论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0380-04

人永生化成骨细胞 hFOB1.19 恶性转化的研究

孟 刚,李 懿,辛 榕,郭乔楠 (第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 建立人胚永生化成骨细胞系(hFOB1.19)的恶性转化模型,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 hFOB1.19 细胞转化浓度后,以 MNNG 作启动剂,佛波酯(12-O-Te-tradecanoyl phorbol 13-acetate, TPA)作促进剂对 hFOB1.19 细胞进行转化,90 d 后通过细胞形态、DNA 含量分析、软琼脂集落形成试验和裸鼠体内致瘤试验鉴定细胞恶性转化程度。**结果** 经 MNNG 和 TPA 协同处理 hFOB1.19 细胞 90 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;高倍体细胞数,转化组(81.08%)高于对照组(55.03%);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,建立了人胚永生化成骨细胞系的恶性转化模型。

关键词: 人永生化成骨细胞; MNNG; TPA;恶性转化
中图法分类号: R329.2; R73-354; R730.2 **文献标识码**: A

Malignant transformation of immortalized human fetal osteoblastic cell line hFOB1.19

MENG Gang, LI Yi, XIN Rong, GUO Qiao-nan (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a malignant transformed human fetal osteoblastic human cells from the immortalized cell line hFOB1.19 in order to explore the molecular mechanism in tumorigenesis of osteosarcoma. **Methods** hFOB1.19 cells were treated sequentially by an initiated factor, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and a promoter, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA). The features of malignancy of transformed cells were identified by cell morphology, DNA content analysis, colony forming frequency on soft agar and tumorigenetic test in nude mice. **Results** Continuous passaging after the treatments resulted in the formation of a few paramorph foci and exhibited in an extensively random orientation. The poly-ploid of DNA was 81.08% in experiment group, much higher than that in control group (55.03%). Compared with that of negative control cell, colony formation efficiency of transformed cells in semisolid agar showed a a significant increase. The transformed cells formed tumors subcutaneously in the nude mice, which were verified to be poorly differentiated osteosarcoma histopathological examination. **Conclusion** Mocking the process of malignant transformation of human cells, we establish malignant transformed immortalized human fetal osteoblastic human cells (hFOB1.19) model.

Key words: human immortal osteoblast cells; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate; malignant transformation

肿瘤的发生是一个长期的、多阶段、多基因改变积累的过程,具有多基因控制和多因素调节的复杂性,而体外细胞转化是反映体内多阶段肿瘤发生过程的良好细胞模型,与体内细胞恶性转化有较好的相关性。恶性转化实验以及在其基础上所建立的众多实验体系,在检测外来致癌因素的同时,更旨在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(gene spectrum)。诱导体外培养细胞的恶性转化,是研究癌变的重要手段。纪卫东等[1]应用体外人支气管上皮细胞系(16 HBE)为靶细胞,建立起了二羟环氧苯并芘发细胞恶性转化模型。证明强烈化学致癌物可以诱导培养细胞癌变。本实验用化学致癌物 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)作

基金项目:国家自然科学基金(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,主要从事骨肿瘤发生机制方面的研究。电话:(023)68753878
通讯作者:郭乔楠,E-mail: qiaonan85@263.net
收稿日期:2006-06-07;修回日期:2006-09-23

为转化人胚永生化成骨细胞系（hFOB1.19）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，建立人成骨细胞恶性转化的模型。这对骨肉瘤发生机制的研究具有理论意义和实用价值。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞与动物　　人永生化成骨细胞系（hFOB1.19）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，雌雄各半。

1.1.2　主要试剂　　TPA 购自 Fluka 公司，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，乙二胺四乙酸二钠（EDTA）为汕头市光华化学厂产品，胎牛血清为 Hyclone 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　　hFOB1.19 细胞用 DMEM 培养液（含 10% 胎牛血清，300 mg/L G418）在 36 ℃，5% CO_2 饱和湿度的环境中培养，细胞大致按 $1.2\times10^4/cm^2$ 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 hFOB1.19 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、0.1 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。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 RFE 30%～70% 的浓度为转化实验浓度。

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 2.5×10^5 个细胞；至细胞处于 70%～80% 融合生长阶段时，加入 1 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 4×10^4 个细胞/培养瓶（100 ml）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 4 次（共 28 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　细胞 DNA 分析　　处理第 90 天实验组和对照组细胞经消化，PBS 洗 2 次，70% 乙醇固定，制成单细胞悬液，存入4 ℃冰箱。上机前 30 min 加碘化丙锭（PI，Sigma）DNA 染色，用流式细胞仪（FACS calibur，美国 BD 公司）进行 DNA 分析。

1.2.5　锚着非依赖性生长实验　　取处理第 90 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 2 000 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 3 个平行样，培养 2 周后计数每组细胞的集落形成率。

1.2.6　裸鼠成瘤实验　　6 周龄的 BALB/c 裸鼠 4 只（雌雄各半）。取 0.2 ml 含 5×10^6 个两阶段转化细胞的无血清 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 hFOB1.19 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。

1.2.7　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，分别以鼠抗人 CK 单克隆抗体、鼠抗人 Collagen-Ⅰ单克隆抗体、鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体为一抗、参照 S-P 免疫组化试剂盒方法进行，检测 CK 及 Vimentin 用微波修复抗原，检测Ⅰ型胶原时用 0.4% 胃蛋白酶修复，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；碱性磷酸酶组织化学染色按照 NBT/BCIP 显色剂说明书进行。

1.3　统计学分析

数据以 $x\pm s$ 表示。

2　结果

2.1　MNNG 对 hFOB1.19 细胞的毒性作用

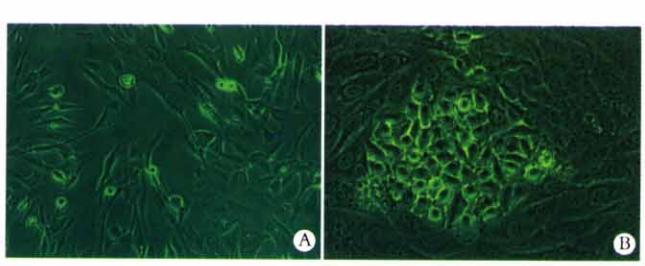
hFOB1.19 细胞的 CEF 和 RFE 随着 MNNG 剂量的增加而降低（表 1）。选择 RFE 在 30%～70% 范围之内的 1 μg/ml 作为转化实验的剂量。

表 1　MNNG 对 hFOB1.19 细胞的毒性作用

浓度（μg/ml）	绝对克隆形成率［$(x\pm s)$%］	相对克隆形成率（%）
0	60.0±5.0	100.0
0.1	52.5±4.2	87.5
0.5	44.5±4.0	74.2
1.0	31.5±2.8	52.5
2.0	7.0±2.5	11.7
5.0	0	0

2.2　两阶段转化实验对 hFOB1.19 细胞的转化作用

对照组细胞在第 90 天时仍呈扁平样、细胞以梭形为主，单层生长，排列有序，未观察到转化灶的形成，见图 1A。而实验组细胞从第 82 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，细胞质较少，排列密集，与周围未转化细胞有明显区别见图 1B。但转化灶细胞缺乏重叠生长的生长方式，与 Reznikoff 等制订的细胞转化灶判断标准有差异。



A：对照组；B：实验组

图 1　两组 hFOB1.19 细胞生长及形态学观察　（倒置显微镜 ×400）

2.3 细胞DNA分析含量

流式细胞仪检查结果比较实验转化组与对照组DNA组方图；DNA >4n细胞的高倍体及不整倍体细胞前者81.08%，后者55.03%。

2.4 两阶段转化实验对细胞软琼脂集落形成的影响

第90天对照组细胞不能在软琼脂上形成克隆生长，而第90天实验组细胞能在软琼脂上形成克隆生长，见图2。说明MNNG与TPA协同转化的细胞部分呈现出锚着不依赖性生长，获得了某些恶性细胞的生物学。

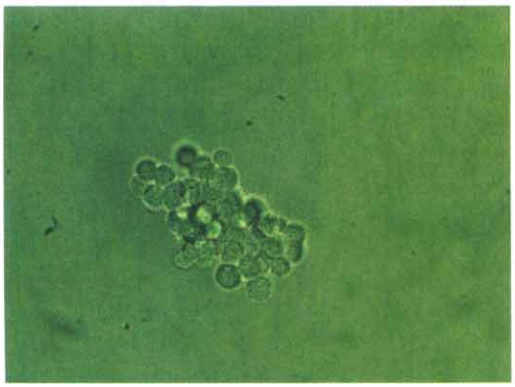


图2 转化细胞在软琼脂上生长形成的集落 （倒置显微镜×400）

2.5 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（图3），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，可见病理性分裂象（图4）；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阳性表达（图5、6）。

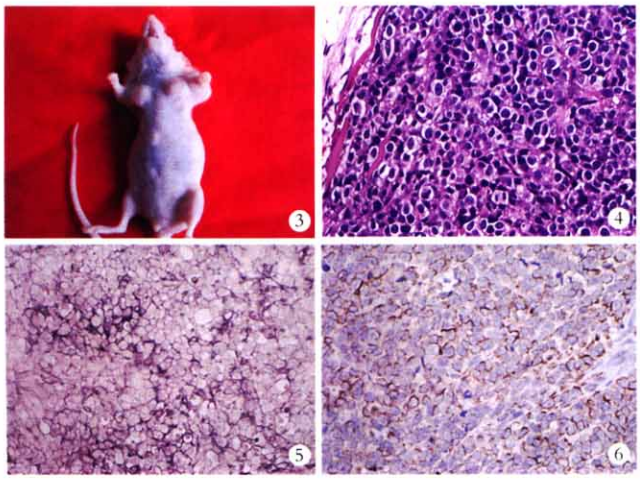


图3 转化细胞诱发裸鼠皮下成瘤

图4 转化细胞在裸鼠体内成瘤的组织病理学观察 （HE×400）

图5 移植瘤组织中碱性磷酸酶表达 （×400）

图6 转化细胞中波形蛋白表达 （S-P×400）

3 讨论

成骨细胞的恶性转化与骨肉瘤的发生有着密切的关系。人成骨细胞是成骨细胞恶性转化实验的较理想的实验细胞，原代培养的人成骨细胞属并非永生化细胞，然而细胞恶性转化必须跨越永生化阶段[2]。我们选择用SV40 LT抗原基因永生化的人成骨细胞系（hFOB1.19）进行实验。Harris等[3]证实hFOB1.19细胞与人成骨细胞有高同源性，它是研究正常成骨细胞体外生物学特征的极好的模式系统。hFOB1.19细胞虽为永生化，但并无恶性肿瘤细胞特征，与以往细胞恶性转化实验中所用成骨细胞株HOS TE85相比较是更加适合的研究对象。

Dunkel等对细胞转化的定义是诱导培养细胞出现与肿瘤相关的特定表型。这些表型包括形态学、膜特性、蛋白分泌以及基因表达等[4]。在上述表型改变中，细胞形态学改变是最常用的检测指标，转化实验即是通过观察形态转化灶的形成来评价细胞是否发生转化。可以认为转化灶是由转化细胞所形成的克隆。不同来源的细胞所产生的转化灶有所不同。对本实验中细胞转化灶的判断，我们结合细胞转化过程中细胞形态的实际改变同时参照Miller等[5]在继往的骨源性细胞致瘤转化实验中出现的转化灶的形态。要证实细胞发生了恶性转化，还应结合其他与转化伴随出现的细胞表型改变[6]。实验中我们应用流式细胞技术证实转化细胞表现了肿瘤细胞的遗传学特征。锚着不依赖性生长是转化细胞体外培养中较方便、也是常用的观察指标。转化细胞失去了对贴壁的依赖性[7]，锚着不依赖性生长与转化细胞的致瘤性有很好的符合率，具有AIG表型的细胞移植到裸鼠体内，通常能非常有效地形成肿瘤，实验转化组细胞出现大集落生长，而对照细胞无集落生长，表明MNNG与TPA协同转化的细胞部分呈现出锚着不依赖性生长。致瘤性是判断恶性转化最主要、最关键的指标。实验中裸鼠皮下肿块进行性生长，光镜下显示移植瘤组织为恶性肿瘤，我们通过免疫组织化学及组织化学证明肿瘤细胞来源于间叶组织并有骨源性细胞的特征，属于骨源性恶性肿瘤。

人体细胞发生恶性转化大致经过启动、DNA损伤与修复、促进、发展几个阶段，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。本癌变实验运用两阶段转化方法；使用公认的直接致癌化学物MNNG与促癌物TPA进行转化实验。同动物细胞相比，与人有高同源性的细胞DNA修复功能强大，需多次染毒才能导致细胞DNA不可逆损伤，产生一定数量“启动细胞”；实验中经过2次MNNG染毒后持续TPA作用的细胞长期传代（100 d）未见细胞形态及软琼脂集落形成能力的改变。我们增加MNNG染毒次数，连续4个细胞对数生长期染毒后持续TPA作用才出现

细胞转化的特征[8]。与以往我们致瘤性转化低恶性度的HOS TE85细胞相比需要更多次的染毒及更长的转化时间，但hFOB1.19细胞与人成骨细胞有更高的同源性，hFOB1.19细胞的运用增加了体外转化过程与体内骨肉瘤发生过程的相似度，我们可以藉此转化过程研究体内骨肉瘤发生相关机制，同时为后继研究提供可靠的转化细胞模型。

参考文献：

[1] 纪卫东，陈家堃，吕嘉春，等. 二羟环氧苯并芘诱发细胞恶变后基因和蛋白表达差异分析[J]. 中国职业医学，2005，32(5)：2-5.
[2] Rhim J S. Neoplastic transformation of human cells *in vitro*[J]. Crit Rev Oncog，1993，4(3)：313-335.
[3] Harris S A，Enger R J，Riggs B L，*et al*. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line [J]. J Bone Miner Res，1995，10(2)：178-186.
[4] Landolph J R. Mechanisms of chemically induced multistep neoplastic transformation in C3H 10T 1/2 cells[J]. Carcinog Compr Surv，1985，10：211-223.
[5] Miller A C，Mog S，Mckinney L，*et al*. Neoplastic transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by heavy metal-tungsten alloy particles：induction of genotoxic effects[J]. Carcinogenesis，2001，22(1)：115-125.
[6] Smith G J，Bell W N，Grisham J W. Clonal analysis of the expression of multiple transformation phenotypes and tumorigenicity by morphologically transformed 10T1/2 cells[J]. Cancer Res，1993，53(3)：500-508.
[7] Wei S J，Trempus C S，Ali R C，*et al*. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and UV radiation-induced nucleoside diphosphate protein kinase B mediates neoplastic transformation of epidermal cells[J]. J Biol Chem，2004，279(7)：5993-6004.
[8] 孟 刚，李 懿，郭乔楠，等. 人成骨细胞株HOS TE85致瘤性转化的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(11)：1151-1153.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2007)05-0383-01

个案与短篇

LEKSELL C型伽玛刀双靶点治疗原发性三叉神经痛

刘海鹏，杨 辉，黄其林，王 彬，王传琦，吴晓东 （第三军医大学新桥医院神经外科伽玛刀中心，重庆 400037）

2005年7月至2006年2月，25例原发三叉神经痛(trigeminal neuralgia，TN)患者在我们中心接受了伽玛刀双靶点治疗，取得良好的疗效，现报告如下。

1 对象与方法

1.1 一般资料

本组25例TN患者，其中男性11例，女性14例，年龄26-75岁，平均58.2岁，病程：0.5-23年(平均6.9年)。右侧14例，左侧11例；疼痛分布区：第Ⅰ支1例，第Ⅲ支3例，Ⅰ+Ⅱ支3例，Ⅱ+Ⅲ支12例，Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ支6例。患者均长期服卡马西平和反复多次封闭无效，其中1例经微血管减压术失败，1例经三叉神经感觉根切断术失败。患者行伽玛刀治疗前均经MRI检查，以排除继发性三叉神经痛。

1.2 治疗方法

安装LEKSELL立体定位仪：在局麻下安装，使定位仪框架的Y轴与患者颅基底线平行，X轴中点对准头颅中线，框架两侧保持水平位。磁共振定位：采用0.5T MRI定位扫描，为完整显示三叉神经根，本组均加行3D-SPGR扫描。影像资料由磁共振工作站经网络传输到伽玛刀的计算机上。靶点和剂量计划：HP p1235计算机工作站，Gama Plan 5.33软件进行定位和剂量计划。选用4 mm准直器，在三叉神经根近端设置第1个靶点，沿三叉神经走行在第1个靶点远端设置第2个靶点，使50%的等剂量曲线包绕三叉神经根部，靶中心剂量为75-85 Gy，单次照射，使20%等剂量线限在桥脑表面。由3人核对数据无误后，将治疗计划传至伽玛刀控制室。其后用LEKSELL C型伽玛刀实施治疗计划。

1.3 疗效判定[1]

评价疼痛缓解的标准包括TN发作频率和程度的减轻。疼痛缓解100%为优；疼痛缓解>80%(无需药物)为良；疼痛缓解50%-80%(需要少量用药)为有效；疼痛缓解<50%为无效。

2 结果

显效时间：本组治疗后23例疼痛缓解，疼痛缓解出现时间为1-112 d，平均16.8 d。治疗当日疼痛缓解5例(22%)，2周内疼痛缓解13例(57%)，1-3个月以内疼痛缓解4例(17%)，治疗后4个月疼痛缓解1例(4.3%)。疼痛缓解率：本组随访3-10个月，平均7个月。本组优14例，良7例，有效2例，无效2例；优良率为84%，总有效率为92%。复发率：2例疼痛缓解后在术后8、10个月复发。并发症：本组患者治疗后有1例出现疱疹，无其他近期放射不良反应。随访复查，1例患者自觉患侧面部麻胀感，客观检查面部痛、触觉无明显减退(不同于感觉根切断术后的麻木)，无其他颅神经及脑干受损症状和体征，无死亡病例。

（下转395页）

作者简介：刘海鹏(1966-)，男，陕西省兴平市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事功能神经外科和立体定向放射神经外科方面的研究。电话：(023)68755231，E-mail：haipenghu@sina.com
通讯作者：杨 辉，电话：(023)68774610

收稿日期：2006-04-20；修回日期：2006-06-25