

经纤支镜取材肺癌细胞培养的研究

周开华, 苏晓三, 金志贤, 和煦, 杜俊毅
(昆明医科大学附属甘美医院, 云南昆明 650011)

[摘要] **目的** 探讨经纤支镜活检取材并进行原代肺癌细胞培养的方法, 以提高培养成功率. **方法** 30例经纤支镜活检肺癌组织进行原代细胞培养, 对肿瘤组织形态与原代细胞培养成功率相关性进行分析. **结果** 30例经纤支镜取材肺癌细胞培养病例, 原代培养成功17例, 占总例数的56.67%. 纤支镜下呈菜花样生长肺癌组织培养成功率84.62% (11/13); 肿瘤沿管壁生长管腔狭窄表面有或无突起的培养成功率分别为66.67% (2/3)和37.5% (3/8); 球状肿块质硬培养成功率16.67% (1/6), 菜花状与其他采用确切概率法比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** 经纤支镜活检肺癌组织体外原代细胞培养简单易行, 阳性率可达56.67%, 且原代培养成功率与纤支镜下肿瘤组织形态相关.

[关键词] 肺肿瘤; 肿瘤细胞, 培养; 支气管镜检查

[中图分类号] R73-351 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 10-0125-04

Lung Cancer Cell Culture from Bronchofibrosopic Biopsy

ZHOU Kai-hua, SU Xiao-san, JIN Zhi-xian, HE Xu, DU Jun-yi
(The Affiliated Ganmei Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate a method of collecting lung cancer cells with bronchofibrosopic biopsy for primary culture and to improve the success rate of primary culture. **Methods** Thirty lung cancer specimens were obtained through bronchoscopic biopsy for primary culture. The correlation of cancer morphology under bronchofibrosopic and success rate of primary culture was analyzed. **Results** Among the lung cancer specimens obtained through bronchoscopic biopsy, primary culture was successful in 17 of 30 cases (56.67%). The success rate of cauliflower-like tumor mass under bronchofibrosopic was 84.62% (11/13). The success rate of infiltrating tumor mass under bronchial mucosa with luminal stenosis with or without cristate were 66.67% (2/3) and 37.5% (3/8), respectively. The primary culture of a globular and stiff tumor mass was successful only 1 in 6 cases (16.67%). **Conclusions** The primary culture of lung cancer cells obtained from bronchofibrosopic biopsy is simple and effective with a total success rate of 56.67%. Furthermore, the success rate of primary culture is significantly correlated with the cancer morphology under bronchofibrosopic.

[Key words] Lung neoplasms; Tumor cells; Cultured; Bronchoscopy

肿瘤细胞原代培养的成功与否常常是有关肿瘤细胞研究的关键, 同时大量纯化的肿瘤细胞和原代培养的肿瘤细胞又是肿瘤遗传学、肿瘤分子生物学、肿瘤免疫学以及抗肿瘤药物等学科研究的重要对象^[1]. 纤维支气管镜(纤支镜)检查是确诊肺癌最重要手段之一, 可以在段及亚段水平直视支气管粘膜, 并且通过活检获得肿瘤组织标本^[2,3]. 笔者对

纤支镜活检肺癌组织进行原代细胞培养的方法进行探讨, 并对纤支镜下肺癌组织生长类型与活检组织原代培养的成功率的相关性进行研究.

1 资料与方法

1.1 肺癌组织取材

[基金项目] 昆明市卫生局基金资助项目 (2011kjc02)

[作者简介] 周开华 (1963~), 男, 云南昆明市人, 医学硕士, 主任医师, 主要从事呼吸内科临床工作.

[通讯作者] 苏晓三. E-mail: suxs163@163.com; 金志贤. E-mail: jzx666999@163.com

收集昆明医科大学附属甘美医院 2011 年 5 月至 2013 年 5 月接受纤支镜检查的肺癌患者, 年龄在 50~79 岁, 平均 65 岁。男性 25 例, 女性 5 例。经纤支镜术前麻醉后, 使用奥林巴斯 CV-260 电子纤维支气管镜进行检查, 发现管内新生物后取材。将纤支镜钳取的肿瘤组织浸入 4℃ 含有 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的无血清 LHC 培养基 (Invitrogen) 中, 立即送往实验室。

1.2 原代肺癌细胞培养

将肿瘤组织置于 50 mL 离心管内, 加入 I 型胶原酶溶液 5~10 mL (Invitrogen) (胶原酶 I 溶解在 LHC 培养基中, 终浓度为 1 mg/mL), 在 37℃ 水浴箱中振荡、温浴 1 h。含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青/链霉素的 LHC 培养基混匀细胞并将细胞接种至 24 孔培养板中, 放入 37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中, 每 2~3 d 观察细胞生长状态并半量换液。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 统计软件分析数据, 各组间肺癌细胞原代培养成功率采用确切概率法比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 经纤支镜肺癌组织取材

影响肺癌原代培养成功的最主要因素是活检组织所含活细胞太少和伴随的微生物污染^[4,5]。对于呈菜花样生长肿块, 其顶部多为坏死组织, 活检阳性率不高, 应在肿瘤基底部活检 (图 1A); 而对于沿气管壁浸润生长的肿块, 其底部较宽大而不易活检的病灶, 应采用在不同部位多次取材 (图 1B)。纤支镜经鼻顺利插入后钳取约 3~5 块组织, 钳取肺癌组织块大小 2 mm × 4 mm × 1 mm ~ 3 mm × 5 mm × 2 mm (图 2)。

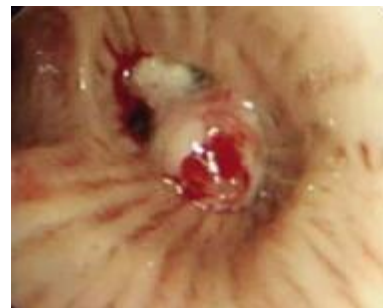
2.2 原代培养肺癌细胞

本实验中原代肺癌细胞生长良好并可以传代至少 1 代视为培养成功。30 例标本中 17 例培养成功, 失败 13 例, 其中 7 例因细胞数太少, 6 例因微生物污染。6 例微生物污染均为霉菌污染。组织块经胰酶消化后镜下呈大小不等细胞团, 3 d 后细胞贴壁, 高倍镜下可见大量核分裂相; 之后细胞分裂、增殖, 至 10~14 d 时细胞融合率 >80%, 此时可传代 (图 3)。肺癌细胞原代培养成功率与纤支镜下肿瘤组织形态相关, 菜花状肿块培养成功率最高达到 84.62%; 沿管壁生长管腔狭窄表面有小突起肿块成功率为 66.67%; 沿管壁生长管腔狭窄、

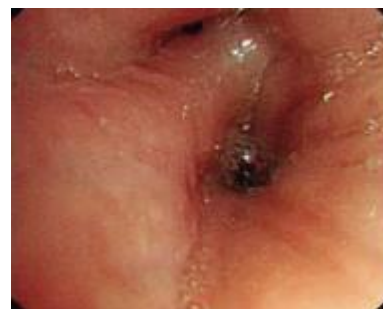
无小突起肿块成功率 37.5%; 球状、质硬肿块培养成功率最低为 16.67%, 菜花状与其他采用确切概率法比较 ($P < 0.05$), 见表 1。

3 讨论

文献报道经纤支镜肺癌细胞培养由于取材少培养成功率低 (<30%), 目前国内外已较少采用^[2,3]。原代肺癌细胞体外培养成功率与下列因素有关^[6,7]: 所取肿瘤组织的多少; 在原代培养中, 成纤维细胞的排除是肺癌细胞培养能否成功的关键之一; 取材新鲜与否; 肺癌细胞体外培养要尽量模拟体内的营养环境, 使细胞在接近人体内环境的环境中生长;



A



B

图 1 纤维支气管镜检像

Fig. 1 Bronchoscopic images

A: 菜花样肿块; B: 沿气管壁浸润生长肿块



图 2 纤维支气管镜活检组织

Fig. 2 Bronchoscopic biopsy

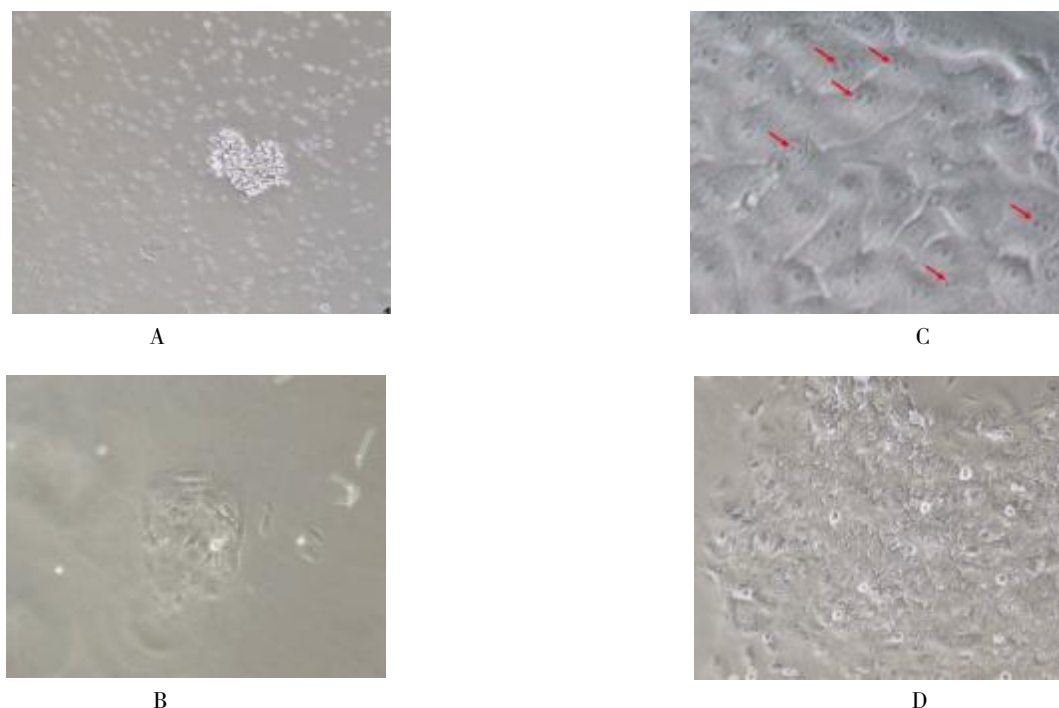


图 3 原代培养肺癌细胞

Fig. 3 Primary culture of lung cancer cells

A:经胰酶消化活检组织 (10×); B:贴壁原代肺癌细胞 (3 d, 10×);
C:原代肺癌细胞 (箭头示核分裂相, 40×); D:原代肺癌细胞 (10 d, 10×)

表 1 纤支镜下肿瘤组织形态与原代培养成功率

Tab. 1 Cancer morphology under bronchofibroscope and success rate of primary culture

肿瘤组织形态	总例数 (n)	占受检总数的比例 (%)	培养成功例数 (n)	培养成功比例 (%)
菜花状, 质地松软	13	43.33	11	84.62
沿管壁生长管腔狭窄, 无小突起	8	26.67	3	37.5*
沿管壁生长管腔狭窄, 有小突起	3	10	2	66.67*
球状肿块质硬	6	20	1	16.67*
合计	30		17	56.67*

与菜花状, 质地松软组比较, * $P < 0.05$.

肺癌细胞所处的体外环境需保持无菌; 培养基中添加适量的血清可能会对细胞的贴附有利的^[8,9]. 针对以上肺癌细胞原代培养的关键环节, 本研究在以下几个方面进行了改进: 合理选择病人; 活检前无菌生理盐水冲洗活检钳以降低活检组织污染几率; 取材后放于专用组织保存液中并在 10 min 内送培养; 改良了培养方法. 经过上述取材及培养方法的改进, 笔者在每次取材 2 钳子, 使用平均大小约 3 mm × 4 mm × 2.5 mm 的组织块进行培养的情况下, 培养成功率得到了明显的提高, 达到 56.67%. 经过统计分析发现菜花状包块培养成功率最高达到 84.62%; 其它形态组的培养成功率为 35.29% (沿管壁生长管腔狭窄表面有小突起者; 沿管壁生长管腔狭窄、无小突起者以及球状肿块质硬者), 2 组经统计学比较有显著性差异 ($P < 0.05$). 因此笔

者得出如下结论: 在不增加取材风险的前提下经过改良取材和培养方法可使经纤支镜取材肺癌细胞培养的阳性率大幅度提高; 纤支镜下呈菜花样生长较浸润型生长肿瘤组织原代培养成功率高. 经纤支镜取材肺癌细胞培养的优点是快速、简便、成功率高, 而且成本较低, 对肿瘤细胞损伤小, 可大量获得纯化的肿瘤细胞, 提高了肿瘤细胞原代培养的成功率, 可为肿瘤遗传学、肿瘤分子生物学、肿瘤免疫学以及抗肿瘤药物等研究提供非常有用的研究材料^[10].

[参考文献]

- [1] GAZDAR A F, GIRARD L, LOCKWOOD W W, et al. Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102 (17): 1 310 - 1 321.

- [2] TANIO Y, WATANABE M, INOUE T, et al. Chemo-radio-resistance of small cell lung cancer cell lines derived from untreated primary tumors obtained by diagnostic bronchofiberscopy [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1990, 81(3): 289 - 297.
- [3] 熊伟, 沈寒放. 纤支镜活检组织肺癌细胞原代培养药敏检测意义的初步探讨 [J]. *第三军医大学学报*, 1997, 19(2): 134 - 136.
- [4] SEO J, PARK S J, KIM J, et al. Effective method for the isolation and proliferation of primary lung cancer cells from patient lung tissues [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(8): 1165 - 1174.
- [5] ZHENG C, SUN Y H, YE X L, et al. Establishment and characterization of primary lung cancer cell lines from Chinese population [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(3): 385 - 392.
- [6] GAZDAR A F, OIE H K. Cell culture methods for human lung cancer [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1986, 19(1-2): 5 - 10.
- [7] OIE H K, RUSSELLE E K, CARNEY D N, et al. Cell culture methods for the establishment of the NCI series of lung cancer cell lines [J]. *J Cell Biochem Suppl*, 1996, 24(1): 24 - 31.
- [8] MASUDA N, FUKUOKA M, TAKADA M, et al. Establishment and characterization of 20 human non-small cell lung cancer cell lines in a serum-free defined medium (ACL-4) [J]. *Chest*, 1991, 100(2): 429 - 438.
- [9] 周开华, 陈晓丹. 恶性胸水培养肿瘤细胞失败原因分析 [J]. *昆明医学院学报*, 2011, 32(5): 47 - 49.
- [10] SUGAYA M, TAKENOYAMA M, OSAKI T, et al. Establishment of 15 cancer cell lines from patients with lung cancer and the potential tools for immunotherapy [J]. *Chest*, 2002, 122(1): 282 - 288.

(2013-07-23 收稿)

(上接第 124 页)

文应用免疫组化检测了 78 例宫颈癌组织中 Vimentin 的表达, 发现 78 例宫颈癌组织中 Vimentin 的阳性表达率 30/78 (38.5%), 淋巴转移阳性者 Vimentin 的阳性表达率显著高于淋巴转移阴性患者; 宫旁浸润阳性患者 Vimentin 的阳性表达率显著高于宫旁浸润阴性者。说明 Vimentin 与宫颈癌淋巴转移和宫旁浸润有关, 检测 Vimentin 可有效预测宫颈癌淋巴转移和宫旁浸润, 为宫颈癌患者个体化治疗方案选择提供有效的监测手段。

[参考文献]

- [1] CHEN Y Y, QIEMR, WANXL, et al. The clinicopathologic evaluation of lymph vascular space invasion involvement in cervical cancer [J/CD]. *Chin J Obstet Gynecol Pediatr (Electron Ed)*, 2009, 5(1): 34 - 38.
- [2] LANG J H. Notes of gynecological surgery [M]. 2nd ed Beijing: China Science and Technology Press, 2004: 178 - 180.
- [3] 林仲秋. 《2009 NCCN 宫颈癌临床实践指南》解读 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2009, 36(2): 167 - 168.
- [4] 韩晶, 蹇爱荣, 胡丽芳, 等. 基于免疫荧光图像的微管蛋白半定量分析 [J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(24): 2901 - 2904.
- [5] LEE C L, HUANG K G, WANG C J, et al. Laparoscopic radical trachelectomy for stage Ib1 cervical cancer [J]. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 2003, 10(1): 111 - 115.
- [6] PLANTE M. Vaginal radical trachelectomy: An update [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 111(2 Suppl): 105 - 110.
- [7] 潘燕, 韩婧, 张晔, 等. Vimentin 在肿瘤转移中的作用及药物研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2010, 41(6): 413 - 416.
- [8] 魏军成, 吴明福, 张永涛, 等. 波形蛋白对前列腺癌细胞侵袭与转移的影响 [J]. *癌症*, 2008, 27(1): 30 - 34.
- [9] LIU T, ZHANG X, SHANG M, et al. Dysregulated expression of Slug, vimentin, and E-cadherin correlates with poor clinical outcome in patients with basal-like breast cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2013, 107(2): 188 - 194.
- [10] MCINROY L, MAATTA A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(1): 109 - 114.
- [11] NIEMINEN M, HENTTINEN T, MERINEN M, et al. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration [J]. *Nature cell biology*, 2006, 8(2): 156 - 162.

(2013-07-24 收稿)