞的原代培养方法。细胞生物学杂志 2009; 31(5): 731-4.
- 2 张茹, 龚均, 王晖, 王利, 雷娟, 冉力伟, 等。人正常食管粘膜上皮细胞的纯化分离和传代培养。第四军医大学学报 2005; 26(16): 1468-71.
- 3 鲍春荣, 丁芳宝, 黄盛东, 梅举, 张宝仁。人食管上皮细胞培养、冻存及复苏方法的实验研究。上海医学 2006; 29(6): 339-41.
- 4 Fitzgerald RC, Farthing MJ, Triadafilopoulos G. Novel adaptation of brush cytology technique for short-term primary culture of squamous and Barrett's esophageal cells. Gastrointest Endosc 2001; 54(2): 186-9.
- 5 李万里, 岑石强, 黄富国, 杨志明, 解慧琪。显微剥离酶消化法培养人胚胎食管鳞状上皮细胞的实验研究。中国修复重建外科杂志 2006; 20(4): 459-62.
- 6 秦雄, 徐志飞, 赵学维。食管上皮细胞的体外培养及形态学观察。解剖学杂志 2002; 25(6): 594-5.
- 7 丁志勇, 鲍春荣, 丁芳宝, 杨胜生, 庄聪文, 程先进, 等。人食管上皮细胞原代培养方法的改良研究。临床军医杂志 2009; 37(4): 537-9.
- 8 Schettini ST, Pinus J. Gastric-tube esophagop lasty in children. Pediatr Surg Int 1998; 14(1-2): 144-50.
- 9 柏启州, 杨永珠, 王志强, 苟云久。组织工程化人正常食管上皮细胞的培养。中国组织工程研究与临床康复 2008; 12(33): 6447-9.

Comparison of Different Methods in Primary Culture of Human Normal Esophageal Squamous Epithelium

Xiao-Lin He¹, Yue-Hong Li^{1*}, Xiang-Hong Zhang¹, Xia Yan², Jun-Ling Wang²

¹Department of Pathology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

²Lab of Experimental Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract The purpose of this study was to compare the different methods in primary culture of human normal esophageal epithelial cells (HNEECs) and look for appropriate methods to acquire abundant and well growth esophageal epithelial cells for next experiment. The human normal esophageal epithelial cells were isolated from surgically excisional normal esophagus of patients with esophageal cancer. Tissue explant and enzyme digestion methods were used to clutue HNEECs with DMEM/F12 mixed medium and with serum-free medium K-SFM. Gross examination, inverted microscopy observation and immunocytochemistry had been used to observe and identify growth, morphological characteristics of the regenerate esophageal epithelial cells. In DMEM/F12 mixture medium using tissue explant method, the regenerated esophageal epithelial cells, shaping slabstone appearance, grew fast with little fibroblasts pollution, and covered 70%~80% area of culture flask after 15~17 days, but the passage cells grew with more fibroblasts pollution. In the serum-free medium K-SFM using enzyme digestion method, the cells grew as well as the former, covered 70%~80% area of culture flask after only 10~12 days. Moreover, the cells can be used for cryopreservation, recovery and passage. The cells cultured with the other methods were not as good as the cells cultured with these two methods. About 90% of the regenerated cells, cultured with above methods, were cytokeratin positive staining with immunohistochemistry, which indicated that they were all epithelial cells. For primary culture of human esophageal epithelial cells, enzyme digestion method with the serum-free medium K-SFM is the best, but expensive. Tissue explant method with DMEM/F12 mixture medium is cheap with a long culture time, but not for passage. The two methods both can be choosen for different experiments.

Key words esophagus; epithelial cells; primary culture

Received: January 8, 2011 Accepted: March 14, 2011

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2005000763)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265561, E-mail: liyuehong1993@tom.com