

细胞培养的新进展——基质在细胞培养中的应用

潘 琼 婧

(中国医学科学院肿瘤研究所)

近年来分子生物学理论和技术的发展使有可能分析细胞中调节基因表达的分子机制,其中许多工作是利用体外培养的细胞来进行的。但在体外要保持细胞的分化状态十分困难,再加上血清中有很多易变和未知因素参与,实验结果更难分析,所以需要技术上的突破,使体外培养的细胞能保持接近于机体中的生理状态,无论这些细胞是来自正常组织还是病态组织。

在多细胞机体中,复杂的细胞-细胞间相互作用调节着细胞的生长和分化,而细胞和细胞间的相互作用中,细胞外基质是重要的物质基础。基质生物学的研究,使细胞培养技术从传统的培养方法进展到无血清培养,并利用组织特异的细胞外基质作为培养底物,使细胞在培养中保持它们的分化表型。

一、基质(Matrix)

基质是蛋白、糖蛋白和蛋白多糖以及其他一些未知因子组成的复杂混合物。它们相互交联共同作用才产生基质的生物效应。在过去十多年中,细胞外基质(Extracellular matrix)的生物学和化学的研究由于新技术的应用,尤其是利用单克隆抗体,分离和鉴定了不少基质成分,但到现在基质生物学的研究还受到以下两个方面的限制:

(1) 许多基质成分是不溶解的,因而难以分离完整的成分(如IV型胶原)。有的提取方法常破坏部分分子,有的基质成分如I型胶原和纤粘素(Fibronectin)用化学分离和提纯的标准方法能使它们溶解,还有一些成分则由于不溶性的缘故,至今还未能分离和提纯。

(2) 基质对细胞的影响是复杂的分子相互作用的结果,而不是一种或两种成分的作用,所以既要分析单独的成分,还要研究基质成分的混合物。

在这样一个研究背景上,目前在细胞培养中所用的基质是用负选择法来制备粗提取物。正选择法是用提取液将活性因子溶解,负选择是选择不溶解的成分。当然,用粗提取物是暂时的,以后无疑要分离、纯化和鉴定更多的生物学上有活性的因子,把这些因子重组为“限定基质”(defined matrix)。Oldberg和Rouslahfi^[1]提出一种初步的“限定基质”,由I型胶原、硫酸软骨素和纤粘素组成。Kleinman等^[2]用IV型胶原、层粘素(Laminin)和硫酸肝素制备另一种“限定基质”。

二、利用细胞外基质的粗提取物进行细胞培养

(一) 胶原

在所有的细胞类型中,正常上皮细胞是最难在体外维持生存的。用胶原作为细胞培养的底物,可帮助细胞贴壁,促进细胞存活和分化。各种正常上皮细胞,包括乳腺、皮肤、结肠和其他上皮细胞在漂浮胶原凝胶上都能生长^[3-5]。漂浮胶原膜已较广泛应用,即将胶原凝胶涂于培养皿(与一般的胶原涂瓶一样),在接种细胞后18—20小时,用解剖刀片切胶原膜边缘,使凝胶膜与塑料底物分离,轻轻摇动后,胶原膜漂浮于培养液面下^[6]。最近有报道^[6]小鼠乳腺上皮细胞在胶原基质内和胶原基质上都能生长,并分化为管状,在胶原内的生长更好。胶原浓度可影响上皮细胞的生长和形

态,最佳浓度为 2 mg/ml 凝胶。又有报道^[7]小鼠乳腺在胶原凝胶内用无血清培养基培养,并用致癌物二甲苯蒽或 N-亚硝基-N-甲基脒处理,能诱导乳腺增生和癌变。

70 年代末和 80 年代初,细胞培养研究用的胶原底物都是 I 型胶原,由于容易分离和制备,但不是对所有的细胞都有良好的效果,所以要使特殊细胞类型附着并表达其功能,需要有特殊的胶原类型。了解各种细胞的细胞外基质成分,对做好细胞培养有一定的参考价值(表 1)。

表 1 成年哺乳动物组织中细胞外基质的系统群

细胞类型	细胞外基质的主要成份		
	胶原类型	锚状蛋白	蛋白多糖(主要的)
成纤维细胞	I	纤粘素	硫酸皮肤素 硫酸软骨素
软骨细胞	II	软骨粘连素	硫酸软骨素
网织细胞	III	纤粘素	硫酸肝素
成纤维细胞			
上皮细胞	IV, V	层粘素	硫酸肝素
肌细胞	V	—	硫酸肝素

胶原对细胞的影响是间接的,为基质成分的化学支架,而其他的基质成分则与细胞直接接触(图 1)。

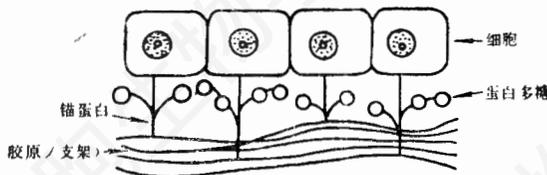


图 1 细胞和基质关系的模式图

(二) 细胞外基质(ECM)粗提物

大部分早期的工作用牛内皮细胞的单层培养。长有单层细胞的培养皿用 Triton-100 在 PBS 中的 0.5% 溶液处理 10 分钟,或 1 mol/L 尿素用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液调至 pH 8,在 37℃ 孵育 30 分钟,用这种稀碱液或稀去垢液提取后,在培养皿上留下细胞渗出物或残余

物,再用生理盐水或无血清培养液漂洗几次,就成为铺有 ECM 的培养皿。用 70% 乙醇灭菌 10—15 分钟,置 4℃ 冰箱,在一星期内都可用于培养^[8,9]。用上皮细胞和其他间叶细胞也可制备 ECM,但方法各有不同,如用 3 T 3/BALB 细胞制备 ECM,用 EDTA 或胰蛋白酶去除细胞,再用含 1 mg/ml 透明质酸的无钙镁盐水洗,脱落的细胞可再培养,说明这种脱落细胞的方法对细胞是无损伤的^[10]。也有细胞培养成单层后,用 5 mmol/L EDTA 在 37℃ 保温 10 分钟,洗后在室温用 0.025 mol/L NH₄OH 处理 10 分钟,重复二次, PBS 洗后用 70% 乙醇灭菌 10—15 分钟^[11]。从正常细胞分离 ECM 比从恶性细胞分离更易成功,这可能是由于恶性细胞产生了降解基质成分的酶。

附着有内皮细胞基底物的培养皿,比常规用的塑料培养皿优越,能促进细胞附着、克隆生长和细胞分化。大部分正常上皮细胞在塑料培养皿上的附着率(attachment efficiencies)为 0.1% 至 10% (高度依赖于细胞接种密度和细胞类型),在 ECM 上可增加到 90% 至 100%,无论正常细胞或肿瘤细胞、原代培养或细胞系都如此。集落生长率(测量一个细胞生长为一群落的能力),正常上皮细胞在一般培养皿上常小于 0.1%,在 ECM 上则增加到 50% 以上。比较原代培养的存活时间,正常上皮细胞在塑料培养皿上常常是一周或两周,在 ECM 上可延长到几周或几个月。ECM 不仅影响细胞贴附和存活,更影响细胞生长,降低对血清的要求,改变细胞生长所需的激素^[8,12]。例如,血管平滑肌细胞在塑料培养皿上需要血清生长,如接种在 ECM 上,则血浆或血清均可用。血浆和血清的差别是血清中含有丰富的血小板生长因子(PDGF),可能因为制备 ECM 的内皮细胞生长在有血清的培养基中,PDGF 已与 ECM 结合^[13]。

制备 ECM 的内皮细胞可以来自细胞系或胚胎的内皮细胞,没有组织特异性或种属特异性,而且容易制备,并可用来培养许多类型细

胞。如最近 Furhan 等^[14]报道牛角膜内皮细胞的 ECM 能调节大鼠卵泡颗粒细胞分化, 细胞在 ECM 上生长为紧密的多层, 象完整的卵泡壁, LH/hCG 受体数增加两倍, 即使没有雌激素刺激, 孕酮显著增高。但培养在不经处理的培养皿上, 无论有无雌激素, 都不产生孕酮。可是 ECM 对有的成年组织特异功能的研究还有局限性, 如肝细胞合成白蛋白或胰岛细胞分泌胰岛素, 需要有更有效的其他类型的基质作为培养底物。

(三) 生物基质(Biomatrix)

生物基质是整组织用负选择法产生的粗提取物。从组织分离基质的第一个报告是 Meezan 等^[15]的工作。用水、低离子强度盐缓冲液和去垢剂, 并配合离心, 去除不要的成分, 留下组织的不溶解提取物。Rojkind 等^[16]用特殊孔径的聚乙烯酯过滤器过滤, 使基质成分更丰富, 选择基质中已知长度的纤维, 分离的纤维主要含有胶原、弹性蛋白和各种蛋白质, 如自大鼠肝、胰和前列腺制备的生物基质都含有 I、III 和 IV 型胶原(大约比例为 1:20:3)和纤粘素、层粘素, 还有每种组织的独特成分。Wicha 等^[17]又改进了提取方法, 主要是:

- (1) 用高离子强度的缓冲液来保留各种成分, 使与分化有关的蛋白多糖保留为不溶解型;
- (2) 减少用去垢剂, 避免与生物基质结合, 对细胞产生毒性;
- (3) 用液氮反复冻融, 使坚硬的纤维状生物基质变为粉末, 便以分散在培养皿上, 成为均匀的底物。

生物基质有种属特异性和组织特异性, 能加强各种体外培养的正常上皮细胞和恶性细胞的存活, 并保持它们的分化状态。

① 生物基质的提取程序^[18](见图 2)

② 生物基质对细胞分化的影响:

生物基质配合有血清培养大大促进细胞附着率、克隆形成率和存活率, 并能维持细胞的分化功能, 这些研究已在大鼠肝、胰岛细胞、前列腺和乳腺上皮细胞培养中^[16,19,20]得到评价。不同培养时期许多组织的特异功能, 如大

鼠肝的白蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、酪氨酸氨基转移酶、胰岛细胞的胰岛素、前列腺上皮细胞的前列腺结合蛋白等在生物基质上和胶原凝胶培养相比, 分化水平开始较低, 以后逐渐升高, 培养三至四周后达高峰, 以后维持稳定水平。大鼠肝细胞在生物基质-1.0(用 1.0 mol/L NaCl 提取)配合无血清培养能增殖, 而在生物基质-3.4(用 3.4 mol/L NaCl 提取)则无有丝分裂, 细胞分化状态更好。进一步研究这两种提取物的差别, 发现大量层粘素、蛋白多糖和其他盐酸胍(guanidine-HCl)提取的蛋白在生物基质-3.4 中, 虽然这些研究还不完全, 但说明蛋白多糖和/或氨基葡聚糖是使细胞生物活性不同的有关成分。Kramer 等^[21]也指出丰富的特异蛋白多糖(如硫酸乙酰肝素)能抑制细胞生长和维持分化。

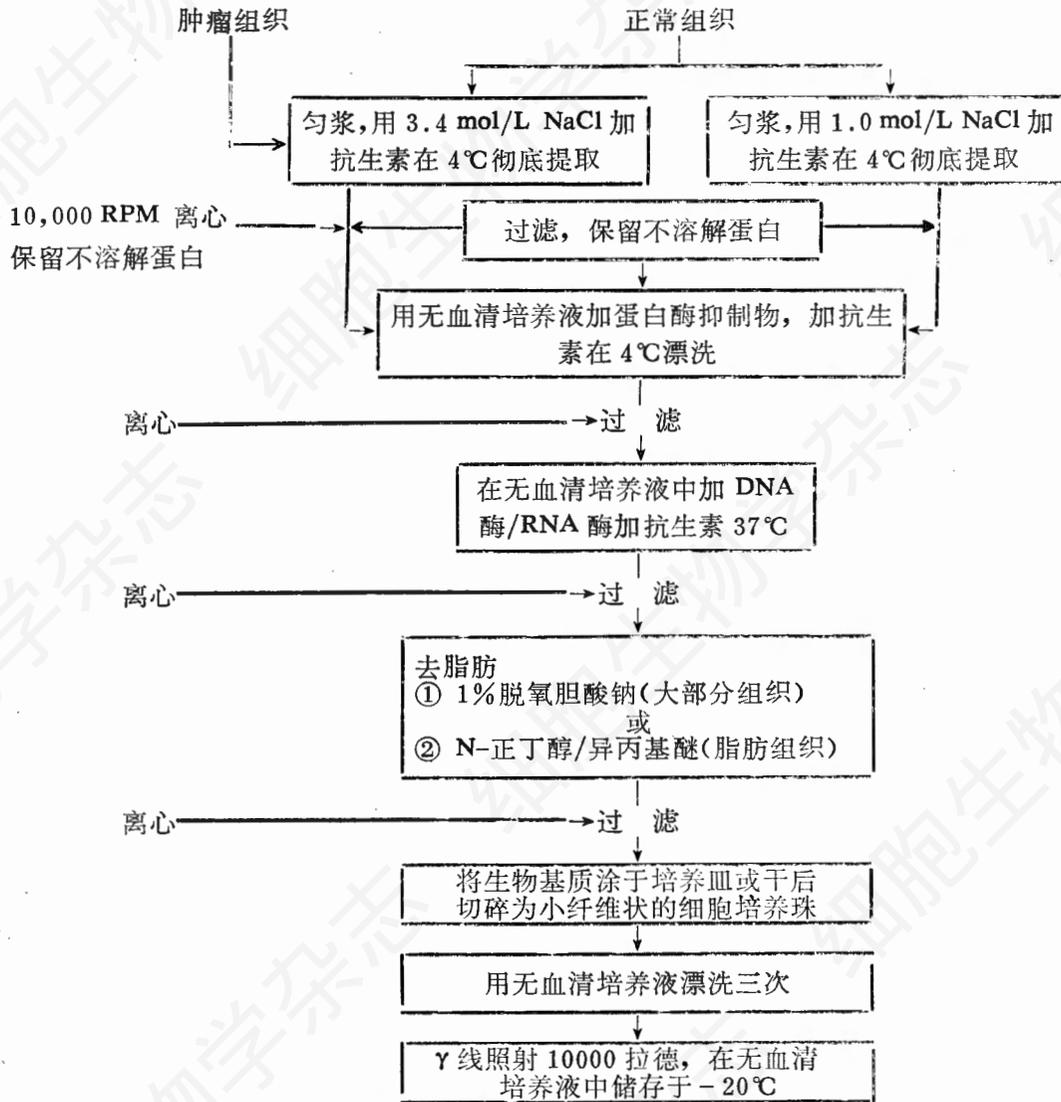
(四) 重建基底膜基质(Reconstituted basement membrane matrix)

重建基底膜基质是自 EHS(Engelbreth-Holm-Swarm)提取, EHS 是一种小鼠移植瘤, 分泌基底膜蛋白, 提取方法详见 Kramer 等最近的报道^[22]。Kramer 等用这样的基质研究了人纤维肉瘤细胞的浸润行为。Hadley 等^[23]报道支持细胞(Sertoli cells)和肌状细胞共同培养在 ECM 上生长为立方细胞, 但不分化, 而培养在重建的基底膜中, 则分化为精索, 并有生殖细胞产生。

正常上皮细胞对 EHS 生物基质的分化反应比对正常组织基质快, 但较不稳定, 仅持续几个星期。而在正常细胞的生物基质上, 细胞功能一旦达到最高峰, 能稳定几个月, 可能由于肿瘤细胞释放降解酶的缘故。

正常肝细胞的稳定增殖需要特殊的肝生物基质, 或由再生肝制的生物基质-3.4 mol/L 或生物基质-1.0 mol/L, 还需有无血清培养基、胰岛素、胰高血糖素(glucagon)、上皮生长因子、生长激素、催乳激素(prolactin)和微量元素, 并只能接种低密度的细胞^[18]。

(五) 羊膜粗提取物(Crude extracts from

图 2 生物基质的提取程序^[8]

amniotic membrane)

提取方法和提取 ECM 相似, 用稀碱或去垢剂提取, 再用 PBS 或培养液漂洗。提取后的羊膜是完整的, 一面含有 IV 型基质(基底膜), 另一面为 III 型基质(stroma)。将细胞种在提取后的羊膜上, 计算羊膜下培养皿上的集落形成率, 并分析培养液的酶活性(肿瘤细胞产生的降解酶)来估计肿瘤细胞的浸润潜能。用正常成纤维细胞和上皮细胞作为对照实验。

羊膜是胚胎组织, 羊膜的粗提物略有或没有组织特异性或种属特异性。用羊膜作细胞培

养底物的工作还不多。Madri 和 Williams^[24]用粗提的羊膜培养血管内皮细胞, 如种在基底膜一面, 细胞扁平, 形成紧密连接(tight junction), 间隙连接(gap-junction), 停止移动, 形成管状结构。如将细胞种在基质一面, 细胞增殖, 移动到基质的分子中, 只有在培养时间延长后, 才能形成管状结构。

基质的应用为细胞培养开辟了前景, 正常细胞的分化需要有溶解的调节物(激素和条件培养基因子)和基质中不易溶解的调节物相互作用。基质生物学这一领域发展很快, 许多长

学、内分泌学、肿瘤学、分子生物学等正在为分离的学科如细胞生物学、生物化学、病理基质生物学这个方向走向一起。利用粗提物还是个过渡,建立“限制基质”(defined matrix)将为细胞培养创造更好的条件。

摘 要

基质生物学的研究使传统的细胞培养技术有重大进展,这种改革包括无血清培养,为每种细胞补充一定的激素和利用组织特异的细胞外基质作为培养底物。这种培养方法能促进细胞附着、克隆生长和细胞分化,尤其适合于上皮细胞的生长。用于细胞培养的基质有胶元、细胞外基质(ECM)粗提物、生物基质、重建基底膜基质、羊膜粗提取物等,分别介绍了大概的提制方法和应用情况。

参 考 文 献

- [1] Oldberg A. and Ruoslahti E., 1982, *J. Biol. Chem.* 257 : 4859—4863.
- [2] Kleinman H. K. et al., 1983, *Biochemistry* 22 : 4969—4974.
- [3] Benya I. D. and Shaffer J. D., 1982, *Cell* 30 : 215—244.
- [4] Guido D. and Bernfield M. 1981 *J. Cell Biol.* 91 : 281—286.
- [5] Emmerman J. T. and Pitelka D. R., 1977, *In Vitro* 13 : 346—348.
- [6] Jones W. and Hosick H. L., 1986, *Cell Biol. Intn. Reports* 10 : 277—286.
- [7] Guzman R. C. et al., 1987, *Cancer Res.* 47 : 275—280.
- [8] Gospodarowicz D. et al., 1981, *J. Cell Physiol.* 109 : 69—81.
- [9] Hellerquist C. G., 1982, *Methods Enzymol.* 82 : 530—544.
- [10] Abatangelo G. R. et al., 1982, *Exp. Cell Res.* 137 : 73—78.
- [11] Quigley J, et al., 1986, In “Mechanisms of Cancer Metastasis. Potential Therapeutic Implication” (Ed. Honn K. V. et al.) Martinus Nijhoff Publishing, Boston pp: 309—338.
- [12] Gospodarowicz D. et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 4094—4098.
- [13] Smith J. C. et al., 1982, *Nature (Lond)* 296 : 154—156.
- [14] Ferhan A. et al., 1986, *Endocrinology* 118 : 1878—1885.
- [15] Meezan E. et al., 1977, *Life Sci.* 17 : 1721—1732.
- [16] Rojkind M. et al., 1980, *J. Cell Biol.* 87 : 255—263.
- [17] Wicha M. S. et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 3213—3217.
- [18] Reid L. M. and Jefferson D. M. 1984 In “Mammalian Cell Culture. The Use of Serum Free Hormone Supplemented Media” (Ed. J. P. Mather) Plenum Press, New York and London pp. 254—290.
- [19] Reid L. M. et al., 1980, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 349 : 70—76.
- [20] Reid L. M. et al., 1981, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 372 : 354—370.
- [21] Kramer R. H. et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257 : 2678—2686.
- [22] Kramer R. H. et al., 1986, *Cancer Res.* 46 : 1980—1989.
- [23] Hadley M. A. et al., 1985, *J. Cell Biol.* 101 : 1511—1522.
- [24] Madri J. A. and Williams S. K. 1983, *J. Cell Biol.* 97 : 153—165.