

用悬浮式组织培养法观察大肠癌细胞的侵袭特性

张亚历 黄卓垣 李学农 陈茂松

(第一军医大学病理解剖学教研室)

侵袭和转移是恶性肿瘤的两个突出的生物学特征,对瘤细胞侵袭组织过程的观察有助于阐明其侵袭机制^[1]。本文采用了悬浮式离心组织块培养法,观察了人体大肠癌细胞系HR 8348的体外侵袭心肌组织块过程,现报告如下。

材料和方法

瘤细胞系 人体直肠癌HR 8348细胞系,由浙江省肿瘤医院肿瘤研究所引入^[2]。

组织块 取怀孕20天大鼠胚胎心脏,用含抗生素的Hanks液洗后切成1—2 mm³的组织块待用。

培养液 RPMI 1640(GIBCO),内含10%灭活小牛血清,青霉素80单位/ml,链霉素50 μg/ml,两性霉素0.5 μg/ml, pH 7.2—7.4。

体外组织块培养 如图所示将大鼠胚胎心肌组织装入直径为0.5 cm的透析袋内(每袋2—3块),套在小玻管上用丝线扎紧。将传代培养后3天的瘤细胞单层用0.25%胰蛋白酶消化后制备成浓度为1×10⁵/ml的细胞悬液,经小玻管加入4—5滴约0.25 ml,

用橡胶吸头套住管口。每一锥形离心管内,加入适量培养液,使透析袋浸于其中,经500转/分离心2—3分钟,使小管内瘤细胞悬液进入透析袋内与靶组织混匀,置37℃培养箱内,隔日换液并经常挤压橡胶吸头,使透析袋内液体翻动,促进营养液的交换。上述过程均按无菌操作进行。

对照 取鼠胚胎肝制成细胞悬液及肝细胞原代培养,调细胞浓度为1×10⁵/ml(活力检测经台盼蓝排除试验达80%以上),按上法加入组织培养体系,以检测细胞非特异性嵌附。

标本制备 培养后第2、3、4、5、6天各取2—4管,取出透析袋内组织块。一半用中性福尔马林固定,常规石蜡包埋、切片,HE染色,普通光学显微镜下观察。另一半组织用2.5%戊二醛固定及1%锇酸后固定,酒精逐级脱水后,临界点CO₂干燥,镀膜后日立S 450扫描电镜观察。

结 果

培养后第二天取材,在光学显微镜下可观察到瘤细胞成不连续的单层贴附于器官表面,细胞之间较松散。高倍镜下可见瘤细胞纤细的胞质突与邻近组织表面接触。培养第三天,瘤细胞浸润现象愈为明显,它们往往呈条索状沿着肌纤维间隙向组织深部浸润(图版图1)。这些浸润的瘤细胞多为偏圆形,核分裂象多见,核仁明显。在深部组织中瘤细胞浸润前沿,常见单个散在的瘤细胞,好似从瘤细胞团脱入到组织间隙一样。

应用扫描电镜可观察到瘤细胞侵袭过程表面形态微细变化。培养第二天,仅见散在单个瘤细胞分布于心肌组织块表面,这些瘤细胞通过其胞质的纤细突起或扁平皱壁,紧紧贴附于靶组织表面(图版图3)。部分瘤细胞则见胞核

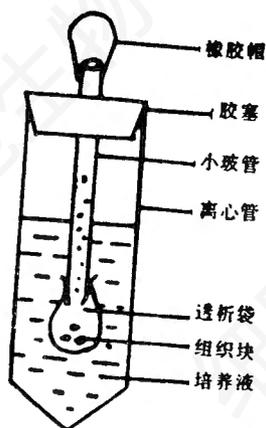


图 悬浮培养示意图

部向胞突贴附处移动,胞质后侧仅留下菲薄的胞质,略似白细胞游走阿米巴样运动。

培养3天以后的组织块,常见瘤细胞在组织表面连接成片。在光镜下成层排列的瘤细胞群(图版图2),在扫描电镜下往往呈紧密相嵌排列,复盖在心肌组织表面,此时,不易观察到瘤细胞的浸润过程。这些表层细胞常有许多微绒毛状突起,皱壁较少,极似肠道腺上皮的组织构象(图版图4)。

为对比离心作用对细胞非自然嵌入组织间隙的作用,本文用正常胚鼠肝细胞悬液和单层细胞加入培养体系,实验经重复3次,在培养后第2—6天取材光镜观察,均未见细胞的粘附,亦未在肌纤维间发现“钻入”的肝细胞。

讨 论

关于瘤细胞体外侵袭机制的研究,国内外已有一些文献报道^[1,3],一些作者对适应该研究的体外培养系统亦进行了研究^[4,4]。我们采用的悬浮式培养法,与其他作者采用的方法相比,有以下优点:(1)通过离心处理,促进了瘤细胞与组织块的接触;(2)利用袋装培养增加了局部瘤细胞悬液浓度;(3)通过双层管加液系统及内管橡皮头挤压,促进了培养物营养液的更新及代谢产物释放;(4)通过悬浮培养,瘤细胞与组织块能从多方位吸取营养。目前,瘤细胞侵袭最成功的组织培养是 Mareel 等所建立的方法^[6],他们将瘤细胞与鸡胚共孵育以检测筛选各种抗侵袭药物^[7]。据称保持悬浮和摇动状态是使培养成功的关键,本文培养系统具有类似的特性。

培养时的低速短时离心处理,可使经小管加入的瘤细胞浓聚在透析袋靶组织附近,增加瘤细胞与靶组织接触机会。观察表明,瘤细胞浸润见于靶组织四周且浸润的瘤细胞生长活跃,核分裂象明显。提示瘤细胞浸润与离心力所致的组织块单面瘤细胞被动堆积无关。正常肝细胞经同样处理,甚至未见靶组织表面有肝细胞,这可能与正常细胞不容易与组织发生粘

连有关。

应用该培养系统,可成功观察人体直肠癌细胞系的体外组织侵袭过程。培养早期,瘤细胞常单个散在以伪足贴附的形式附着于心肌组织块表面,部分细胞可观察到胞体阿米巴样运动形态,提示瘤细胞的“伪足贴附”和“阿米巴样挤入”可能在该直肠癌细胞侵袭机制中具有重要作用。这与高进等对人鼻咽癌细胞系、肝癌和食管癌细胞系的观察结果较为一致^[8]。

培养3天后,普通光学显微镜下,可见瘤细胞成串排列沿心肌纤维间隙向深部组织浸润,该处瘤细胞生长活跃,细胞体积较小,核仁明显,核分裂象多见,与其他作者对结肠癌组织浸润前沿的瘤细胞观察结果一致^[9]。位于组织表层的细胞则胞体较大,复层相嵌排列,核分裂象较少,细胞表面有丰富的微绒毛。这些细胞与深部浸润的瘤细胞的形态差异是否反映了瘤细胞的异质性或不同分化状态,尚需进一步研究。

摘 要

本文采用悬浮式组织培养法用光镜及扫描电镜观察了人体直肠癌细胞系 HR 8345 的体外组织侵袭过程。结果表明,该法可成功显示瘤细胞的侵袭性,培养第二天后,瘤细胞即以伪足贴附的形式粘附于大鼠心肌表面,然后呈条索状沿着肌纤维间隙向组织深部浸润。侵袭深部的瘤细胞与贴附在组织表面的瘤细胞具有不同的形态特征。本文对瘤细胞体外侵袭机制进行了简要讨论。

参 考 文 献

- [1] 高进, 1987, 中国科学(B辑), (9): 962—965.
- [2] 张宗显,等, 1986, 中国科学(B辑), (11): 1197—1199.
- [3] Schleich, A. B. et al., 1976, *J. Natl Cancer Inst.*, 56: 211—224.
- [4] Hart, I. R. et al., 1978, *Cancer Res.*, 38: 3218—3220.

- [5] Kramer, R. H. et al., 1986, *Cancer Res.*, 46: 1980—1983.
- [6] Mareel, M. et al., 1979, *Virch Arch. B.*, 30: 95—111.
- [7] Mareel, M. et al., 1989, *Clin. Expl. Metastasis*, 7: 283—300.
- [8] 高进等, 1982, 中国医学科学院学报, 4: 162—165.
- [9] Carr, I. et al., 1986, *Chin Expl. Metastasis*, 4: 129—132.

杂交瘤 116 株细胞无血清培养基的研制

李云宝 姚曾序

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

小鼠杂交瘤 116 株是分泌抗人小细胞肺癌单克隆抗体(IgG₁)的细胞,于 1987 年本所细胞免疫组建株^[1]。本文报道研制成功了适合这株细胞长期培养、传代的无血清培养基的配方,从而为从条件培养液中纯化这株杂交瘤所分泌的单抗,提供了方便。

材 料 和 方 法

细胞培养 常规培养液为基础培养基添加 10% 新生小牛血清, pH 7.0—7.2, 细胞培养瓶或 24 孔塑料板均置于 5% CO₂ 培养箱, 37°C ± 0.5°C 培养。每次接种细胞的活细胞率在 95% 以上。

分泌抗体的检测 用 ELISA 双抗体夹心法, 包括抗体和辣根过氧化物酶标记抗体均为纯化后的羊抗小鼠 IgG 抗血清。反应底物为四甲基联苯胺(上海医科大学化学教研室产制)。检测用酶联免疫检测仪(华东电子管厂生产)。

无血清培养基成份 铁传递蛋白、胰岛素、牛血清白蛋白、乙醇胺均 sigma 产品; 硒(分析纯, 本所细胞工程组赠予), 使用前配制成硒酸 10⁻⁴ mol/L 母液。配制液使用超纯水(17 megohm-cm)。

结 果 和 讨 论

一、两种基础培养基的比较

选用两种基础培养基, DMEM (sigma 产品) 和 DME/F₁₂Ham (sigma 产品), 如不同浓度的小牛血清(cs)培养 116 株细胞。比较培养 72 小时的活细胞数和细胞生长倍数。

从表 1 可见, 116 细胞更适应在以 DMEM

表 1 116 株细胞在两种培养液中生长情况的比较

培养液	活细胞数 × 10 ⁵ /ml	细胞生长 倍数*
DMF/F ₁₂ Ham + 5%cs	69.8(67.5, 72)	3.5
DMEM + 5%cs	112.4(110.7, 114)	5.6
DME/F ₁₂ Ham + 2%cs	34.9(34.5, 35.2)	1.8
DMEM + 1%cs	37.4(37.8, 37)	1.9

活细胞数系两瓶活细胞的平均值。

* 活细胞数除以接种细胞数。

为基础培养基的培养液中生长, 无论血清含量为 5% 或 2% 时, 均见如此情况。另外, 在血清为 1% 时, 细胞虽仍见生长, 但与 5% 血清组相比较, 生长倍数已显著降低, 表明培养液中的血清含量已达到或者接近维持细胞生长、增殖的阈值。

二、促细胞生长因子的选择

选择常用于无血清培养液的添加成分硒酸、铁传递蛋白、胰岛素、乙醇胺和白蛋白^[2-4], 分别以不同剂量添加在上一实验的低血清培养液(DMEM + 1%cs)中, 观察细胞生长动态, 结果见表 2—表 6。

从表 2—6 所列结果可见, 在低血清培养液中添加一定量的硒酸, 铁传递蛋白和乙醇胺均有促进 116 细胞生长、增殖的作用, 有效剂量的范围也较大。其中 5 μmol/L 乙醇胺或 50 μg/ml 铁传递蛋白可使 72 小时培养的细胞数高于对照组一倍以上。另外在乙醇胺 10 μmol/L—40

刘敏瑛参加细胞培养工作。