

大肠癌细胞原代培养方法的研究进展

高丽萍¹⁾, 白松²⁾, 杨丽娟¹⁾, 邹英鹰¹⁾, 王芳¹⁾

(1) 昆明医科大学基础医学院病理学教研室, 云南昆明 650500; 2) 昆明医科大学第一附属医院干疗科, 云南昆明 650032)

[摘要] 大肠癌细胞原代培养目前尚未建立一种合理、稳定、高效的培养模式, 通过查阅国内外关于大肠癌细胞原代培养方法的文献, 对常用方法及最新方法进行概括、分析和总结, 得出结论: 目前常用的组织块法、机械分离法、胰酶消化法和胶原酶消化法培养效果均不理想, 而 Liberase DH 消化法有望成为一种大肠癌细胞原代培养的有效方法, 但可行性有待进一步探究。

[关键词] 大肠癌细胞; 原代培养; 方法

[中图分类号] R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 02-0156-05

Research Progress in the Primary Culture of Human Colorectal Cancer Cells

GAO Li-ping¹⁾, BAI Song²⁾, YANG Li-juan¹⁾, ZOU Ying-ying¹⁾, WANG Fang¹⁾

(1) Dept of Pathology, School of Basic Medical Science of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Dept. of Cadres Rehabilitation, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] A rational, stable and efficient method for primary culture of colorectal cancer cells has not been established. By reading the latest domestic and international literature on the primary culture methods of colorectal cancer cells, we generalize, analyze and summarize the commonly used methods and the latest methods, and provide new ideas for establishment of primary culture model of colorectal cancer. So common methods such as tissue, mechanical separation, trypsin digestion and collagenase digestion on colorectal cancer cells in primary culture are not good ideal, and Liberase DH is expected to become effective method, but the feasibility needs to be further explored.

[Key words] Colorectal cancer; Primary culture; New method

大肠癌是消化系统肿瘤中常见的恶性肿瘤之一^[1]。为研究其发病机制和治疗, 国外已建立了大肠癌细胞株, 但经过长期培养, 其生物学特性易发生变异而不利于发病机制和治疗的研究^[2]。因此, 建立合理、稳定、高效的大肠癌细胞原代培养模式已成必然^[3]。目前常用的大肠癌细胞原代培养方法有组织块法、机械分离法、胰酶消化法和胶原酶消化法。本文对以上几种方法进行分析、概括和总结, 并介绍国外最新的 Liberase DH 消化

法。

1 大肠癌细胞原代培养的常用方法

1.1 消化方法

1.1.1 组织块法 (1) 用 HBSS 液反复洗涤组织块, 直至将坏死组织、脂肪组织和血细胞洗净^[4]。由于大肠癌细胞易受肠道细菌的污染, 因此, Danielle^[5]等常在洗涤过程中适当加入青霉素、链霉素、庆大

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81260361); 云南省自然科学基金资助项目 (2010CD079)

[作者简介] 高丽萍 (1988~), 女, 福建龙岩市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤侵袭与转移研究工作。

[通讯作者] 王芳. E-mail:wangfang_01@126.com; 白松. E-mail:baisong523@163.com

霉素和两性霉素 B 等抗生素; (2) 将组织块剪碎, 用 HBSS 液反复吹打组织块, 使其充分分散; (3) 将组织块转至加有 HBSS 液的离心管中; (4) 离心后弃去上清液; (5) 重复 (3) 和 (4) 两次; (6) 将组织块转至含完全培养基的离心管中, 离心弃上清; (7) 将组织移入培养瓶中, 加完全培养基, 放入培养箱中倒置 2~4 h 后, 翻转培养瓶继续培养. 通常完全培养基是由基础培养基、抗生素、胎牛血清 (FBS) 和生长因子等配制^[6]. 国内学者培养大肠癌细胞所用基础培养基通常为 1640 培养液^[3, 7, 8], 而国外学者常用 DMEM 培养液^[9, 10]. Chailier^[11]等在培养 CRC 时在培养基中加入了 EGF、胰岛素、转铁蛋白和谷氨酰胺. 鄢^[12]等通过实验证实, 预先用鼠尾胶原处理培养瓶, 能增强细胞的贴壁效果, 有利于细胞的生长; (8) 24 h 后取出培养瓶, 再加入完全培养基, 放入培养箱继续培养 2 d; (9) 3 d 后取出培养瓶, 弃悬浮物, 继续加入完全培养基培养.

虽有文献报道^[13], 组织块培养法获得大肠癌细胞的成功率较高, 但该方法存在以下弊端: (1) 培养出的细胞不够纯, 含杂细胞较多, 尤其是成纤维细胞^[4]. 有学者指出^[3], 一定浓度的 FBS 可抑制成纤维细胞的生长; (2) 组织大小不易掌握. 一般将组织剪碎至 0.5~1 mm, 剪得过小易损伤细胞, 反之, 则不利于细胞的游出.

1.1.2 机械分离法 (1) 同组织块法步骤的 (1)~(5); (2) 将组织碎块移入不锈钢滤网中, 研磨并将研磨液于转入离心管中; (3) 在离心管中加入等体积肿瘤细胞分离液; (4) 离心并收集中间层于另一个离心管中; (5) 加入 HBSS 液, 离心后移除上清液; (6) 用 HBSS 液重悬, 重复步骤 (5) 一次; (7) 加入完全培养基重悬; (8) 将悬液移入预先用鼠尾胶原处理过的培养瓶^[14], 将培养瓶放入 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养.

该方法通过剪碎、挤压、研磨来破坏组织细胞间的连接, 使细胞充分散开, 从而获得单个细胞. 虽然在理论上解决了组织块培养法不利于细胞游出的问题, 但研磨毕竟会对组织细胞产生一定程度的损伤, 收集到的细胞活性很低, 因此成功率很低 (18.3%)^[3], 因此, 在实际培养中很少用到这一方法.

1.1.3 胰酶消化法 (1) 同组织块法步骤的 (1)~(5); (2) 将组织碎块移入无菌离心管中, 加入胰蛋白酶消化液, 放入 37℃ 恒温箱中, 不断震荡, 收集消化液于离心管中; (3) 离心并弃上清液, 收集细胞沉淀后, 用 HBSS 液重悬, 置于 4℃ 冰箱

中, 直至充分消化; (4) 将细胞悬液通过无菌的不锈钢滤网, 收集滤液于无菌离心管中; (5) 同机械法步骤的 (3)~(8).

胰酶消化法一般用 0.25% 的胰酶作用于细胞间, 用化学方法使细胞间连接断开来获得单个细胞, 解决了机械分离法对细胞的损伤. 因此, 该方法在细胞培养中受到研究者的青睐, 特别是在细胞传代时^[15]用的较多. 但有利必有弊, 不同细胞的消化时间不同、消化不充分和消化过了都不利于细胞生长. CRC 细胞一般消化 1~5 min, 至显微镜下观察到细胞变圆脱落, 加入适量血清终止消化^[16].

1.1.4 IV 型胶原酶消化法步骤 (1) 同组织块法的 (1)~(5); (2) 将组织块移入无菌离心管中, 加入 IV 型胶原酶消化液, 放入 37℃ 恒温箱中, 不断震荡, 直至组织块充分弥散开为消化结束; (3) 将消化液连同组织碎块一起移入不锈钢滤网, 收集滤液于无菌离心管中; (4) 同机械法步骤的 (3)~(8).

IV 型胶原酶消化法特异性的水解细胞间天然胶原蛋白的三维螺旋结构^[17]而不损伤蛋白质和组织, 终止消化同样用血清.

1.2 传代方法

当细胞覆盖瓶底 80%^[18]左右进行传代. (1) 弃培养液, 用 PBS 液清洗两回, 加入胰蛋白酶, 置于 37℃ 恒温箱中; (2) 显微镜下观察, 当细胞开始变圆并脱落, 可向离心管中加入等体积培养液以终止消化; (3) 离心, 弃上清液; (4) 加入完全培养基重悬. 分别移入 2 个预先用鼠尾胶原处理过的培养瓶中, 即为 P1 代; (5) 将培养瓶放入 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中继续培养.

2 国外近年来的原代培养新方法—Liberase DH 消化法^[9, 19]

2.1 消化方法

(1) 同组织块法步骤的 (1)~(5); (2) 将碎组织块转入 50 mL 离心管内, 用消化液 A 重悬 [含 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素和 0.28 μg/mL Liberase DH (05401054; Roche) 的 20 mL DMEM] 用搅拌器充分搅拌, 置于 37℃ 的水浴箱内边震荡边消化 2 h; (3) 消化完毕后从水浴箱中取出, 直接在 4℃ 离心机 1 000 r/min 离心 5 min (Liberase DH 消化法全程离心都在 4℃ 离心机上进行), 弃上清液; (4) 用洗液 B (含 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素的 20 mL HBSS) 旋转震荡清洗组织碎块; (5) 用 500 μm 的不锈钢滤网

过滤组织；(6) 将滤液转入 50 mL 离心管中，再用 40 μm 的滤网过滤；(7) 将 40 μm 的滤网完全浸入加有 30 mL HBSS 的组织培养皿内，轻微搅拌，移除直径 < 40 μm 的组织碎片、细胞团块和单个细胞；(8) 用自动转液器收集残留在 40 μm 滤网上的组织块，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中 1 000 r/min 离心 5 min. 弃上清液；(9) 用洗液 B 旋转震荡清洗组织，再在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机上 1 000 r/min 离心 5 min, 弃洗液；(10) 将组织碎块转入 25 cm 培养瓶内，加入完全培养基含 8 ng/mL bFGF(13256-029; Invitrogen)^[20], 0.1 mM 2-mercaptoethanol (137-06862; Wako), 100 U/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两性霉素 B(541-01961; Wako) 的 4 mL Serum-free cell medium (Stempro hESC SFM)^[21]; (11) 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h.

2.2 传代方法

按比例配制好胶原液：A:B:C=7:2:1 [A: Cellmatrix type I-A (Nitta Gelatin)；B: 5xDMEM (12100-038; Gibco)；C: reconstitution buffer (50 mmol NaOH, 260 mmol NaHCO_3 , 200 mmol Hepes)]。将配置好的胶原液存放于冷环境中，避免形成凝胶：(1) 吸取 100 μL 的胶原液于培养瓶内，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 无菌环境中 30 min，使其形成凝胶，凝胶形成后将培养瓶置于冷环境中；(2) 再在形成的凝胶表面加入 30 μL 的胶原液，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 无菌环境中 30 min 后，再将培养瓶置于冷环境中；(3) 在显微镜下将之前的组织轻轻移入刚刚形成的凝胶中，使其表面平坦，加入 3 mL 的完全培养基（同前），置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 的培养箱中培养 2~3 d 换液；(4) 2~3 周后，弃培养基，用加有 0.2 mg/mL IV 型胶原酶 (4186; Worthington) 的 3 mL DMEM (11965-092; Gibco) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中消化 1 h，不断震荡，使其充分消化；(5) 充分消化后转入 50 mL 无菌离心管，并加入 10 mL PBS 液，混合均匀，1 000 r/min 离心 2 min，弃上清液；(6) 转入无菌培养瓶，加 3 mL 的完全培养基，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 的培养箱中培养。

3 小结

为了获得更好的培养效果，还应注意以下几点：(1) 取材：取材的好坏直接关系到细胞的成活率与生长状况。因此取材应注意：①选未经放射治疗的大肠癌手术患者^[3]；②尽量避开坏死区；③常规培养法取材后应立即置于完全培养基中，而 Liberase DH 消化法取材后置于含 100 U/mL 青霉

素，100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素，100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两性霉素 B 的 20 mL DMEM 中。④将组织块保存于 4 $^{\circ}$ 环境中^[22]，尽可能在 30 min 内处理组织块^[3, 23]；(2) 在培养基中加入适量抗生素可有效防止细胞污染^[15]；(3) 若培养瓶内有成纤维细胞，可用胰蛋白酶消化去除。数量较多，可直接在显微镜下，用机械刮除法将成纤维细胞刮除^[24]；(4) 国外许多学者的经验表明，CRC 原代培养时，由于细胞刚脱离正常组织，可加入 15%~20% 的高浓度 FBS，以满足细胞对营养的需要。待细胞稳定传代后 FBS 可降至 10%^[20]。

综上，CRC 的原代培养是非常精细和难度较大的基础工作，我们迫切希望在不断完善和总结经验的基础上建立一套真正适合 CRC 的合理、稳定、高效的培养模式，为研究大肠癌发病机制、预防和治疗做出卓越贡献。

[参考文献]

- [1] SAUNDERS M, IVESON T. Management of advanced colorectal cancer: state of the art [J]. Br J Cancer, 2006, 95(2): 131-138.
- [2] LANGDON S P. Basic principles of cancer cell culture [J]. Methods Mol Med, 2004, 88(1): 3-15.
- [3] 杨磊磊, 戴岳楚, 董米连, 等. 大肠癌细胞的原代培养方法 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2012, 18(4): 341-345.
- [4] ARUL M, ROSLANI A C, NG C L, et al. Culture of low passage colorectal cancer cells and demonstration of variation in selected tumour marker expression [J]. Cytotechnology, 2014, 66(1): 481-491.
- [5] PASTOR D M, PORITZ L S, OLSON T L, et al. Primary cell lines: false representation or model system a comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines [J]. Int J Clin Exp Med, 2010, 3(1): 69-83.
- [6] YU C S, HUANG A C, LAI K C, et al. Diallyl trisulfide induces apoptosis in human primary colorectal cancer cells [J]. Oncol Rep, 2012, 28(3): 949-954.
- [7] 袁航, 屠世良. 大肠癌原代细胞培养方法的探索 [J]. 温州医学院学报, 2013, 43(12): 808-812.
- [8] 焦保庭, 杨伟明, 贺子彪, 等. 原代大肠癌细胞分离培养中的影响因素 [J]. 贵州医药, 2007, 31(10): 870-872.
- [9] KONDO J, ENDO H, OKUYAMA H, et al. Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(15): 6235-6

- 240.
- [10] KU J L, SHIN Y K, KIM D W, et al. Establishment and characterization of 13 human colorectal carcinoma cell lines: mutations of genes and expressions of drug-sensitivity genes and cancer stem cell markers[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(6): 1 003 – 1 009.
- [11] CHAILLER P, BEAULIEU J F, MENARD D. Isolation and functional studies of human fetal gastric epithelium in primary culture[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 806(1): 137 – 155.
- [12] 鄢开胜, 罗凌惠, 付勇, 等. 鼠尾胶原在原代培养耳蜗血管纹边缘细胞中的应用 [J]. *临床耳鼻咽喉科*, 2006, 20(10): 463 – 465.
- [13] 柳良仁, 刘振华, 魏强. 前列腺原代基质细胞培养方法的研究[J]. *四川大学学报*, 2010, 41(3): 518 – 522.
- [14] OZDENER M H, RAWSON N E. Primary culture of mammalian taste epithelium [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 945(1): 95 – 107.
- [15] CREE I A. Principles of cancer cell culture[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 731(1): 13 – 26.
- [16] SPISNI R, FAILLI A, ORSINI G, et al. Colorectal cancer: tissutal explantation and primary cell culture[J]. *Ann Ital Chir*, 2009, 80(3): 211 – 217.
- [17] SIMON P. *Cancer cell culture: methods and protocols*[M]. New Jersey: Humana Press, 2004: 79 – 93.
- [18] SRIGUNAPALAN S, EYDELNANT I A, SIMMONS C A, et al. A digital microfluidic platform for primary cell culture and analysis[J]. *Lab Chip*, 2012, 12(2): 369 – 375.
- [19] OKUYAMA H, YOSHIDA T, ENDO H, et al. Involvement of heregulin/HER3 in the primary culture of human urothelial cancer[J]. *J Urol*, 2013, 190(1): 302 – 310.
- [20] PAEK S H, SHIN H Y, KIM J W, et al. Primary culture of central neurocytoma: a case report[J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(5): 798 – 803.
- [21] ASHLEY N, JONES M, OUARET D, et al. Rapidly derived colorectal cancer cultures recapitulate parental cancer characteristics and enable personalised therapeutic assays [J]. *J Pathol*, 2014, 1(1): 1 – 12.
- [22] SHARPE C C, DOCKRELL M E. Primary culture of human renal proximal tubule epithelial cells and interstitial fibroblasts[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 806(1): 175 – 185.
- [23] BROUQUET A, TALEB P, LOT AS, et al. A model of primary culture of colorectal cancer and liver metastasis to predict chemosensitivity [J]. *J Surg Res*, 2011, 166(2): 247 – 254.
- [24] MACLEOD K G, LANGDON S P. Essential techniques of cancer cell culture [J]. *Methods Mol Med*, 2004, 88(1): 17 – 29.

(2014-10-21 收稿)

征稿启事

为进一步支持和推动昆明医科大学学科建设的发展,使《昆明医科大学学报》的学术质量得到进一步的提升,《昆明医科大学学报》编辑部决定自2012年1月1日起,国家自然科学基金资助课题的综述可以在学报正刊发表,另外对国家自然科学基金资助课题、云南省自然科学基金资助课题及昆明医科大学“十二五”省级、校级重点学科立项建设的研究论文,给予优先刊登及优稿优酬的奖励机制.欢迎广大科研教学人员、硕士及博士研究生踊跃投稿.网上投稿 <http://kmykdx.cnjournals.cn>, 电话: 0871 – 65936489, 0871 – 65393133.

昆明医科大学学报编辑部
2014年1月1日