

成人食管上皮细胞的原代培养方法

孙巍¹ 李月红^{1,2*} 张祥宏¹ 严霞¹ 曹富民¹ 王俊灵¹ 王娟¹ 姚志刚¹¹河北医科大学实验病理室, 石家庄 050017; ²河北医科大学第二医院病理科, 石家庄 050000

摘要 探讨一种简便实用、成本低、纯度高并且成熟稳定的成人食管上皮原代培养的方法。成人食管上皮细胞来源于食管癌患者手术切除食管的正常黏膜上皮。采用组织块法, 分别在DMEM/F12混合培养基和1640培养基中培养成人正常食管上皮细胞。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。结果表明, 与1640培养基相比, 应用DMEM/F12混合培养基具有明显的优越性。正常食管上皮细胞在DMEM/F12混合培养基中生长较好, 细胞融合快, 成纤维细胞污染少, 可以生长成为典型的“铺路石”样, 可连续培养21天, 组织块最多可以被迁移4次, 且细胞生长状态良好。免疫细胞化学染色鉴定证实95%的细胞具有广谱细胞角蛋白, 即确定是食管上皮来源的细胞。本研究应用改良的组织块法培养的正常食管上皮细胞纯度高、产量较大, 可以满足正常食管上皮细胞恶性转化方面的研究工作, 而且方法简便易行、成熟稳定, 是一种适合推广应用的正常食管上皮细胞培养方法。

关键词 食管; 上皮细胞; 细胞培养

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 具有明显的地区性。食管癌死亡在恶性肿瘤中占16.05%, 死因排在胃癌、肝癌和肺癌之后, 居恶性肿瘤的第4位^[1]。食管癌的发生机制始终是研究的热点问题之一, 但目前尚未完全阐明。近年来有关各种理化因素导致正常的食管上皮细胞发生恶性转化, 进而最终发展成食管癌的研究逐渐受到了重视, 但研究正常食管上皮细胞的增殖、分化和恶性转化的首要条件是获得体外培养的正常食管鳞状上皮细胞。目前国内外可供应用的正常食管细胞株很少且有关体外正常食管鳞状上皮细胞培养方法的研究甚少, 而且多数方法或不稳定可靠, 或步骤复杂所用试剂昂贵, 严重制约了后续的研究工作。本研究结合国内外的一些培养方法, 采用传统的组织块法在含有低浓度血清的复合培养基中体外培养食管上皮细胞。以期探索一种简便、廉价、细胞质量较高的成熟稳定的培养方法, 为体外进一步研究正常食管上皮细胞的恶性转化方面的工作提供可靠的细胞来源。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和材料

食管鳞状上皮取自河北医科大学第四医院2008年03月至2008年09月食管癌手术标本8例。DMEM(美国Gibco公司)、F12(美国Gibco公司)、1640(美国Gibco公司)、胰岛素(Sigma公司)、表皮生长

因子(epidermal growth factor, EGF, Toyobo公司)均经滤除菌处理。青霉素(华北制药厂)、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(中山金桥公司)、胎牛血清(天津四季青厂)。Olympus倒置相差显微镜。

1.2 培养基制备

将DMEM与F12按等比例混合制备成为1:1混合培养基, 另外加入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。

1.3 食管鳞状上皮的取材及分离培养

以食管癌手术后3 h以内的食管标本为材料。肉眼选取距肿瘤边缘3 cm以外的大约2 cm×3 cm大小的食管残端黏膜, 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。每次取材后, 所取食管标本残端均经病理证实为正常的食管鳞状上皮细胞, 无不典型增生及肿瘤细胞。在无菌条件下反复冲洗食管黏膜。置于1640培养基中, 尽量剪除黏膜下血管和结缔组织, 将黏膜剪成2 mm²大小的组织块。在25 ml培养瓶底部涂布胎牛血清, 并且放入温箱中稍晾干, 将剪好的黏膜贴于培养瓶内, 黏膜面均朝上, 每瓶9块, 每个组织

收稿日期: 2009-01-09 接受日期: 2009-08-20

河北省自然科学基金资助项目(No.C2005000763)

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

块间相隔 1 cm, 然后加入少量 DMEM 与 F12 混合(1:1)培养基使组织块湿润, 其后 48 h 内将瓶中的培养基加到 2 ml。放入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱培养。以后每 2~3 天换液一次。5 天后开始有细胞从组织块边缘长出, 14 天后换液均去掉漂浮的组织块。每个组织块所长出的上皮晕直径可有 2~3 cm, 4~5 个组织块长出的细胞可以覆盖培养瓶底。以后将组织块迁移到新的培养瓶中, 按上述方法培养, 组织块可以被连续迁移数次, 每次均有细胞长出, 状态良好生长稳定。同时, 使用 1640 培养基应用上述方法进行食管上皮细胞的原代培养, 观察培养细胞生长情况和状态。

1.4 观察指标

1.4.1 细胞学观察 当有细胞从组织块边缘爬出后, 倒置显微镜下每日观察细胞的形态和生长情况。

1.4.2 免疫细胞化学染色 将组织块放到盖玻片上, 细胞爬片。培养一段时间当上皮晕铺满盖玻片大部分时, 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、胰蛋白酶消化修复及血清封闭, 滴加角蛋白抗体, 37 °C 温育 2 h, 分别加入二抗和三抗, PBS 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

在 DMEM 与 F12 混合培养基中, 组织块最快在 5 天后有细胞开始长出。细胞成卵圆形和多角形, 胞质透亮, 细胞核不清。8~9 天细胞生长加快, 可在组织块周围观察到典型的上皮晕, 细胞融合后形成上皮细胞典型的“铺路石”样形态(图 1)。21 天上皮细胞可铺满瓶底。其中可见少量的梭形成纤维细胞。以后细胞逐渐变大, 细胞核明显, 细胞边缘清晰, 增殖能力下降。长出的上皮细胞可以存活 14 天。将已经长出细胞的组织块迁移到另一培养瓶中, 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, 组织块最多可以迁移 4 次前后共生长 67 天。而在单独 1640 培养基中, 上皮细胞长出较慢, 一般需要 7 天, 细胞轮廓不清, 体积较大, 老化快, 存活时间短, 成纤维细胞污染严重。

2.2 免疫细胞化学染色结果

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 2)。使用 DMEM

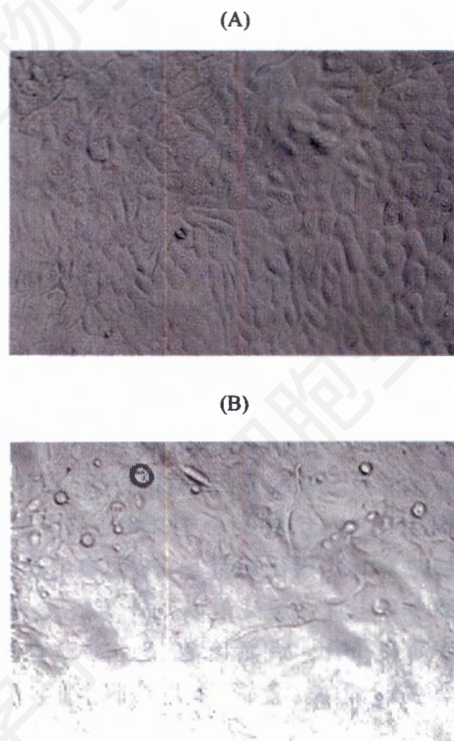


Fig.1 Cell morphology

A: the appearance of typical slabstone of human esophageal squamous epithelial cells with DMEM/F12 (200×); B: the human esophageal squamous epithelial cells cultured with 1640 (200×)

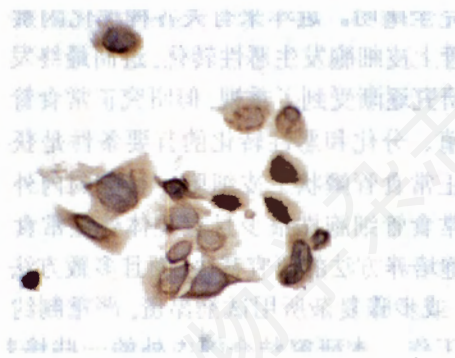


Fig.2 The result of immunocytochemistry of CKpan (400×)

与 F12 混合培养基者镜下可见大量阳性染色细胞, 比例高达 95% 以上。使用 1640 培养基者阳性染色细胞所占比例仅为 60% 左右。

3 讨论

食管癌在我国是一种常见的消化道肿瘤, 各种理化因素如亚硝酸盐、霉菌毒素、机体的营养状态等^[2]都可引起食管上皮癌变。在研究食管癌发生时需要大量食管上皮细胞, 然而目前没有可靠的细胞株供研

究者使用。本研究应用改良的组织块法培养出的细胞通过倒置显微镜观察和免疫细胞化学染色证明是正常食管上皮细胞。本方法可以稳定地培养食管原代细胞, 简捷、方便、试验周期短, 易于推广。

体外培养成人原代食管上皮细胞较为困难。国内外相关文献较少, 一般有组织块法和酶消化法两种方法。Fitzgerald 等^[3]使用 MCDB 153 短期培养食管上皮细胞获得成功。鲍春荣等^[4]用 Dispase 分离酶加胰蛋白酶、EDTA 消化, 使用 K-SFM 培养食管上皮细胞获得了成功。李万里等^[5]用显微剥离酶消化法培养人胚胎食管鳞状上皮细胞获得成功。但是上述方法所使用的消化酶和培养基过于昂贵, 显微剥离食管粘膜的技术要求较高且人的胚胎食管不易获取, 这些都限制了上述方法的使用。

组织块法虽然方法简便, 但是细胞爬出晚生长慢且易被成纤维细胞污染, 本身也有其缺点。本研究参考了关于培养人口腔和尿道上皮的实验研究, 发现 DMEM/F12 混合培养基在培养上皮细胞上有其特有的优势^[6,7]。首先, DMEM 培养基虽然营养成分相对较少, 但是各个成分含量高。F12 培养基所含成分多, 各个成份组成均衡。二者混合以后很适合上皮细胞的生长。其次, 正常浓度钙离子(1.2~1.4 mmol/L)促进角质形成细胞多层生长和角化, 低浓度钙离子(0.03~0.06 mmol/L)抑制细胞多层生长^[8]。DMEM/F12 (1:1)混合培养基的钙离子浓度是 1.1×10^{-3} mmol/L 属于低浓度钙离子, 适合食管上皮细胞生长^[9]。本研究同时利用 1640 培养基加入 EGF、胰岛素培养细胞发现相对于使用 DMEM/F12 混合培养基而言, 组织块的成活少, 成纤维细胞污染严重。产生上述差异可能是因为 1640 培养基本身营养成分的关系和其本身钙离子浓度有关。相对于 1640 培养基, DMEM/F12 混合培养基的成分多且较均衡, 其中含有 1640 所没有的丙氨酸、胱氨酸、半胱氨酸, 培养基中的矿物质含量也很丰富。1640 培养基中未添加氯化钙, 由于钙离子的缺乏所以不利于上皮细胞的贴壁生长。

本研究改进了原代培养的操作步骤和所使用的

培养基成分, 使本方法更加简便、规范化。第一, 用含有抗生素的 1640 培养基浸泡组织, 这样可以保持细胞活性和杀菌。第二, 在实验中发现使用两性霉素 B 消灭真菌是不必要的, 只要使用清洗液反复冲洗组织块和尽量加快操作速度即可避免真菌和细菌的污染。第三, 将组织取回来后应马上培养, 不应该放入 1640 培养基中在低温下过夜。本研究实验发现, 在低温下过夜会影响组织块的成活率。第四, 使用 DMEM/F12 混合培养基加入 EGF 和胰岛素, 将培养基的成分最大限度地简化。使用相对较低的血清浓度可以抑制成纤维细胞的污染, 加入 EGF 和胰岛素后可促进上皮细胞的生长, 延长细胞存活时间。在本研究中组织块可以反复种植并且可以保证食管上皮细胞的产量和质量, 也是本研究的一个特点。本研究中仅有少量成纤维细胞的污染, 完全可以满足实验的需要。综上所述, 使用 DMEM/F12 混合培养基利用组织块法培养成人食管上皮细胞是一个简捷、廉价、易于推广的培养方法。

参考文献(References)

- [1] 邹小农. 食管癌流行病学, *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13(18): 1-4
- [2] 刘桂亭, 杨胜利. 河南林州食管癌病因的探索历程, *中国肿瘤*, 2008, 17(6): 454-456
- [3] 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):186-189
- [4] 鲍春荣, 丁芳宝, 黄盛东, 等. 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): 339-341
- [5] 李万里, 岑石强, 黄富国, 等. 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): 459-462
- [6] 陈 文, 李森恺, 史宏道, 等. 人体口腔粘膜上皮细胞体外培养和鉴定, *现代口腔医学杂志*, 2005, 19(5): 489-491
- [7] 李森恺, 陈 文, 李养群, 等. 人体尿道粘膜上皮细胞的连续培养, *中华实验外科杂志*, 2003, 20(4): 371-372
- [8] R.I.弗雷谢尼. *动物细胞培养基本技术指南*, 第四版, 北京: 科学出版社, 2004, 412
- [9] R.I.弗雷谢尼. *动物细胞培养基本技术指南*, 第四版, 北京: 科学出版社, 2004, 109

The Culture of Human Esophageal Squamous Epithelial Cells

Wei Sun¹, Yue-Hong Li^{1,2*}, Xiang-Hong Zhang¹, Xia Yan¹, Fu-Min Cao¹,

Jun-Ling Wang¹, Juan Wang¹, Zhi-Gang Yao¹

(¹Lab of Experimental Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ²Department of Pathology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract To explore the optimal simple and convenient method to culture the highly purified human normal esophageal epithelial cells. The human normal esophageal epithelial cells were isolated from surgically resected normal esophagus of patients with esophageal cancer. The normal esophagus cells were cultured in mixed medium of DMEM/F12 and 1640 medium with 15% fetal calf serum respectively with tissue explant method. The morphological characteristics of the regenerate epithelial cells were observed and identified by direct observation, cell morphology and immunocytochemistry. The results indicated that the regenerate normal esophageal epithelial cells in mixed medium of DMEM/F12 showed faster growth and cellular junction, formed appearance of typical slabstone with less fibroblast than that in 1640 medium. The regenerate epithelial cells could be cultured for at least of 21 days and the tissue explants could be implanted for 4 times with better growth. The result of immunocytochemistry showed that 95% of the epithelial cells cultured in mixed medium of DMEM/F12 expressed CKpan, which confirmed that the cells originated from esophageal epithelium, but only 60% approximately in 1640 medium. In the study, the human normal esophageal epithelial cells cultured in mixed medium of DMEM/F12 with tissue explant could have high purity and abundant yield, which could be applied to the research of esophageal epithelial malignant transformation and be suitable for promotion.

Key words esophagus; epithelial cells; cell culture

Received: January 9, 2009 Accepted: August 20, 2009

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