文章编号:1000-5404(2006)11-1151-03

论著

# 人成骨细胞株 HOS TE85 致瘤性转化的研究

孟 刚[1],李 懿[1],郭乔楠[1],肖 航[2] (第三军医大学西南医院:[1]病理学研究所,[2]西南医院老年病科,重庆 400038)

**提 要:目的** 建立人成骨细胞株 HOS TE85 致瘤性转化的模型,作为骨肉瘤癌变过程细胞分子生物学研究的模型。**方法** 通过克隆形成率实验确定 N-甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)对 HOS TE85 细胞转化浓度后,以 MNNG 作启动剂,佛波酯(12-0-Te-tradecanoyl phorbol 13-acetate, TPA)作促进剂对其进行转化,66 d 后通过细胞形态、软琼脂集落形成实验和裸鼠体内致瘤实验鉴定细胞转化程度。**结果** 经 MNNG 和 TPA 协同处理 HOS TE85 细胞 66 d 后,细胞中出现形态异常的转化灶,转化灶细胞失去接触抑制;转化细胞凝集性增强;软琼脂克隆形成率明显增加;转化细胞在裸鼠皮下成瘤,病理组织学证实为低分化骨肉瘤。**结论** 模拟人体细胞发生恶性转化的过程,建立了 HOS TE85 的恶性转化模型。

**关键词:** HOS TE85;MNNG;TPA;恶性转化
**中图法分类号:** R322.71; R73-351; R738.1 **文献标识码:** A

# Neoplastic transformation of human osteoblast-like cell line HOS TE85

MENG Gang[1], LI Yi[1], GUO Qiao-nan[1], XIAO Hang[2] ([1]Department of Pathology, [2]Department of Gerontology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To establish human osteoblast-like cell lines TE85 model of neoplastic transformation for exploring molecular mechanism in canceration process of osteosarcoma. **Methods** HOS TE85 cells were treated by MNNG (initiated factor) and TPA (promotor). The malignancy of transformed cells was identified by observing the cell form, colony forming frequency on soft agar and tumorigenesis in nude mice. **Results** Continuous passage after induction of neoplastic transformation led to the formation of a few paramorph foci that exhibited an extensively random orientation. The agglomeration in experiment group was more than that in control group. As compared with that of negative control cells, colony formation efficiency of transformed cells in semisolid agar showed a significant increase and the transformed cells could form tumor subcutaneously in the nude mice. The tumors were a poorly differentiated osteosarcoma confirmed by histopathological examination. **Conclusion** Simulating the process of malignant transformation of human cells, we establish neoplastic transformation of human osteoblast-like cell lines TE85 model.

**Key words:** human osteoblast-like cell line TE85; MNNG; TPA; neoplastic transformation

骨肉瘤的发病机制和防治仍是目前研究的热点和难点。在骨肉瘤中可见到呈明显异型性的成骨细胞样细胞和肿瘤性骨样组织,因此成骨细胞的恶性转化与骨肉瘤的发生有着密切的关系。细胞恶性转化实验是在体外培养的条件下,从细胞受到致癌原作用到细胞生长、增殖和分化等特性发生失控性变化以及由此而导致的裸鼠致瘤性,此过程基本上模拟了靶细胞向肿瘤细胞的演变过程。恶性转化实验揭示某一类肿瘤在其发展的各阶段究竟有哪些基因以表达、突变或其他形式的改变参与,即找到癌基因谱。周喆等[1]已完成塞替派诱发永生化人支气管上皮细胞的恶性转化。陈传德等[2]用可溶性乙酸镍对人支气管上皮细胞系(16HBE)体外恶性转化成功。皆证明化学致癌物可以诱导培养细胞癌变。本实验用化学致癌物 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)作为转化人成骨细胞株 HOS TE85 细胞的启动剂,培养传代后加入促癌物佛波酯(12-0-Te-tradecanoyl phorbol 13-acetate, TPA)诱导其恶性转化,建立 HOS 恶性转化的模型。这对骨肉瘤癌变机制的研究有理论意义和实用价值。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371446)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371446)
作者简介:孟 刚(1975-),男,四川省南充市人,硕士,医师,主要从事骨肉瘤方面的研究。电话:(023)68753878,E-mail:mgdoctor@sina.com
通讯作者:郭乔楠,E-mail:qiaonan85@263.net
收稿日期:2006-01-07;修回日期:2006-03-13

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 HOS TE85 购自美国模式菌种收藏所(ATCC),BALB/c 裸鼠 4 只,由第三军医大学实验动物中心提供,6 周龄,雌雄不拘,体质量为 15 ~ 17 g。

1.1.2 主要试剂 佛波酯(TPA)购自 FLUKA,N-甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)购自日本东京化成工业株式社会;DMEM 培养基、胰蛋白酶为 Gibco 公司产品;低熔点琼脂粉、二甲基亚砜(DMSO)为 Sigma 公司产品。鼠抗人 CK 单克隆抗体、鼠抗人 collagen-Ⅰ单克隆抗体、鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体、免疫组化试剂盒均购自北京中衫公司;NBT/BCIP 显色剂为 Roche 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HOS TE85 细胞用 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)在 37 ℃,5% $CO_2$ 饱和湿度的环境中培养,细胞大致按 $1.0 \times 10^4$/25 $cm^2$ 密度接种。隔日换液,每 3 ~ 4 天传代 1 次。

1.2.2 细胞毒性实验 接种 HOS TE85 细胞 200 个于 60 mm的培养皿(内置 5 ml 培养液),培养 24 h 后,加入 MNNG,终浓度分别为 5、2、1、0.5、0.2 μg/ml,并设 DMSO 溶剂对照。每个剂量设 3 个平行样。在 37 ℃,5 % $CO_2$ 的培养箱中培养24 h后,细胞用 PBS 洗 3 次,加入新鲜培养液继续培养 7 d。用甲醇固定细胞 10 min ,然后用 10% Giemsa 染色,显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数,然后计算绝对克隆形成率(absolute colony forming efficiency, CFE)和相对克隆形成率(relative colony forming efficiency, RFE)。选择相对克隆形成率为 30% ~ 70% 的浓度为转化实验浓度[3]。

1.2.3 两阶段细胞转化实验 细胞转化实验用 25 $cm^2$ 培养瓶,每瓶加 5 ml DMEM 培养基,接种 $4 \times 10^4$ 个细胞;至细胞处于 70% ~ 80% 融合生长阶段时,加入 0.2 μg/ml 的 MNNG 或 DMSO(阴性对照),培养 24 h 后弃去处理液,用 PBS 洗 2 次;0.25% 胰蛋白酶 +0.02% EDTA 消化后按 $4 \times 10^4$ 个/培养瓶传代培养,细胞进入指数生长期即完成 1 次诱发;如此重复诱发共 2 次(共 14 d)后维持细胞在含 TPA(溶剂为 DMSO,终浓度为 200 ng/ml)的培养液中继续培养(细胞 80% 融合时传代),每天观察、记录各瓶细胞生长及形态变化。

1.2.4 锚着非依赖性生长实验 取处理第 66 天实验组和对照组细胞,分别用软琼脂克隆生长实验鉴定其锚着不依赖性。采用 60 mm 平皿,每皿加入 3 ml 0.7% 底层琼脂糖-DMEM 完全培养基[1.4 % 底层琼脂糖和 2 × DMEM 完全培养基(含 20% FBS 及 2 倍抗生素)1∶1 混合],待凝固后加上顶层为 3 ml 含 500 个待测细胞的 0.35 % 琼脂-DMEM 完全培养基[0.7 % 顶层琼脂糖和 2 × DMEM 完全培养基(含 20% FBS 及 2 倍抗生素)1∶1 混合],每组细胞设 5 个平行样,培养 2 周后计数每组细胞的集落形成率。

1.2.5 裸鼠成瘤实验 6 周龄的 BALB/c 裸鼠 4 只。取 0.2 ml 含 $5 \times 10^6$ 个处理第 66 天细胞的无血清 DMEM 混悬液注入裸鼠右侧颈部与背部交界处,阴性对照组注射含等量未经处理的 HOS TE85 细胞的无血清 DMEM,每组 2 只。每周观察记录注射部位及肿块发生情况,当肿瘤达 1 $cm^3$ 时,处死动物,解剖,固定包埋肿瘤组织块,进行病理学检查。

1.2.6 免疫细胞化学及组织化学染色鉴定 标本经常规石蜡包埋,制备 5 μm 厚连续切片,切片经常规脱蜡至水,参照 S-P 免疫组化试剂盒方法进行,DAB 显色,苏木精复染,透明,中性树脂封片,PBS 代替一抗作为阴性对照;组织化学染色按照 NBT/BCIP 显色剂说明书进行。

### 1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用独立样本 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 MNNG 对 HOS TE85 细胞的毒性作用

HOS TE85 细胞的绝对克隆形成率和相对克隆形成率随着 MNNG 剂量的增加而降低,呈现剂量反应关系(表 1)。选择相对克隆形成率在 30% ~ 70% 范围之内的 0.2 μg/ml 作为转化实验的剂量。

**表 1 MNNG 对 HOS TE85 细胞的毒性作用**

| 药物浓度(μg/ml) | 绝对克隆形成率(%, $\bar{x} \pm s$) | 相对克隆形成率(%) |
|---|---|---|
| 0 | 61.5 ± 1.6 | 100 |
| 0.2 | 30.5 ± 1.8 | 49.5 |
| 0.5 | 12.5 ± 1.7 | 20.3 |
| 1.0 | 7.5 ± 2.3 | 12.2 |
| 2.0 | 1.9 ± 1.8 | 3.1 |
| 5.0 | 0 | 0 |

### 2.2 两阶段转化实验对 HOS TE85 细胞的转化作用

对照组细胞在第 66 天时仍呈扁平样、细胞以梭形为主,单层生长,未观察到转化灶的形成,见图 1 。而实验组细胞从第 60 天开始出现形态变化,可观察到转化灶的出现,转化灶细胞呈多边形,核大,排列密集,与周围未转化细胞有明显区别见图 2。但转化灶细胞缺乏重叠生长的生长方式。转化细胞碱性磷酸酶组织化学染色细胞质弱阳性。

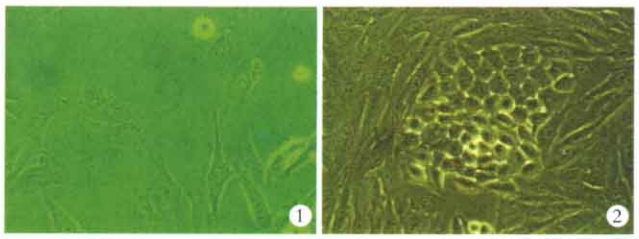


**图 1 对照 HOS TE85 细胞的形态观察** (倒置显微镜 ×400)

**图 2 处理后转化灶形成** (倒置显微镜 ×400)

### 2.3 两阶段转化实验对细胞软琼脂集落形成的影响

第 46 天对照组细胞有(11.4 ± 3.6)% 能在软琼脂上形成克隆生长,而第 66 天实验组细胞能在软琼脂上形成克隆生长者明显增多,为(37.2 ± 7.2)%,与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。说明 MNNG 与 TPA 协同转化的细胞锚着不依赖

性增强，获得了更高的恶性细胞生物学特性。

### 2.4　裸鼠致瘤性

裸鼠接种两阶段转化细胞 2 周后，在注射局部均开始出现小肿块，并逐渐长大，而阴性对照组未见肿块形成。镜下肿块可见细胞大部分呈巢团状分布，以大圆细胞为主，核大，核膜清楚，核仁 1 ~ 3 个，可见病理性分裂像，见图 3；免疫组织化学显示波形蛋白、Ⅰ型胶原阳性表达，角蛋白阴性表达；组织化学显示碱性磷酸酶细胞质阳性表达见图 4。

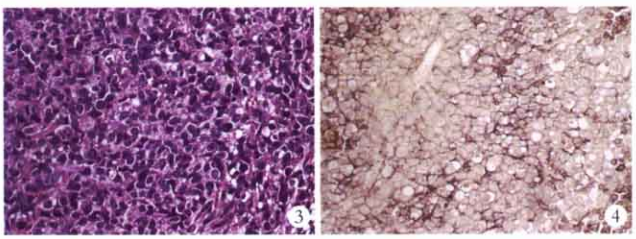


**图 3　转化细胞在裸鼠体内成瘤的组织病理学观察**　（HE ×400）

**图 4　肿瘤 ALP 组织化学染色**　（×400）

## 3　讨论

本实验判断细胞转化的指标主要有 4 个方面：①细胞形态改变；②细胞凝集性增强；③软琼脂细胞集落形成率增加；④裸鼠成瘤实验。本实验中通过细胞形态变化判断细胞发生初期转化的标准虽与 Reznikoff 等以及 IARC/NCI/EPA 联盟[4]制订的标准有差异，但与 Miller 等[5]以及 Rani 等[6]进行的骨源性细胞致瘤转化实验中细胞发生初期转化时的形态变化一致，说明判断标准可能因细胞而异。病理学检查镜下细胞及间质并不呈常见骨源性肉瘤生长方式（未见明显类骨质形成），但免疫组织化学及组织化学显示肿瘤细胞来源于间叶组织并有骨源性细胞的一些特征，这显示转化过程中细胞发生了去分化并部分丧失了骨源性细胞的特性。

人体细胞发生恶性转化历经较长时间，大致经过启动、DNA 损伤与修复、促进、发展几个阶段，设计体外实验应尽量符合人体实际。而外源性因子诱发体外细胞恶性转化的研究证实，它也是一个多阶段连续的发展过程。在细胞培养条件下，用化学、物理和生物等各种致癌因素，都可人为地诱发细胞发生恶性转化。转化时需要让细胞直接受到致癌物作用，从细胞受到打击后到发生恶性转化，一般需要 2 周到 3 个月时间。本研究癌变实验是基于两阶段设计[5]；实验使用公认的直接致癌化学物 MNNG（一种不依赖于酶的代谢而引起癌变的烷化剂）作为启动剂启动细胞转化，待细胞 DNA 损伤及错误性修复固定后，再长时间使用 TPA（作用于细胞生长因子信号系统，通过甘油二酯作用于蛋白激酶 C，促进蛋白合成和细胞增殖）促进恶性转化。此模型可以作为骨肉瘤癌变过程细胞分子生物学研究的模型，藉转化过程研究转化相关机制，同时为后继研究提供可靠的转化细胞模型。

成骨细胞的恶性转化与骨肉瘤的发生有着密切的关系。人成骨细胞是最佳实验细胞，原代培养的人成骨细胞属有限细胞系，它的传代数有限（5 ~ 7 代），不能满足实验周期要求；同时它并非永生化细胞，而细胞恶性转化必须跨越永生化阶段[7]。因此，我们选择了 HOS TE85 细胞系为研究对象。国内众多研究者也都以其替代原代培养的成骨细胞及在体成骨细胞为研究对象[8]，并且此细胞体外呈低饱和密度生长，在软琼脂中低克隆性生长，无裸鼠致瘤性，对病毒及化学物质的转化作用极其敏感。由于本实验是以人的类成骨细胞株为研究对象，该细胞的功能状态与原代培养的成骨细胞及在体成骨细胞间有一定差异。因此，进一步研究将以原代培养的成骨细胞或与人原代成骨细胞同源性更高的细胞为研究对象。

**参考文献：**


[1] 周　喆，袁素波，廖明阳. 塞替派诱发人支气管上皮恶性转化成瘤细胞的生物学特性[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2005，19(2)：133 - 136.

[2] 陈传德，吴中亮，陈家堃. 乙酸镍对人支气管上皮细胞系的恶性转化研究[J]. 癌变·畸变·突变，2003，15(2)：72 - 74.

[3] DUNKEL V C，ROGERS C，SWIERENGA S H，*et al*. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories：Ⅲ. Cell transformation in C3H/10T1/2 mouse embryo cell，BALB/c 3T3 mouse fibroblast and Syrian hamster embryo cell cultures[J]. Mutat Res，1991，246(2)：285 - 300.

[4] IARC/NCI/EPA Working Group. Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transforming assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals：overview and recommended protocols[J]. Cancer Res，1985，45：2395 - 2399.

[5] MILLER A C，BLAKELY W F，LIVENGOOD D，*et al*. Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride[J]. Environ Health Perspect，1998，106(8)：465 - 471.

[6] RANI A S，QU D Q，SIDHU M K，*et al*. Transformation of immortal，non-tumorigenic osteoblast-like human osteosarcoma cells to the tumorigenic phenotype by nickel sulfate[J]. Carcinogenesis，1993，14(5)：947 - 953.

[7] RHIM J S. Neoplastic transformation of human cells *in vitro*[J]. Crit Rev Oncog，1993，4(3)：313 - 335.

[8] 孙　兰，岳　赟，杨　京，等. 17β-雌二醇长时程作用促进成骨细胞 HOS TE85 $^{45}$Ca 摄取及间质矿化[J]. 药学学报，2003，38(3)：181 - 184.


（编辑　张大春）