

神经母细胞瘤裸鼠原位荷瘤细胞系与转移瘤细胞系生物学异质性分析



李富江¹ 鹿洪亭² 董 蓓³

【摘要】 目的 利用本实验室建立的神经母细胞瘤体外细胞系,建立神经母细胞瘤荷瘤鼠原位荷瘤与转移瘤模型,并用原位荷瘤及转移瘤分别建立细胞系,比较原位荷瘤及转移瘤的差异,从而验证神经母细胞瘤的肿瘤异质性。**方法** 利用本实验室建立的神经母细胞瘤细胞系,制备单细胞悬液,通过Typlan 细胞计数法,调整细胞浓度为 $1 \sim 9 \times 10^7/\text{mL}$ 。接种于裸鼠皮下,建立荷瘤鼠原位荷瘤与转移瘤模型,并用原位荷瘤及转移瘤分别建立细胞系,通过细胞生长的测定、软琼脂克隆形成以及免疫组织化学检测和裸鼠成瘤实验等方法,比较两种细胞系的差异。**结果** 在原位荷瘤及转移瘤细胞株中,转移瘤细胞株在增殖能力、克隆形成能力及肿瘤细胞成瘤能力方面均明显高于原位荷瘤细胞株。**结论** 裸鼠原位荷瘤及转移瘤两株细胞具有明显差异,证明神经母细胞瘤肿瘤具有异质性,这种异质性可能是神经母细胞瘤转移的重要原因。

【关键词】 神经母细胞瘤;生物学;小鼠;动物实验

Neuroblastoma nude mice with metastases in situ tumor-burdened cell lines biological heterogeneity analysis. LI Fu-jiang, LU Hong-ting, DONG Qian. Pediatric surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, 16 Jiangsu road, Qingdao, Shandong, 266003, Corresponding author: Dong Qian, E-mail: 18661801885@163.com

【Abstract】 Objective Use of neuroblastoma cell lines established in our laboratory, neuroblastoma tumor bearing rat orthotopic tumor and metastatic tumor models are established. Based on the cell lines with the situ tumor and metastatic tumor, differences between situ tumor and metastatic tumor are compared to verify the tumor heterogeneity of neuroblastoma. **Methods** Use of neuroblastoma cell lines established in our laboratory, we prepare single cell suspension, and the cell concentration is adjusted to $1 \sim 9 \times 10^7/\text{mL}$ through the Typlan cell count method. Then the tumor cell is inoculated subcutaneously in nude mice, and neuroblastoma tumor bearing rat orthotopic tumor and metastatic tumor models are established. Finally, making use of the cell lines with the situ tumor and metastatic tumor, we compare the differences of two cell lines via the cell growth assay, soft agar colony formation, immunohistochemical detection, tumor formation in nude mice and other methods. **Results** For situ tumor and metastatic tumor cell lines, the proliferation ability, colony formation ability and tumorigenic ability of metastatic tumor cells are significantly higher than situ tumor cell lines. **Conclusions** Two cell lines have significant differences between nude mice bearing tumor and metastasis tumor. It is verified that the neuroblastoma has tumor heterogeneity and the neuroblastoma metastasis probably caused by the heterogeneity.

【Key words】 Neuroblastoma; Biology; Mice; Animal Experimentation

侵袭和转移是恶性肿瘤最重要的特征之一,它是一个多阶段复杂的过程,受许多特殊基因的调控,它们或被激活,或被抑制,相互协同或拮抗,最终影

响肿瘤细胞的生物学特性。已有许多文献报道同一肿瘤组织中不同肿瘤细胞的侵袭性、转移能力有差别,即肿瘤细胞存在异质性。肿瘤细胞的异质性是恶性肿瘤的重要特征之一。研究肿瘤细胞异质性及其所导致的肿瘤细胞生物学行为的改变,对了解肿瘤细胞的生物学特性及其和转移之间的关系有重要意义。本研究建立神经母细胞瘤荷瘤鼠原位荷瘤与转移瘤模型,并用原位荷瘤及转移瘤分别建立细胞

系,发现两株细胞系存在异质性,运用细胞生物学的手段,检测两种细胞株的体外增殖能力、细胞周期、克隆形成能力及肿瘤细胞成瘤能力的差异,并对其异质性在分子基础上进行初步探讨。

材料与方法

一、细胞株和小鼠

人神经母细胞瘤细胞系由本研究室保存,细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 在 5% CO₂、37 ℃ 条件下培养。小鼠 SPF 级近交系 BALB/nude 系,6~8 周龄,体重 1 820 g,雌雄均购自上海斯莱克动物有限公司(原中科院上海试验动物中心)。

二、材料与设备

DMEM 购自 Gibson 公司,胎牛血清购自 Life Technologies 公司,胰酶购自 Gibco 公司,DEPC 购自上海生工公司,SuperArray 公司生产的 TrueLabeling-AMP 线性 RNA 扩增试剂盒;SuperArray 公司生产的 No. OHS-028(人)Oligo Tumor Metastasis Microarray 肿瘤转移基因芯片;Ambion 公司生产的 Message-AmpTMIIaRNA Kit, TRIZOL® 试剂(Invitrogen life technologies)。

三、形态学观察

1. 倒置相差显微镜观察:将细胞传代于底部铺有载玻片的培养皿中,培养 24 h,使细胞获得良好的贴壁,取出载玻片。

2. 透射电镜观察:于不同培养时间取样,用 2.5% 戊二醛于 4 ℃ 固定 3 d,加入 2% BSA,再用 1% 锇酸于 4 ℃ 固定过夜。固定脱水后用树脂包埋并在 70 ℃ 聚合 7 h。超薄切片放在 150 目铜网上。用 Philips CM120 透射电镜检测,加速电压为 80 kV。

四、细胞生长的测定(MTT 法)

将原位荷瘤及转移瘤细胞消化后,调整至 3×10^4 的细胞密度,以 1 mL/L 分别接种于 3 cm 的培养皿中,2 d 换液,连续培养 7 d,每日各取 3 个计数,取平均值作为结果。设 3 个平行孔,实验重复 3 次,计算平均值。将实验结果制成细胞生长曲线图。

五、软琼脂克隆形成实验

将原位荷瘤及转移瘤细胞系分别取对数期生长细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液,活细胞计数,离心浓缩,调整细胞浓度为 1×10^3 细胞/mL,将其接种于 24 空板中的软琼脂中,置于 CO₂ 培养箱,37 ℃,5% CO₂ 及饱和湿度环境下培养 2~3 周。把培养板放置于倒置显微镜上,计数直径 > 75

μm 或含 50 个细胞以上的克隆(计数克隆),计算形成率。

六、制备荷瘤及转移瘤强胞

取对数生长期荷瘤及转移瘤细胞,调整细胞的初浓度至 1×10^4 个/mL 并加入 24 孔板,每孔 2 mL,细胞贴壁后加入不同剂量的槲皮素,使其终浓度为 15 μmol/L,30 μmol/L,60 μmol/L,每孔容量均为 2 mL,每个浓度设 2 个复孔,不加药为对照组。培养 24 h 收获细胞,10 mL PBS 洗涤 3 次,1 000 r/min,持续 5 min,弃上清液,加入 100 μL PI 染液 50 μg/mL,置入温箱内避光 40 min,放入 4℃ 冰箱过夜,上流式细胞仪,经 MODFIT 软件去除细胞碎屑后检测周期分布及细胞凋亡,Cel-IQuest 软件记录、分析实验结果,以上实验重复 3 次。

七、裸鼠成瘤实验

将原位荷瘤及转移瘤细胞亚群用无菌技术接种至裸鼠右侧背部皮下,每个亚群接种每只裸鼠的细胞总数均为 2×10^4 个,每隔 3 d 观察皮下肿瘤的生长情况。

八、原位荷瘤及转移瘤基因芯片差异表达

采用 SuperArray 系列 Oligo Tumor Metastasis Microarray 基因芯片 4 张,分 2 组对同一细胞系建立的荷瘤鼠模型原位荷瘤及转移瘤细胞进行芯片杂交,检测发光信号,通过对图像和数据的分析,比较原位荷瘤与转移瘤的共同差异表达基因。

九、统计学处理

实验结果中数据用 SPSS 统计软件处理,进行 *t* 检验及方差分析。

结 果

一、试验鼠细胞系细胞形态学观察结果

1. 倒置相差显微镜观察:实验鼠转移瘤细胞系的细胞形态和原位荷瘤细胞系的细胞形态有一定差别,转移瘤细胞系细胞较原位荷瘤系细胞更小,形态呈更不规则形、更明显的菊团状生长,细胞核大、深染,单独分布,分化更低,细胞贴壁更紧。其它特性基本一致,见图 1、图 2。

2. 透射电镜观察:转移瘤细胞系细胞多是团簇分布,细胞之间界限清楚,胞间空隙较小。含纵行排列的微小管的外围齿状突起,有致密核心的有包膜儿茶酚胺小圆颗粒;细胞形态不规则,细胞电子密度较高,部分细胞膜呈扇蛤样,细胞膜上绒毛凸起较多。胞内细胞器较原位荷瘤细胞系细胞明显多。细

胞核极不规则,呈现分叶状,核膜皱褶,内陷很多,核膜清晰,核周隙较宽,核空多而大,皱褶周围分泌物较多,提示该种细胞代谢旺盛。胞核内异染色质及常染色质均较多,常染色质与异染色质比例较高,整个核的电子密度较高,胞浆着色较深。核周的线粒体数量较多,而形态细小,线粒体电子密度较高,线粒体的双层膜清晰,线粒体嵴凸明显,糖元颗粒较多。部分粗面内质网扩大成池,池内充满中等电子密度的细颗粒状物质。胞浆内脂滴较多,部分细胞内可见脂滴呈聚集存在。胞浆内的空泡及丝状结构较多,见图 3、图 4。

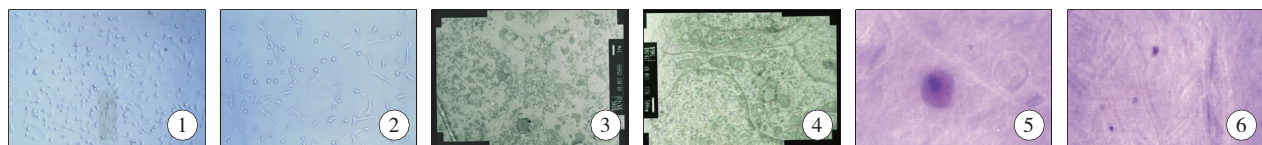


图 1 体外培养的转移瘤神经母细胞瘤细胞 ($\times 100$); 图 2 体外培养的人神经母细胞瘤细胞 ($\times 100$); 图 3 体外培养的裸鼠转移瘤人神经母细胞瘤细胞电镜图 ($\times 5000$); 图 4 体外培养的裸鼠原位荷瘤人神经母细胞瘤细胞电镜图 ($\times 5000$); 图 5 NB 转移瘤细胞在软琼脂中形成的细胞克隆,细胞数多于 50 个 ($\times 100$); 图 6 NB 原位荷瘤细胞形成的细胞克隆较小,细胞数不超过 10 个 ($\times 100$)。

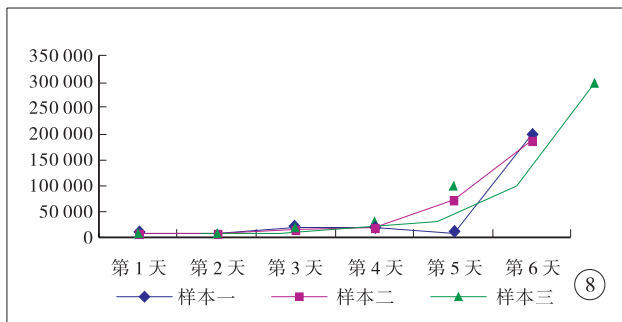
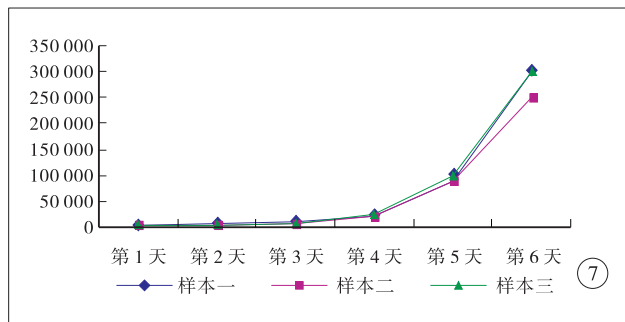


图 7 鼠神经母细胞瘤细胞原位致瘤组样本 1~3 生长曲线图 (图中横坐标代表培养细胞培养时间,纵坐标代表细胞数,下同); 图 8 鼠神经母细胞瘤细胞转移瘤组样本 1~3 生长曲线图。

经流式细胞仪检测不同转移性能的两种神经母细胞瘤细胞株的 DNA 相对含量,确定细胞周期各时相所占百分数,转移瘤与原位荷瘤细胞株比较,无论

S 期比例,还是 S + G₂M 期都高,说明其体外增殖能力较强,经 t 检验,差异有显著统计学意义 ($P < 0.05$),见图 9、图 10。

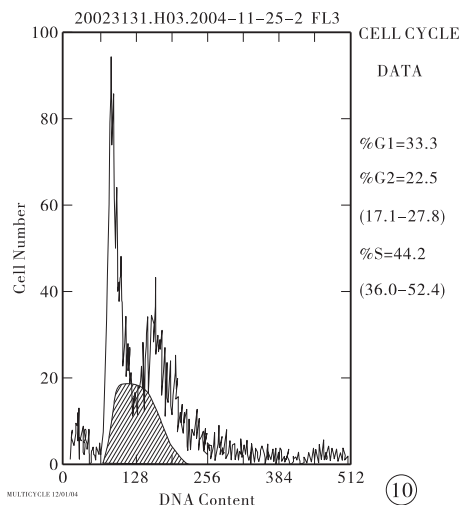
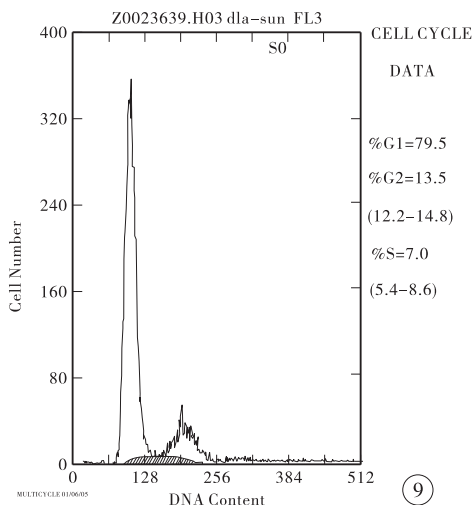


图 9 鼠神经母细胞瘤原位瘤流式细胞周期图; 图 10 鼠神经母细胞瘤转移瘤流式细胞周期图。

五、裸鼠成瘤率

接种转移瘤细胞株的裸鼠和接种原位荷瘤细胞株的裸鼠 1 个月内在皮下均形成明显的种植瘤,成瘤率均为 70% (7/10),但前者 30% 发生肝脏及腹腔转移,后者仅个别发生转移。

六、差异表达基因

在 113 个候选转移相关基因中,筛选出 10 个显著差异表达基因:表达共同上调的基因有 8 个,包括细胞黏附基因 PNN、MCAM,细胞基质金属蛋白酶 MMP3,细胞生长增殖相关基因 FGFR4(成纤维细胞生长因子跨膜受体)、IL1B、MDM2TNFSF10,凋亡相关基因 GZMA(颗粒酶 A);共同下调的基因有 MYC、TP53。转移瘤与原位荷瘤相比,转移瘤中肿瘤转移基因表达明显高于原位荷瘤组,而转移抑制基因则低于原位荷瘤组,见表 1。

表 1 神经母细胞瘤转移瘤与原位移植瘤表达谱的部分差异表达基因

GeneBank	Symbol	转移瘤/原发瘤标准值	差异表达趋势
NM_000610	CD44	1. 2432E + 0	↑
NM_000609	CXCL12	2. 3894E + 0	↑↑
NM_003467	CXCR4	1. 9144E + 0	↑
NM_002231	KAI1	5. 1660E - 1	↓
NM_004530	MMP2	1. 3320E + 0	↑
NM_002422	MMP3	3. 9908E + 0	↑↑
NM_004994	MMP9	1. 2912E + 0	↑
NM_021111	RECK	5. 9246E - 1	↓
NM_003255	TIMP2	1. 0827E + 0	↑
NM_003376	VEGF	4. 3672E + 0	↑↑

讨 论

肿瘤转移是恶性肿瘤细胞特有的生物学行为,是临床治疗恶性肿瘤非常棘手的问题,也是病人死亡的主要原因,是目前肿瘤研究的焦点问题^[4]。

转移是决定肿瘤的侵袭性及临床后果最重要的过程。原发肿瘤及其转移灶在基因含量、形式、功能以及成分上存在相当大的异质性,不能认为转移灶是其原发肿瘤简单的克隆。转移灶在与原发肿瘤不同的免疫及营养环境下生长,例如在淋巴结、肝脏、骨髓内生长,这些生长环境会影响肿瘤的形态及结构异质性,例如小肠肿瘤在肝脏的转移灶,其空间生长平面不会象原发肿瘤那样局限^[5,6]。许多临床病理研究是在原发肿瘤标本上进行的,但是一旦肿瘤切除,其中的肿瘤细胞就不再影响患者的预后,临床发展过程则主要取决于转移。只从研究生物标记物

在外科切除的原发肿瘤中的表达情况来判断临床预后后的相关性是错误的,不能认为所有原发肿瘤细胞与其转移瘤内的瘤细胞在生物学结构及功能上是一致的,这一问题常为人们所忽视。因此强调,有必要对原发肿瘤及其转移瘤的生物学情况进行详细的比较研究。

神经母细胞瘤(Neuroblastoma, NB)是小儿最常见的恶性肿瘤,其恶性程度高,早期转移多,约 60%~70% 的病例有骨髓转移,成为神经母细胞瘤患者的主要死因。进展期神经母细胞瘤虽经手术、化疗、放疗甚至骨髓移植等综合治疗,仍有很高的复发率^[7,8]。因此,探讨神经母细胞瘤的转移机制和影响因素,寻找可能的干预机制,从特性到共性重点研究,对解释整个恶性肿瘤的转移机制,具有重要意义。同时了解神经母细胞瘤骨髓转移机制也是制定新的肿瘤治疗方案的理论基础。

本课题旨在建立神经母细胞瘤原位荷瘤及转移瘤荷瘤鼠模型,从而可以在更加接近人体内环境的情况下,探讨神经母细胞瘤在人体内发生转移的规律,证明肿瘤异质性理论。

我们发现转移瘤及原位荷瘤细胞株二者的生物学性状有诸多差异,存在明显的异质性。转移瘤细胞株比原位荷瘤细胞株具有更短的群体倍增时间和更高的增殖倍数,转移瘤细胞株相对原位荷瘤细胞亚群具有更强的增值能力。癌症干细胞起源学说认为癌症干细胞虽然数目很少,但能够瘤性克隆生长,从而产生不同表型的癌细胞亚群。在癌的生物特性中,作为恶性肿瘤重要标志的成瘤能力最为关键。本实验证实转移瘤细胞株和原位荷瘤细胞株亚群的成瘤能力存在明显差异,证明两亚群细胞的成瘤能力的异质性。有理论认为,这也许是由于不同潜能的肿瘤细胞亚群与宿主组织或细胞之间相互作用,不断消长和选择组织中最具有成瘤能力的细胞竞争性存活发展的结果。肿瘤干细胞的不对称分裂,分裂后形成 2 个不对称细胞的机制才可能是肿瘤异质性的根本原因。转移瘤细胞株亚群具有较强的增值和成瘤能力。以上结果说明转移瘤细胞亚群具有基本的肿瘤干细胞特性。由于肿瘤存在 DNA 含量、细胞周期时相分布的异质性,从而导致细胞增殖能力和浸润、转移方面的差异。通过肿瘤细胞的异质性现象,人们提出了肿瘤干细胞学说^[8-10]。这一学说能解释肿瘤某些方面的行为与特性,也正在逐步为人们接受。肿瘤细胞异质性现象只有用肿瘤干细胞理论才能解释,即肿瘤干细胞在不同选择压力下,向

不同功能方向分化、成熟,造成肿瘤细胞的群体漂移,从而形成异质性。

本实验在 113 个候选转移相关基因中,筛选出多显著差异表达基因,功能涉及介导细胞黏附、凋亡及基质金属蛋白酶、细胞因子、细胞转录、细胞周期调节、细胞生长与增殖、凋亡诱导等方面。转移瘤与原位荷瘤相比,转移瘤中肿瘤转移基因表达明显高于原位荷瘤组,而转移抑制基因则低于原位荷瘤组^[11-15]。其中 CXCL12、CXCR4 在神经母细胞瘤裸鼠转移瘤中表达明显上调,且 CXCL12 呈更显著趋势。说明趋化因子 CXCL12 与其特异性受体 CXCR4 所构成的 CXCL12-CXCR4 生物学轴在神经母细胞瘤播散和器官特异性转移中发挥着重要作用。

我们成功建立神经母细胞瘤荷瘤鼠局部原位荷瘤及转移瘤模型,证实我们自己建立的神经母细胞瘤体外细胞系具有局部致瘤及转移特性,而第二次裸鼠致瘤实验鼠原位荷瘤体外细胞系主要局部致瘤,形成转移瘤较少,而鼠转移瘤细胞系接种出现较高局部致瘤率及高转移率,说明细胞系中存在具有转移潜性的细胞亚群,而此类细胞亚群正是肿瘤转移的细胞生物学基础,由此证明了肿瘤异质性理论,并为下一步探讨神经母细胞瘤转移机制奠定基础。与 Fidler 及 Yamori^[16,17] 研究结果一致,即在一个原发性恶性肿瘤细胞群体中,并不是所有瘤细胞均具有侵袭和转移能力,仅某些特殊亚群才具有转移潜能,产生转移表型。在这些具有转移潜能的肿瘤细胞亚群中,它们各自的转移潜能也不一致。

参考文献

- 1 陈鑫,董蓓,于倩倩,等. 神经母细胞瘤不同侵袭能力细胞株的建立及研究[J]. 中华小儿外科杂志,2013,34(2):86-89.
- 2 郝希伟,董蓓. 神经母细胞瘤原位荷瘤与转移瘤裸鼠模型建立的实验研究[J]. 实用医院临床杂志,2012,9(4):23-24.
- 3 王家祥,孟庆磊,张大,等. 裸鼠皮下移植人神经母细胞瘤模型的建立和 HIF-1 α 及其相关蛋白的表达[J]. 中华小儿外科杂志,2011,32(8):604-609.
- 4 张恒瑜,鹿洪亭,董蓓,等. 微小 RNA-7 对人神经母细胞瘤侵袭和转移能力的影响[J]. 中华实验外科杂志,2013,30(2):1264-1265.
- 5 Heppner GH. Tumor heterogeneity[J]. Cancer Res, 1984, 44:2259-2265.
- 6 罗远建,金科,甘青,等. 儿童神经母细胞瘤的影像学表现[J]. 临床小儿外科杂志,2007,6(2):51-53.
- 7 龚振华,川村健児,栗山裕. 神经母细胞瘤的综合治疗[J]. 临床小儿外科杂志,2005,4(2):81-84,87.
- 8 RubioD, GarciaCastroJ, Martin MC. A spontaneous human adult stem cell transformation[J]. Cancer, 2005, 65:3035-3039.
- 9 高鹏. 肿瘤干细胞-神经母细胞瘤靶向治疗新思路[J]. 中华小儿外科杂志,2012,33(10):782-785.
- 10 威士芹,肖现民. 神经母细胞瘤干细胞研究进展[J]. 中华小儿外科杂志,2010,31(7):545-547.
- 11 陈鑫,董蓓,鹿洪亭,等. RNA 干扰趋化因子受体 4 基因表达对神经母细胞瘤体外侵袭能力的影响[J]. 中华小儿外科杂志,2011,32(4):285-289.
- 12 Barnhill LM, Williams RT, Cohen O, et al. High Expression of CAI2, a 9p21-Embedded Long Noncoding RNA, Contributes to Advanced-Stage Neuroblastoma[J]. 2014, 74(14):3553-3563.
- 13 姚伟,李凯,王作鹏,等. 抑制 β -catenin 表达对神经母细胞瘤 BE2C 细胞体外增殖作用的影响[J]. 中华小儿外科杂志,2014,35(2):104-108.
- 14 潘敏,陈鑫,张虹,等. miR-34a 对神经母细胞瘤生长、侵袭和迁移的影响[J]. 中华小儿外科杂志,2014,35(5):338-342.
- 15 张蛟,刘秋亮,高敬尧. DKK1 在儿童神经母细胞瘤组织中的表达及临床意义[J]. 临床小儿外科杂志,2015,14(5):388-390.
- 16 Fidler IJ. Angiogenic heterogeneity: regulation of neoplastic angiogenesis by the organ microenvironment[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(14):1075-1081.
- 17 Yoneyama H, Hara T, Kato Y, et al. Nucleotide sequence variation is frequent in the mitochondrial DNA displacement loop region of individual human tumor cells[J]. Mol Cancer Res, 3(1):14-20.

(收稿日期: 2015-03-17)