

小儿睾丸卵黄囊瘤组织原代培养的不同方法评价

张浩川 沈金辉 陈聪德 李仲荣 陈肖鸣

摘要 目的 采用组织培养技术在体外培养取自人体的睾丸卵黄囊瘤组织,比较并建立人睾丸卵黄囊瘤细胞原代培养的理想方法。**方法** 分别采用机械分散法、酶消化法和植块培养法进行人睾丸卵黄囊瘤细胞的体外原代培养,倒置显微镜及台盼蓝染色观察并比较三者的培养成功率、细胞活力、细胞形态和数量等,免疫组化法鉴定其细胞来源。**结果** 原代培养的成功率、细胞活力与培养方法密切相关,植块培养法成功率高,细胞活力强,优于其他两种培养方法。培养的原代细胞能贴壁生长,AFP 染色均呈阳性,表达于胞质, β -HCG 染色均阴性,符合睾丸卵黄囊瘤生物学特征。**结论** 植块培养法是一种科学可行的小儿睾丸卵黄囊瘤细胞原代培养的方法,能为进行人睾丸卵黄囊瘤细胞的分离培养纯化及特性研究提供实验基础。

关键词 睾丸卵黄囊瘤 原代培养 方法学

Evaluation of Effect in Primary Culture of Testicular Yolk Sac Tumor by Different Methods in Childhood. Zhang Haochuan, Shen Jinhui, Chen Congde, Li Zhongrong, Chen Xiaoming. Department of Pediatric Surgery, The Yuying Children Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To compare and establish an ideal method for the primary culture of testicular yolk sac tumor in childhood *in vitro*. **Methods** The tissues of testicular yolk sac tumor were separately cultured by three methods: physical disassociation, tissue digestion and tissue explant. The cell culture efficiency, cell vitality and cell morphology were observed and evaluated by phase - contract microscopy and trypan - blue dying methods. The cell source was identified by immunohistochemistry. **Results** Methods applied in primary culture were important factors affecting the subsequent outcome. The successful rate and cell vitality of tissue explant was significantly higher than others. The primary cell of testicular yolk sac tumor was positive for AFP and negative for β -HCG. **Conclusion** The tissue explant is an ideal method for the primary culture of testicular yolk sac tumor in childhood *in vitro*. It may provide a methodological and experimental foundation for isolation, subculture and biological characterization of testicular yolk sac tumor in future.

Key words Testicular yolk sac tumor; Primary culture; Methodology

细胞培养已成为医学基础研究中必不可少的手段。随着抗生素、培养基、培养用品及培养技术的发展,目前世界上已建立了数百种肿瘤细胞系。对于睾丸卵黄囊瘤体外培养研究的报道,最初见于小鼠来源的胚胎性癌,如 NULLI-SCC1、F9、P19、NE、NF-1 等小鼠来源生殖细胞的细胞系的建立及相关研究见于文献报道,但这些细胞系由于来源于小鼠,与发生于人体的胚胎性癌存在种属的差异^[1]。在 2008 年 Kiyosumi 等^[2]人报道了成功建立人卵巢卵黄囊瘤细胞系,目前尚未见报道来源于国人的睾丸卵黄囊瘤原代培养或细胞株的建立及相关研究。因此,本项研究的目的在于为小儿睾丸卵黄囊瘤的基础研究提供一种

新的实验对象;应用组织细胞培养技术,在体外培养来源于人体的小儿卵黄囊瘤细胞,探索最适的原代培养方法,为后续进行人睾丸卵黄囊瘤细胞的分离培养纯化及特性研究提供实验基础。

材料与方法

1. 主要试剂与仪器:DMEM 购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清、新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,琼脂糖(Agar A)购自 BBT 公司,胰酶购自美国 Sigma 公司,鼠抗人 AFP 和鼠抗人 β -HCG 单抗均购自美国 Zymed Laboratories 公司,DAB Kit 购自北京中山生物技术有限公司,倒置相差显微镜 TS100 购自日本 Nikon 公司。

2. 标本来源:来自温州医学院附属儿童医院小儿外科诊治的 2 例睾丸肿瘤手术患者的新鲜标本。患儿男性,年龄 21 个月和 17 个月,血 AFP 测得 1210ng/ml 和 2430ng/ml,术前未经化疗或放疗,术后标本均经病理诊断为卵黄囊瘤。

3. 肿瘤组织的取材:术中待肿瘤组织块切下后,在酒精灯旁将组织块切成两块,一块送病理科病理切片;另一块分别用无菌生理盐水及含双抗的 D-Hanks 液冲洗去除血污后,立刻浸入含上述 D-Hanks 液的无菌玻璃小瓶中带回实验室。

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(2004Y204463);浙江省卫生厅卫生科技重点项目(2004ZD009)

作者单位:325027 温州医学院附属育英儿童医院小儿外科

通讯作者:陈肖鸣,电子信箱:cxm@wzmc.net

在超净台上取出肿瘤组织块,仔细剔除其他组织及可疑的坏死组织,借助小尖镊及眼科剪将肿瘤组织剪成 0.3~0.5cm 长的小块,共 30 份。

4. 实验分组:30 份标本随机分为 3 组,每组 10 份,分别采用机械分散细胞培养法、酶消化解离细胞培养和植块培养法各培养 10 份。

5. 原代培养方法:(1)机械分散细胞培养法:备 15ml 无菌离心管、50ml 培养瓶、一次性无菌培养皿、手术器械、消化酶(0.25% Trypsin + 0.02% EDTA)及完全培养液。在超净台上,取 1ml 含有脱落细胞的睾丸卵黄囊瘤组织块移入 15ml 无菌离心管,1000r/min 离心 10min,去上清,加入 5ml 培养液重新混匀,待组织块下沉后,去除剩余上清,将组织块移至无菌培养皿上,用眼科剪将组织块尽量剪至 1mm³ 左右大小的碎块,加 5ml 培养液重新悬浮,移入 15ml 无菌离心管,吹打 2~3min,待碎块下沉后,取 1ml 上清至培养瓶。置于 37℃,含 5% CO₂ 及饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。(2)酶消化解离细胞培养法:备 15ml 无菌离心管、50ml 培养瓶、一次性无菌培养皿、手术器械、消化酶(0.25% Trypsin + 0.02% EDTA)及完全培养液。取睾丸卵黄囊瘤组织碎块移入无菌离心管中,加含 0.02% EDTA 的 0.25% Trypsin 消化 10min,1000r/min 离心 5min,去上清,加 1.5ml 培养液,混匀后稍静置,待未消化小块下沉后将悬液移入离心管中,加入 5ml D-Hanks 液,混匀后 1000r/min 离心 5min,去上清,含 0.02% EDTA 的 0.25% Trypsin 再次消化,将悬液移入培养瓶,置于 37℃,含 5% CO₂ 及饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。(3)植块培养法:在培养瓶中加少量培养液湿润生长面,取部分睾丸卵黄囊瘤组织碎块间隔约 0.5~1cm 排列接种到生长面上,加 0.5ml 培养液后倒置培养瓶,置于 37℃,含 5% CO₂ 及饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。约 30h 后,培养瓶的植块已牢固贴附于生长面,翻转培养瓶,将培养液加量至 5ml,继续培养。

6. 形态学观察:在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况,包括细胞贴壁情况和细胞形态,并照相记录。

7. 细胞活力测定:台盼蓝排斥实验观察比较各组细胞活力情况。PBS液洗涤培养瓶3次,胰酶消化,离心收集后制成

细胞悬液,用巴氏吸管各取 1 滴细胞悬液与 1 滴台盼蓝混合滴入细胞计数板,镜下观察,计数 100 个细胞。细胞活力(台盼蓝拒染率) = 染色阴性细胞数/100 个细胞 × 100%。

8. 细胞来源鉴定:分别取 3 种不同培养方法获得的原代人睾丸卵黄囊瘤细胞,用免疫细胞化学法进行 AFP 和 β-HCG 免疫组化染色,免疫细胞化学步骤参照 SP 试剂盒提供的说明书进行。

结 果

1. 不同的培养方法与肿瘤细胞生长情况:结果见表 1。

表 1 培养方法与肿瘤细胞生长情况

培养方法	培养瓶数	生长瓶数	成功率(%)
机械分散细胞培养法	10	1	10
酶消化解离细胞培养法	10	3	30
植块培养法	10	8	80

2. 倒置显微镜下的观察情况:(1)机械分散细胞培养法:培养第 6 天仅 1 例见细胞开始贴壁生长,其余 9 例连续培养 2 周后培养瓶中的细胞仍未见有活细胞长出,原种植移入的细胞已发生坏死、凋亡(图 1A)。(2)酶消化解离细胞培养法:分别在培养第 4、5、7 天,3 个培养瓶中见有细胞开始贴壁生长,呈短梭形或多角形,大小不一,但是贴壁细胞数量较少,也可见少量细长分支的成纤维样细胞贴壁和很多漂浮的死亡细胞(图 1B)。(3)植块培养法:4 个培养瓶在培养的第 3 天、2 个培养瓶在第 5 天、2 个培养瓶在第 6 天开始出现细胞贴壁生长,见贴壁组织块的周围有较多细胞呈晕样向外长出。细胞呈短梭形或多角形,大小不一,胞质内可见颗粒。位于植块周边的细胞生长活跃,可见到较多的细胞分裂相,外围的细胞与细胞之间间隙较大(图 1C)。



图 1 3 种培养方法后细胞生长情况的观察(倒置显微镜,100×)

A. 机械分散法培养第 3 天,培养瓶中原种植细胞发生坏死、凋亡;B. 酶消化细胞培养法培养第 7 天,培养瓶中见有细胞开始贴壁生长,可见少量细长分支的成纤维样细胞贴壁;C. 植块培养法培养第 7 天,培养瓶中见大量细胞从植块周围长出,细胞生长活跃,可见较多的细分裂象,箭头所指为处于分裂的两个细胞

3. 细胞活力测定:机械分散细胞培养法、酶消化

解离细胞培养法和植块培养法的台盼蓝拒染率分别

是 28%、55% ~ 60% 和 72% ~ 80%, 提示用植块培养法培养的细胞活力较其他两种好。

4. 细胞来源鉴定: 3 种方法培养的原代细胞 AFP

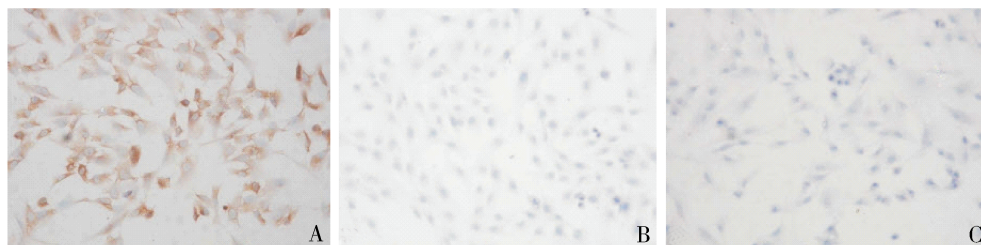


图 2 原代培养的肿瘤细胞免疫细胞化学表达情况 (苏木精复染, $\times 200$)

A. AFP 阳性, 表达于胞质; B. β -HCG 未见表达; C. 阴性对照片

讨 论

原代培养 (primary culture) 的实质就是培养物在被分割和再种植前的初次培养。原代培养的成功与否是决定能否成功建立一个细胞系的关键。原代培养的成功率与组织或细胞的供体情况、取材方法、培养方法以及培养条件以及污染的预防等都相关, 其中不同培养方法是影响细胞原代培养成功和活力的重要因素^[3]。

根据培养物及标本处理方式的不同, 肿瘤的原代培养有几种不同的方法。如果培养物是分散生长的细胞, 如生长在体液 (如胸腔积液、腹腔积液) 中的肿瘤细胞、或是血液系统肿瘤, 则可以穿刺抽取供体的体液或血液, 从中分离获取肿瘤细胞, 移入培养体系中直接培养。PA-1 细胞株即是抽取了一名白人女性卵巢恶性畸胎瘤复发患者的腹腔积液细胞培养建立的^[4]。如果培养物是机体的器官或组织的一部分, 根据取材后组织块处理方式的不同, 又有植块培养法和分散细胞培养法两种主要方法。根据分散细胞方法的不同, 分散细胞培养法又可分为机械分散法和酶消化法等。植块培养法就是将取材得到的组织块切割成一定大小的植块, 再将这此植块接种到培养体系中进行培养。当初 Harrison (1907 年) 在创立体外培养这门技术时, 就最先建立了植块培养法。机械分散细胞培养法是指通过各种物理方法将取材得到的组织解离成单细胞悬液以用于接种培养的方法。可通过吸管吹打, 研磨加网筛过滤, 甚至用刀切割或剪刀剪碎等多种途径分散细胞。机械分离法对于组织机械解离耐受力不强的细胞容易造成伤害, 细胞的存活率相对较低。在本研究中, 采用机械分散细胞培养法, 仅成功 1 例, 余都没有观察到肿瘤细胞的生长, 原接种细胞发生坏死、凋亡, 机械法费时、费力、低效,

染色均呈阳性, 表达于胞质; β -HCG 染色均阴性, 见图 2。

培养出来的细胞活性差, 本研究中细胞活力为 28%, 接近于文献报道^[5]。酶消化解离细胞培养法是选用 Trypsin、Collagenase、Pronase 等多种化学酶类来消化细胞间质, 获取单细胞悬液以用于接种培养的方法。酶消化法对细胞的损伤作用总的来说较机械分散法轻, 然而过度消化也会对细胞造成很大的伤害, 胰蛋白酶对细胞的损伤明显, 长时间或者高浓度胰蛋白酶作用后大量细胞被灭活。甚至有人认为胰蛋白酶消化超过 20min, 则可破坏细胞表面的蛋白质, 使细胞表面通透性升高, 活力下降, 而且酶消化法所获得的细胞纯度不高^[6]。本实验中发现酶消化法成功率是 30%, 结果见贴壁细胞数量较少, 也可见少量细长分支的成纤维样细胞贴壁和很多漂浮的死亡细胞, 细胞活力较差, 约 55% ~ 60%, 较难用于传代培养。组织块法操作简单易行, 已被广泛应用于各种肿瘤组织的原代培养中, 其基本原理是使组织块贴附瓶壁上, 以利于细胞从组织块中游出, 组织块贴壁否是细胞能否游出的前提, 但是组织块贴壁并不保证细胞的游出, 还受组织来源、供体年龄、组织大小、培养条件和贴附底物等多种因素的影响。

本研究的标本来自一例 21 个月龄的男性患儿, 患儿术前未接受过放疗或化疗, 组织块取自原发部位睾丸组织, 故供体情况和取材方法为成功培养提供了重要保证。本研究采用植块培养法, 分别在培养第 4、5、7 天, 培养瓶中都观察到有大量细胞从植块的边缘长出。尽管在不同的组织类型中, 单个细胞在体外也能生长繁殖, 本研究的结果显示, 植块培养法的成功率为 80%, 明显高于分散细胞培养法和酶消化解离细胞培养法。我们认为, 组织块法的成功率高、操作简便、不易污染, 并且可以在相对较短的时间内获得数量众多的原代细胞, 是一种简单、高效的原代培

养方法。鄂征等^[7]指出,体外培养的细胞与在体细胞相似,细胞与细胞之间具有相互依存的关系,细胞与细胞之间存在着物质的交换以及信息的沟通。由于构成植块的细胞之间保留了在体时细胞之间的相互作用,因而在体外培养时,植块内的细胞更容易存活和生长。Kenny PA 和 Bissell 等人^[8]研究发现,肿瘤细胞的生长状况甚至组织表型在很大程度上要受到其所处的微环境(包括细胞及细胞外基质)的影响。由于细胞微环境的影响日益受到重视,三维立体培养已成为今后组织培养发展的一个方向^[9]。

经以上 3 种培养方法的原代睾丸卵黄囊瘤细胞,细胞呈短梭形或多角形,大小不一,胞质内可见颗粒。免疫细胞化学显示:AFP 染色均呈阳性,表达于胞质, β -HCG 染色均阴性,初步证实细胞来源于睾丸卵黄囊瘤。目前细胞稳定传代培养,增殖活跃,肿瘤细胞的纯度较高,可以用于后续的实验研究。

参考文献

- 1 Choi SC, Choi JH, Shim WJ, *et al.* P19 embryonal carcinoma cells; a new model for the study of endothelial cell differentiation. *Biotechnol*

Lett, 2008, 30(7):1169-1175

- 2 Kiyosumi Shibata, Hiroaki Kajiyama. Establishment and Characterization of an Ovarian Yolk Sac Tumor Cell Line Reveals Possible Involvement of Nkx2.5 in Tumor Development *Oncology*, 2008, 74:104-111
- 3 薛庆善. 体外培养的原理与技术. 北京:科学出版社, 2001:2-7
- 4 Dong KW, Chi TF, Juan YW, *et al.* Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 184(5):835-843
- 5 Di Carlo D, Wu LY, Lee LP. Dynamic single cell culture array. *Lab Chip*, 2006, 6(11):1445-1449
- 6 Pai JH, Xu W, Sims CE, *et al.* Microtable arrays for culture and isolation of cell colonies. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(6):2595-2604
- 7 鄂征. 组织培养技术及其在医学研究中的应用. 北京:中国协和医科大学出版社, 2004:125
- 8 Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ. Targeting the tumor microenvironment. *Front Biosci*, 2007, 12(5):3468-3474
- 9 Storm MP, Orchard CB, Bone HK, *et al.* Three-dimensional culture systems for the expansion of pluripotent embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107(4):683-695

(收稿:2010-12-08)

(修回:2011-03-24)

疾病不确定感对卵巢上皮癌患者癌因性疲乏及化疗不良反应指标评分影响

孙春燕 黄悦 白田妹 杨宏 王坤

摘要 **目的** 分析疾病不确定感对卵巢上皮癌患者癌因性疲乏和化疗毒性不良反应指标评分的影响。**方法** 连续选择 59 例卵巢上皮癌近期接受化疗(PAC 方案)患者,她们分别接受了“Missals 疾病不确定感量表”、癌因性疲乏评估量表和 WHO 制定的“抗癌药急性和亚急性毒性不良反应问卷”评估。**结果** 癌因性疲乏指标比较中,不确定感高分组(28 例)的“您是否需要休息”、“您是否感到过劳累”、“您是否已经累了”等条目得分以及癌因性疲乏总分均明显高于低分组(31 例, P 均 $< 0.01 \sim 0.05$)。化疗毒性不良反应指标比较中,高分组的恶心和呕吐、腹痛、便秘、腹泻相关症状评分和毒性不良反应总分均明显大于低分组(P 均 $< 0.01 \sim 0.05$)。**结论** 疾病不确定感评分可明确影响到卵巢上皮癌患者癌因性疲乏和化疗毒性不良反应指标评分。

关键词 卵巢癌/上皮性 化疗 疾病不确定感 癌因性疲乏/评分 毒性不良反应指标/评分

Influence of Disease Uncertainty on Toxic and Side Effect Scores of Chemical Therapy Among Epithelial Ovarian Cancer Patients. Sun Chunyan, Huang Yue, Bai Tianmei, Yang Hong, Wang Kun. Department of Gynaecology and Obstetrics, The 202 Hospital of Chinese PLA, Liaoning 110003, China

Abstract Objective To analyze the influence of disease uncertainty on toxic and side effect scores of chemical therapy among epithelial ovarian cancer patients. **Methods** A total of 59 patients with epithelial ovarian cancer were treated by chemical therapy (Program PAC), while they were also evaluated according to Missals Uncertainty in Illness Scale, cancer-related fatigue assessment scale, and

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(20102240)

作者单位:110003 沈阳,解放军第 202 医院妇产科