DOI:10.16016/j.1000-5404.201508112

一种改进的肾透明细胞癌原代细胞培养方法

宋 雷[1],叶文凌[2],刘 勇[1],王 伟[3],黄 睿[1] (730030 兰州,西北民族大学医学院医学机能学教研室[1];475000 河南 开封,河南大学医学院细胞生物学与遗传学教研室[2];730000 兰州,兰州大学第二医院泌尿外科[3])

[摘要] **目的** 对肾透明细胞癌原代培养方法进行改进,以获得纯度及活力更高、遗传表型与来源更相近的肾透明细胞癌细胞系。**方法** 将经过胶原酶消化法或机械法取得的肿瘤样本单细胞悬液,置入超低黏附培养板,用添加有丝分裂原等细胞因子的无血清培养基悬浮培养,离心滤除非肿瘤细胞和无成瘤能力肿瘤细胞,获得纯度高、异质性的肿瘤细胞囊球,囊球可以连续传代悬浮培养,也可转至常规培养条件培养,都可得到能连续传代的肿瘤细胞株。用流式细胞仪鉴定瘤球传代细胞,并与肾癌临床样本细胞进行表型比对。**结果** 与单纯机械法或胶原蛋白酶消化法分离细胞及含血清培养基培养的方法相比,本法成功率更高,获得的肾透明细胞癌细胞保持与临床样本相似的异质性分化类型和表面抗原表达,并且无杂细胞污染。培养的细胞可经历稳定的连续传代并用于肿瘤相关研究。**结论** 该方法简便易行,成功率高,培养的肾透明细胞癌细胞株可作为肾癌研究的良好实验模型。

[关键词] 肾透明细胞癌;原代培养;无血清培养基;免疫表型

[中图法分类号] R329-33; R737.11 [文献标志码] A

Modified primary culturing of renal clear cell carcinoma

Song Lei[1], Ye Wenling[2], Liu Yong[1], Wang Wei[3], Huang Rui[1] ([1]Department of Medical Function, Medical College, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu Province, 730030; [2]Department of Cell Biology and Genetics, Medical College, Henan University, Kaifeng, Henan Province, 475000; [3]Department of Urology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[**Abstract**] Objective To improve the method of primary culture of kidney cancer cells to get cells with high purity and similar phenotype. Methods Clinical specimens of renal clear cell carcinoma were digested and mechanically dissociated to prepare mono-cell suspension. The cells were subsequently cultured in ultra-low-adhesion plates, and tumor spheroids were formed after changing the medium to serum-free RPMI1640 medium (SFM) supplemented with mitogens. Tumor spheroids could be digested and passaged to get successive generation. Monolayer adherent cells (MACs) could be obtained from the digested tumor spheres and maintained as monolayer cultures in RPMI 1640 routine medium. Aliquots of the cell suspension were subjected to fluorescence-activated cell sorting to quantify the expression of cell surface antigen in the specimen cells and passaged cells. Results The improved method could dramatically increase the cells at high yield and high purity compared with traditional methods, and the cells obtained by serum-free culture had similar phenotype with primary cells and had no fibroblast cell incorporation. Conclusion The improved method is feasible and convenient and has high success rate. The cultured cells act as experimental model for research of renal cell carcinoma.

[**Key words**] renal clear cell carcinoma; primary culture; no serum medium; immunophenotype

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81000961). Corresponding author: Ye Wenling, E-mail: hexi81@163.com

肾细胞癌是肾癌最常见的类型,占85%~90%[1]。为研究其发病机制和治疗,建立合理、稳定、高效的细胞原代培养模式已成必然。原代培养指直接从体内取出肿瘤细胞或组织进行的第1次的培养,应用于各类

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81000961)

[通信作者] 叶文凌,E-mail:hexi81@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151207.1701.014.html(2015-12-07)

实验研究[2-3]。目前常用的肾透明细胞癌原代培养法有组织块法、机械分离法、胰酶消化法和胶原酶消化分散细胞培养。但存在如下缺点:①受恶性肿瘤组织类型复杂性的影响,体外原代培养成功率较低。②通过酶消化法分离的肿瘤细胞,体外贴壁扩增本身具有细胞选择作用,得到的细胞能否代表体内真实细胞组成,值得商榷。③非肿瘤组织和坏死组织难以较好地去除,培养细胞含杂细胞较多,尤其是成纤维细胞。④对细胞量要求较高,机械研磨会损伤细胞活性,都不利于原代培养的成功。⑤现有方法容易受到培养体系的影响,特别是胎牛血清的质量和数量、培养基种类、肿瘤细胞类型等都是影响肿瘤细胞体外原代培养的主要因素。裸鼠体内传代法则需要 SPF 级动物实验室,操作要求较高,其他不可控因素较多。近年来国外有人采取新的原代培养方法试图获得遗传表型更接近原位肿瘤的培养细胞,如 Endo 等[4]研发了一种肿瘤组织来源的瘤球培养(cancer tissue-originated spheroid,CTOS)法,用于 125 例外科切除样本和 18 例胸腔积液中非小细胞肺癌细胞的原代培养,即将部分消化的肿瘤块用干细胞培养基培养,获得了具有高度活性和纯度的原代肺癌细胞,其中外科组织的 CTOS 法成功率为 80.0%。Seidel 等[5]在无血清培养条件下从恶性脑胶质瘤中获得肿瘤球,进行了原代培养。无血清悬浮培养法的研究结果表明:不管是来自临床样本活细胞还是肿瘤细胞系的瘤球形成细胞都具有干细胞样的属性,其增殖、分化、自我更新、细胞表型、致瘤性和放化疗抗性都很好地重塑了来源细胞的属性[6]。因此,本研究探讨采用该法进行肾细胞癌原代培养的可行性,以期为肾癌研究提供理想的模型。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清、青霉素、链霉素购自美国 HyClone 公司;胶原酶Ⅱ、胰蛋白酶、胰岛素和牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;小鼠抗人上皮膜抗原(EMA)单克隆抗体、小鼠抗人 CD68 单抗、小鼠抗人 CK8 单抗、兔抗人 CK18 单抗、FITC-或 PE-连接的小鼠抗 IgG 同型对照抗体均购自美国 Miltenyi Biotec 公司;Alexa Flour® 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG(二抗)、Alexa Flour® 594 标记的山羊抗小鼠 IgG(二抗)均购自北京中衫金桥生物技术有限公司;碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、表皮生长因子(epithelial growth factor,EGF)购自美国 PeproTech 公司。

1.2 标本来源

肾透明细胞癌组织取自兰州大学第二医院 2011 年 9 月至 2012 年 2 月行手术单侧全切或部分切除的 9 例患者,共取得 11 块肾透明细胞癌组织。

1.3 方法

1.3.1 组织块处理方法 肿瘤样本在手术切除后的 1 h 内进行收集,取 50 mL 塑料无菌带盖离心管,内装 RPMI1640 细胞培养液 20 mL(提前在 4 ℃冰箱中预冷),培养液内含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素。在无菌环境下,切取非坏死部位的肿瘤样本,体积在 1 cm^3 以上置于所述无菌离心管内,冰上运输,迅速带回实验室。在生物安全柜内,将肿瘤样本转移至 100 mm 细胞培养皿(Corning,430167)内,用 PBS 10 mL 冲洗 3 次,将血细胞清洗掉,剔除表面筋膜等非肿瘤组织。将肿瘤组织转移至一新的 100 mm 细胞培养皿内,滴加 0.5 mL PBS,用无菌手术刀片、手术剪和手术镊将肿瘤组织全部分割为直径小于 1 mm 的小碎块。转移至 50 mL 离心管,用台式离心机,500 r/min 离心 2 min,用移液器移除离心管内上清,再用 10 mL 含胶原酶Ⅱ(200 U/mL 或 5 mg/mL)的无血清 RPMI1640 培养基进行重悬,置 37 ℃恒温摇床上进行振荡、消化 1 h(消化时间取决于样本大小;如果样本大于 1 g 则消化时间增至 1.5 ~ 2 h)。将消化后的肿瘤组织悬液用台式离心机 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,消化的肿瘤组织用 10 mL PBS 重悬,过筛(100 目,孔径 0.16 mm),将其收集于 100 mm 培养皿中。

1.3.2 肾癌细胞囊球培养 肾癌非黏附囊球培养基组成参照 Bussolati 等[7]的方法,即无血清 RPMI1640 培养基中含有 10 ng/mL bFGF、20 ng/mL EGF、5 μg/mL 胰岛素和 0.4 g/100 mL 的 BSA。按本实验室方法将上述得到的细胞悬液过 40 μm 孔径的细胞筛并收集于 50 mL 离心管内,用血细胞计数板计数。然后将其 1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清,用无血清 RPMI1640 重悬,悬液的细胞数为 1×10^3/mL。细胞置入超低黏附细胞培养 6 孔板中,2 000 细胞/孔,同样培养 3 板,置于 37 ℃,5% CO_2 细胞培养箱中培养 14 d,期间每 3 天添加上述的无血清 RPMI1640 培养基,100 μL/孔。新配制的无血清 RPMI1640 培养基在 4 ℃下保存应不超过 2 周。

1.3.3 肾癌细胞传代培养 无血清培养基中形成的瘤球最大直径达 200 μm 时,只需利用重力作用,沉降 10 min,弃去上清,收集瘤球置于 15 mL 离心管中。为避免胰酶消化损害,将收集的瘤球细胞加入 Accutase 酶(Life technologies)1 mL(可根据瘤球数量调整为1 ~ 5 mL)进行消化裂解,室温下 10 min。然后

用移液器吹打消化液,1 200 r/min 离心 5 min,吸取弃去上清液,细胞分瓶置于无血清培养基中继续扩大培养和传代。在肾癌瘤球原代培养期间任意时间都可用含 10%(体积分数)胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL链霉素的 RPMI1640 常规培养液 5 mL 重悬瘤球消化后的细胞,细胞数≤10^5/mL,将其置入 T25 细胞培养瓶中进行贴壁扩大培养,待细胞铺满 85% 瓶壁时,进行细胞常规传代培养。分别用上述方法培养细胞超过 50 代而没有衰老迹象,即说明细胞原代培养和建系成功。

1.3.4 培养细胞的鉴定 对肾透明细胞癌临床样本细胞和经过无血清悬浮培养得到的细胞分别用荧光素连接的抗 CK8、CK18、CD68 和 EMA 单克隆抗体与肿瘤细胞表面特异性抗原进行免疫杂交,用流式细胞仪检测相对荧光强度。按 WHO 肾细胞癌病理分类和诊断标准[8](CK8、CK18 和 EMA 阳性,CD68 阴性)作为培养细胞是否与其来源细胞遗传表型一致的依据。细胞用含 1% BSA 的 PBS 洗 2 遍,选用上述抗体含 2% 热灭活人血清的 PBS 液 4 ℃下孵化 30 min,用 PBS 洗 2 遍重悬于 FACs 缓冲液,用 FACScan 流式分析仪(BD 公司)测定分析。

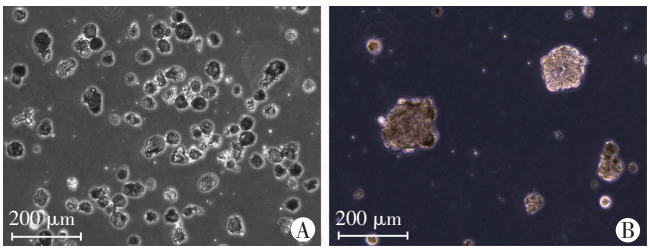
2 结果

2.1 培养结果比较

用传统组织块法和胶原酶消化法进行原代培养共 11 例,成功 3 例。用本方法进行肾透明细胞癌原代培养 9 例,均获成功。对所得肿瘤样本处理后单细胞计数结果显示,平均为 4.34×10^6 个细胞,最大值 2.01×10^7(肿瘤样本较大),最小值 1.05×10^4(肿瘤样本较小)。本改进方法统一采用 3.6×10^4 个细胞,数量如果不够则按 2 000 个细胞/孔孵育瘤球。采用本法所需细胞较少,不受样本大小限制。

2.2 培养细胞的生长

从肾透明细胞癌临床样本组织得到的细胞经无血清培养形成高尔夫球样的肾癌瘤球,非黏附瘤球可以连续传代,后代瘤球生长良好(图 1)。将瘤球消化后的单细胞换为常规培养可得到正常生长的贴壁细胞,该细胞可连续传代培养(图 2)。截至目前,已传代超过 50 代。这表明本实验中非黏附/贴壁培养经过连续传代建立了稳定的人肾透明细胞癌细胞系。采取悬浮瘤球培养法后消化重悬并用常规贴壁培养法得到的第 1 代贴壁细胞,有的呈小圆形,有的呈纺锤形和树枝状,表现为贴壁后分化为具有不同形态的肿瘤细胞且细胞亚群间有明显的界限(图 3),表明肿瘤的异质性。而后随着贴壁培养与传代,细胞达到终末分化,形态差异不再明显。



A:组织样本细胞直接培养第 5 天;B:瘤球传代第 6 代瘤球生长第 7 天

图 1 倒置相差显微镜观察肾透明细胞癌瘤球形态

在瘤球培养过程中撤去无血清培养基,然后模拟传统原代培养方式中组织块法进行原代培养,即直接换为传统的 1640 培养基继续培养,则发现肿瘤细胞爬出瘤球并贴壁扩大生长(图 4)。

2.3 培养细胞的鉴定

流式细胞仪检测细胞表面抗原结果(图 5)可见:经过原代培养的细胞与肾癌组织细胞具有相同的细胞膜免疫表型,免疫表型与肾透明细胞癌类似,呈细胞角蛋白 CK8、CK18 及上皮细胞膜抗原 EMA 阳性,CD68 阴性。这表明体外原代培养的肿瘤细胞很好地再现了体内肿瘤细胞的遗传表型。

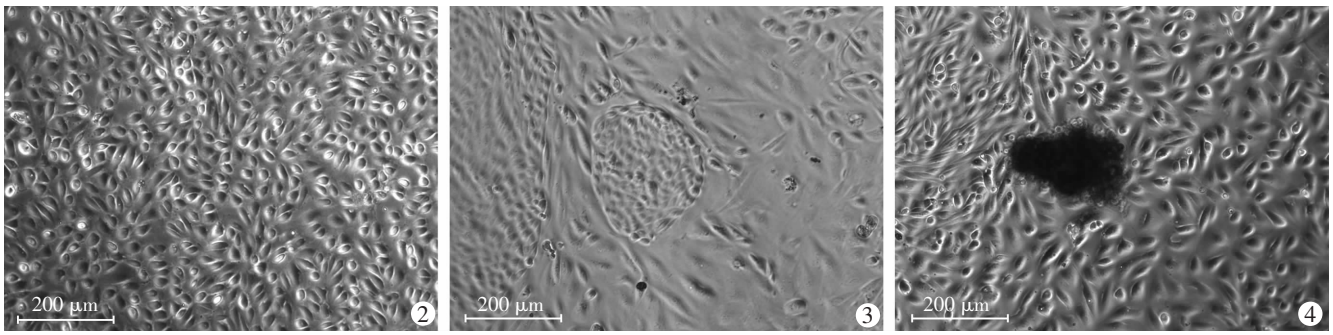
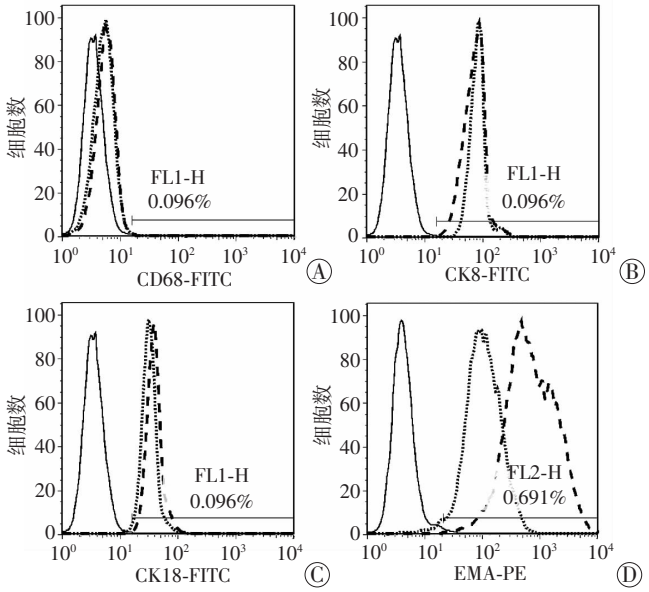


图 2 倒置相差显微镜观察用瘤球形成细胞得到的贴壁培养第 5 代传代细胞形态

图 3 倒置相差显微镜观察用悬浮瘤球培养后得到的第 1 代贴壁培养细胞形态

图 4 瘤球(呈阴影状)培养过程中撤去无血清培养基,模拟传统原代培养组织块法得到贴壁培养细胞



A:CD68;B:CK8;C:CK18;D:EMA;黑线代表同型对照,段虚线代表临床样本细胞,点虚线代表用本法获得的细胞系细胞

图5 流式细胞仪检测本法获得的细胞和临床样本细胞的上皮细胞表面抗原

3 讨论

在许多基础和临床前研究中常常使用非黏附培养系统从各种正常组织类型中收集具有干细胞属性的细胞亚群。悬浮培养体系被用于从原发肿瘤组织样本和肿瘤细胞系中富集未分化细胞亚群,克服了贴壁原代培养的许多弱点,例如肿瘤组织包含高比例的间质纤维,使用单纯的酶法或机械法获得瘤细胞是困难的,一味延长酶消化时间或机械分离强度则必然造成细胞破碎化或减少活细胞。用非黏附材料和无血清培养基使细胞增殖生长形成三维囊球,促进了具有祖细胞表型细胞的增殖[9-10]。

随着科研水平的进步,对肿瘤细胞体外实验的细胞来源要求将更为严谨,获得保留体内生物学特性和遗传属性的优质肿瘤细胞是进行药敏实验及机制研究的前提。本研究改进的肾透明细胞癌原代培养方法建立肿瘤细胞株,忠实地重塑其来源组织的遗传特性,研究其癌变、分子遗传以及转移、演变机制的可靠性大大提高,采用本法保证了对珍贵临床样本进行体外建系的成功率。尽管在本研究中只采用了透明细胞癌临床组织用于原代培养,但是原理上其他任何类型的肿瘤组织甚至某些正常组织均可采用类似的方法进行原代培养。例如 Lee 等[11]介绍的非黏附肿瘤球培养方法;Vu 等[12]报道的临床肝癌组织原代培养方法。综上所述,用本法获得近似临床样本的细胞用于后续研究具有可行性和一定的推广意义。

参考文献:

[1] 李伟, 李晓宇, 黄建华, 等. 干细胞标志基因 Sox2 和 Oct4 在肾细胞癌组织中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤, 2014, 34(8): 739-744, 767.

[2] Li Y, Wang H, Sun T, *et al*. Biological characteristics of a new human glioma cell line transformed into A2B5(+) stem cells[J]. Mol Cancer, 2015, 14: 75. DOI: 10.1186/s12943-015-0343-z

[3] 刘小珍,郑智国,凌志强. 肿瘤细胞原代培养与保存[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(4): 276-283.

[4] Endo H, Okami J, Okuyama H, *et al*. Spheroid culture of primary lung cancer cells with neuregulin 1/HER3 pathway activation[J]. J Thorac Oncol, 2013, 8(2): 131-139. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182779ccf

[5] Seidel S, Garvalov B K, Acker T. Isolation and culture of primary glioblastoma cells from human tumor specimens[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1235: 263-275. DOI: 10.1007/978-1-4939-1785-3_19

[6] Lee K M, Han W, Kim J B, *et al*. The CD49d+/high subpopulation from isolated human breast sarcoma spheres possesses tumor-initiating ability[J]. Int J Oncol, 2012, 40(3): 665-672. DOI: 10.3892/ijo.2011.1289

[7] Bussolati B, Bruno S, Grange C, *et al*. Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas[J]. FASEB J, 2008, 22(10): 3696-3705. DOI: 10.1096/fj.08-102590

[8] 马建辉, 郑闪, 吕宁, 等. 2004 年 WHO 肾细胞癌的病理分类和诊断标准[J]. 现代泌尿外科杂志, 2008, 13(1): 65-69.

[9] Wang S, Huang S, Zhao X, *et al*. Enrichment of prostate cancer stem cells from primary prostate cancer cultures of biopsy samples[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 7(1): 184-193.

[10] Portillo-Lara R, Alvarez M M. Enrichment of the Cancer Stem Phenotype in Sphere Cultures of Prostate Cancer Cell Lines Occurs through Activation of Developmental Pathways Mediated by the Transcriptional Regulator DeltaNp63alpha[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130118. DOI: 10.1371/journal.pone.0130118

[11] Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, *et al*. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines[J]. Cancer Cell, 2006, 9(5): 391-403.

[12] Vu N B, Nguyen T T, Tran L C, *et al*. Doxorubicin and 5-fluorouracil resistant hepatic cancer cells demonstrate stem-like properties[J]. Cytotechnology, 2013, 65(4): 491-503. DOI: 10.1007/s10616-012-9511-9

(**收稿**:2015-08-26;**修回**:2015-09-22)

(编辑 汪勤俭)