

前列腺癌细胞 Transwell 小室体外侵袭模型的建立及应用价值研究*

高伟¹ 陈强² 牛海涛^{2△} 刘青山¹ 刁会丰¹ 刘军¹

(1 青岛大学医学院 山东 青岛 266021 2 青岛大学医学院附属医院泌尿外科 山东 青岛 266003)

摘要 目的 建立前列腺癌细胞 transwell 小室体外侵袭模型,并探讨该侵袭模型在前列腺癌转移研究方面的意义。方法:将 200μl 2 组前列腺癌细胞加入 Transwell 小室侵袭模型上室分别培养 12、24、36、48h,加入侵袭模型上室的细胞取不同浓度 (1.0×10⁵、2.0×10⁵、3.0×10⁵、4.0×10⁵ / ml)温箱中培养,在不同时间点观察不同浓度的前列腺癌细胞穿过基质膜的细胞数,测定 2 组前列腺癌细胞的侵袭能力。结果:穿过 ECM 胶聚碳酸酯膜的细胞在第 12h 较少,而随着时间的延长逐渐增多。细胞穿膜在 24 小时前后最显著,同时,穿过人工基底膜的细胞数随着细胞浓度增高而增多,但细胞浓度大于 3.0×10⁵/ml 时,穿过人工基底膜的细胞数无明显变化。结论 本实验成功建立了前列腺癌细胞 Transwell 小室体外侵袭模型,其在前列腺癌研究方面具有较高的应用价值。该侵袭模型的建立可间接判断肿瘤的侵袭力并且对探明前列腺癌的转移机制及影响因素具有重要意义。

关键词 前列腺癌细胞;transwell 小室 肿瘤浸润

中图分类号 R737.25 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 08-1462-04

Establishing Transwell Chamber for Prostatic Carcinoma Cell Study*

GAO Wei¹, CHEN Qiang², NIU Hai-tao^{2△}, LIU Qing-shan¹, DIAO Hui-feng¹, LIU Jun¹

(1 Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, P.R.China;

2 Department of Urology, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, P.R.China)

ABSTRACT Objective: To establish a transwell chamber for invasive human prostatic carcinoma cell. **Methods:** Transwell chamber in vitro assay was used to invasion of two cell lines. 200μl two cell of various concentrations (1.0×10⁵, 2.0×10⁵, 3.0×10⁵, 4.0×10⁵ / ml) was added into the upper chamber, and the cells were allowed to penetrate the membrane for 12, 24, 36 and 48, respectively. The invasive rate was assessed by quantifying cells on the under surface of the membrane. **Results:** The invasion of two prostatic cell lines was different. The invasive cells were low 12 hours after the incubation, and which increased dramatically at 24 hours. 24 hours later the rate reached a relative plateau. The invasion quantity increasing with the cells concentration increased. The increasing slowed down when the cell concentration reached 3.0×10⁵ / ml. Under the identical conditions, the invasion ability of the cells with the capacity of bone marrow metastasis than the cells without ability of bone marrow metastasis. **Conclusions:** The transwell chamber for the prostatic carcinoma cells were successfully established. It will be crucial for future study of the invasive ability of the prostatic carcinoma cells.

Key words: Prostatic carcinoma cells; Transwell chamber; Neoplasm

Chinese Library Classification(CLC): R737.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 08-1462-04

前言

前列腺癌是欧美国家男性常见的恶性肿瘤,发病率居所有恶性肿瘤的第二位^[1]。近年来我国前列腺癌的发病率逐年上升,目前采用 5α 还原酶抑制剂预防前列腺癌未获成功^[2],故前列腺癌体外侵袭模型的建立对于前列腺癌的预防及治疗方面的研究具有广泛的应用价值。本实验应用 2 种不同的前列腺癌细胞 pc-3、22RV1 细胞系建立了该肿瘤的体外侵袭模型,该侵袭模型的建立可间接判断肿瘤的侵袭力适用于前列腺癌细胞的不同实验条件和影响因素,对探明前列腺癌的转移机制及其影响因素具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞来源 前列腺癌细胞系本实验选用 2 组细胞系包括 pc3 和 22RV1,两种细胞株均购自中国科学院细胞库。

1.1.2 材料及设备 Transwell 小室(Corning 公司,聚碳酸酯膜孔径 8.0μm),ECM(Sigma 公司),倒显微镜(Olympus),加样枪(Eppendorf 公司),制冰机,细胞培养箱,超净工作台,-4℃及 -20℃冰箱。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清(美国 Hyclone 公司),1640 培养液(美国 Hyclone 公司,含 100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素),趋化液

* 基金项目 山东省博士基金资助项目 (BS2010YY009)

作者简介 高伟 (1985),男,硕士研究生,主要研究方向 泌尿系肿瘤的外科治疗,E-mail:qiyiguo6699@126.com

△通讯作者 牛海涛,E-mail:Niuhaitao1976@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-11-08 接受日期 2011-11-30)

(含 10%血清的 1640 培养液),0.05%结晶紫染液(北京中杉金桥生物技术有限公司),1/2000PBS 缓冲液 (青岛大学医学院附属医院中心实验室)。

1.2 研究方法

1.2.1 实验分组 将以下 2 组细胞系分别进行 Transwell 侵袭模型的建立 ;A 组 pc-3 细胞系 (来源于骨转移的前列腺癌细胞),B 组 22RV1 细胞系 (来源于无骨转移的前列腺癌细胞)。

1.2.2 细胞预处理 2 组前列腺癌细胞系用含均 10%胎牛血清的 1640 培养液并置于 36.5℃,CO₂ 培养箱中培养 (CO₂ 的浓度为 5%)。实验前一天将贴壁生长至 70%~80%融合的 A,B,2 组前列腺癌细胞培养液换成无血清的 1640 培养液;制备趋化液,以含 10%血清的 1640 培养液作为趋化液注入 Transwell 小室的下室内;实验前一天将冻存于 -20℃冰箱的 ECM 胶置于 4℃冰箱 24h 缓慢融化;所有的无菌器皿及枪头均需提前置于 -20℃冰箱 12h 以上。用 PBS 缓冲液冲洗细胞两遍,加入 1 ml0.25%胰蛋白酶作用 1~2min,相差显微镜下观察细胞皱缩变圆,从培养瓶底脱落时立即加适量含血清培养液终止消化,1000r / min 离心 5 min 收集细胞;用细胞计数板将细胞密度调整至 1.0×10⁵、2.0×10⁵、3.0×10⁵、4.0×10⁵ / ml。

1.2.3 前列腺癌细胞 Transwell 小室体外侵袭模型的建立 整个实验操作均应在超净工作台里及冰上进行,所有器皿及枪头均需预冷处理用。从 4℃冰箱取出的无血清 1640 培养液将 ECM 胶稀释至终浓度为 0.8 mg/ml,按 60μl/ 孔将 ECM 胶加至 Transwell 小室的上室聚碳酸酯膜上,36.5℃培养箱里孵育 8 h,用加样枪吸除 ECM 胶上层析出的液体 将制备好的不同浓度 (1.0×10⁵、2.0×10⁵、3.0×10⁵、4.0×10⁵/ml) 2 组前列腺癌细胞悬液 200μl 加入已铺好 ECM 胶的 Transwell 小室的上室;下室按 600μl / 孔加入趋化液 将 Transwell 小室置于 36.5℃培养箱中,分别孵育 12、24、36、48h。在不同时间将 Transwell 小室的上室取出,

首先用加样枪将吸除上室内液体,然后用 PBS 溶液浸湿的棉签轻轻将 ECM 胶和聚碳酸酯膜上表面的细胞擦去,用 4%的多聚甲醛固定聚碳酸酯膜下表面细胞 30 min 后,用 0.05%结晶紫液染色 45min,蒸馏水洗 3 遍以上。

1.2.4 结果判断 用高倍镜 (×400) 计数聚碳酸酯膜下表面的细胞数(图 A、B),分别对上、下、左、右和中间 5 个视野计数,取平均值,每组设 3 个平行样本,取均数。将穿过人工基底膜的细胞数确定为侵袭指标,穿过膜的细胞个数多代表细胞的侵袭能力强^[3、4]。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,两组独立均数比较用 t 检验。P < 0.05,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前列腺癌细胞在穿膜过程中的形态学变化

在 6h、8h、12h 三个时间点用显微镜 (×400) 观察,悬浮于 Transwell 小室的上室之中的前列腺癌细胞形态由长梭形渐变成椭圆形至圆形,约 6h 后悬浮的细胞逐渐贴附于凝固的基质胶表面,至 8 h 细胞变形开始穿透基质胶,12h 已有少量细胞穿过聚碳酸酯膜并贴附于聚碳酸酯膜的下表面。

2.2 两组前列腺癌细胞侵袭细胞个数随着浓度的变化情况

A、B 2 组细胞系在 24h 时,分别观察细胞浓度为 1.0×10⁵/ml、2.0×10⁵/ml、3.0×10⁵/ml、4.0×10⁵/ml 时穿过 ECM 胶聚碳酸酯膜的细胞数(表 1)。结果表明 2 组前列腺癌细胞穿过 ECM 胶聚碳酸酯膜细胞数均随细胞浓度的增高,穿过细胞数也相应的增加,但细胞浓度高于 3.0×10⁵/ 时,穿过 ECM 胶聚碳酸酯膜的细胞数无显著变化。在同一浓度下(3.0×10⁵/ml),穿过 ECM 胶聚碳酸酯膜 A > B。A 组与 B 组相比,差异有统计学意义 (P < 0.05),表明有骨转移的细胞侵袭能力大于无骨转移的细胞。

表 1 A、B 2 组细胞系在 24h 时,各细胞浓度侵袭过人工基底膜的细胞数

Table 1 The invasive cells with various concentrations for 24h

细胞浓度(Cell concentrations)	1.0×10 ⁵ / ml	2.0×10 ⁵ / ml	3.0×10 ⁵ / ml	4.0×10 ⁵ / ml
Pc-3 侵袭细胞数 (The invasive cells)	5.97±1.58	17.66±2.35	27.33±24.90	80.20±3.89
22RV1 侵袭细胞数 (The invasive cell)	1.80±2.58	13.01±1.98	21.40±22.06	46.80±4.86

2.3 两组前列腺癌细胞侵袭细胞个数随着时间的变化情况

A、B 2 组细胞系在细胞浓度为 3.0×10⁵/ml 时,分别观察 12h、24h、36h、48h 穿过 ECM 胶聚碳酸酯膜的细胞数(表 2)。结果表明 2 组前列腺癌细胞穿过 ECM 胶聚碳酸酯膜细胞数均随时

间的延长而增多,24h 前后穿膜的细胞数增幅最明显,48h 以后逐渐趋于饱和 在同一时间点(24h),穿过 ECM 胶聚碳酸酯膜细胞数 A > B。A 组与 B 组相比,差异有统计学意义(P < 0.05),表明有骨转移的细胞侵袭能力大于无骨转移的细胞。

表 2 A、B 2 组细胞系在细胞浓度为 3.0×10⁵ / ml 时,各时间点侵袭过人工基底膜的细胞数

Table 2 The invasive cells with the concentrations of 3.0×10⁵ / ml for 12, 24, 36 and 48 respectively

细胞侵袭时间 (The invasive hours)	12h	24h	36h	48h
Pc-3 侵袭细胞数(The invasive cells)	6.00±2.95	27.33±24.90	28.40±4.04	90.73±7.46
22RV1 侵袭细胞数(The invasion cells)	1.30±1.84	21.40±22.06	26.10±19.66	56.10±28.14

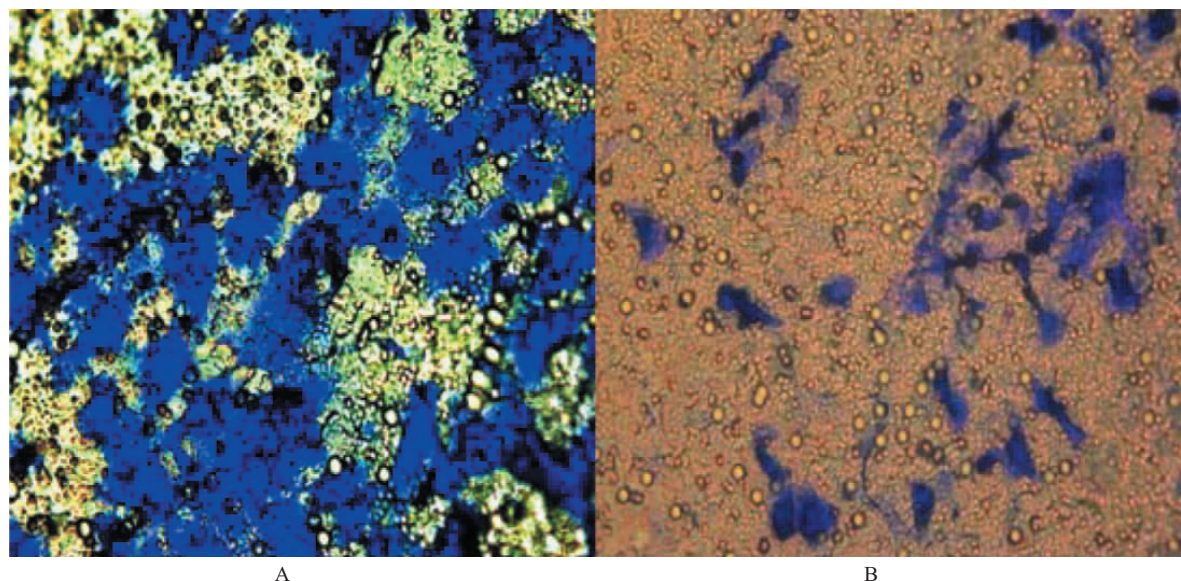


图 1 pc-3 及 22RV1 两种前列腺癌细胞在 24h, 浓度为 3.0×10^5 / ml 的穿膜细胞形态

图 A pc-3 细胞在 24h, 浓度为 3.0×10^5 / ml 侵袭过人工基底膜后结晶紫染色形态 ($\times 400$)

图 B 22RV1 细胞在 24h, 浓度为 3.0×10^5 / ml 侵袭过人工基底膜后结晶紫染色形态 ($\times 400$)

Fig.1 The morphous of invasive prostatic carcinoma cells at 24 hours with the cell concentration was 3.0×10^5 /ml

A group of cells were stained with crystal violet on the under surface of the membrane at 24 hours with the cell concentration was 3.0×10^5 /ml ($\times 400$)

B group of cells were stained with crystal violet on the under surface of the membrane at 24 hours with the cell concentration was 3.0×10^5 /ml ($\times 400$)

3 讨论

前列腺癌是男性泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤之一,我国前列腺癌的发病率近年来呈上升趋势^[5],目前对于前列腺癌仍缺乏有效治疗手段,有研究发现间歇性雄激素阻断治疗能够提高生活质量、延长雄激素抵抗及存活时间,在近 10 来得到广泛关注^[6-9]。晚期前列腺癌有多种治疗措施,而间歇性与持续性雄激素阻断是两种临床较为常见的两种内分泌疗法^[10]。晚期前列腺癌患者易发生骨转移,而且 70% 以上的前列腺癌患者死于骨转移^[11]。侵袭和转移是恶性肿瘤细胞重要的生物学特性,侵袭在肿瘤转移的整个过程中发挥核心作用,高转移的肿瘤细胞其侵袭力较强。前列腺癌的转移主要通过血行途径,癌细胞穿过基底膜,穿入与穿出血管都要依赖于肿瘤细胞的侵袭力,因此该侵袭模型的建立对了解前列腺癌侵袭和转移能力具有重要意义^[12]。

Transwell 小室体外侵袭模型是目前较为成熟的综合判断肿瘤侵袭转移能力、分析肿瘤细胞黏附、降解和穿透转移能力的实验方法^[13]。虽然该实验方法已比较成熟但也不能忽略该实验的影响因素,其对实验结果具有决定性意义。该实验影响因素包括多个方面,如侵袭小室构建时人工基底膜的厚度、完整性,侵袭时间的选择以及人工基底膜的染色方法等。本实验选用 $48 \mu\text{g}$ ECM 胶对 transwell 上室进行铺胶,一次铺膜会出现一些微孔未被覆盖,因此 Wanda 等建议将总量分次铺膜,这样制备的人工基底膜较为完整^[14]。不同的实验目的决定侵袭时间的选择,随着时间的延长,趋化物和人工基质胶的稳定性都会受

到不同程度的影响。国内外体外侵袭实验的观察时间范围为 $4 \sim 72 \text{h}$ ^[15,16],本研究对预实验结果进行分析后选择 24h 这一时间点,该时间点能较理想地区别出癌细胞的侵袭力。本实验我们将穿过人工基底膜的细胞数定为侵袭指标^[17],并用 0.05% 结晶紫液将膜染色后,随机选取高倍镜下 5 个视野计数细胞,取均值。国外有研究报道用 125I 标记 UDR(脱氧尿嘧啶核苷),将其加入细胞培养液后癌细胞转录时 mRNA 中包含 125I-UDR,癌细胞用放射元素标记后做侵袭试验,进而测定人工基底膜上的放射指标来分析其侵袭力^[18]。这一方法的优点是较为准确,但存在放射性污染,操作技术条件要求较高等缺点。有文献报道将 MTT 比色法与 Transwell 小室侵袭试验相结合,能较准确的测定出癌细胞的体外侵袭力,具有敏感准确、快速简便、无放射污染等优点^[19]。本实验参照文献的 MTT 法进行改良^[19],应用 0.05% 结晶紫液作为染色剂对细胞进行染色,有效的提高了实验数据的可靠性及准确性。

为了探究 Transwell 小室法应用于前列腺癌细胞的具体条件,我们检测了 2 种不同的前列腺癌细胞系在不同细胞浓度和不同时间的侵袭细胞数,从中获得稳定的细胞浓度和侵袭时间,作为前列腺癌体外侵袭性模型的标准化条件^[20]。本实验结果显示:A、B 2 组细胞系在细胞浓度为 3.0×10^5 / ml 时,24h 穿过 ECM 胶聚碳酸酯膜细胞数分别为 27.33 ± 24.90 、 21.40 ± 22.06 ; A、B 2 组细胞系在 24h 时,细胞浓 3.0×10^5 / ml 穿过 ECM 胶聚碳酸酯膜细胞数分别为 27.33 ± 24.90 、 21.40 ± 22.06 。该实验结果充分表明,有骨转移能力的前列腺癌细胞的侵袭能力强于无骨转移能力的前列腺癌细胞。前列腺癌细胞体外实验条件的标

准化有利于今后针对前列腺癌的多种体外研究^[20],前列腺癌细胞 Transwell 小室侵袭模型的建立可间接判断癌细胞的侵袭能力并且对探明前列腺癌的转移机制及影响因素具有重要意义。

参考文献 (References)

- [1] 孙颖浩.前列腺癌的诊治进展[J]. 上海医学, 2011, 34(7):487-488
Sun Ying-hao. Diagnosis of Prostatic carcinoma and progress in therapy[J]. Shanghai Medical Journal, 2011, 34(7): 487-488
- [2] 鲍镇美. 前列腺癌的预防及诊断治疗[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(12): 797-799
Bao Zhen-mei . Prevention and diagnosis and treatment of Prostatic carcinoma[J]. Chinese Journal of Urology, 2004, 25(12): 797-799
- [3] Geminder H, Sagi Assif O, Goldberg L, et al. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXCL12 chemokine stromal cell-derived factor-1 in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma [J]. J Immunol, 2001, 167(8):4747-4757
- [4] Meier R, Mu hlethaler-Mottet A, Flahaut M, et al. The chemokine receptor CXCR4 strongly promotes neuroblastoma primary tumour and metastatic growth, but not invasion [J]. PloS one, 2007, 2(10):e1016
- [5] Zhang W, Xiang YB, Liu ZW, et al. Trends analysis of common urologic neoplasm Incidence of elderly people in Shanghai, 1973-1999 [J]. Ai zheng, 2004, 23(5):555-558
- [6] Miyamoto H, Messing EM, Chang C. Androgen deprivation therapy for prostate cancer: current status and future prospects [J]. Prostate, 2004, 61:332-353
- [7] Vogelzang NJ, Chodak GW, Soloway MS, et al. Goserelin versus orchiectomy in the treatment of advanced prostate cancer: final results of a randomized trial. Zoladex Prostate Study Group [J]. Urology, 1995, 46: 220-226
- [8] Sato N, Gleason ME, Bruchovsky N, et al. Intermittent androgen suppression delays progression to androgen-independent regulation of prostate-specific antigen gene in the LNCaP prostate tumor model [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1996, 58: 139-146
- [9] De Leval J, Bocca P, Yousef E, et al. Intermittent versus continuous total androgen blockade in the treatment of patients with advanced hormone-naïve prostate cancer: results of a prospective randomized multicenter trial [J]. Clin Prostate Cancer, 2002, 1:163-171
- [10] 余凯远, 翁志梁, 王思齐, 等. 间歇性与持续性雄激素阻断治疗晚期前列腺癌疗效比较[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(11):761-764
Yu Kai-yuan, Weng Zhi-liang, Wang Si-qi, et al. Comparison of intermittent versus continuous androgen blockade in the treatment of advanced prostate cancer [J]. Chinese Journal of Urology, 2006, 27(11): 761-764
- [11] Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, et al. Cancer statistics, 2001 [J]. CA Cancer J Clin, 2001, 51(1): 15-36
- [12] 周宇, 潘铁军, 汪国栋, 等. 前列腺癌细胞 PC-3 骨转移动物模型的建立 [J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2010, 2(1):45-47
Zhou Yu, Pan Tie-jun, Wang Guo-dong, et al. Establishment of bone metastasis model of prostate cancer cell line PC-3 [J]. Journal of Contemporary Urologic and Reproductive Oncology, 2010, 2(1):45-47
- [13] 王元天, 许纯孝. Boyden 小室侵袭试验测定膀胱癌细胞的体外侵袭力 [J]. 山东医科大学学报, 2000, 8(4):354-357
Wang Yuan-tian, Xu Chun-xiao. Utilization of Boyden chamber to characterize the in vitro invasion of human bladder transitional carcinoma cells [J]. Acta Academiae Medicinae Shandong, 2000, 38(4): 354-357
- [14] Mackinnon WB, Hancock R, Dyne M, et al. Evaluation of an in vitro invasion assay for use on solid tissue samples and cultured cells [J]. Invasion Metastasis, 1992, 12(5-6):241-252
- [15] Seton-Rogers SE, Lu Y, Hines LM, et al. Cooperation of the ErbB receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(5):1257-1262
- [16] Jacob K, Webber M, Benayahu D, et al. Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone [J]. Cancer Res, 1999, 59(17):4453-4457
- [17] Sato H, Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis [J]. J Biochem, 1996, 119(2):209-215
- [18] Repesh LA. A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion [J]. Invasion Metastasis, 1989, 9(3):192-208
- [19] 王元天, 许纯孝. MTT 比色法测定膀胱癌细胞的体外 [J]. 肿瘤, 2001, 21(1):45-47
Wang Yuan-tian, Xu Chun-xiao. Evaluation of the invasive ability of transitional-cell bladder carcinoma by the MTT colorimetric assay [J]. Tumor, 2001, 21(1):45-47
- [20] 王莉, 董蓓, 江布先, 等. 神经母细胞瘤细胞 Boyden 小室体外侵袭模型的建立及意义探讨 [J]. 中华小儿外科杂志, 2010, 31(6):458-462
Wang Li, Dong Qian, Jiang Bu-xian, et al. Establishing Boyden chamber for invasive neuroblastoma [J]. Chinese Journal of Pediatric Surgery, 2010, 31(6): 458-462