

无血清培养基中成釉细胞瘤细胞的生长特性

曾东林, 黄洪章, 张 彬, 潘朝斌

(中山大学附属第二医院口腔颌面外科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】研究成釉细胞瘤细胞在无血清培养基中的生长特性, 建立成釉细胞瘤细胞的无血清培养法。【方法】用 Defined Keratinocyte- SFM (DK- SFM) 无血清培养基和 DMEM 培养成釉细胞瘤细胞, 观察细胞的生长特性、细胞形态和传代次数, 流式细胞仪 (FCM) 测定 S 期细胞比率 (SPF) 和增殖指数 (PI)。【结果】在 DK- SFM 培养基中, 细胞传代 6 次, 平均生长 92 d; 细胞形态清晰, 仅见少许散在的成纤维细胞生长; SPF 值为 12.3% ~14.5%, PI 值为 11.6% ~15.3%。在 DMEM 中, 细胞传代 3 次, 平均生长 61 d; 细胞境界不清, 并可见较多的成纤维细胞; SPF 值为 7.9% ~9.2%, PI 值为 8.3% ~9.6%。【结论】成釉细胞瘤细胞在 DK- SFM 无血清培养基中存活时间长, DK- SFM 较 DMEM 更适合体外培养成釉细胞瘤细胞。

关键词: 成釉细胞瘤; 培养基; 细胞培养

中图分类号: R739.8

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2006)01-0113-04

Growth Characteristics of Ameloblastoma Cells Cultured in Serum- free Medium In Vitro

ZENG Dong-lin, HUANG Hong-zhang, ZHANG Bin, PAN Chao-bin

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat- sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the growth behavior of ameloblastoma cells cultured in serum- free medium and to establish the serum- free culture method for ameloblastoma cells in vitro.【Methods】 The Defined Keratinocyte- SFM (DK- SFM) medium and DMEM medium were used for ameloblastoma cell culture in vitro. The growth rates in different culture media were observed. The morphology and passages of ameloblastoma cells in different media were investigated. The SPF value and PI value of the cells were detected by flow cytometry. 【Results】 In DK- SFM medium, ameloblastoma cells were taken through 6 passages and maintained about 92 days. The shape of cultured cells in DK- SFM medium was distinct. Only some sporadic fibroblast was seen in DK- SFM medium. The SPF value and PI value of cells cultured in DK- SFM were 12.3%- 14.5% and 11.6%- 15.3%, respectively. However, in DMEM medium, the cells were only taken through 3 passages and maintained about 61 days, and the shape of it was not clear. A lot of fibroblasts were seen in DMEM medium. The SPF value and PI value of cells cultured in DMEM were 7.9%- 9.2% and 8.3%- 9.6%, respectively. 【Conclusion】 Ameloblastoma cells have long survival time in DK- SFM medium, which is better for the growth of ameloblastoma cells than that of DMEM medium.

Key words: ameloblastoma; culture medium; cell culture

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):113- 116]

成釉细胞瘤 (ameloblastoma, AB) 是口腔颌面部常见的牙源性上皮性肿瘤, 虽为良性肿瘤, 但其具有局部侵袭性生长的特点, 临床治疗容易复发^[1-3]。因而, 采用体外培养的 AB 细胞来研究其侵袭的分子机制和生物学特性是一种重要的方法。由于 AB 细胞在常规培养基中生长缓慢^[4-6], 存活时间短, 因而不利于 AB 的生物学研究。为了探索能更适合 AB 细胞生长的培养基, 本研究拟在国内首次采用无血清培养基培养 AB 细胞, 研究 AB 细胞在无血清培养基

中的生长特性。

1 材料与方法

1.1 细胞培养用主要材料和培养方法

DMEM 培养液 (Gibco); 型胶原酶 (Gibco); 型胶原 (Gibco); 酶联免疫检测仪 (Dragon, MK3), 流式细胞仪 (BD 公

收稿日期: 2005-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471896); 广东省自然科学基金资助项目 (04300240)

作者简介: 曾东林 (1969-), 男, 湖南邵东人, 讲师, 博士生; 黄洪章, 教授, 课题负责人, 通讯作者。E-mail: huanghengzhang@Tom.com

司, USA), Defined Keratinocyte-SFM (DK-SFM) 培养液 (GIBCO, 10744 号); SP 免疫组化试剂盒、细胞角蛋白 14 (Cytokeratin14, CK14)(克隆号 LL002)、CK16 (克隆号 LL025)、CK18 (克隆号 DC10)、Vimentin (克隆号 V9)均购自 Maixin-Bio 公司。

新鲜 AB 组织标本 3 例, 经病理诊断为滤泡型 AB 2 例, 丛状型 AB 1 例。无菌条件下取 AB 组织, 以含 200 U/mL 青霉素、200 U/mL 链霉素的 PBS 液清洗 AB 组织 3 次, 每次 5 min, 将组织剪成 1~2 mm³ 大小的组织块, 放入含 1 mg/mL 胶原酶的 DMEM 培养液中, 37 ℃ 恒温水浴振荡器中消化过夜, 见组织块呈絮状时停止消化。取消化混合物, 1 000 r/min (LD₄₋₂ 型, r = 10 cm) 离心 5 min, 去上清液, 加入 PBS 清洗并重悬沉淀物 3 次, 离心去上清液, 加入 DMEM 培养液, 以吸管吹打使细胞分散, 台盼兰细胞染色计数, 使细胞密度为 1 × 10⁶/mL, 接种于 25 cm² 细胞培养瓶中, 置 37 ℃, 体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。细胞接种后静止培养 3 d 后, 更换培养液, 将细胞分为 DMEM 组和 DK-SFM 组, 分别加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 和 DK-SFM 培养液, 然后每 3~4 d 更换相应的培养液一次。所用的培养瓶及培养板预先以 I 型胶原包被。

1.2 细胞形态的观察

每日在倒置相差显微镜下观察细胞的形态, 并拍摄照片。

1.3 细胞生长曲线

取第 2 代的 DMEM 组和 DK-SFM 组的细胞, 分别以每孔 5 × 10³ 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔加入相应的培养液 200 μL。将培养板移入 CO₂ 培养箱中, 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度条件下, 静止培养 2 d 后, 每隔 2 d 按 MTT 法检测细胞的生长状况。每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μL, 继续培养 4 h, 终止培养, 吸除培养孔内的上清液, PBS 清洗培养孔 3 次, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。选择 492 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度, 记录结果。于每一时段分别取 DK-SFM 组和 DMEM 组的 12 个复孔的平均值, 以时间为横轴, 吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.4 流式细胞仪分析

取第二代培养的肿瘤细胞, 制备单细胞悬液, 细胞数不少于 6 × 10⁵, 常规碘化丙啶 (PI) 一步法染色, 进行流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 分析, 以人淋巴细胞作为内参标准, 变异系数 (CV) 小于 5%, 按通用的标准公式计算 DNA 指数 (DI)、S 期细胞比率 (SPF) 和增殖指数 (PI)^[6-7]。

1.5 免疫组化染色

取第 2 代培养的细胞, 在 6 孔培养板内预置盖玻片, 加入细胞培养基, 预制细胞爬片。取待染的细胞爬片, PBS 清洗 3 次, 将盖玻片浸入含 4 g/mL 多聚甲醛溶液中固定 20 min, 用 PBS 清洗 15 min, 采用 SP 免疫组化试剂盒, 按试剂盒说明操作, 分别行 CK14, CK16, CK18 和 Vimentin 免疫组化染色, DAB 显色。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件包的独立样本 t 检验法分别检验 DK-SFM 组和 DMEM 组在不同时段的细胞吸光度的差异, 检测两组 SPF 值的差异及 PI 值的差异, 检验水准 = 0.05。

2 结果

2.1 细胞形态学和 HE 染色

2.1.1 原代细胞 培养第 4 d, 镜下可见在培养瓶底有小的细胞集落形成, 集落呈散在分布。培养第 8 天, DK-SFM 组的上皮细胞集落明显扩大, 细胞呈铺路石样排列, 细胞呈多边形, 集落中央未见细胞堆积的现象, 集落中未见成纤维细胞, 集落之间未见成纤维细胞; DMEM 组的上皮细胞集落略有扩大, 细胞形态各异, 呈梭形、椭圆形、多边形, 细胞轮廓不清晰, 显微镜下见集落中央的颜色较周边的明显深, 细胞似呈复层排列, 集落之间有较多的成纤维细胞, 成纤维细胞增殖快, 在低倍镜下呈现为围绕上皮细胞集落呈漩涡状排列。培养 2 周后, 细胞汇合达 60%~70%, DK-SFM 组细胞呈铺路石样排列, 基本未见成纤维细胞, 而 DMEM 组的上皮细胞集落较小, 集落之间有多量的成纤维细胞, 虽经多次酶消化和反复贴壁法只能清除部分成纤维细胞 (图 1)。



图 1 原代成釉细胞瘤细胞相差显微镜观察

Fig.1 The image of the primary passage Ameloblastoma cells viewed with contrast phase microscope.

A. Cultured in DK-SFM; B. Cultured in DMEM (100 ×)

2.1.2 传代细胞 当原代细胞汇合达 60%~70%, 按 1:2 传代。第一次传代后, DK-SFM 组的细胞增殖明显加快, 大部分细胞仍然呈多边形, 亦可见圆形的细胞; DMEM 组的上皮细胞增殖慢, 细胞形态各异, 梭形细胞增多, 成纤维细胞增殖快。至培养 55~61 d, DK-SFM 组细胞传代了 4 次, 细胞形态无大的变化, 培养细胞中见单个散在的成纤维细胞; 而 DMEM 组只传代了 3 次, 且上皮细胞重叠排列, 细胞形态不一致, 细胞界限不清晰, 集落之间有较多的成纤维细胞。培养 85~97 d, DK-SFM 组第 6 次传代, 细胞增殖速度下降, 细胞内出现空泡及黑色颗粒, 最后从培养瓶底脱落; DMEM 组的上皮细胞于第 3 代时从培养瓶底脱落死亡, 为成纤维细胞所代替。传代细胞的 HE 染色, 细胞呈多边形, 细胞浆红色, 细胞核蓝色, 有 1~2 个核仁。DK-SFM 组的细胞境界清晰, DMEM 组细胞形态不一致, 细胞境界

不清。

2.2 细胞生长曲线

DK-SFM 组的细胞接种后增殖较快, 到第 8 d 时细胞已经铺满了培养孔底, 10 d 时, MTT 法检测细胞的吸光度继续增加, 细胞仍在增殖; DMEM 组的细胞增殖较慢。在接种培养后的 4 d、6 d、8 d、10 d, DK-SFM 组细胞的吸光度均大于 DMEM 组。经 t 检验, $t_{4d}=4.71, P_{4d}=0; t_{6d}=5.05, P_{6d}=0; t_{8d}=4.33, P_{8d}=0.001; t_{10d}=11.98, P_{10d}< 0.001$ 。不同时间的 P 值均小于 0.05, 具有统计学意义(图 2)。

2.3 流式细胞仪分析

AB 细胞 DI 值 0.95- 1.01, 在正常二倍体细胞范围, DMEM 组细胞的 SPF 值、PI 值分别为 7.9% ~9.2%和 8.3% ~9.6%; DK-SFM 组的 SPF 值、PI 值分别为 12.3% ~14.5%和 11.6% ~15.3%。经 t 检验, $t_{spf}=6.66, P_{spf}=0.005, t_{pi}=4.14, P_{pi}=0.038$, P 值均小于 0.05, DMEM 组和 DK-SFM 组细胞的 SPF 值、PI 值有显著性差异。

2.4 免疫组化染色结果

DMEM 组和 DK-SFM 组的细胞 CK14, CK16 染色阳

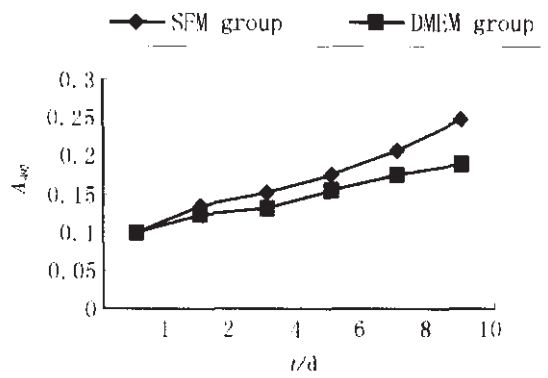


图 2 DK-SFM 组和 DMEM 组的 AB 细胞生长曲线
Fig.2 Growth curve of ameloblastoma cells of DK-SFM group and DMEM group

性, 胞浆呈棕红色, 高倍镜下呈丝网状, 苏木素复染后, 细胞核呈蓝色; CK18 染色阴性, Vimentin 染色阴性 (图 3)。

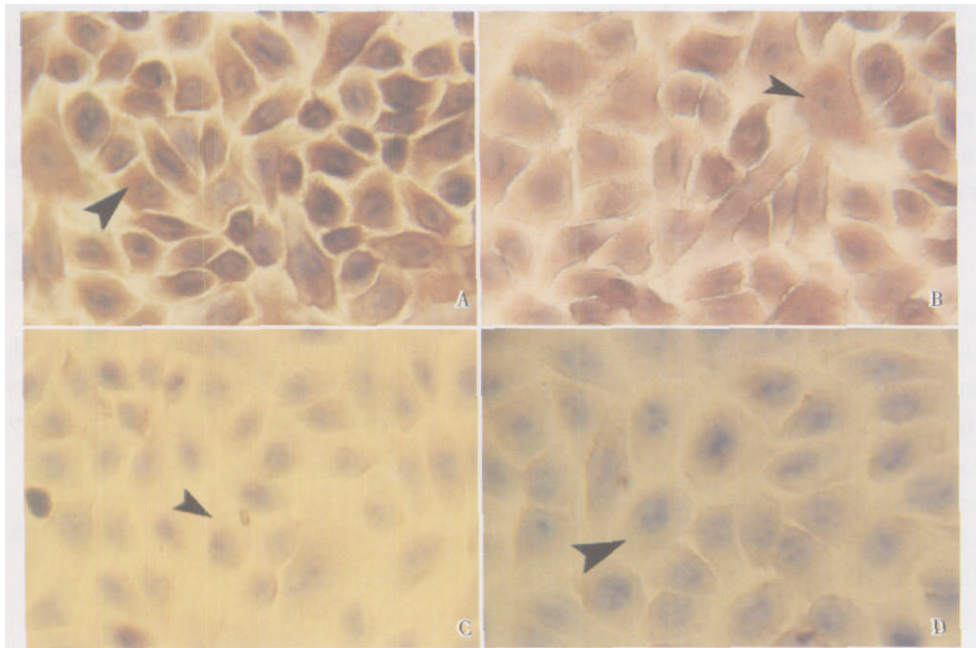


图 3 AB 的免疫组化染色

Fig.3 Ameloblastoma cells stained by immunohistochemistry

The cytoplasm was showed by arrow. A: Cytokeratin 14 positive expression; B: Cytokeratin 16 positive expression; C: Cytokeratin 18 negative expression; D: Vemintin negative expression. (×400)

3 讨论

不同的细胞在体外培养时需要的培养基不同。由于 AB 在普通的培养基中生长缓慢, 传代次数少, 存活时间短, 因此, 探索能更好适宜于 AB 细胞体外增殖生长所需的特定培养基具有重要意义。通常用于培养 AB 细胞的培养基是血清浓度为 10% ~20% 的 DMEM^[4,5]。在这种培养基中, 除了

上皮细胞生长, 还出现了多量的成纤维细胞, 需要通过多次应用反复贴壁法和酶消化才能清除大部分成纤维细胞, 而且, 上皮细胞生长缓慢。在本研究中, 用 DMEM 培养时观察到了相似的结果, 培养瓶底出现了较多的成纤维细胞。DK-SFM 原本用于培养角化细胞, 该培养基不支持成纤维细胞的生长, 在该培养基中, 角化细胞不分化^[6]。本研究将其应用于 AB 细胞的培养, 发现在该培养基中, 原代培养的细胞中没有观察到成纤维细胞, 只是在传代的细胞中见单

个散在的成纤维细胞,因而提高了上皮细胞的纯度。

有研究者用 DMEM 培养 AB 细胞^[6,9],细胞在培养液中存活的时间只有 50-60 d,传代 3-4 代。本研究发现,在 DK-SFM 培养基中,AB 细胞平均存活了 92 d,传代 6 代,这同其他研究者应用 MCDB153 培养基培养 AB 细胞的结果相似^[9]。DK-SFM 组的 SPF 值和 PI 值明显高于 DMEM 组,说明细胞在 DK-SFM 培养基中的增殖速度比 DMEM 组的快。因而,DK-SFM 比 DMEM 更适合于 AB 细胞的生长。

CK 是上皮细胞的一种特征性标志,不同的上皮细胞表达不同类型的 CK。CK14 常用于标记单层鳞状上皮,CK16 常用于标记增生的鳞状上皮,CK18 常见于复层上皮包括腺上皮。有研究显示,AB 上皮细胞的 CK14、CK16、CK18 阳性表达,并且认为 CK16 可能是 AB 快速生长的一个指标^[10-12]。在本研究中,培养的上皮细胞 CK14、CK16 免疫组化染色阳性,CK18、Vimentin 免疫组化染色阴性,证明培养的细胞是单层鳞状上皮来源,而非间叶组织来源,并且具有较快的增殖潜能;而且,在该种培养基中,细胞没有分化为复层鳞状上皮细胞。

总之在 DK-SFM 培养基中,细胞生长快,细胞形态更清晰,上皮细胞纯度高,DK-SFM 比 DMEM 更适合 AB 细胞的生长,适合较长期培养 AB 细胞并进行生物学研究。

(衷心感谢中山大学光华口腔医院廖贵清教授、广东省口腔医院曾曙光主治医师对本研究给予的帮助)

参考文献:

- [1] VERED M, SHOHAT I, BUCHNER A. Epidermal growth factor receptor expression in ameloblastoma [J]. *Oral Oncol*, 2003, 39(2): 138-143.
- [2] PINHEIRO J J, FREITAS V M, MORETTI A I, et al. Local invasiveness of ameloblastoma- Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity [J]. *Histopathology*, 2004, 45(1): 65-72.
- [3] NAGATSUKA H, HAN P P, TSUJIGIWA H, et al.

Heparanase gene and protein expression in ameloblastoma: possible role in local invasion of tumor cells[J]. *Oral Oncol*, 2005, 41(5):542-548.

- [4] 赵宁侠,于世凤,王卫化,等.成釉细胞瘤和角化囊肿细胞生长特点的研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 1999, 34(1):31-33.
- [5] HARADA H, MITSUYASU T, NAKAMURA N, et al. Establishment of ameloblastoma cell line, AM-1 [J]. *J Oral Pathol Med*, 1998, 27(5): 207-212.
- [6] 陶谦,黄洪章,魏菁.成釉细胞瘤体外培养和增殖动力学研究[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2001, 11(4): 306-368.
- [7] 朱美玲,陈汝光,刘华,等.人中期胚胎、新生儿脐血及成人骨髓间质干细胞基本生物学特性的比较[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(6): 504-507.
- [8] PIRISI L, YASUMOTO S, FELLER M, et al. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA [J]. *J Virol*, 1987, 61(4):1061-1066.
- [9] 孙燕,汪说之,陈新明.人成釉细胞瘤细胞的体外培养研究[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2001, 11(4):303-305.
- [10] ONGUTI M N, HOWELLS G L, WILLIAMS D M. An immunohistochemical study of keratin expression in ameloblastoma from a Kenyan population[J]. *Oral Dis*, 1999, 5(2): 111-116.
- [11] Crivelini M M, de Araujo V C, de SOUSA S O, et al. Cytokeratins in epithelia of odontogenic neoplasms [J]. *Oral Dis*, 2003, 9(1): 1-6.
- [12] TATEYAMA H, TADA T, OKABE M, et al. Different keratin profiles in craniopharyngioma subtypes and ameloblastoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2001, 197(11): 735-742.

(编辑 刘清海)