论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0942-04

人骨肉瘤抗失巢凋亡细胞的生物学特性研究

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

摘 要:目的 获得人骨肉瘤抗失巢凋亡细胞,了解其生物学特性。**方法** 采用本室建立的人永生化成骨细胞(hFOB1.19)恶性转化细胞株(转化细胞),用抗黏附培养法,模拟脱离基质情况,获得抗失巢凋亡细胞。电子显微镜、荧光显微镜和流式细胞仪观察悬浮培养后不同时相点细胞的形态学改变和凋亡率。MTT法、Transwell小室分别检测细胞增殖情况和细胞的迁移能力。**结果** 形态学观察可见到典型的凋亡细胞,流式细胞仪检测细胞悬浮后24、48、72 h的凋亡(PI染色)情况,凋亡率逐渐升高。抗失巢凋亡细胞再次悬浮同时相凋亡率与转化株相比下降;抗失巢凋亡细胞较对照组(转化细胞)的细胞增殖能力增强,迁移能力增强,转化细胞差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 经过14 d的悬浮培养处理后,获得的人骨肉瘤抗失巢凋亡细胞不仅抗失巢凋亡能力有所增强,增殖能力和迁移能力也有增强。

关键词: 骨肉瘤;失巢凋亡;细胞迁移;细胞增殖

中图法分类号: R329.25;R730.23;R738.1 **文献标识码:** A

Biological characteristics of anoikis-resistant cells from human osteosarcoma cell line hFOB1.19

WEN Lei, MENG Gang, LI Yi, GUO Qiao-nan (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain anoikis-resistant cells from human osteosarcoma cell line hFOB1.19 and investigate its biological characteristics. Methods The osteosarcoma cell line we used was malignant transformed immortalized human fetal osteoblastic human cells (hFOB1.19) which was transformed in our lab (called transformant in this paper). We have used anti-adhesion cell culture method to mimic detachment of tumor cells from extracellular matrix (ECM) to obtain anoikis-resistant variants. Transmission electron microscopy and fluorescence microscopy were used to observe the morphological changes, flow cytometry was used to observe the apoptotic rate. The growth characteristic was observed by MTT. The migration characteristics was examined by transwell cell culture system. Results Typical apoptotic cells were seen after de-adhesion culture. The apoptotic rate of the transformant at 24, 48 and 72 h showed a gradually increasing tendency. The apoptotic rate of anoikis-resistant cells was lower than that of the transformant at the same time point. Compared with the transformant, the anoikis-resistant variants had stronger ability in proliferation and in migration with statistical significance ($P<0.05$). Conclusion After 14 days' de-adhesion culture, we obtain the anoikis-resistant variant cells of osteosarcoma cells, which have higher ability in proliferation and migration.

Key words: osteosarcoma; anoikis; migration; proliferation

正常组织的平衡状态是通过细胞增殖和细胞死亡之间达到平衡来实现的。当细胞从细胞外基质脱离后,正常的细胞会发生失巢凋亡(anoikis)。"anoikis"在希腊语中为无家可归,而肿瘤细胞渐渐丧失了这种特性。恶性肿瘤的侵袭和转移依赖于肿瘤细胞在离开原发部位后能长时间保持存活,因此失巢凋亡能力的获得被认为是恶性肿瘤进行侵袭、转移的先决条件。有15%~20%的患者在临床诊断为骨肉瘤时,使用常规的临床检查手段就可发现肺转移;约有50%的患者在治疗的各阶段出现肺转移[1]。骨肉瘤肺转移是临床患者死亡的主要原因。本实验通过骨肉瘤细胞的悬浮培养获得失巢凋亡抵抗的细胞,为探讨抗失巢凋亡机制和治疗学研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

ploy-HEMA(poly2-hydroxyethyl methacrylate 聚羟乙基异丁烯酸)、二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司,DMEM/F12培养

作者简介:温 磊,女,湖北省武汉市人,硕士研究生,主要从事骨肿瘤发生机制方面的研究。电话:13228683715

通信作者:郭乔楠, E-mail: qiaonan85@263.net

收稿日期:2007-10-17;修回日期:2008-01-06

基、胰蛋白酶购自 Gibco 公司,小牛血清购自兰州民海公司,AO、EB 为 Fluka 公司产品,Transwell 小室为 Corning 公司产品,MTT 为 Ameresco 公司产品。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞培养　　所用细胞株为人永生化成骨细胞(hFOB1. 19)经恶性转化建立的恶性细胞系[2]。用含 10% 小牛血清 DMEM/F12 培养基置于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的环境培养。

1.2.2　骨肉瘤失巢凋亡抵抗细胞的获得　　悬浮培养法:将 poly-HEMA 用 95% 乙醇配成浓度为 50 mg/ml 的溶液。5 mg/cm^2 包被培养板,无菌干燥过夜,使用前在紫外灯下照射 30 min。将转化细胞用胰酶消化,制成悬液加入处理好的板中。每孔约 5×10^5 个细胞[3]。在此条件下悬浮培养孵育细胞,隔日换液。经过 14 d 的悬浮培养后,将细胞收集转移至普通培养瓶中,使其生长成为单层。

1.2.3　细胞增殖活性的检测　　实验分 2 组,分别为转化细胞和经悬浮 14 d 后再次贴壁细胞,按 8 000/孔分别加入 2 个 96 孔板中,补加 DMEM/F12 培养基(含 10% 的小牛血清)至每孔的液体总量为 200 μl 预设,每天检测 4 个重复孔和 1 个不加入细胞悬液且其他处理均相同的空白孔,共 6 d。待第 2 天贴壁后开始逐日每孔加入 10% 的 MTT 溶液(20 μl),在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 3 h,吸出液体,加入 DMSO 200 μl/孔,室温下震荡 10 min。空白孔调零,读取吸光度值[D(490)]。

1.2.4　凋亡流式细胞仪检测　　将转化细胞和经过悬浮 14 d 再次贴壁的细胞分别用浓度为 0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA)的消化液消化,500 r/min,离心 5 min。加入用 poly-HEMA 包被好的 6 孔板,步骤同 1.2.2。收获 24、48、72 h 和 14 d 时细胞。用 PBS 洗 2 遍,75% 的冰乙醇固定,流式细胞仪检测。

1.2.5　透射电镜观察凋亡　　将悬浮了 3 d 的细胞收集在尖底 EP 管内,800 r/min 离心 10 min,去上清,用 2.5% 戊二醛固定液固定,4 ℃冰箱静置 2 h 后,常规透射电镜制样观察。

1.2.6　吖啶橙/溴乙锭(AO/EB)荧光染色观察细胞凋亡　　配制 AO/EB 染料:精确称取 AO、EB 各 1 mg,分别溶于 10 ml pH 7.2 PBS 中,配成 100 μg/ml 的储备液,用前等量混合,备用。AO/EB 染色及观察结果:取悬浮培养 3 d 的转化细胞离心,500 r/min 离心 5 min,加培养基轻轻吹打均匀,然后取该细胞悬液 100 μl,加入 AO/EB 染料 4 μl 混匀,置 1 滴于载玻片,上覆盖玻片,荧光显微镜下观察。

1.2.7　Transwell 小室检测细胞迁移能力　　将培养的转化细胞和悬浮后再次贴壁后的细胞分别消化,500 r/min 离心5 min。在其中加入无血清 DMEM/F 12 培养基,细胞计数板调整 2 种细胞悬液密度至相同。本次实验最终为 2 种细胞均数为 3.3×10^5 ml^{-1}。在 Transwell 小室的上室中加入细胞 100 μl 和 100 μl 的无血清培养基(相当于终浓度为 1.65×10^5)。在下室加入 600 μl 含有 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基。将放有小室的 24 孔板在 37 ℃、5% CO_2 浓度的孵箱中 24 h。孵育结束后,吸干上室,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗 2 次,苏木精染色 2 min,ddH_2O 充分漂洗,然后用湿棉签拭去上方未迁移的细胞。用刀片将膜切下,在 40、100、400 倍光学显微镜下照相。

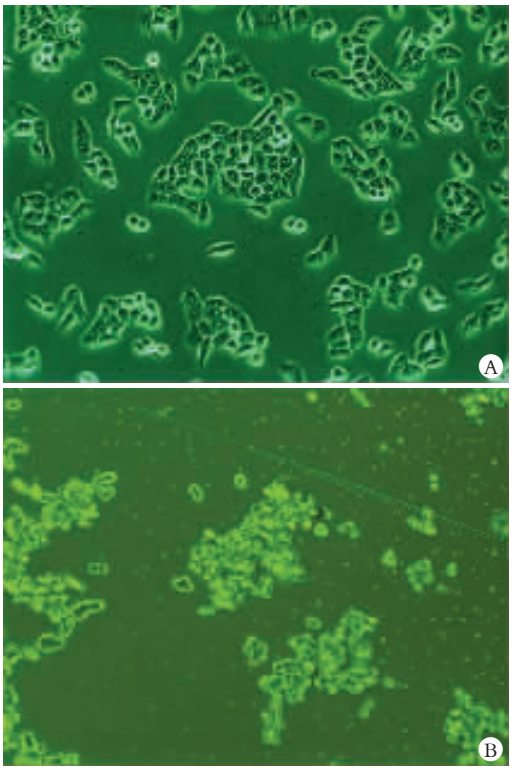
1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行配对 t 检验。

2　结果

2.1　悬浮培养后细胞形态学改变

悬浮培养后细胞形态学发生了明显改变,表现为细胞体积变小,细胞由多角形变为圆形,细胞成团悬浮生长(图 1)。



A:人永生化成骨细胞(hFOB1.19)经恶性转化建立的恶性细胞系;
B:在 poly-HEMA 处理的培养板上悬浮处理中的细胞

图 1　悬浮培养前后细胞形态观察　(倒置显微镜 ×400)

2.2　细胞凋亡的荧光检测结果

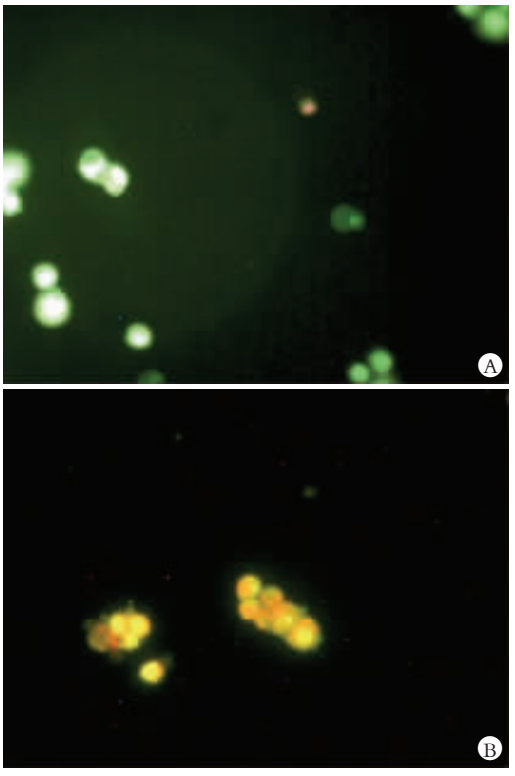
经过 AO/EB 染色后,在荧光显微镜下观察到细胞凋亡形态。AO 能透过细胞膜完整的细胞,嵌入细胞核 DNA,使之发出明亮的绿色荧光。EB 仅能透过细胞膜受损的细胞,嵌入细胞核 DNA,发橘红色荧光。未发生凋亡的细胞饱满,细胞膜光滑,发光均匀,为完整、圆形的绿染的细胞核。早期凋亡的细胞形状不规则,为固缩状或囊泡状绿色,也有完整的细胞核,晚期凋亡的细胞呈完整或不完整的橙红色细胞(图 2)。

2.3　细胞凋亡的流式细胞仪检测结果

细胞凋亡率随着悬浮时间的延长持续升高,24 h 凋亡率为 3.67%,48 h 为 4.29%,72 h 达到 9.31%。14 d 时凋亡率为 23.71%。取 14 d 细胞进行贴壁培养后再次悬浮,取 24、48、72 h 的细胞,发现凋亡率降低,分别为 3.19%、2.38% 和 3.25%。见图 3。

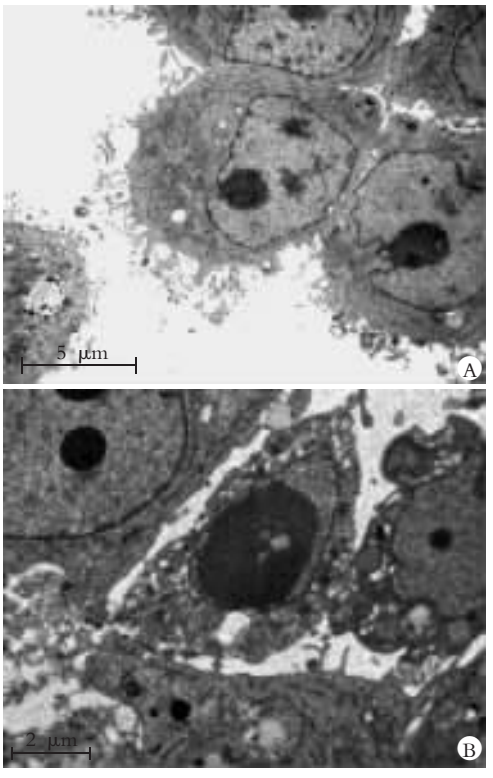
2.4　细胞凋亡的电镜观察结果

未发生凋亡的细胞可见核仁清楚,核仁大,核浆比例增大;凋亡细胞可见细胞皱缩,细胞质芽突并脱落。



A:未发生凋亡转化细胞;B:发生了晚期凋亡的转化细胞

图2 AO/EB法检测细胞凋亡情况 (荧光显微镜×400)



A:未发生凋亡的细胞;B:凋亡细胞

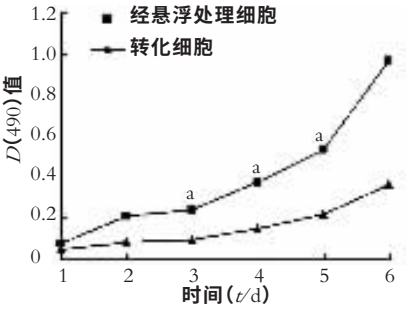
图3 悬浮3 d细胞的透射电镜观察结果

2.5 悬浮培养后细胞增殖活性检测

MTT法检测转化细胞和悬浮14 d细胞的增殖能力,结果表明处理组的增殖能力明显增强,在潜伏期和对数生长期皆如此。在对数生长期细胞增殖很快(图4)。

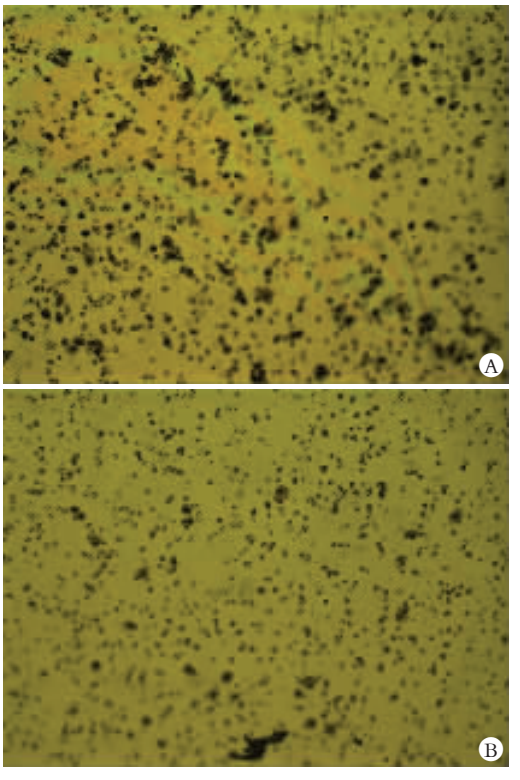
2.6 失巢凋亡抵抗细胞迁移能力检测

实验共用了8个小室,转化细胞4个,经悬浮处理细胞4个,每个小室在400倍视野下拍照5张,每个小室取5个视野,平均每个视野的细胞数:转化细胞为(1.05±0.60),悬浮处理细胞为(4.35±1.50)。2组数据行配对样本t检验,具有显著差异($P<0.05$,图5)。



a:$P<0.05$,与转化细胞比较

图4 悬浮处理细胞和转化细胞增殖能力的比较



A:悬浮处理组;B:普通转化组

图5 悬浮处理细胞和转化细胞迁移能力光镜观察结果 (×100)

3　讨论

失巢凋亡是指细胞在脱离细胞外基质黏附后发生的凋亡,而肿瘤细胞在渐渐丧失这种特性。肿瘤转移包括了肿瘤在原发部位发生侵袭,在血流中的生存和在远处侵袭生长[4]。能够在细胞通过血道或淋巴道转移时脱离基质的生存是转移中的关键步骤[5]。故发生失巢凋亡抵抗被认为和肿瘤转移有关。由于不正确的基质会和失去基质黏附一样使得细胞发生失巢凋亡[6],细胞到了远处组织器官后还是需要有抗失巢凋亡的能力。失巢凋亡可以说是肿瘤转移中的屏障。凋亡抵抗,包括失巢凋亡抵抗是肿瘤转移事件中的早期事件。

目前建立失巢凋亡模型的方法有两种:一种是利用软琼脂培养基培养,这种培养基能较好地将细胞与细胞间的联系暂时中断,但是当单个细胞增殖后细胞间的信号传递可以再次建立;另一种是本实验用的聚羟乙基异丁烯酸处理过的培养皿进行细胞的悬浮培养,可较好地模拟细胞在体内的失巢环境,但是一部分悬浮培养的单个细胞在培养过程中会重新聚集成团,建立细胞间联系[7],这点在本实验中也有发现(图 1B)。我们的实验结果和国外学者实验结果相比,转化株的失巢凋亡率要低,可能原因是细胞恶性转化株已经有造成失巢凋亡抵抗现象的各种改变产生,并经过了软琼脂锚着非依赖性生长实验鉴定,“转化的细胞部分呈现出锚着不依赖性生长”[2]。

本实验结果表明,在失巢凋亡抵抗细胞发生了较明显生物学变化,这些变化包括抗失巢凋亡、增殖和迁移可能存在共同的分子或基因水平变化,如鳞状细胞癌的研究结果表明 CTTN (EMS1)的过表达,通过同时增强细胞的抗失巢凋亡能力和迁移能力对于鳞状细胞癌的转移有促进作用[8]。对 TrkB 的研究发现其过度表达能驱动凋亡抵抗,肿瘤生成,侵袭和肿瘤细胞转移[9,10]。文献[11]认为,获得失巢凋亡抵抗能力不仅与细胞脱离细胞外基质后能够生存有关,还使得细胞能够迁移、侵袭,最终成功的转移至其他部位,有些关键的分子不仅参与了失巢凋亡抵抗,更和细胞转移,定植和增殖相关。一些原癌基因如 ras、β-catenin、上皮生长因子受体和 ErbB2 的表达能够使得原本不发生转移的细胞拥有抗失巢凋亡能力。其中 Ras 能够使得促进凋亡的 BAK 蛋白下调,而使得 Bcl-Xl、cIAP2 和 XIAP 等抑制凋亡的蛋白水平上调[12]。文献[5]中尝试以此为靶点使用 XIAP 拮抗剂等进行动物实验。肿瘤抑制基因 PTEN 维持细胞的锚定依赖性生长,当肿瘤自原发肿瘤分离脱落迁移扩散后,PTEN 诱导肿瘤细胞失巢凋亡,减少了浸润转移的可能性[12,13]。骨肉瘤上对于失巢凋亡机制的研究较少。获得骨肉瘤失巢凋亡抵抗株,为进一步了解其分子和基因水平改变打下基础,包括在癌中的关键调控点是否可用于肉瘤或骨肉瘤有无特异的失巢凋亡抵抗相关基因,寻找到有效和对正常生理功能影响小的治疗靶点。肿瘤细胞在模拟失巢凋亡情况后,抗失巢凋亡又有显著提高,并且伴有便于肿瘤转移的特性如增殖能力和迁移能力增强。由于对于失巢凋亡抵抗分子机制的研究多集中在上皮来源肿瘤,对肉瘤研究较少。通过本实验获得的骨肉瘤失巢凋亡抵抗细胞模型的诸多改变十分有利于肿瘤转移。基于此模型探索肉瘤失巢凋亡抵抗发生中的分子水平改变有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 吴苏稼. 成骨肉瘤肺转移的研究现状[J]. 江苏医药, 2006, 32(2): 160 - 162.

[2] 孟　刚, 李　懿, 辛　榕, 等. 人永生化成骨细胞 hFOB1. 19 恶性转化的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(5): 380 - 383.

[3] Diaz-Montero C M, McIntyre B W. Acquisition of anoikis resistance in human osteosarcoma cells[J]. Eur J Cancer, 2003, 39(16): 2395 - 2402.

[4] Steeg P S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges[J]. Nat Med, 2006, 12(8): 895 - 904.

[5] Berezovskaya O, Schimmer A D, Glinskii A B, *et al*. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2378 - 2386.

[6] Gilmore A P. Anoikis[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(Suppl 2): 1473 - 1477.

[7] 苏立新, 张陈平. 肿瘤失巢凋亡的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2006, 33(5): 387 - 389.

[8] Luo M L, Shen X M, Zhang Y, *et al*. Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance [J]. Cancer Res, 2006, 66(24): 11690 - 11699.

[9] Geiger T R, Peeper D S. The neurotrophic receptor TrkB in anoikis resistance and metastasis: a perspective[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7033 - 7036.

[10] Douma S, Van-Laar T, Zevenhoven J, *et al*. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB[J]. Nature, 2004, 430(7003): 1034 - 1039.

[11] Rennebeck G, Martelli M, Kyprianou N. Anoikis and survival connections in the tumor microenvironment: is there a role in prostate cancer metastasis? [J]. Cancer Res, 2005, 65(24): 11230 - 11235.

[12] Liu Z, Li H, Wu X, *et al*. Detachment-induced upregulation of XIAP and cIAP2 delays anoikis of intestinal epithelial cells[J]. Oncogene, 2006, 25(59): 7680 - 7690.

[13] 朱宝和, 刘　弋. PTEN 基因与肿瘤浸润转移[J]. 国外医学:肿瘤学分册, 2004, 31(10): 739 - 741.

(编辑　汪勤俭)