

人垂体腺瘤细胞原代培养的纯化及其激素的表达与分泌

徐伟光¹, 王海军¹, 黄锦桃², 刘爱军², 李海标², 朱永红²

(中山大学 1. 附属第一医院神经外科; 2 基础医学院组胚教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨原代培养垂体腺瘤的细胞纯化方法及其激素表达与分泌的特点。【方法】采用三种原代培养方法对垂体腺瘤细胞进行培养, 方法 为目前常用的垂体瘤细胞培养方法, 方法 结合使用右旋缬氨酸(D-valine DMEM D-valine)培养液, 方法 采用反复贴壁法结合 DMEM D-valine 培养液培养。观察其细胞形态变化和生长特征, 放射免疫法测定不同培养时间培养液中相应激素的水平。免疫组织化学染色法检测培养细胞生长激素(growth hormone, GH)、泌乳素(prolactin, PRL)的表达。【结果】3 种方法均能成功培养出垂体腺瘤细胞, 呈圆形或椭圆形, 其纯度随培养时间的延长逐渐下降, 培养第 20 天其平均纯度分别为 40%, 46%, 96%。方法 明显高于方法 和方法 , 差异具有显著性意义($P < 0.01$); 培养液中均含有相应激素, 且 3 种方法的激素分泌量没有统计学差异($P > 0.05$); 腺瘤细胞分别呈 GH, PRL 阳性表达, 成纤维细胞表达 I 型胶原。【结论】方法 可得到纯度达 95%以上的人垂体腺瘤细胞, 纯化后的细胞可分别呈 GH 和 PRL 阳性表达并具有良好的激素分泌功能, 为进一步研究人垂体腺瘤的发病机理、药物治疗和颅外移植等方面奠定了实验基础。

关键词: 垂体腺瘤; 细胞培养; 生长激素; 泌乳素

中图分类号: R736; R32

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0007-04

Primary Culture and Purification of Pituitary Adenoma Cells and Characteristics of Hormone Expression and Secretion

XU Wei-guang¹, WANG Hai-jun¹, HUANG Jin-tao², LIU Ai-jun², LI Hai-biao², ZHU Yong-hong²
(1.Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital; 2.Department of Histology and Embryology, Basic Medical College; SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To explore the purification method and the characteristics of hormone expression and secretion of the primary culture of the pituitary adenoma cells.【Methods】Three different methods, the usual means, : the usual means with DMEM D-valine, : double adherence before DMEM D-valine, were used to culture the pituitary adenoma cells. To observe the changes in cell morphology and cell growth, and to detect the alteration of basic hormone secretion along the days of culture with radio-immunity method. Immunohistochemical technique was used to detect the expression of GH and PRL of the cultured cells.【Results】All the pituitary adenoma were successfully cultivated. The morphology of the pituitary adenoma cells was round or elliptic. The purity of the adenoma cells gradually declined along the days of culture. The percentage of the adenoma cells of the three methods were 40%, 46%, and 96%, respectively, 20 d after culture. The purity of was significantly highest among the three methods ($P < 0.01$). The GH and PRL secretion in the media have no significant difference among the three methods ($P > 0.05$). The positive expression of GH or PRL in the pituitary adenoma cells was in accordance with the clinical classification of the pituitary adenoma. The expression of collagen was positive in the fibroblast.【Conclusions】The purity of pituitary adenoma cell was over 95% by method . The expression of GH or PRL was positive in the purified pituitary adenoma cells and these cells have satisfactory hormone secretion function, which provide experiment foundation for studying the pathogenesis, chemical therapy, and extracranial cell transplantation, and so on.

Key words: pituitary adenoma; cell culture; GH; PRL

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(1):7-10, 37]

收稿日期: 2005-06-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470597); 广东省自然科学基金资助项目(4009358)

作者简介: 徐伟光(1980-), 男, 河南洛阳人, 硕士生; 朱永红, 副教授, 导师, 通讯作者. E-mail: wzyh@gzsums.edu.cn

垂体腺瘤是颅内常见肿瘤之一, 约占颅内肿瘤的 10%~15%, 组织学上属于良性, 但部分肿瘤因侵犯周围结构, 临床上难以完全切除, 而且容易复发, 严重威胁着人类身体健康^[1]。因此, 发病机制和生物学特征的研究对垂体腺瘤的诊断和治疗至关重要。由于目前还没有较纯的人垂体腺瘤细胞, 妨碍了对该瘤生物学特性、肿瘤的病因、发病机制、药物的筛选和诊疗措施等方面的深入研究, 为此, 本研究采用不同的 3 种培养方法对 14 例人垂体腺瘤细胞进行培养, 以探索垂体腺瘤细胞原代培养的纯化方法并研究其激素的表达与分泌, 为对该瘤的深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源

14 例标本取自我院神经外科 2004 年 12 月至 2005 年 3 月 14 例垂体腺瘤患者手术切除的肿瘤组织。患者男 7 例, 女 7 例, 年龄 23~68 岁。术前根据临床表现, 血清激素水平和影像学检查作出初步诊断, 再根据术中所见及术后病理学和免疫组织化学染色确诊, 其中垂体生长激素(GH)腺瘤 4 例, 泌乳素(PRL)腺瘤 6 例, 无功能腺瘤 4 例。

1.2 主要试剂

L-DMEM(Gibco), DMEM D-valine(Gibco) 胎牛血清(Hyclon), 胰蛋白酶(Gibco)、HEPES(Gibco), 台盼蓝(Sigma), 多聚赖氨酸(Sigma), GH、PRL 放免试剂盒(北京中山生物技术有限公司), GH、PRL、I 型胶原兔抗人多克隆抗体(福州迈新生物技术开发公司)。

1.3 细胞培养

手术切除的垂体腺瘤组织在无菌操作下放入无血清 DMEM 培养液中, 立即送往实验室, 超净台内无菌 PBS 冲洗 2~3 次, 去除结缔组织, 坏死组织及血块, 将标本用眼科剪剪碎成 1 mm³ 大小组织块, 加 5~6 倍量的 2.5 g/L 的胰蛋白酶(预热至 37℃), 在 37℃ 条件下消化 30~50 min, 每隔 5 min 用吸管吹打分散 1 次, 待细胞分散良好以后, 加入 5 倍量的 DMEM 培养液(内含 10⁵ U/L 青霉素, 0.1 g/L 链霉素, 2.2 g/L 的 NaHCO₃, 2.0 g/L 的 HEPES, 体积分数 15% 胎牛血清, 以下同)终止消化 5 min, 经 100 目细胞滤器过滤后, 1 000 r/min (r=15 cm) 离心 10 min, 弃上清液, 加入 DMEM 培

养液使细胞重悬并分散, 镜检计数, 调整细胞浓度为 1.0×10⁶/mL。用台盼蓝染色计数细胞活性。细胞悬液分成 3 份按以下 3 种方法进行培养。

1.3.1 方法 接种于预先包被了多聚赖氨酸的 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 每两天更换培养液一次。

1.3.2 方法 按方法 接种培养 48 h 后培养液换为 DMEM D-valine (含体积分数 15% 胎牛血清, 10⁵ U/L 青霉素, 0.1 g/L 链霉素, 2.2 g/L 的 NaHCO₃, 2.0 g/L 的 HEPES, 以下同), 72 h 后换回原培养液继续培养, 以后每 2 d 更换培养液一次。

1.3.3 方法 接种于没有包被多聚赖氨酸的 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 24 h 后用吸管连续吹打数次后吸出接种至另一 24 孔培养板中, 24 h 后重复吹打一次, 并吸出接种至包被有多聚赖氨酸的 24 孔培养板中, 培养 24 h 后培养液换为 DMEM D-valine, 再培养 72 h 后换为原培养液继续培养, 以后每 2 d 更换一次培养液。

细胞培养在 37℃、体积分数 5% CO₂、体积分数 95% O₂ 恒温培养箱中, 每 2 d 从孔中取少量培养液置 -20℃ 冰箱中保存, 待放射免疫法测定激素水平。

1.4 激素测定

采用放射免疫法测定培养液中激素类型与水平, 操作按试剂盒要求进行, 以方法 第 2 天的激素值为 100%, 将分泌量转化为相对值表示^[2,3]。

1.5 免疫组织化学和细胞计数

采用免疫组织化学染色法(S-P 法)来检测培养细胞的类型。分别在培养的第 5、10、15、20、25 天于 200 倍镜下随机取 10 个视野下计数圆形椭圆形腺细胞数与细胞总数, 计算百分比, 即腺瘤细胞的纯度。

2 结 果

2.1 形态学观察

倒置相差显微镜下观察, 用酶消化后的瘤细胞成圆形, 活细胞占 95% 以上。方法 : 在培养的最初 48 h, 多数细胞呈圆形或椭圆形, 部分细胞梭形或多边形, 还有少量悬浮的红细胞(换液后可除去)。随着培养时间的延长, 圆形或椭圆形细胞的腺瘤细胞聚集成团状或片状生长, 其周围可见成纤维细胞, 2~3 周后成纤维细胞后铺满单层(图

1A)。方法：换培养液后成纤维细胞受到抑制，生长较慢(图 1B)，但随着时间的延长，成纤维细胞又开始迅速分裂生长，3~4 周长满单层。腺瘤细胞聚集成团状或片状生长。方法：经过反复贴壁和 DMEM D- valine 处理后，成纤维细胞极少见，而呈团状或片状生长的圆形的腺瘤细胞满布于整个视野(图 1C)。

2.2 激素测定

4 例 GH 腺瘤术前血清 GH 值均 >50 $\mu\text{g/L}$ ，培养细胞 GH 分泌量 3 种培养方法没有统计学差异

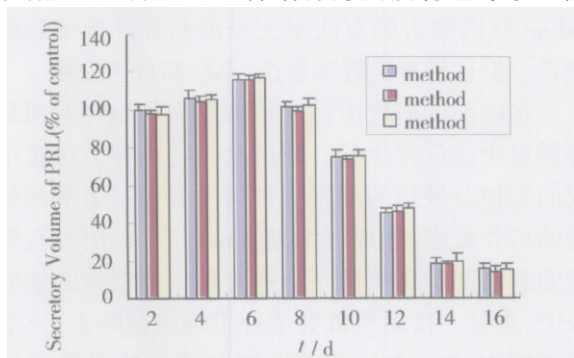


图 2 4 例垂体 GH 腺瘤细胞平均 GH 分泌量随培养时间的变化

Fig.2 The alteration of average basic GH secretion along with the days of culture in 4 cases of GH- secreting pituitary adenomas

($P > 0.05$)。第 6 天分泌量最高，以后逐渐下降，2 周后基本测不到(图 2)。6 例 PRL 腺瘤术前 PRL 值均大于 1 000 $\mu\text{g/L}$ ，3 种方法 PRL 分泌量同样没有统计学差异，第 4~8 天分泌量最高，以后逐渐下降，2 周后基本测不到(图 3)。无功能腺瘤仅测到微量激素分泌。

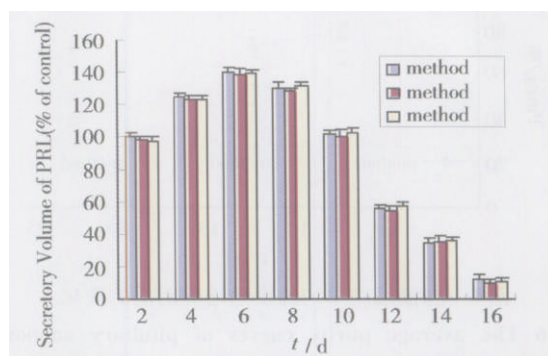


图 3 6 例垂体 PRL 腺瘤细胞平均 PRL 分泌量随培养时间的变化

Fig.3 The alteration of average basic PRL secretion along with the days of culture in 6 cases of PRL- secreting pituitary adenomas

2.3 免疫组织化学和细胞计数

培养 1 周后的细胞作免疫组织化学染色，圆形或椭圆形的腺瘤细胞 分别呈 GH， PRL 表达阳

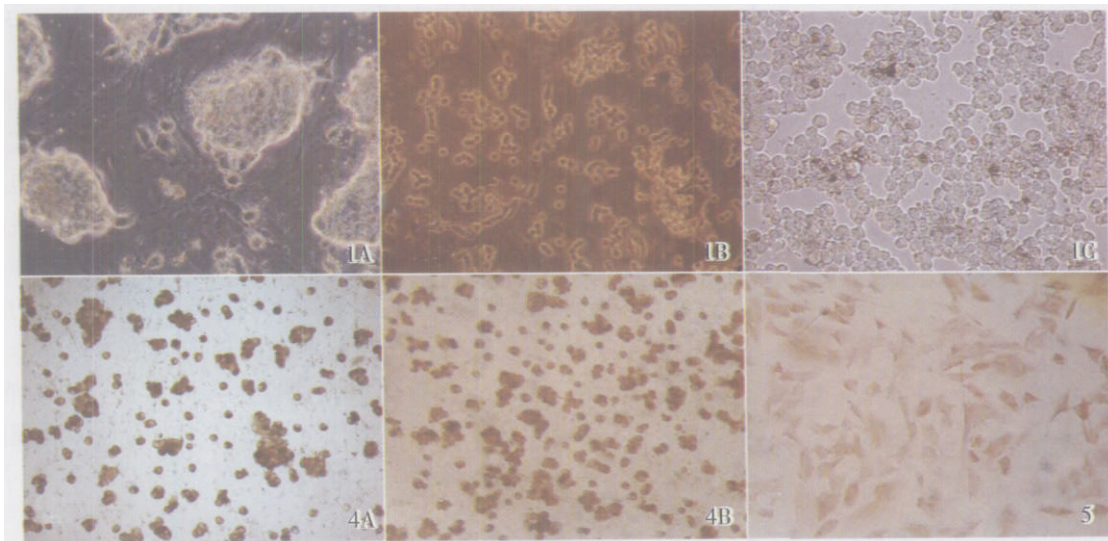


图 1 原代培养 2 周时的细胞形态

图 4 原代培养的垂体腺瘤细胞 GH, PRL 的阳性表达

图 5 成纤维细胞 I 型胶原的阳性表达

Fig.1 The morphology of the primary cultured cells of pituitary adenoma at 2 weeks ($\times 200$)

1A: methods ; 1B methods ; 1C methods

Fig.4 The positive expression of GH and PRL in the primary culture of the pituitary adenoma cells ($\times 100$)

4A: GH; 4B: PRL

Fig.5 The positive expression of collagen type I in fibroblast ($\times 200$)

性(图 4A,B),而成纤维细胞绝大多数呈 I 型胶原表达阳性(图 5)。3 种方法培养的腺瘤细胞的纯度变化如图 6 所示:方法 在培养第 20 天纯度仍可达 95%以上。

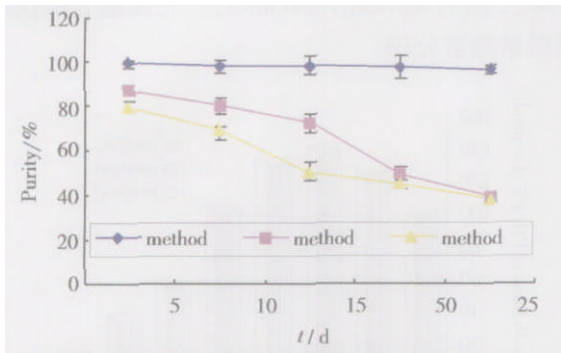


图 6 腺瘤细胞平均纯度随培养时间的变化

Fig.6 The average purity curves of pituitary adenoma cells along the days of culture

3 讨论

垂体腺瘤的体外培养已有 40 多年的历史,如何获得纯度较高的腺瘤细胞,至今仍是有待解决的难题。垂体瘤的良性特征,决定了其培养较为困难。垂体腺瘤细胞体外培养绝大多数是短期的^[4],近几十年仅有少数学者报道过垂体瘤的长期传代培养。由于大多数垂体腺瘤组织分散为散在细胞后不易在普通培养器皿上贴壁,因而成功的单层细胞培养需选用良好的细胞培养基质以促进细胞贴壁。目前常用的有胶原和多聚赖氨酸^[5]。本实验采用预先在培养板上覆盖多聚赖氨酸的方法促进细胞贴壁,结果表明多聚赖氨酸能使腺瘤细胞贴壁生长。

方法 为目前常用的培养方法^[2,3,6],我们发现培养的第 2~10 天即有成纤维细胞出现并迅速分裂增殖,早期出现的梭形或多边形细胞后来均被证实为成纤维细胞,腺瘤细胞形态保持圆形或椭圆形不变,这结果与 Ishiwata 等^[9]的研究结果一致。成纤维细胞的过度生长,在很大程度上影响实验的结果。一些学者采用含 D- valine 的培养液来抑制成纤维细胞的生长^[7,8],这种方法最先在人类和啮齿类动物上皮细胞中应用,随后也应用于其它细胞的培养^[9-11]。上皮细胞含右旋氨基酸氧化酶,成纤维细胞则不含,因而不能将 D- valine 转变为 L- valine,从而使成纤维细胞缺乏这种必需氨基

酸而受到抑制。Padmanabhan 等^[12]发现用含 D- valine 的培养液培养的牛垂体细胞可保持较长时间的分泌功能,这可能与 D- valine 选择性的抑制成纤维细胞生长有关。我们在方法 中应用 DMEM D- valine 培养液,抑制了成纤维细胞的生长,但不杀死成纤维细胞,换回原来的培养液后成纤维细胞又逐渐开始生长。在其他细胞的体外培养过程中也出现类似问题^[9],因为培养液所加的血清中含有少量的 L- valine,能被成纤维细胞利用,为了解决这一问题,Lazzaro 等^[13]通过把血清中 L- valine 分离除去的方法来完全抑制成纤维细胞的生长。但这种方法程序复杂,不能被普遍应用。

在以前的研究中发现垂体腺瘤细胞在普通培养器皿中成悬浮生长。根据这一特点在方法 中我们先把分散后的细胞接种到没有包被多聚赖氨酸的培养板中,让成纤维细胞贴壁后,吸出没有贴壁的腺瘤细胞再接种至包被有多聚赖氨酸的培养板中,重复一次后大部分成纤维细胞被除去,再加上 DMEM D- valine 培养液抑制残余的成纤维细胞,两种方法结合有效的去除和抑制了成纤维细胞的生长,提高了腺瘤细胞的纯度。此外我们的激素测定还表明腺瘤细胞的功能与活性和常用培养方法相似,因此方法 所得到的较高纯度的腺瘤细胞为垂体瘤发病机理、生物学行为、药物干预、颅外移植等研究提供了良好的细胞来源。

正常垂体激素的分泌是在下丘脑分泌的促释放和抑制激素共同调节控制下进行的。本实验测得垂体功能性腺瘤细胞在体外培养的前期也能分泌大量激素,说明功能性垂体腺瘤在体外脱离下丘脑调节因子的作用下,仍可分泌激素。但体外培养环境和体内有着巨大的差异,这种分泌功能随着培养时间的延长而减弱。如何使体外培养的功能性垂体腺瘤细胞保持永久的激素分泌功能,使瘤细胞能正常传代,以建立一个人垂体瘤细胞系是细胞培养亟待解决的难题,尚待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 王海军,陈明振,何东升,等.经蝶窦显微外科手术切除侵袭海绵窦的垂体腺瘤[J].中华显微外科志,2002,25(3):180-182.
- [2] 李杰,史继新,王汉东,等.功能性垂体腺瘤体外培养和激素分泌的特征研究[J].医学研究生学报,2002,15(4):306-308.

(下转第 37 页 to page 37)

用 15%高浓度胎牛血清培养。由于高浓度的血清中含有的细胞因子多,可以保持 MSCs 处于未分化状态。增殖旺盛的细胞不易自发分化,保持未分化状态的 MSCs 对诱导成心肌至关重要^[9]。

参考文献:

- [1] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*,1999, 284(5411):143- 147.
- [2] HANADA K, DENNIS J E, CAPLAN A I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(10): 1606- 1614.
- [3] DEB A, WANG S, SKELDING K A, et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients[J]. *Circulation*, 2003, 107(9): 1247- 1249.
- [4] THEISE N D, BADVE S, SAXENA R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in

mice after radiation - inducement yeloablation [J]. *Hepatology*, 2000, 31(1): 235- 240.

- [5] 曹 丰,贾国良,牛丽丽,等.移植时机对骨髓间充质干细胞修复梗死心肌的影响[J].*第四军医大学学报*, 2005, 26(1):22- 27.
- [6] FUKUDA K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering [J]. *Artif Organs*, 2001, 25(3):187- 193.
- [7] AUDA - BOUCHER G, BERNARD B, FONTAINE - PERUS J, et al. Staging of the commitment of murine cardiac cell progenitors [J]. *Developmental Biology*, 2000, 225(1), 214- 225.
- [8] 华 平,熊利华,张 华,等.体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J].*中山大学学报:医学科学版*, 2004,25(1):68- 69,76.
- [9] LIU Y, SONG J, LIU W , et al. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells:does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? [J]. *Cardiovascular Research*, 2003, 58(2): 460- 468.

(编辑 张恩健)

(上接第 10 页 from page 10)

- [3] CLAUSE L R, KRISTIANSSEN M T,RASMUSSEN L M, et al. Growth hormone receptor expression and function in pituitary adenomas[J].*Clin Endocrinol*, 2004, 60(5) :576- 583.
- [4] FAZEKAS I, HEGEDUS B, BACSY E, et al. Characterization of human pituitary adenomas in cell cultures by light and electron microscopic morphology and immunolabeling[J].*Folia Histochem Cytobid*, 2005, 43(2):81- 90.
- [5] ISHIWATA I, ISHIWATA C, IGUCHI M, et al. Biological characteristics of cultured cells derived from various types of human brain tumors[J].*Hum Cell*,2004, 17(3) : 117- 124.
- [6] 杨 地,吴耀晨.垂体腺瘤细胞培养的实验研究[J].*现代临床医学生物工程学杂志*, 2001, 7(5):355- 356.
- [7] FLORIO T, THELLUNG S, CORSARO A, et al. Characterization of the intracellular mechanisms mediating somatostatin and lanreotide inhibition of DNA synthesis and growth hormone release from dispersed human GH-secreting pituitary adenoma cells in vitro [J].*Clin Endocrinol*,2003, 59(1):115- 128.
- [8] JONES T H, JUSTICE S K, PRICE A. Suppression of tyrosine kinase activity inhibits [3H]Thymidine uptake

in cultured human pituitary tumor cells [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82 (7) :2143- 2147.

- [9] ARMATI PJ, CONSTABLE AL, LLEWELLYN F. A new medium for in vitro peripheral nervous tissue myelination without the use of antimetotics [J]. *J Neurosci Methods*, 1990, 33(2- 3):149- 155.
- [10] SORDILLO L M, OLIVER S P, AKERS R M. Culture of bovine mammary epithelial cells in D -valine modified medium: selective removal of contaminating fibroblasts[J]. *Cell Biol Int Rep*, 1988,12(5): 355- 364.
- [11] HONGPAISAN J. Inhibition of proliferation of contaminating fibroblasts by D -valine in cultures of smooth muscle cells from human myometrium [J]. *Cell Biol Int*, 2000,24(1):1- 7.
- [12] PADMANABHAN V, FRIDERICI K H, CONVEY E M, et al . D -valine medium maintains prolactin production in primary culture[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1982, 28(3): 613- 626.
- [13] LAZZARO V A, WALKER R J, DUGGIN G G, et al. Inhibition of fibroblast proliferation in L -valine reduced selective media [J]. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1992, 75(1):39- 48.

(编辑 刘清海)