

• 基础研究 •

原代培养人嗜铬细胞瘤细胞的生长和分泌特征

郑欣 曾正陪 李明 严维刚 李汉忠

[摘要] 目的 观察体外培养的人嗜铬细胞瘤细胞生长和分泌的特征。方法 连续分次消化人嗜铬细胞瘤组织,进行细胞原代培养;用细胞计数方法测定生长曲线,同时收集细胞液,用高效液相色谱分析法测定其中儿茶酚胺的水平,绘制时间-分泌曲线。结果 在培养的第 3 天,原代培养的人嗜铬细胞瘤细胞数目开始逐渐增多,第 6 天达高峰,第 7 天后细胞数目减少;在细胞培养第 1~2 天,细胞液中去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)浓度明显下降,第 2~8 天无明显变化,多巴胺(DA)浓度在 1~8 天无明显变化。结论 人嗜铬细胞瘤在体外培养时,增殖不显著,但分化明显,其儿茶酚胺的水平,在培养最初明显下降。

[关键词] 嗜铬细胞瘤;细胞培养;儿茶酚胺

Characteristics of growth and secretion in primarily cultured human pheochromocytoma cells ZHENG Xin, ZENG Zheng-pei, LI Ming, et al. Department of Endocrinology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

[Abstract] Objective To investigate the characteristics of growth and secretion in primarily cultured human pheochromocytoma cells. Methods The human pheochromocytoma tissues were digested successively, and the tumor cells were cultured. The growth curves of three tumors were plotted by cell count. At the same time, the catecholamine in the medium was measured with high performance liquid chromatography. Results The number of primarily cultured human pheochromocytoma cells increased gradually from first to sixth day after plating, and then the cell number began to decrease from seventh day. The levels of norepinephrine (NE) and epinephrine (E) in the medium of cultured cells significantly decreased on first and second day, and the levels of NE and E had no significant difference on the second to eighth day. The levels of dopamine in the medium had no significant difference on the first to eighth day. Conclusion The primarily cultured pheochromocytoma cells differentiate obviously after plating, but have no significant proliferation. The levels of catecholamine in the medium are decreased significantly on the first and second day.

[Key words] pheochromocytoma; cell culture; catecholamine

中图分类号: R73-35 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2005)11-0922-02

[本文著录格式] 郑欣,曾正陪,李明,等.原代培养人嗜铬细胞瘤细胞的生长和分泌特征[J].中国康复理论与实践,2005,11(11):922-923.

嗜铬细胞瘤是来源于外胚层神经嵴的肿瘤,可分泌过多的儿茶酚胺(catecholamine, CA)引起高血压。本实验通过观察体外培养的人嗜铬细胞瘤细胞生长和分泌的特点,为进一步的研究提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 人嗜铬细胞瘤细胞原代培养 在无菌条件下,取手术切除的人嗜铬细胞瘤部分组织置于 DMEM 液中,2 h 内进行分离培养。将组织剪成 0.5 cm³ 大小数块,用 D-Hank's 液反复冲洗组织至无血迹,分别将每块组织移入小玻璃瓶中,剪碎至 1 mm³,每瓶加入 0.2% 的 I 型胶原酶 2~3 ml,置 37℃ 水浴振荡消化 30 min,其间用吸管吹打 1 次,静置 1 min,吸取上清消化液至离心管中,剩余组织加入新的 I 型胶原酶继续消化 1~2 次。每次收集的消化液经 900~1000 r/min 离心 5 min,去上清液,用 D-Hank's 液洗细胞 1~2 次。加入

适量培养液(含 15% 胎牛血清,100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素)重悬细胞,用 300 目金属网滤器将细胞悬液过滤,取 0.1 ml 细胞悬液用 0.4% 胎盼兰染色后做活细胞计数。以 1.5 × 10⁵ 细胞/ml 接种到 24 孔板中,每孔加入 1 ml DMEM 培养液(含 15% 胎牛血清),置 37℃ 5% CO₂ 培养箱内静置培养。

1.2 培养液 CA 浓度检测 收集细胞培养液,装入加有防腐剂的小管中,-20℃ 冻存。2 周内采用高效液相色谱电化学检测法测定培养液中 CA,即去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、肾上腺素(epinephrine, E)和多巴胺(dopamine, DA)的浓度。

1.3 细胞生长曲线和时间-分泌曲线测定 向 24 孔板的每孔中接种等量细胞,置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。将细胞随机分成 8 组,每组 3 孔,培养 8 d,每天换液 1 次。从接种次日开始,每天消化计数不同组中每孔的细胞总数,每孔加入 0.9 ml 0.125% 的胰蛋白酶液消化 3~5 min,待细胞接近脱离瓶壁时,加入 0.1 ml 含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液,轻轻吹打制成细胞悬液,用细胞计数器计数,取 3 个孔的平均值。同时收集相对应的每孔细胞培养液,装入有防腐剂的小管

作者单位:1. 100730 北京市,中国医学科学院,中国协和医科大学,北京协和医院内分泌科(郑欣、曾正陪、李明);2. 100730 北京市,中国医学科学院,中国协和医科大学,北京协和医院泌尿外科(严维刚、李汉忠)。作者简介:郑欣(1969-),女,河北阜平县人,博士,主治医师,主要研究方向:内分泌高血压。

中, - 20℃冻存, 2 周内测定 CA 浓度。每天 1 组, 如此至第 8 组结束。用座标图纸绘制成生长曲线和时间-分泌曲线。重复 3 次。

1.4 统计学处理 所得数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件包对细胞生长曲线进行单因素方差分析, 对 CA 的时间-分泌曲线数进行秩和检验。

2 结果

人原代嗜铬细胞瘤细胞培养第 3 天, 细胞数目开始逐渐增多, 第 6 天达高峰, 第 7 天后细胞数目减少。培养第 1~2 天, 细胞液中 NE、E 浓度明显下降, 第 2~8 天无明显变化。细胞液中 DA 浓度在第 1~8 天无明显变化。见表 1。

表 1 细胞的生长情况和 CA 水平

培养时间(d)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
细胞数(×10 ⁵ /孔)	1.62±0.05	1.43±0.43	1.62±0.23	1.97±0.10 ^a	2.32±0.12 ^a	2.71±0.27 ^a	3.22±0.24 ^a	2.86±0.11 ^a	2.24±0.14 ^a
CA 浓度	NE	131.57±54.89	50.48±18.52 ^a	28.37±23.07	17.34±18.61	15.31±13.54	12.39±10.00	12.91±14.68	17.22±14.57
(μg/10 ⁵ 细胞)	E	17.47±9.56	5.03±4.56 ^a	3.10±2.70	2.40±2.46	1.45±1.67	1.40±1.45	1.14±1.30	2.89±2.78
	DA	2.30±2.16	3.34±3.80	2.70±2.48	1.23±1.37	0.97±1.33	0.70±0.95	1.12±1.88	1.40±1.86

注:a:与第 1 天比较, P<0.05。

3 讨论

嗜铬细胞瘤是来源于外胚层神经嵴的肿瘤, 具有分泌功能, 可分泌过多的 CA 引起高血压, 是引起内分泌型高血压的重要原因。细胞培养是在体外模拟体内生理环境使单个或某一类型的细胞群体在体外生存、生长和繁殖的培养方法。应用细胞培养的方法动态观察嗜铬细胞瘤细胞的生长、分裂、分化、衰老与死亡等基本现象, 并进一步系统研究其激素的合成、分泌、释放及其影响因素可为嗜铬细胞瘤发病机制的研究、疾病的防治、新药和新疗法的开拓提供理论依据。

本实验室已建立了原代人嗜铬细胞瘤细胞培养技术^[1], 本次实验观察到的细胞形态和生长情况与以往多次的结果类似。从细胞生长曲线看到, 在细胞增殖的高峰, 细胞总数仅增加约 2 倍, 此外, 随着培养时间的延长, 细胞逐渐出现类似于神经细胞轴突的丝状突起, 并相连成网状。细胞在消化传代后无 CA 分泌, 因此, 嗜铬细胞瘤在体外培养时, 与其他肿瘤细胞不同, 增殖不显著, 但分化明显。

能分泌 CA 是嗜铬细胞瘤细胞功能的重要标志。我们在计数细胞生长曲线时同步测定了细胞 CA 分泌的情况。细胞培养第 1~3 天, 细胞液中 NE、E 水平逐渐下降, 其中第 1~2 天下降明显; DA 水平在 1~8 天无明显变化, 均与国外相关的结果类似^[2,3]。Jaques 等在 18 个人嗜铬细胞瘤的原代培养实验中发现, NE 和 E 的含量随时间下降, 其中测定的两个肿瘤的 DA 水平是不变的, 故认为原因可能与血清中缺乏促进 CA 合成或分泌的某些因子或存在抑制因子有关^[2]。而我们观察到, 在培养的第 2~8 天, 相对于第 1 天, NE 分别下降了 62%、78%、86%、88%、91%、90% 和 87%; E

分别下降 71%、82%、86%、92%、92%、94% 和 84%。这些结果表明, NE 和 E 的下降在培养的最初 1~2 天明显。其原因可能是: ①细胞培养液中最初 CA 的量包含了一部分在体时已合成并储存在囊泡中的 CA; ②血清中缺乏 CA 合成和分泌所需要的因子, 如地塞米松(Yanase 等报道地塞米松可使体外培养的人嗜铬细胞瘤细胞的 CA 水平增加^[4]); ③随着体外培养时间的延长, 因细胞分化, 其合成和分泌 CA 的功能维持在较低的水平。此外, 我们还观察到, 不同个体来源的肿瘤其细胞液中 CA 的水平相差 2~3 倍, 而 Jaques 等观察到的差别最大达 224 倍^[2], 并认为这种差别与肿瘤的部位、性质和个体差异有关。我们的标本来源于肾上腺肿瘤, 因此, CA 水平相差不大, 但与肾上腺外的嗜铬细胞瘤相比是否有明显的差别还有待于进一步的研究。

[参考文献]

[1] 童安莉, 曾正陪, 李汉忠, 等. 人嗜铬细胞瘤细胞的原代培养及鉴定[J]. 基础医学与临床, 2003, 23(4): 447—450.

[2] Jaques S Jr, Tobes MC. Morphologic and biochemical variability of tissue and cultured cells from human pheochromocytoma[J]. J Cell Physiol, 1986, 128(2): 261—270.

[3] Tischler AS, Lee HC, Perlman RL, et al. Production of “ectopic” vasoactive intestinal peptide-like and neurotensin-like immunoreactivity in human pheochromocytoma cell culture[J]. Neuroscience, 1984, 4: 1389—1404.

[4] Yanase T, Nawata H, Higuchi K, et al. Dexamethasone increases both catecholamines and methionine-enkephalin in cultured bovine adrenal chromaffin cells and human extra medullary pheochromocytoma cells[J]. Life Sci, 1984, 35: 1869—1875.

(收稿日期: 2005-07-25)