

## 采用体外侵袭实验分离侵袭性人原代肾细胞癌细胞

谭晓洁<sup>1</sup>, 侯建国<sup>2</sup>, 贺松琴<sup>1</sup>, 陈北川<sup>1</sup>, 曹广文<sup>1\*</sup>

(1. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 体外分离肾细胞癌原代侵袭性和非侵袭性细胞。**方法:** 消化法或植块法对 32 例临床新鲜肾细胞癌进行原代培养。在预实验确定铺胶浓度、消化回收时间的基础上, 采用涂有 Matrigel 的 Transwell 对 3 例原代培养的肾细胞癌细胞进行体外侵袭实验, 分离回收侵袭性和非侵袭性细胞。**结果:** (1) 原代培养成功率为 90.6% (29/32)。(2) 以 1.0 mg/ml、20  $\mu$ l/孔对 Transwell 铺胶, 固定细胞悬液密度 ( $5 \times 10^5$ /ml), 第 5 天消化回收细胞较为理想。非侵袭性细胞散在生长, 侵袭性细胞多呈克隆样生长。侵袭性细胞倍增时间为 36.1 h, 非侵袭性细胞为 50.6 h。**结论:** Transwell 可体外快速分离及回收、培养不同侵袭性的肾癌原代细胞群。用原代肿瘤细胞进行体外侵袭实验代表性好, 但难以突破肿瘤细胞的有限生存期。

**[关键词]** 癌, 肾细胞; 细胞分离; 体外侵袭实验**[中图分类号]** **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-318-04Separation of invasive subpopulation from primary human renal cell carcinoma *via in vitro* invasion assayTAN Xiao-jie<sup>1</sup>, HOU Jian-guo<sup>2</sup>, HE Song-qin<sup>1</sup>, CHEN Bei-chuan<sup>1</sup>, CAO Guang-wen<sup>1\*</sup> (1. Department of Epidemiology, Faculty of Health Service, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To isolate the invasive and non-invasive cells from primary human renal cell carcinoma (RCC) *in vitro*. **Methods:** Fresh RCC surgical specimens from 32 primary RCC patients were primarily cultured following enzyme digestion or mechanical minimization *in vitro*. *In vitro* invasion assay using the Transwell cultures coating Matrigel was performed for separation and recovery of invasive and non-invasive cells from the primary culture of 3 RCC patients. The concentration of Matrigel, recovery time and trypsinization were subsequently optimized. **Results:** The successful rate of primary culture was 90.6% (29/32). Recovery of invasive cells was performed ideally when matrigel (diluted into 1.0 mg/ml and 20  $\mu$ l) was coated onto the filter of the well; cell suspension was at a concentration of  $5 \times 10^5$ /ml and invasive cells were recovered on the 5th day of culture. The growth of non-invasive cells was scattered, while that of the invasive cells was focal. The doubling time of invasive cells was 36.1 h and that of non-invasive was 50.6 h. **Conclusion:** The *in vitro* invasion assay using the Transwell is able to separate and recover the highly invasive primary RCC cells. The primary cells represent intact subpopulation composition, but it can hardly get through the life span of human primary tumor cells.

**[KEY WORDS]** carcinoma, renal cell; cell separation; *in vitro* invasion assay

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 318-321]

肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 是源于肾实质的恶性肿瘤, 约占肾肿瘤的 90%~95%。肾细胞癌临床症状不典型, 25%~30% 的患者初诊时即发现转移, 转移后平均生存期仅为 8~10 个月。RCC 对放疗、化疗、内分泌治疗等多种常规肿瘤治疗手段不敏感<sup>[1]</sup>。寻找特异的肿瘤转移标志是有效预防和治疗 RCC 的前提。分离人新鲜肾癌转移 (侵袭) 性细胞和非转移 (侵袭) 性细胞亚群是研究 RCC 转移特性的相关基因分子基础。由于目前尚难肯定在长期培养中的癌细胞的生物学性状与体内时仍完全相同, 且临床上难于在同一个 RCC 患者中得到原发肿瘤和转移肿瘤, 故本研究拟通过临床肾癌患者 RCC 细胞的原代培养, 采用体外原代 RCC 细胞侵袭实验得到遗传背景较一致的侵袭性和非侵袭性细胞, 为克隆差异表达基因奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 标本来源 汉族人 RCC 新鲜组织, 取自就诊于长海医

院泌尿外科的原发性肾癌手术患者, 共 32 例。

1.2 细胞培养和染色体分析 11 例标本采用消化法、21 例标本采用植块法进行原代培养, 原代培养细胞进行常规染色体分析<sup>[2]</sup>。

1.3 RCC 原代细胞体外侵袭实验 挑选 3 例供体年龄小、原代培养生长旺盛的 RCC, 采用涂有 Matrigel (10 mg/ml, BD, 354234) 的 Transwell (Corning, 3422) 进行体外侵袭实验筛选侵袭性和非侵袭性细胞。

1.3.1 趋化剂 收集 NIH3T3 培养上清。挑选处于对数生长期的 NIH3T3 细胞 (来源 ATCC, 长海医院实验诊断科馈赠), 无血清 RPMI 1640 洗涤 3 次后, 以无血清 RPMI 1640

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30370788)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30370788)。**[作者简介]** 谭晓洁, 硕士生。

\* Corresponding author. E-mail: gcao@smmu.edu.cn

于 CO<sub>2</sub> 培养箱 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 湿度) 继续培养 24 h 后, 收集上清。1 800 r/min 离心 10 min, 收集离心上清, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 冻存。使用时, 配以 300 mg/L 谷氨酰胺, 50 μmol/L 2-巯乙醇, 110 mg/L 丙酮酸钠, 15% 小牛血清。

1.3.2 细胞悬液密度 由于国内外体外侵袭实验研究对象均为细胞系, 且不同种类的细胞系细胞大小不同, 穿膜效率并不一致, 细胞悬液密度 10<sup>5</sup>~10<sup>8</sup>/ml 不等<sup>[3~6]</sup>。鉴于本研究采用原代 RCC 作为实验对象, 将细胞悬液密度定为 5×10<sup>5</sup>/ml。

1.3.3 铺胶浓度 进行预实验对经原代培养的 RCC 细胞体外侵袭实验的铺胶浓度进行摸索。参照有关说明, 薄胶涂层 50 μl/cm<sup>2</sup>, Transwell (Corning, 3422) 规格为 0.33 cm<sup>2</sup>/孔, 所以铺 Matrigel 体积为 16.5 μl/孔, 便于操作取整 20 μl/孔, 又优化的铺胶浓度为 85 μg/cm<sup>2</sup>, 所以理论上胶最终稀释的浓度为 1.7 mg/ml。故取 1.0、2.0、2.5 mg/ml 进行预实验。按 1.0、2.0、2.5 mg/ml, 20 μl/孔铺胶, 每种浓度铺 2 孔, 以 5×10<sup>5</sup>/ml, 0.1 ml/孔加入 RCC 细胞悬液。待下室有个别细胞漏下, 经消化回收后, 光镜下每孔随机挑选 3 个视野计数侵袭性细胞。

1.3.4 最佳消化回收时间 国内外体外侵袭实验的观察时间范围为 4~72 h<sup>[7,8]</sup>。通过预实验动态观测计数侵袭细胞的数量, 寻找其达到高峰的时间, 并结合原代 RCC 细胞倍增时间确定侵袭细胞回收时间。按预实验选定的铺胶浓度, 20 μl/孔铺胶, 铺 12 孔, 以 5×10<sup>5</sup>/ml, 0.1 ml/孔加入 RCC 细胞悬液。从第 2 天起, 每日消化回收 2 孔, 光镜下每孔随机挑选 3 个视野计数侵袭细胞数量, 并按侵袭性、非侵袭性细胞分别培养。

1.3.5 体外侵袭实验及回收过程 按预实验选定的铺胶浓度, 20 μl/孔铺胶, 铺 6 孔, 以 5×10<sup>5</sup>/ml, 0.1 ml/孔加入 RCC 细胞悬液至上室, 加 NIH3T3 培养上清 0.6 ml/孔至下室, 进行体外侵袭实验。观察一个最佳消化回收时间后, 回收侵袭

性、非侵袭性细胞。回收具体过程: 无菌眼科镊夹住 Transwell 插件边缘将其放入盛有 D-Hank's 的小烧杯中, 反复清洗 1~2 min, 注意勿使滤膜的上下表面受到损伤。无菌棉签快速刮除滤膜上表面的 Matrigel 层。吸除下室 NIH3T3 培养上清, 加入 0.25% 胰酶 0.6 ml/孔。将清洗好的插件对应放入各室, 并于上室中加入 0.25% 胰酶 0.1 ml/孔, 消化贴于滤膜上下表面的细胞 (CO<sub>2</sub> 培养, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 湿度)。待镜下观察滤膜上表面细胞变圆 (约 6~7 min), 并可见下室已有滤膜下表面消化脱落的细胞时, 盖好 Transwell 外盖, 用手指轻弹 Transwell 边缘, 以使滤膜下表面消化变圆的细胞落入下室。下室加入 1.5 ml/孔完全培养基, 上室加入 0.1 ml/孔完全培养基终止消化。无菌镊夹住插件反复上下提升若干次, 进一步使滤膜下表面消化的细胞脱落, 进入下室。反复吹打下室细胞悬液, 1 800 r/min 离心 5 min 收集侵袭细胞。弃上清, RPMI 1640 完全培养基 (10% 小牛血清) 吹打形成单细胞悬液移至 24 孔培养板 (Transwell 去除插件) 中培养。同样方法处理上室细胞。24 孔培养板置 CO<sub>2</sub> 培养箱 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 湿度) 中继续培养。观察细胞学形态, 测定倍增时间。

1.4 统计学处理 采用第二军医大学卫生勤务学系统统计学教研室 SAS 9.12 软件, 进行多个样本均数比较的方差分析, 检验水准为 α=0.05。

## 2 结果

2.1 RCC 的原代细胞培养 消化法和植块法原代培养情况见表 1。植块法培养周期长, 但游出的细胞增殖能力较强, 传代次数相对较多, 一般形成较明显的克隆。培养细胞进行染色体分析, 染色体众数为 48 条, 提示所培养的细胞以肿瘤细胞为主。在以往的研究中我们应用免疫组化等方法证实了该原代培养获得肿瘤细胞<sup>[9]</sup>。

表 1 RCC 细胞原代培养情况  
Tab 1 Culture of primary RCC cells

Methods	Successful rate of primary culture				Subculture
	F0	F1	F2	F5	
Digestion	90.9(10/11)	81.8(9/11)	63.6(7/11)	9.1(1/11)	1-6
Fragment	90.5(19/21)	76.2(16/21)	33.3(7/21)	23.8(5/21)	1-14
Total	90.6(29/32)	78.1(25/32)	43.8(14/32)	18.8(6/32)	1-14

2.2 铺胶浓度 次日光镜下观察上室细胞已贴壁, 并渗入 Matrigel 层中, 下室无细胞漏下。第 6 天各孔均有个别细胞漏下。经消化回收后, 1.0、2.0、2.5 mg/ml 浓度下侵袭细胞数分别为 48.50±5.01、50.67±9.65、51.83±7.63, 差别无统计学意义 (P>0.05)。因此在以下实验中按照 1.0 mg/ml 铺胶。

2.3 最佳消化回收时间 侵袭细胞数量随回收时间的延长而变化的趋势见图 1。第 1、2 孔曲线趋势相同, 第 3 次消化回收由于终止消化时反复吹打产生过多泡沫, 影响了视野选

择和计数, 反映在图 1 则出现了一个低峰。从第 4 次消化回收开始, 侵袭细胞数量没有明显变化 (P>0.05), 即第 4、5、6 次消化回收的细胞数量差别无统计学意义, 反映在图 1 则曲线自消化回收第 4 天起趋向平缓。所以侵袭细胞数量达到高峰的时间很有可能位于在第 4 次消化回收时间附近, 即实验第 5 天。由此可见在实验第 5 天后进行消化回收比较有意义, 回收效率较高。此外还应考虑到原代 RCC 细胞的倍增时间, 侵袭过膜时间不宜过长以免影响细胞状态, 因其不能及时得到传代而老化。

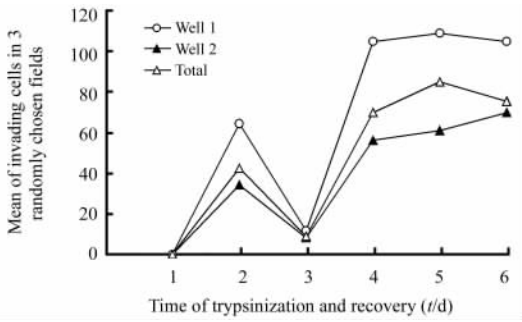


图 1 RCC 穿膜侵袭细胞数量随时间变化的趋势  
Fig 1 Changes of RCC cells invading membrane with the change of time

2.4 体外侵袭实验及回收 实验第 2 天上室细胞贴壁,已渗入 Matrigel 层。第 6 天每孔均有个别细胞漏下。于第 6 天消化回收,8 h 后观察:非侵袭性细胞 60%~70% 已贴壁,侵袭性细胞贴壁较少(30%~50%),多数细胞沉于孔底平面上,尚未变形。第 7 天观察:非侵袭性细胞散在生长,侵袭性细胞贴壁者多呈克隆样生长(图 2)。侵袭性细胞倍增时间为 36.1 h,非侵袭性细胞的倍增时间为 50.6 h。

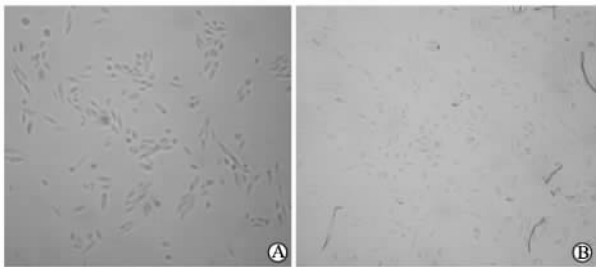


图 2 侵袭性细胞与非侵袭性细胞形态学比较  
Fig 2 Comparison of morphology of invasive and non-invasive cells(×100)

A: Invasive cells, focal growth; B: Non-invasive cells, scattered growth

### 3 讨论

本实验在体外 RCC 原代培养的基础上,针对 3 例标本进行了侵袭性、非侵袭性细胞的体外初筛。该法通过采用 Transwell 模拟体内运动侵袭能力较强的肿瘤细胞脱离原细胞群,分泌或促使周围细胞分泌某些酶类降解细胞外基质成分——Matrigel,在某特异器官或组织(NIH3T3 无血清培养上清)的趋化下发生侵袭的过程。转移性肿瘤细胞和少量白细胞可通过 Matrigel 层,非转移性肿瘤细胞、成纤维细胞、表皮细胞不能通过<sup>[10]</sup>。查阅国内外文献,众多学者大都使用该法鉴定细胞系的侵袭能力,而对原代培养的细胞即非细胞系进行分离回收者较少。笔者在此方面作了初步的探索和尝试。

在 Boyden 小室侵袭实验基础上改进的 Transwell 体外

快速侵袭实验(以下简称 Transwell 实验)弥补了以往体外侵袭实验的不足。早期所使用的尿囊膜、羊膜等作为侵袭材料,不仅取材比较困难,技术含量高,而且上述组织材料存在遗传异质性致使实验结果重复性差。含有大量基底膜成分的 Matrigel 相比较而言易处理,简化了实验过程。Transwell 实验结果、分离效率受众多因素的影响,例如 Matrigel 浓度过高时,即使是侵袭性细胞也很难通过;浓度过低,则不足以形成屏障作用,非侵袭性细胞也可通过。究竟在什么样的条件下进行实验,使得穿过微孔滤膜的细胞尽可能多的是高侵袭性肿瘤细胞,降低实验的假阳性,需要对铺胶浓度、体积、细胞种类及总量、侵袭回收时间等参数进行摸索。这是 Transwell 实验的前提,也是难点所在。

首先,有关胶浓度、胶体积、胶总量的设定,各类文献报道不一致,标准范围有所出入。依据 Matrigel 的使用说明,Matrigel 在可凝固的前提下,有两种稀释范围分别适用于侵袭实验(50 μl/cm<sup>2</sup>)和细胞的三维培养(150~200 μl/cm<sup>2</sup>),即薄胶涂层和厚胶涂层。笔者采用薄胶涂层 50 μl/cm<sup>2</sup>。又 Transwell (Corning, 3422)规格为 0.33 cm<sup>2</sup>/孔,所以铺 Matrigel 体积为 16.5 μl/孔,便于操作取整 20 μl/孔。选取文献中常用的 3 种浓度:1.0 mg/ml、2.0 mg/ml、2.5 mg/ml,此时胶总量依次为 20 μg、40 μg、60 μg。其中 60 μg 远远超过了推荐的标准范围 21.45~41.25 μg,胶的量过高。所以从理论角度来看,2.5 mg/ml 不可取,但预实验还是选取了上述 3 种浓度进行观察。结果发现 3 种浓度下 RCC 细胞穿膜数量没有统计学差别,即胶浓度至少在 1~2.5 mg/ml 对实验结果没有明显影响。但实际操作中以 2.5 mg/ml 铺胶时,由于胶滴的表面张力,胶不易展开铺平,可能造成局部的“漏洞”,使实验假阳性升高。采用 1.0 mg/ml、2.0 mg/ml 铺胶时未遇到上述问题,但铺胶是否均匀,肉眼很难辨认,最佳方案是进行均质性检验,如考马斯亮兰染色<sup>[11]</sup>。此步本实验未进行,这是本实验不足之处。

其次,关于侵袭回收时间点的选取。相关文献报道 4~72 h 不等。由于本实验采用 RCC 原代培养的细胞,细胞来源复杂,含有一定比例的非肿瘤细胞,所以为保证实验结果的阳性率,我们在以往 1×10<sup>5</sup>/ml 基础上增至 5×10<sup>5</sup>/ml,由此通过动态观察细胞侵袭数量确定最佳回收时间点。图 1 显示自第 4 次消化回收开始,细胞数量未发生统计学意义上的变化,所以实验第 5 天可考虑回收 RCC 侵袭性、非侵袭性细胞。此外,Transwell 实验周期不宜过长。一方面,时间过长,非侵袭性细胞也会因 Matrigel 已经降解而突破屏障漏入下室;另一方面,无论滤膜上表面还是下表面,细胞的分裂增殖不易观察,时间过久,一旦细胞由传代期进入衰退期,回收再培养的成功率会严重受到影响。因此笔者建议原代培养的细胞进行体外侵袭实验特别是需要回收时,应将原代培养细胞的倍增时间作为重要的参考指标。实验中可使用同一批 RCC 细胞做对照,提供传代时间参考。笔者于实验第 6 天回收细胞,目前细胞生长状态良好(图 2)。

与以往国内外文献报道的体外侵袭实验所不同的是:第一,本实验未进行有关侵袭百分率及侵袭指数的计算。对于细胞系的体外侵袭能力的鉴定,侵袭百分率和侵袭指数是常

规的衡量指标。侵袭百分率是细胞降解 Matrigel 穿过滤膜的个数与细胞运动(不涂 Matrigel)穿过滤膜的个数的百分比。侵袭指数是实验细胞系与对照非侵袭性细胞系侵袭百分率的比值。在细胞来源比较单一或者说是细胞系的情况下计算上述指标比较有参考价值。若为原代培养的细胞,细胞种类繁多,各类细胞倍增时间并不一致,加之侵袭回收周期较长,无论是侵袭性还是非侵袭性细胞都已经发生不同程度的分裂增殖,此时计算两个指标已没有实际意义,误差较大。近来也有文献将细胞系的群体倍增时间考虑进去,从而修正上述两个指标。而本实验旨在经过体外侵袭实验反复筛选高侵袭性细胞,不是单纯评价细胞群体的侵袭性,所以实验的侧重点未放在此处。第二,本实验采用的是原代培养的 RCC 细胞而非细胞系。在肿瘤细胞转移的过程中,肿瘤细胞与周围基质的相互作用举足轻重。这个过程不仅仅是指肿瘤细胞克服周围基质的阻碍和屏障发生转移,更重要的是肿瘤细胞通过某些信号途径促使周围正常细胞分泌因子协同转移。所以使用细胞系不能完全代表肿瘤细胞的侵袭特性,基于原代培养的肿瘤细胞更加模仿体内环境,从而提高了实验结果的真实性与可靠性。另一方面也应看到,原代培养的细胞虽然代表性好,但分裂增殖不稳定,不能突破细胞的有限生存期。这即是采用 Transwell 进行 RCC 原代体外筛选的瓶颈所在。筛选的结局是细胞的老化,例如两次预实验进行初筛后,细胞经过增殖分裂期后停止生长,细胞的数量达不到再次筛选的标准,使得反复筛选难以进行,后续实验受到影响。

#### [参考文献]

- [1] Curti BD. Renal cell carcinoma[J]. JAMA, 2004, 292:97-100.  
 [2] 侯建国,曹广文,李光辉,等. 人肾透明细胞癌细胞系的建立及其生物学特性[J]. 中华实验外科杂志,1996,13: 350-351.  
 [3] Hou M, Tan L, Wang X, et al. Antisense Tiam1 down-regulates the invasiveness of 95D cells *in vitro* [J]. Acta Biochim

Biophys Sin, 2004, 36:537-540.

- [4] Nagakawa O, Fujiuchi Y, Fuse H, et al. Differential effect of chromogranin A fragments on invasion and growth of prostate cancer cells *in vitro* [J]. Urology, 2003,62:553-558.  
 [5] Price DJ, Miralem T, Jiang S, et al. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells[J]. Cell Growth Differ, 2001,12: 129-135.  
 [6] Pross M, Lippert H, Misselwitz F, et al. Low-molecular-weight heparin (reviparin) diminishes tumor cell adhesion and invasion *in vitro*, and decreases intraperitoneal growth of colonadeno-carcinoma cells in rats after laparoscopy [J]. Thromb Res, 2003,110:215-220.  
 [7] Seton-Rogers SE, Lu Y, Hines LM, et al. Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101:1257-1262.  
 [8] Jacob K, Webber M, Benayahu D, et al. Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone[J]. Cancer Res, 1999,59:4453-4457.  
 [9] 张晓琴,曹广文,侯建国,等. 人肾细胞癌细胞的原代培养及癌基因表达初步分析[J]. 第二军医大学学报,1999, 20: 280-282.  
 [10] Terranova VP, Hujanen ES, Loeb DM, et al. Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1986, 83:465-469.  
 [11] Brools SA, Schumacher U. Metastasis research protocols: volume II analysis of cell behavior *in vitro* and *in vivo* [M]. New Jersey: Humana Press, 2001.

[收稿日期] 2005-07-14

[修回日期] 2006-01-18

[本文编辑] 曹 静

### Subcutaneous pedicle limberg flap for facial reconstruction

Li JH, Xing X, Ouyang TX, Ping L, Jie X, Guo ET(Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433,China)

[ABSTRACT] **Background:** A residual dog-ear arising from the traditional Limberg flap transposition sometimes influences the cosmetic outcomes, and the Limberg flap with a subcutaneous pedicle is an innovation applicable to a variety of facial defects and free from the dog-ear. **Objective:** To investigate the outcome of the subcutaneous pedicle Limberg flap for the reconstruction of medium-sized facial skin defects. **Materials and methods:** From August 2002 to June 2004, the subcutaneous pedicle Limberg flap was designed to repair facial skin defects in 17 patients (19 flaps), and the size of the lesions ranged from 2.0×1.9 cm to 5.0×4.5 cm. **Results:** All flaps survived with primary healing postoperatively. The patients were followed up from 1 to 22 months, and functionally and cosmetically satisfactory outcomes were achieved. **Conclusions:** This subcutaneous pedicle Limberg flap provides a competitive repair alternative for the treatment of medium-sized skin defects in the face.

[Dermatol Surg, 2005,31(8 Pt 1): 949-952]