

# 人正常食管上皮细胞的体外培养

## *In vitro* culture of normal human esophageal epithelial cells

刘洪涛,张宝仁,黄盛东\*,刘晓红,孙志刚

(第二军医大学长海医院胸心外科,上海 200433)

[关键词] 食管;上皮细胞;细胞培养技术;培养基,无血清

[中图分类号] R 333.1 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2006)09-1041-02

近年来正常食管上皮细胞恶性转化导致食管癌发生逐渐引起人们重视,体外正常食管上皮细胞的原代及传代培养成为研究正常食管上皮细胞增殖、分化及恶性转化的必要条件。国内关于人正常食管上皮细胞体外培养的研究罕见。我们参考国外学者的研究<sup>[1]</sup>,成功建立了人正常食管上皮细胞原代和传代培养的方法,获得了一些经验和体会,总结如下。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂 无血清角化细胞培养基 Keratinocyte-SFM、RPMI 1640 培养基、胎牛血清、0.25% Dispase II、0.25%胰蛋白酶/EDTA 均为美国 Gibco 公司产品。二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司。青霉素钠、硫酸链霉素购自华北制药股份有限公司。0.05%洗必泰由长海医院药学部提供。冻存液由 KSFM 和 10%的 DMSO 配成。

1.2 主要仪器 一次性塑料 6 孔板、25 cm<sup>2</sup> 及 75 cm<sup>2</sup> 一次性塑料培养皿、冻存管均为美国 Corning 公司产品。细胞培养箱为 Heraeus 公司产品。100 目和 200 目不锈钢滤网购自上海不锈钢厂。倒置相差显微镜为日本 Olympus 公司产品。

1.3 人正常食管上皮细胞的分离、原代及传代培养 标本取自食管中段癌患者(男,60 岁)术后 0.5 h 内远离癌组织 5 cm 的食管上皮。取材前经患者及家属知情同意。将食管标本沿长轴纵行切开、展平,用 0.9%生理盐水反复冲洗内腔表面,无菌条件下剪取远离癌组织的正常食管上皮,长约 3 cm,生理盐水冲洗后放入 4℃ PBS(含 200 U/ml 青霉素、200 μg/ml 链霉素)中立即带回实验室。去掉血块和坏死组织,修剪去除皮下结缔组织和肌肉,交替使用 0.05%洗必泰和 PBS 反复冲洗上皮,共计 6 次,每次冲洗 1 min。将上皮剪成碎块,每块大小约 1 mm<sup>2</sup>,收集碎块放入 50 ml 无菌离心管中,加入 10 ml 0.25%Dispase II 混匀,37℃水浴振荡消化 3 h。消化完毕室温下直接离心,1 500 r/min×5 min,去上清,加入 10 ml 0.25%胰蛋白酶/EDTA 与组织碎块混匀,37℃水浴振荡消化 15 min。加入含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 10 ml 终止消化,经 100 目和 200 目不锈钢滤网去除组织碎块,收集滤过后的细胞悬液,放入新离心管中,室温下离心,1 500 r/min×5 min,弃上清,用 PBS 重悬细胞洗涤 2 次。用 KSFM 培养液重悬配制细胞悬液,锥虫蓝拒染法检测细胞活力。将细胞接种于 6 孔板中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,接种后 24 h 半量换液,之后 2~3 d 换液。当细胞生长至 80%~90%融合时按 1:2 传代。传代时,用吸

管吸出培养液, PBS 洗涤板孔 2 次,加入 0.25%胰酶/EDTA 37℃消化约 1~2 min,倒置相差显微镜下见大部分细胞变圆脱壁后加入含血清的 RPMI 1640 培养液终止消化,吸管反复吹打板底使细胞脱壁均匀悬浮,取细胞悬液,室温下离心 1 500 r/min×5 min,弃上清,用 PBS 重悬细胞洗涤 1 次,用 KSFM 混悬细胞,调整细胞密度传代培养于新的培养瓶中。细胞再次融合后(3~5 d),1:2 传代(第 3 代)。冻存细胞时,将所需细胞按照上述方法消化离心后用预冷的 1 ml 冻存液混悬收集于 1.5 ml 冻存管中,按标准程序梯度降温,最后置于液氮中保存。

1.4 原代培养细胞的形态学观察及鉴定 在倒置相差显微镜下观察食管上皮细胞生长状态、形态变化。采用两步法行正常食管上皮细胞角蛋白免疫组化染色,主要步骤为室温下 95%乙醇固定生长于无菌盖玻片表面的细胞 30 min,蒸馏水洗涤 1 次, PBS 洗涤 2 次,加入鼠抗人广谱角蛋白单克隆抗体室温下孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鼠二抗室温下孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次后 DAB 显色 10 min,再用苏木精精染细胞核 10 min,流水冲洗,盐酸分化、温水返蓝,3~5 min 后观察。胞质棕黄色表明细胞角蛋白阳性。用 PBS 代替一抗作空白对照,用人成纤维细胞作阴性对照。

### 2 结果

2.1 形态学观察 采用 0.25% Dispase II 和 0.25%胰蛋白酶/EDTA 联合消化法成功获得食管上皮细胞。锥虫蓝拒染法显示细胞成活率在 80%以上。原代培养的细胞为均一的食管上皮细胞,无成纤维细胞混杂,目前细胞已传至第 7 代,隔代收集细胞作液氮冻存。倒置相差显微镜下观察刚接种时细胞形态多样,单个散在分布或成数个细胞团,有成熟的鳞片状上皮细胞和体积较小的类圆形细胞,24 h 后部分细胞贴壁。原代培养的贴壁细胞在倒置相差显微镜下观察,细胞体积较小,轮廓清晰,立体感强,呈多角形,散在分布,胞核大,圆形或卵圆形,1~3 个核仁,核质比例正常,培养 12 d 细

[基金项目] 国家自然科学基金(30471718)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30471718)。

[作者简介] 刘洪涛, 博士生, 住院医师。

E-mail: liuhtelmol@hotmail.com

\* Corresponding author. E-mail: huangsd@public6.sta.net.nc

胞生长融合达到80%~90%,细胞排列紧密,呈“铺路石”样排列、区域性生长(图1),给予传代。传代后的上皮细胞12h即完全贴壁伸展,单层生长,呈多角形,大小均一,3~5d后即呈铺路石样外观,可再次传代。4代之前细胞形态、大小均一,4代之后随传代次数增加细胞变大出现多形性,核内颗粒增多,可见核内空泡,但细胞增殖能力无明显减弱。6代之后部分区域细胞扁平,核内颗粒增多,分裂像减少,生长缓慢,贴壁生长能力下降。液氮冻存的食管上皮细胞复苏后细胞成活率达90%。

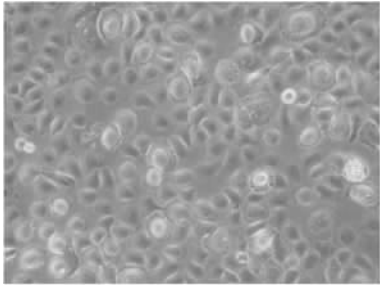


图1 培养12d的原代人正常食管上皮细胞为多角形,胞质丰富,镶嵌排列(×200)

2.2 免疫组化检查 细胞角蛋白免疫组化染色显示原代培养的食管上皮细胞胞质呈棕黄色(图2),高倍镜可见胞质内呈棕黄色网状角蛋白颗粒,空白对照和阴性对照组细胞不着色。

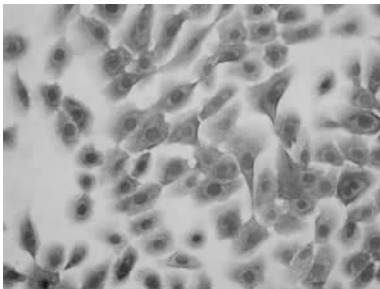


图2 原代培养的人正常食管上皮细胞表达细胞角蛋白(×400)

### 3 讨论

目前国内报道人正常食管上皮细胞体外培养文献较少,国外的文献所采用的方法较多,我们根据国外文献进行了实验条件的摸索,成功培养出人正常食管上皮细胞。本实验所采用标本来自于1例60岁食管癌患者正常食管上皮,取材培养过程中,切取部分组织制成石蜡切片镜检证实为正常鳞状上皮组织。此后我们相继做了6例相同实验,年龄最小45岁,最大64岁,培养食管上皮细胞均获成功,说明本实验所采用方法方便可行。

正常食管上皮细胞培养首先需要注意污染问题。食管与外界相通,黏膜表面通常附有细菌或霉菌,因此培养前需要作预处理。为此,我们在取材时先将食管剖开,内腔使用无菌生理盐水反复冲洗,将所需标本取下后再次冲洗,然后浸入无菌的含青霉素、链霉素的PBS中放置于冰盒内带回实验室。在超净台内交替使用洗必泰和PBS反复冲洗标本,冲

洗过程中注意将食管上皮展平,减少褶皱,以保证冲洗效果。经上述处理后再将标本剪碎依次使用Dispase II和胰蛋白酶消化,接种培养。目前我们共计培养6例正常食管上皮,经上述预处理无1例出现细菌和霉菌污染。

原代细胞培养多采用组织块法、酶消化法或机械分离法<sup>[2]</sup>。组织块法可用于培养食管上皮细胞<sup>[3]</sup>,本实验采用Dispase II和胰酶联合消化法成功培养出正常食管上皮细胞。与组织块法比较,本方法不易造成细胞污染,操作方便,收获细胞时间短,细胞融合快,是目前国外同类研究最常用的方法。各家报道使用酶的浓度不同,我们经过摸索,使用0.25% Dispase II和0.25%胰蛋白酶/EDTA适合于细胞分离培养,严格掌握消化时间不致于对细胞造成损伤,完全满足细胞培养需要。本实验所采用Dispase II是从多粘芽孢杆菌培养液中提取的中性蛋白酶,选择性地分解纤维结合素和IV型胶原,可以有效、作用温和地分离上皮和皮下组织,保存上皮细胞活力,再使用胰酶可以破坏桥粒和半桥粒,从而获取上皮单细胞。

正常上皮细胞的培养需要注意避免成纤维细胞的污染和过度增殖,因为血清常含有对上皮细胞生长起抑制作用的TGF- $\beta$ 1等因子,所以本实验采用无血清角化细胞培养液KFSM,抑制成纤维细胞生长促进上皮细胞的增殖<sup>[4]</sup>,保证了本实验获得的上皮细胞纯度高。我们实验中发现,单纯使用无血清培养基4代之前上皮细胞生长良好,增殖旺盛,此后细胞生长、增殖能力有所减退,因此4代之前上皮细胞用于相关研究最佳。国外研究报道KFSM中加入表皮生长因子(EGF)、小牛垂体提取物(BPE)等因子食管上皮细胞可连续传代超过30次而细胞生长增殖能力无衰减<sup>[5]</sup>。

本研究建立了人正常食管上皮细胞原代及传代培养的方法,使用Dispase II和胰酶联合消化收获食管上皮细胞,方法简便可行,效果确切,使用无血清角化细胞培养基加适当生长因子可满足上皮细胞连续传代的需要。

### [参考文献]

- [1] Andl CD, Mizushima T, Nakagawa H, et al. Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration, and aggregation in esophageal keratinocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:1824-1830.
- [2] 弗雷谢尼 RI. 动物细胞培养——基本技术指南[M]. 章静波, 徐存栓译. 4版. 北京:科学出版社, 2004:180-207.
- [3] Oda D, Savard CE, Eng L, et al. Reconstituted human oral and esophageal mucosa in culture [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, 34:46-52.
- [4] Shipley GD, Pittelkow MR. Control of growth and differentiation *in vitro* of human keratinocytes cultured in serum-free medium [J]. *Arch Dermatol*, 1987, 123:1541-1544.
- [5] Kawabe A, Shimada Y, Soma T, et al. Production of prostaglandin E2 *via* bile acid is enhanced by trypsin and acid in normal human esophageal epithelial cells [J]. *Life Sci*, 2004, 75: 21-34.

[收稿日期] 2006-01-13

[修回日期] 2006-08-29

[本文编辑] 曹静