

·技术研究·

应用 Percoll 非连续密度梯度离心法富集人前列腺上皮细胞

温星桥¹, 李小娟², 张 勇³, 周祥福¹, 蔡育彬¹, 高 新¹

(中山大学附属第三医院 1. 泌尿外科, 2. 保健科, 3. 核医学科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨应用 Percoll 非连续密度梯度离心法从人前列腺增生组织中纯化上皮细胞的可行性。【方法】无菌条件下用胶原酶消化前列腺增生组织碎块, 获得细胞悬液经两种不同质量密度溶液 ($\rho_A = 1.070 \text{ g/mL}$ Percoll 和 $\rho_B = 1.035 \text{ g/mL}$ Percoll) 的梯度柱离心后, 以注射器于两种 Percoll 溶液界面之间抽出前列腺上皮细胞, 以 HBSS 液洗涤细胞后置于 37°C 、体积分数 $5\% \text{ CO}_2$ 孵箱中连续培养。观察细胞形态及生长, 台盼蓝染色计算活细胞率, 细胞角质蛋白免疫组织化学染色鉴定上皮细胞。【结果】经 Percoll 非连续比重梯度离心法, 能将上皮细胞与成纤维细胞和其他基质细胞分离, 纯度达 95% 以上。台盼蓝染色计算活细胞率达 95% 。纯化得到的细胞呈上皮细胞特有的铺路石样外观, 可连续传 3-5 代。细胞角质蛋白 CK7/8 染色阳性证实细胞为上皮源性。【结论】Percoll 非连续密度梯度离心法简便可行, 能获得纯度较高、活力良好的前列腺上皮细胞。

关键词: 细胞培养; 上皮细胞; 良性前列腺增生症

中图分类号: R697.31

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)02-0228-04

Enrichment of Epithelial Cells from Human Benign Prostatic Hyperplasia by Discontinuous Percoll Gradient Centrifugation

WEN Xing-qiao¹, LI Xiao-juan², ZHANG Yong³, ZHOU Xiang-fu¹, CAI Yu-bin¹, GAO Xin¹

(1. Department of Urology; 2. Department of Health Care; 3. Department of Nuclear Medicine, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】To evaluate the feasibility of culturing epithelial cells from human benign prostatic hyperplasia (BPH) tissue by discontinuous Percoll gradient centrifugation. 【Methods】Prostate tissues from BPH men were cut into small pieces and digested as single cell suspension by collagenase in sterile conditions. The cell suspension was added into discontinuous Percoll gradient (mass density, $\rho_A = 1.035 \text{ g/mL}$ and $\rho_B = 1.070 \text{ g/mL}$) and centrifuged. The cells were sucked out between the interface of the two Percoll solutions by a syringe, washed by HBSS solution and cultured in 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ condition. Trypan blue staining was used to calculate the cell viability. The cell-morphology was observed by light microscope and the cell characteristics were identified by immunohistochemistry staining of cytokeratin. 【Results】The epithelial cells were isolated from fibroblasts and other stroma cells, the purity could be achieved as 95% . Trypan blue staining result showed 95% of the cells were viable. The cultured epithelial cells had typical cobblestone shape and could be maintained up to 3-5 passages. The cells were stained positively by cytokeratin 7/8 antibody. 【Conclusions】The method of discontinuous Percoll gradient centrifugation is a convenient and feasible method to enrich pure and viable prostatic epithelial cells.

Key words: cell culture; epithelial cell; benign prostatic hyperplasia

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006(2):228-231]

良性前列腺增生症 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 是影响老年男性健康的常见病, 常导

致排尿困难、泌尿系感染、肾功能损害等^[1,2]。前列腺由腺上皮 (epithelium) 和围绕腺上皮四周的基质

收稿日期 2005-11-16

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (05001762); 默沙东科研经费资助项目 (2005)

作者简介: 温星桥 (1975-) 男, 广东清远人, 博士, 主治医师, 高新教授, 博士生导师, E-mail: xingqiaowen@yahoo.com

(stroma)组成,收集纯度高且活力好的上皮细胞是开展 BPH 研究的前提^[3]。既往采用反复贴壁法来去除基质细胞来提高上皮细胞的纯度,操作复杂、耗时长,得到的细胞纯度较低。Percoll 是一种表面被聚乙酰吡咯烷酮包被的硅胶颗粒,最近被用于分离多种细胞并取得良好效果^[4-6],我们尝试 Percoll 非连续密度梯度离心法富集前列腺上皮细胞获得成功,报道如下。

1 材料和方法

1.1 前列腺组织收集和细胞的分离

人良性前列腺增生组织来自耻骨上经膀胱摘除的前列腺标本。无菌条件下,取增生结节处组织,剪切成 1 mm³ 大小,置培养皿中(其中留取部分组织作 HE 染色以证实病理类型)。用冷磷酸盐缓冲液(PBS)清洗两遍,除去血细胞,置 RPMI-1640(美国 Gibco 公司,无酚红,含 100 μg/mL 庆大霉素),加入胶原酶(collagenase, Sigma),置于 37 °C 水浴中振荡(130 min⁻¹)过夜消化 16~18 h,用 200 μm 不锈钢网过滤收集上清,以反复重力沉淀法去除较轻的基质成分,离心收集上皮成分,加培养基 RPMI-1640,参照文献^[6]方法,加入胰岛素 1 μg/mL,可的松 10 ng/mL、微量元素合剂(trace element solution, Fisher Scientific)1 μL/mL、表皮生长因子 5 ng/mL、磷酸乙醇胺 50 ng/mL、叶酸盐 1 μg/mL、维生素 C 5 μg/mL、转铁蛋白 5 μg/mL、庆大霉素 4 万 U/L 等混合而成。

1.2 应用 Percoll 纯化前列腺上皮细胞

先各准备 10 mL 两种等渗 Percoll(美国 Amersham Biosciences 公司)溶液:(A)_A=1.070 g/mL,由 Percoll 5 mL、1.5 mol/L NaCl 0.9 mL 和 H₂O 4.1 mL 配成;(B)_B=1.035 g/mL,由 Percoll 2.3 mL、1.5 mol/L NaCl 0.9 mL 和 H₂O 6.8 mL 配成。准备一个 15 mL 无菌 conical 管,先往管内注入 5 mL 较低质量密度的(B)溶液,然后从管底部小心缓慢注入 5 mL 较高质量密度的(A)溶液,往管中加入 1 mL 悬于 HBSS 液的细胞,整支管以 500 × g 离心 20 min。离心后前列腺上皮细胞聚集于两种不同的 Percoll 界面之间,基质细胞聚集于管的最顶层。以 18 g 注射器针头于两种 Percoll 溶液界面之间抽出前列腺上皮细胞,以 HBSS 液稀释洗涤,稍离心沉淀得到细胞,置于 37 °C、体积分数

5%CO₂ 孵箱中培养。20 h 后吸去未贴壁细胞及培养液,更换新鲜培养液。细胞贴壁后每日观察上皮细胞在体外培养期间的形态、贴壁情况,每 3~5 d 更换培养液 1 次。

1.3 前列腺上皮细胞的鉴定

1.3.1 形态学观察 细胞贴壁后,每天以倒置显微镜观察细胞外观、生长及贴壁情况。

1.3.2 细胞接种 细胞接种在预铺胶原的玻璃盖片,长满后取出,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,体积分数 95%乙醇固定 15 min,苏木素-伊红(HE)染色、封片,显微镜观察细胞形态。

1.3.3 免疫组织化学染色 为证实细胞为上皮源性,采用细胞角质蛋白 7/8 免疫组织化学染色。在培养的第 3~5 天取出盖玻片,PBS 清洗 2 次,丙酮/甲醇(1:1)-20 °C 固定 30 min;风干,用抗细胞角质蛋白 7/8 抗体作免疫组织化学鉴定。用体积分数 10%小牛血清封闭 20 min,弃血清,加藻红蛋白(phycoerythrin, PE)偶联的抗细胞角质蛋白 7/8 抗体(1:100,anti-cytokeratin, clone CAM 5.2, BD Biosciences,可识别相对分子质量 M_{r,7}=48 × 10³ 和 M_{r,8}=52 × 10³ 的细胞角质蛋白 7 和 8),于 37 °C 孵育 60 min;PBS 漂洗 5 min,3 次,细胞核 DAPI 衬染,封片,计算阳性细胞占总的细胞数的百分比。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。为确认细胞为前列腺来源,用类似文献^[6]行前列腺特异性抗原(PSA)染色,PSA 一抗及二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.4 前列腺细胞活力测定

取 Percoll 分离后富集的单个前列腺上皮细胞悬液,稀释到 1 × 10⁶ 个/mL,取 9 滴细胞悬液移入小试管中,加 1 滴 4 g/L 台盼蓝溶液,混匀,在 3 min 内用血球计数板分别计数活细胞和死细胞,算出活细胞率(%),计算公式为:

$$\text{活细胞率} = \frac{\text{活细胞总数}}{\text{活细胞总数} + \text{死细胞总数}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 HE 染色证实取材为良性前列腺增生组织

于取材部位留取部分前列腺组织,作常规切片、HE 染色,证实病理类型为良性前列腺增生(图 1)。

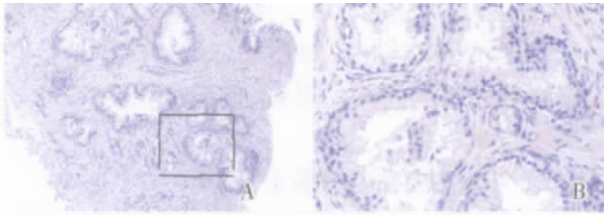


图 1 HE 染色证实培养取材部位为良性前列腺增生
Fig.1 The cultured tissue was proved to be benign prostatic hyperplasia by HE staining

A: prostatic hyperplasia ($\times 100$); B: the magnification from the framed area in A ($\times 400$)

2.2 Percoll 分离后细胞层的观察

大体观察：源于人良性前列腺增生组织的细胞经 Percoll 分离后，可观察到上皮细胞在离心管中位于两种不同质量密度 Percoll 之间，界面清晰。小心地于两种 Percoll 溶液界面之间抽吸出细胞，经 PBS 漂洗后，离心弃上清，留取细胞沉淀进行培养，台酚蓝染色活细胞率达 95%。

2.3 前列腺上皮细胞的培养和形态观察

接种时原代细胞为体积较小的圆形，轮廓清晰光滑，胞浆透亮，倒置显微镜下有立体感。接种 8 h 后悬浮细胞沉降于皿底，24 h 后大部分细胞贴壁，胞质逐渐展开，细胞扁平、变大，折光性减弱，胞核清晰可见，完全铺展后细胞大小为贴壁前的 2~3 倍。贴壁的细胞逐渐形成细胞单层。第 5~6 天时细胞相互接触，成上皮细胞特有的铺路石 (cobblestone) 外观 (图 2)。第 23~28 天时，大部分细胞形态开始发生改变，部分细胞脱落，由椭圆形成梭形，胞浆出现空泡和粗大颗粒状物质，细胞皱缩、老化、脱落。

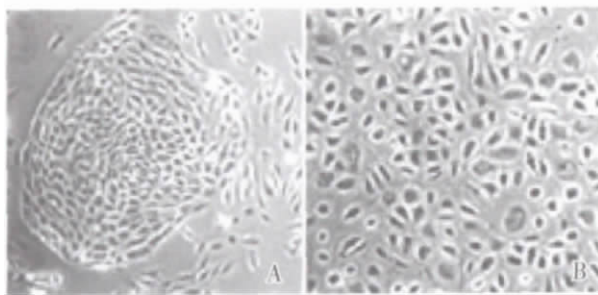


图 2 Percoll 非连续密度梯度离心法纯化所得上皮细胞外观

Fig.2 The cobblestone appearances of the cells purified by discontinuous Percoll gradient centrifugation

A: primary cultured cells without passaged ($\times 100$); B: primary cultured cells after passaged ($\times 200$)

2.4 前列腺上皮细胞的鉴定

镜下外观：显微镜下观察培养细胞长满后呈上皮细胞特有的铺路石样外观，多角形，核大，符合上皮细胞特征，HE 染色后，细胞呈类圆形，胞核蓝染，胞浆淡红，可见中期核分裂相。免疫组化观察：细胞贴壁培养 7 d 后行用抗细胞角质蛋白 7/8 抗体作免疫组织化学染色，阳性细胞占 95% 以上 (图 3) 提示细胞为上皮源性。前列腺特异性抗原 (PSA) 染色 90% 以上的细胞为阳性，证实细胞为前列腺来源。

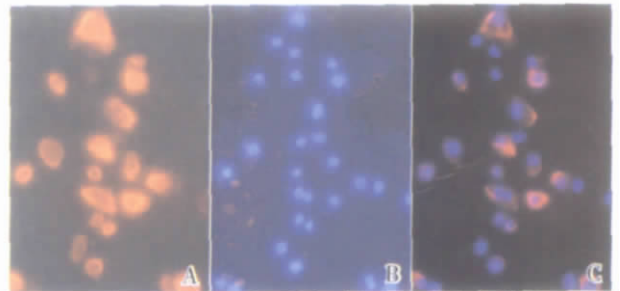


图 3 前列腺上皮细胞免疫组织化学染色鉴定

Fig. 3 Immunohistochemical staining for the purified epithelial cells ($\times 400$)

A: cytoplasm stained red by cytokeratin 7/8 antibody; B: the nuclear stained blue by DAPI; C: the merged picture of A and B

3 讨论

前列腺组织中除上皮细胞外，还有成纤维细胞、成肌纤维细胞、平滑肌细胞等多种成份。分离前列腺细胞的方法有多种，传统的反复贴壁法、重力沉淀法等耗时长、操作复杂，得到的上皮细胞容易混杂基质细胞，纯度较低。由于大多数非上皮细胞生长增殖速度快，在培养中即使存在少量也会很快超过上皮细胞的数量，耗去大量的营养，影响上皮细胞的生长和研究。Percoll 是一种表面包被聚乙酰吡咯烷酮的硅胶颗粒，由于 Percoll 扩散常数低，所形成的梯度十分稳定，可根据各种细胞的特点以非连续密度 Percoll 梯度离心法来分层纯化细胞。此外，Percoll 不穿透生物膜，对细胞无毒害，因此广泛用于分离多种细胞、亚细胞成分^[4-6]。

我们经多次实验反复尝试比较，发现用 1.070 g/mL 和 1.035 g/mL 两种不同质量密度的 Percoll 梯度柱离心后，前列腺上皮细胞可富集于两种 Percoll 溶液界面之间，层次清晰、易于抽吸。经培养得到的上皮细胞纯度达 95% 以上，呈上皮细胞

特有的铺路石样外观；细胞角质蛋白 CK7/8 免疫组织化学染色阳性，进一步证实了细胞为上皮源性。以上结果表明应用不同质量密度 Percoll 梯度分离可获得纯度较高的前列腺上皮细胞。此法操作相对简单，不需特殊设备或大量昂贵的单克隆抗体。应用此法时注意：严格无菌操作；配制 Percoll 溶液时要准确，细胞悬液注入 Conical 管时操作小心，离心机加速、降速时要慢、要平稳，离心后抽吸细胞时勿破坏溶液界面。

目前用于研究良性前列腺增生症的永生性 (immortalized) 的、非恶性转化的细胞模型很少，对应用 Percoll 纯化得到的原代前列腺上皮细胞采用新方法^[7,8]进行永生性，筛选出有代表意义的细胞株，将有助于进一步研究 BPH 上皮细胞的功能。

参考文献：

- [1] FONG Y K, MILANI S, DJAVAN B. Natural history and clinical predictors of clinical progression in benign prostatic hyperplasia[J]. *Curr Opin Urol*, 2005, 15(1): 35- 41.
 - [2] 温星桥,高 新.经尿道前列腺汽化切除术对心肌酶及血压心率的影响[J].*中山医科大学学报*, 2000, 21(6): 454- 457.
 - [3] BYRNE R L, LEUNG H , NEAL D E. Peptide growth factors in the prostate as mediators of stromal epithelial interaction[J]. *Br J Urol* , 1996, 77(6):627- 632.
 - [4] SEKINE H, WATANABE H,GILKESON G S. Enrichment of anti -glomerular antigen antibody - producing cells in the kidneys of MRL/MpJ- Fas^{pr} mice [J]. *J Immun*, 2004, 172(3):3913- 3918.
 - [5] JINGA V, GAFENCU A, ANTOHE F. Establishment of a pure vascular endothelial cell line from human placenta[J]. *Placenta*, 2000, 21(4):325- 328.
 - [6] WILSON M J, SELLERS R G,WIEHR C, et al. Expression of matrix metalloproteinase- 2 and - 9 and their inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase- 1 and - 2, in primary cultures of human prostatic stromal and epithelial cells[J]. *J Cell Physiol*, 2002, 191(2): 208- 213.
 - [7] WATANABE N, ODAGIRI H, TOTSUKA E.A new method to immortalize primary cultured rat hepatocytes [J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(8):2457- 2462.
 - [8] GIL J , KERAI P, LLEONART M, et al. Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c- Myc[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6):2179- 2183.
- (编辑 张敏瑞)
-
- (上接第 224 页 from page 224)
- Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(22):5071- 5074.
- [2] 黄慧强,彭玉龙,林旭滨,等. CHOP 方案治疗 106 例外周 T 细胞淋巴瘤临床长期随访结果分析[J].*癌症*, 2004,23(11s): 1443- 1447.
 - [3] ADIDA C, HAIOUN C, GAULARD P, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B- cell lymphomas[J]. *Blood*, 2000, 96(5):1921- 1925.
 - [4] SCHLETTE E J, MEDEIROS L J, GOY A, et al. Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large- cell lymphoma[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(9):1682- 1688.
 - [5] SHIN S, SUNG B J, CHO Y S, et al. An anti- apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase3 and 7[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4):1117- 1123.
 - [6] SPAN P N, SWEEP F C, WIEGERINCK E T. et al. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients [J]. *Clin Chem*, 2004, 50(11):1986- 1993.
 - [7] SHINOHARA E T,GONZALEZ A, MASSION P P, et al. Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in patients with resected non small cell lung carcinoma[J]. *Cancer*, 2005, 103(8):1685- 1692.
 - [8] ITO R, ASAMI S, MOTOHASHI S, et al. Significance of survivin mRNA expression in prognosis of neuroblastoma[J]. *Bid pharm Bull*, 2005, 28(4):565- 568.
 - [9] 罗俊航,陈 炜,戴宇平,等.CD44v6 和 survivin 在膀胱移行细胞癌中的表达及其意义[J].*中山大学学报 : 医学科学版* ,2004, 25(3S):79- 80.
 - [10] 向晓娟,何友兼.弥漫大 B 细胞淋巴瘤 survivin 表达与预后关系探讨[J].*中国肿瘤临床* ,2004,31(9): 509- 512.
 - [11] MARTOMEZ A, BELLOSILLO B, BOSCH F, et al. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell Proliferation and survival[J]. *Am J Pathol*,2004,164(2): 501- 510.
 - [12] 顾 霞,林汉良.不同类型淋巴瘤 Survivin 的表达及其意义[J].*癌症*,2004,23(6):655- 661.
- (编辑 黄小延)