·论 著·

两种人抗失巢凋亡骨肉瘤细胞模型建立方法的比较

张 伟[1,2],曾 静[1],郭乔楠[1] (1.第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038;2.中国人民解放军62121部队卫生所,陕西 西安 710086)

[摘 要] **目的** 比较琼脂糖平铺法与poly-HEMA包被法悬浮培养人骨肉瘤细胞建立人抗失巢凋亡骨肉瘤细胞模型的异同和优劣。**方法** 选择hFOB1.19恶性转化细胞和SaOS-2骨肉瘤细胞,分别采用琼脂糖平铺法和poly-HEMA包被法进行悬浮培养建立人抗失巢凋亡骨肉瘤细胞模型,倒置相差显微镜、透射电子显微镜观察悬浮培养后细胞的形态学改变。**结果** 琼脂糖平铺法悬浮培养人骨肉瘤细胞可成功建立人抗失巢凋亡骨肉瘤细胞模型,且与poly-HEMA包被法相比较,琼脂糖平铺法价格经济、操作容易、效果更优。**结论** 琼脂糖平铺法悬浮培养细胞建立抗失巢凋亡细胞模型更适用。

[关键词] 骨肉瘤;失巢凋亡;模型;细胞培养

[中图分类号] Q318.11; Q243; R738.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)02-0077-03

Comparison between two methods in establishing human anoikis-resistant osteosarcoma cell models

ZHANG Wei, ZENG Jing, GUO Qiao-nan (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To compare features, advantages and disadvantages of two anti-adhesion cell culture methods by covering agarose and coating poly-HEMA on cell culture plates in establishing human anoikis-resistant osteosarcoma cell models, respectively. **Methods** A malignant transformed hFOB1.19 cell lines and SaOS-2 osteosarcoma cell lines were cultured in the cell culture plates covered with a layer of agarose and poly-HEMA, respectively. Inverted phase contrast microscopy and transmission electron microscopy were used to observe their morphological changes. **Results** A human anoikis-resistant osteosarcoma cell model had been established successfully by anti-adhesion cell culture method by covering a layer of agarose on cell culture plate. And this method was economical, easy-operating, and effective, comparing with the one by coating poly-HEMA. **Conclusions** The anti-adhesion cell culture method by covering agarose on cell culture plates is more applicable than by coating poly-HEMA in establishing human anoikis-resistant osteosarcoma cell models.

Keywords: osteosarcoma; anoikis-resistant; model; method

失巢凋亡是指正常细胞失去细胞与细胞外基质间接触而引起的细胞凋亡[1],而有一些细胞,例如恶性肿瘤细胞,失去和细胞外基质间的接触则不会发生凋亡,这些细胞就具有抗失巢凋亡能力[2-3]。该领域的研究者常采用阻止细胞贴壁的悬浮培养手段来建立抗失巢凋亡细胞模型,较常用的方法有琼脂糖平铺法与poly-HEMA包被法两种[4]。笔者采用琼脂糖平铺法与poly-HEMA包被法进行比较,以期寻找出更优的抗失巢凋亡细胞模型建立方法。

1 材料与方法

1.1 设备及试剂

离心机(Sigma)、超净工作台(AIRTECH)、倒置显微镜(Olympus)、细胞培养箱(Form)、烤箱、普通细胞培养器材一套、六孔细胞培养板(Costar)、直径10 cm玻璃培养皿若干个、PBS液(中杉金桥)、含10%小牛血清(兰州民海)的高糖DMEM培养液(Gibco)、胰蛋白酶(Difco)、EDTA-2Na(汕头光华化学)、琼脂糖(Sigma)、poly-HEMA(Sigma)、95%乙醇(成都金山化工)、hFOB1.19人永生化成骨细胞恶性转化细胞[5](本课题组建立)、SaOS-2骨肉瘤细胞(ATCC)。

1.2 培养皿的处理

1.2.1 琼脂糖平铺法 采用1 g琼脂糖和100 mL PBS配成1%的琼脂糖PBS悬液,高压锅灭菌两次,从高压锅取出后置于超净工作台内冷却到60 ℃(仍为液态),移液管吸取琼脂糖PBS溶液平铺于灭菌处理过的培养皿底部(直径10 cm的培养皿加入琼脂糖溶液约5 mL,六孔培养板每孔加入琼脂糖溶液约2 mL),待冷却形成凝胶即用。剩余的琼脂糖溶液,如本次操作

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30971139);重庆市科委自然科学基金资助项目(CSTC,2009BA5009)

[作者简介] 张 伟(1973-),女,黑龙江省哈尔滨市人,主治医师,硕士,主要从事肿瘤病理学方面的研究。电话:13571998508;曾 静,女,硕士研究生,并列第一作者,电话:(023)68754433

[通讯作者] 郭乔楠,教授,电话:(023)68754433,E-mail:qiaonan85@263.net

[收稿日期] 2010-01-13 [修回日期] 2010-01-30

无污染，可储存于 50 ℃烤箱内（该温度琼脂糖仍为液态），下次取出即可使用[5-8]。

1.2.2 poly-HEMA 包被法 称取适量的 poly-HEMA 溶于 95% 乙醇，制成 30 mg/mL 的 poly-HEMA 乙醇溶液。由于 poly-HEMA 较难溶，可在加热板上轻度加热、玻棒剧烈搅拌直至肉眼观似胶水状、无未溶颗粒为止。该过程 30 ~ 60 min。然后室温冷却 30 min，观察无乙醇蒸发的气泡（否则包被的培养皿板底极易出现气泡样结构，细胞采图背景不清晰）。于超净工作台内用移液管吸取约 5 mL 的 poly-HEMA 乙醇溶液放入培养皿中（六孔培养板每孔加入 2 mL），用手周期性地摇动培养皿，以使之均匀包被。静置培养皿，开起超净工作台风机，加速乙醇蒸发，使之干燥。约 45 min 后，观察培养皿底部已干燥至完全透明时，再向培养皿内加入 5 mL poly-HEMA 乙醇溶液（六孔培养板每孔加入 2 mL），以填补第一次包被时未覆盖上 poly-HEMA 的空隙，重复上述步骤。处理好的培养皿可用封口胶密封，储存于 4 ℃冰箱内（尽量两周内使用）。使用前用 1 × PBS 洗 3 遍，于超净工作台内紫外线照射消毒 1 h[1,9-13]。

1.3 骨肉瘤细胞的悬浮培养

消化对数生长期贴壁的 hFOB1.19 人胚永生化成骨细胞恶性转化细胞和 SaOS-2 骨肉瘤细胞，制成 1×10^6/mL 的单细胞悬液，取 5 mL 细胞悬液加入分别用琼脂糖平铺法和 poly-HEMA 包被法处理的培养板或培养皿中，37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱内培养，隔日换液[8,13]。

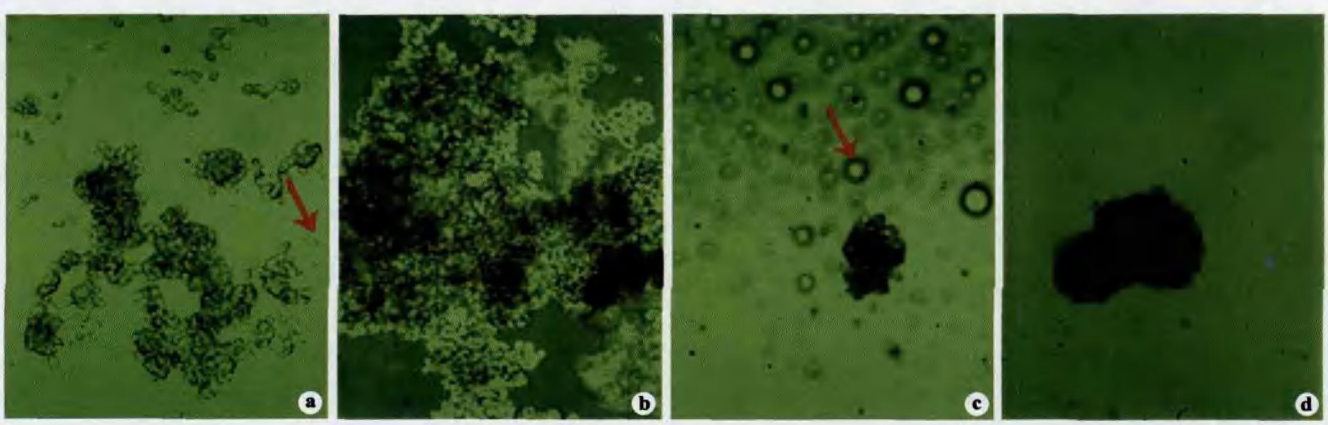
1.4 细胞形态学观察

采用倒置相差显微镜观察两种方法悬浮培养 72 h 后细胞的形态学改变。透射电子显微镜观察细胞凋亡的情况。

2 结果

2.1 两种方法悬浮培养 72 h 的细胞形态学对比

poly-HEMA 包被法悬浮培养 hFOB1.19 永生化成骨细胞恶性转化细胞 72 h（图 1a），可见细胞呈团簇状，但已出现细胞贴壁现象（图中箭头所示）。琼脂糖平铺法悬浮培养 hFOB1.19 永生化成骨细胞恶性转化细胞 72 h（图 1b），细胞亦呈团簇状，但无细胞贴壁现象，且背景清晰。poly-HEMA 包被法悬浮培养 SaOS-2 骨肉瘤细胞 72 h（图 1c），背景中出现大量气泡（图中箭头所示）。琼脂糖平铺法悬浮培养 SaOS-2 骨肉瘤细胞 72 h（图 1d），细胞呈紧密团簇状，无细胞贴壁现象，背景清晰。



a：poly-HEMA 包被法悬浮培养 hFOB1.19 永生化成骨细胞恶性转化细胞 72 h；b：琼脂糖平铺法悬浮培养 hFOB1.19 永生化成骨细胞恶性转化细胞 72 h；c：poly-HEMA 包被法悬浮培养 SaOS-2 骨肉瘤细胞 72 h；d：琼脂糖平铺法悬浮培养 SaOS-2 骨肉瘤细胞 72 h

图 1 两种方法悬浮培养细胞倒置显微镜观察

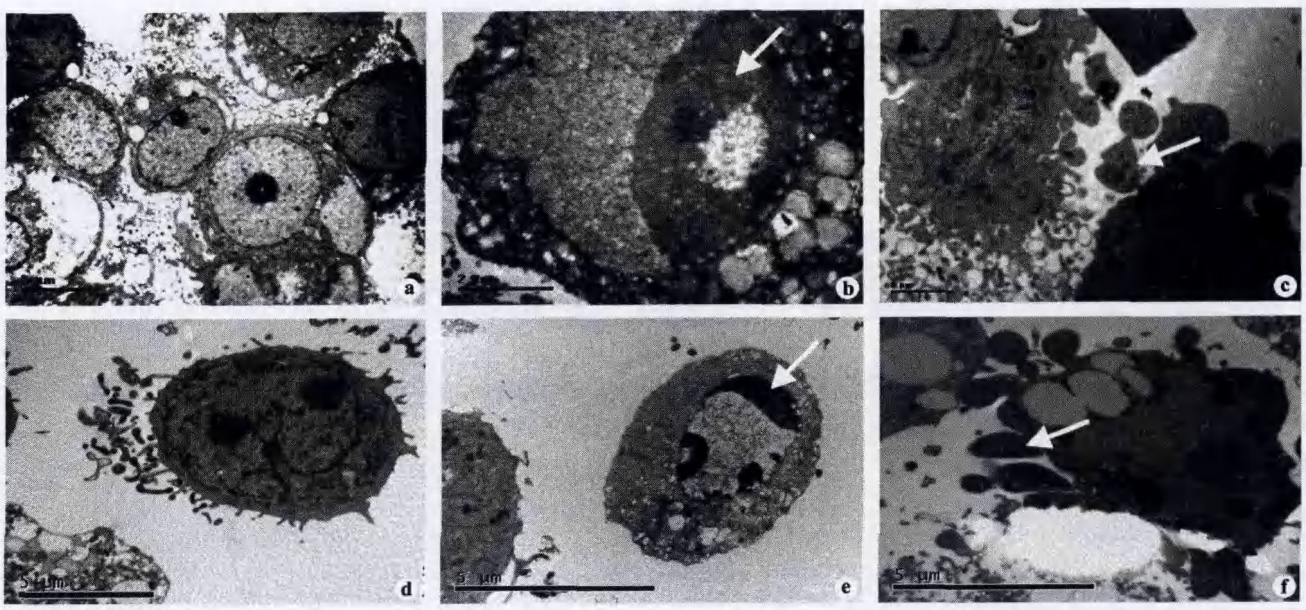
2.2 细胞凋亡的透射电镜观察

透射电镜观察 poly-HEMA 包被法悬浮培养 hFOB1.19 永生化成骨细胞恶性转化细胞的正常细胞（图 2a）、早期凋亡细胞（图 2b）和晚期凋亡细胞（图 2c），可见早期凋亡细胞染色质浓缩成半月形附于核膜（图 2b），晚期凋亡细胞脱落的凋亡小体（图 2c）。琼脂糖平铺法悬浮培养 hFOB1.19 永生化成骨细胞恶性转化细胞的正常细胞（图 2d）、早期凋亡细胞（图 2e）和晚期凋亡细胞（图 2f）透射电镜观察，可见早期凋亡细胞染色质浓缩成半月形附于核膜（图 2e），晚期凋亡细胞脱落的凋亡小体（图 2f）。

3 讨论

抗失巢凋亡是肿瘤细胞具有转移能力的重要标志。将肿瘤细胞悬浮培养是建立抗失巢凋亡模型的重要手段。目前常用的悬浮培养方法有两种，即 poly-HEMA包被法和琼脂糖平铺法。poly-HEMA 包被法是国外研究者悬浮细胞培养较常用的方法，它利用 poly-HEMA不带电荷的特性，使细胞不能贴壁，从而达到悬浮生长的目的。由于用于悬浮培养细胞的poly-HEMA 多为从国外进口产品，因此，poly-HEMA 包被法价格较昂贵；且操作步骤繁杂，耗费时间较长；操作中稍不注意，会有气泡产生，影响细胞采图效果；或遗漏未包被的空隙，则会产生细胞贴壁的现象。而琼脂糖平铺法同样

可以成功建立抗失巢凋亡细胞模型。由于琼脂糖不含带电荷的基团,将其平铺于培养皿底,细胞在这种处理的培养皿中生长,无法贴壁,从而达到悬浮培养的目的。



a: poly-HEMA 包被法,正常细胞; b: poly-HEMA 包被法,早期凋亡细胞,染色质浓缩成半月形附于核膜(↑); c: poly-HEMA 包被法,晚期凋亡细胞,脱落的凋亡小体(↑); d: 琼脂糖平铺法,正常细胞; e: 琼脂糖平铺法,早期凋亡细胞,染色质浓缩成半月形附于核膜(↑); f: 琼脂糖平铺法,晚期凋亡细胞,脱落的凋亡小体(↑)

图2 两种方法悬浮培养 hFOB1.19 恶性转化细胞透射电镜观察

国内一些研究者常采用该法悬浮培养细胞。所使用的琼脂糖价格便宜,培养方法操作步骤简单,一次性配好高温消毒后,储存于适当温度,即可取出使用,时效性好;而且对比悬浮培养细胞的效果,该法更优。通过对两种建立抗失巢凋亡模型方法的比较实验,本文认为,琼脂糖平铺法悬浮培养细胞建立抗失巢凋亡细胞模型更适用。

[参考文献]

[1] Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis[J]. J Cell Biol, 1994,124(4):619-626.

[2] Ramachandra M, Atencio I, Rahman A, et al. Restoration of transforming growth factor Beta signaling by functional expression of smad4 induces anoikis [J]. Cancer Res, 2002,62(21):6045-6051.

[3] Zhu Z, Sanchez-Sweatman O, Huang X, et al. Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells[J]. Cancer Res, 2001,61(4):1707-1716.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 李建军,蒋 勇,胡绍毅,等. 三维或单层培养结肠癌 HT-29 细胞药物敏感性及生物学特性的变化[J]. 第三军医大学学报,2005,27(17):1760-1762.

[7] 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.

[8] Luo ML, Shen XM, 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] Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001,13(5):555-562.

[10] Geiger TR, Peeper DS. Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis[J]. Cancer Res, 2007,67(13):6221-6229.

[11] Mawji IA, Simpson CD, Hurren R, et al. Critical role for Fas-associated death domain-like interleukin-1-converting enzyme-like inhibitory protein in anoikis resistance and distant tumor formation[J]. J Natl Cancer Inst, 2007,99(10):811-822.

[12] Diaz-Montero CM, McIntyre BW. Acquisition of anoikis resistance in human osteosarcoma cell[J]. Eur J Cancer, 2003,39(16):2395-2402.

[13] 温 磊,孟 刚,李 懿,等. 人骨肉瘤抗失巢凋亡细胞的生物学特性研究[J]. 第三军医大学学报,2008,30(10):942-945.

(编辑:余汇洋)