

人滑膜肉瘤细胞株SW982中肿瘤干细胞的分离及鉴定*

黄哲, 锡林宝勒日

Separation and identification of cancer stem cells in synovial sarcoma SW982 cell lines

Huang Zhe, Xilinbaoleri

文章亮点:

①采用不断剥夺血清浓度的方法培养细胞,与药物筛选相结合,筛选人滑膜肉瘤细胞株 SW982。②高浓度阿霉素所筛选的耐药细胞具有高致瘤性。③体外培养的人滑膜肉瘤细胞系 SW982 中存在具有高致瘤性的肿瘤干细胞样细胞。

Abstract

BACKGROUND: Synovial sarcomas are highly malignant tumor, but there is no effective treatment method. The tumor stem cell theory provides a new approach for the treatment of synovial sarcomas.

OBJECTIVE: To explore whether stem-like cells exist in synovial sarcoma SW982 cell lines.

METHODS: We cultured SW982 cells in a low concentration of serum medium, and the cells which were cultured in the lowest concentration of serum medium were selected for the drug-resistant experiment. The inhibition rate of tumor cells cultured under different concentrations of adriamycin (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L) were tested by MTT assay. We performed tumorigenicity experiments in the nude mice with the drug-resistant and non-drug-resistant cells respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Drug-resistant capacity of SW982 cells was improved after cultured with low concentration of serum. In the tumorigenicity experiments, there were two nude mice in which a tumor formed after injected with drug-resistant cells; and tumors did not form in the others. There are high tumorigenicity tumor stem-like cells in the SW982 cell lines. We can collect high tumorigenicity synovial sarcoma cell line effectively with high concentration of adriamycin, and enrich the synovial sarcoma stem cells, but the cells need further purification.

Huang Z, Xilinbaoleri. Separation and identification of cancer stem cells in synovial sarcoma SW982 cell lines. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(32): 5983-5987. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

摘要

背景: 滑膜肉瘤属于高度恶性肿瘤,目前尚无有效治疗手段。肿瘤干细胞理论的提出为滑膜肉瘤的治疗提供了新的思路。

目的: 探寻人滑膜肉瘤细胞系 SW982 中是否存在干细胞样细胞。

方法: 首先采用不断剥夺血清浓度的方法培养 SW982 细胞,选择在最低血清浓度培养下的细胞进行抗药实验。MTT 法测定在 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L 阿霉素浓度下的肿瘤细胞抑制率。裸鼠接种耐药细胞与非耐药细胞观察是否有肿瘤生成。

结果与结论: 经过降血清培养后的 SW982 细胞的耐药性有所增强;在裸鼠成瘤实验中耐药细胞接种后有 2 只裸鼠成瘤,余均未成瘤。说明:①体外培养的人滑膜肉瘤细胞系 SW982 中存在具有高致瘤性的肿瘤干细胞样细胞。②采用高浓度阿霉素药物筛选细胞实验可以有效富集具有高致瘤性的滑膜肉瘤细胞群,进而富集滑膜肉瘤干细胞,但尚需进一步纯化。

关键词: 滑膜肉瘤; 肿瘤干细胞; 阿霉素; 裸鼠; MTT 法; 干细胞

黄哲, 锡林宝勒日. 人滑膜肉瘤细胞株 SW982 中肿瘤干细胞的分离及鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(32): 5983-5987. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Huang Zhe★, Studying for master's degree, Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China huangzhe123168@163.com

Corresponding author: Xilinbaoleri, M.D., Chief physician, Associate professor, Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China xjbonetumor@126.com

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.32.018

Received: 2012-03-13
Accepted: 2012-05-23

新疆医科大学附属肿瘤医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

黄哲★, 男, 1984年出生, 山东省滕州市人, 汉族, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事为软组织肿瘤方面的研究。
huangzhe123168@163.com

通讯作者: 锡林宝勒日, 博士, 主任医师, 副教授, 新疆医科大学附属肿瘤医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011
xjbonetumor@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)32-05983-05

收稿日期: 2012-03-13
修回日期: 2012-05-23
(20120313035/YJ·C)

0 引言

关于肿瘤起源的研究一直是肿瘤界研究的热点问题, 传统观念认为肿瘤是成熟体细胞在多种因素共同作用下恶变而成, 但是随着人们对肿瘤起源研究的不断深入“肿瘤干细胞”学说逐渐成为近10多年来肿瘤界研究的热点问题。美国癌症研究协会肿瘤干细胞研究小组于2006年对肿瘤干细胞作了如下定义: 存在于肿瘤组织中的具有无限自我更新能力并能产生不同分化程度的肿瘤细胞的细胞^[1]。目前国际上公认的肿瘤干细胞主要特点有高致瘤性、自我更新能力、多向分化潜能、超强耐药及抗辐射。

滑膜肉瘤属于软组织肉瘤, 其局部复发、早期转移、耐药及抗辐射也是一个亟待解决的难题, 虽然临床上早已采取以手术为主并联合应用放疗及化疗的综合治疗方案, 但治疗效果并不理想^[2]。肿瘤干细胞学说的提出为这样难题的解决提供新的研究方向。根据肿瘤干细胞理论可推测滑膜肉瘤中也必定存在着能够维持其不断生长的肿瘤干细胞。SW982细胞系是较为常用的滑膜肉瘤细胞株, 生物学特性较为稳定, 对其肿瘤干细胞的研究具有重大意义。阿霉素是临床上常用的广谱抗肿瘤药, 对胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、肝癌等多种恶性肿瘤均有较好的疗效^[3-7]。有报道指出其是治疗软组织肉瘤单药效果最好的化疗药物之一, 可使软组织肉瘤的10年无瘤生存率从45%提高到55%, 局部无瘤生存率从75%提高到81%^[8]。但是由于阿霉素的不良反应比较明显, 且人类也无法使用超大剂量的阿霉素进行治疗, 因此目前在临床使用的化疗药物剂量下根本无法解决治愈肿瘤这一根本问题。

本实验根据肿瘤干细胞超强耐药的特点, 在体外应用高浓度阿霉素从滑膜肉瘤SW982细胞系中筛选出具有超强耐药的细胞群, 并对该耐药细胞群与非耐药细胞群进行差异性比较, 探讨利用阿霉素耐药实验是否可以有效富集具有肿瘤干细胞特性的滑膜肉瘤细胞群。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外培养及随机对照动物实验。

时间及地点: 于2011-01/09在新疆医科大学第一附属医院科技楼细胞实验室及新疆医科大学动物实验中心完成。

材料:

动物: 选取SPF级健康4周龄雌性BALB/C裸鼠10只, 体质量16~20 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 饲养于新疆医科大学动物实验中心, 实验在SPF屏障内进行, 分笼饲养。

细胞株: 人滑膜肉瘤SW982细胞购于美国标准生物物品收藏中心^[9]。

主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
干粉型 Leibovitz's L-15 培养基及胎牛血清	美国 Gibco BRL 公司
MTT 及二甲基亚砜	美国 Amersco 公司
阿霉素、青霉素、链霉素	山东鲁抗医药股份有限公司
SW-CJ-IF 型单人双开净化工作台	苏净集团安泰公司
HERA Cell 240 型细胞培养箱	德国 Heraeus 公司
IX71 型荧光倒置相差显微镜	日本 Olympus 公司
X-Mark 型全自动酶标仪	美国 Bio-Rad 公司

方法:

细胞培养: 细胞培养时首先采取逐步减少培养液中血清含量的方法培养, 依次采用含体积分数为10%, 5%, 2%及1%的胎牛血清的L-15培养基培养所需细胞, 孵箱条件为37 °C、饱和湿度。细胞贴壁近占培养瓶底面积85%~90%时, 用0.25%胰蛋白酶消化、传代。实验选用对数生长期细胞。

MTT法检测所需阿霉素浓度: 采用经过含体积分数1%的胎牛血清的L-15培养基培养后的SW982细胞, L-15重悬细胞, 有限稀释法调整细胞数至 5×10^3 /孔接种于96孔板, 24 h后细胞贴壁后, 再分别用质量浓度为1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L的阿霉素加入96孔板中处理细胞。分别于24, 48, 72, 96 h检测不同药物浓度下细胞的抑制率, 每隔24 h向不同时间组96孔板中加入20 μ L MTT液, 在37 °C、饱

和湿度条件下孵育4 h, 弃去孔内液体, 每孔加入150 μL 二甲基亚砜, 利用酶标仪在波长为490 nm条件下轻微震荡10 min测定其吸光度值并计算检测各组细胞的抑制率。采用抑制率最高的药物浓度加入培养瓶内继续培养, 96 h后收集耐药细胞。

裸鼠成瘤实验: 将10只裸鼠利用随机数字法分为5组, 分别选用耐药细胞与非耐药细胞重悬于500 μL 生理盐水中, 按100, 1 000, 2 000, 5 000及10 000个细胞数分别注射于5组裸鼠右腋皮下, 每隔3 d观察裸鼠右腋窝皮下是否有肿物形成, 共观察6周。

瘤体组织病理形态观察: 接种6周后全部处死裸鼠, 将体内瘤体进行石蜡包埋后, 组织标本连续定向切片4张, 厚度4 μm , 常规苏木精伊红染色, 显微镜观察。

主要观察指标: ①细胞在降血清培养过程中及随后在高浓度阿霉素应用时的生长状态变化情况。②裸鼠接种后成瘤情况。

统计学分析: 用SPSS 17.0统计软件中的两因素方差分析对所得数据进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 所有裸鼠均进入结果分析, 无脱失。

2.2 降血清培养后人滑膜肉瘤SW982细胞生长速度发生变化 含体积分数10%血清培养液中培养时人滑膜肉瘤SW982细胞平均传代时间为两三天, 体积分数5%血清培养液中培养时人滑膜肉瘤SW982细胞时平均传代时间为三四天, 体积分数2%血清培养液中培养时人滑膜肉瘤SW982细胞时平均传代时间为六七天, 体积分数1%血清培养液中培养时人滑膜肉瘤SW982细胞时平均传代时间为8~10 d。最终选用在含体积分数1%血清浓度培养液中培养的细胞进行抗药实验。

2.3 MTT法测定人滑膜肉瘤SW982细胞抑制率的结果 阿霉素药物敏感度试验显示, 阿霉素浓度在1~40 mg/L时, 对人滑膜肉瘤SW982细胞的抑制率随着药物浓度的增加而增加, 其抑制率具有明显的上升趋势, 且具有时间和剂量依赖性($P < 0.01$), 见表1, 2。

由图1可以得出, 在24 h之内, 随着阿霉素浓度的升高其对人滑膜肉瘤SW982细胞的抑制率也随之增高, 但随着时间的延长, 药物浓度在1~40 mg/L之间时其对人滑膜肉瘤SW982细胞的杀伤力随药物浓度的增加而增加, 而阿霉素的浓度大于40 mg/L以上时, 其对人滑

膜肉瘤SW982细胞的抑制率并没有明显的上升趋势, 其结果显示变化趋于平稳且呈下降趋势, 结果提示长时间大剂量的化疗药物可以对人滑膜肉瘤SW982细胞产生大规模的杀伤作用, 但并不能将人滑膜肉瘤SW982细胞全部杀死, 未被消灭的人滑膜肉瘤SW982细胞应该为具有超强耐药特点的肿瘤干细胞样细胞, 且在高药物浓度的微环境中可以刺激肿瘤干细胞产生耐药现象并诱导其分化出一部分耐药细胞并在特殊的微环境中增殖生长。

表1 不同浓度阿霉素下对SW982细胞的抑制率
Table 1 Inhibition rate of SW982 cells in different concentrations of adriamycin ($\bar{x}\pm s, n=3, \%$)

Concentration of adriamycin ($\mu\text{mol/L}$)	Inhibition time (h)			
	24	48	72	96
1	1.25 \pm 0.17	4.64 \pm 0.05	7.64 \pm 0.53	10.75 \pm 0.79
10	6.23 \pm 0.19	10.36 \pm 0.71	15.44 \pm 0.76	24.69 \pm 0.65
20	10.08 \pm 1.92	15.86 \pm 1.44	24.41 \pm 2.28	39.50 \pm 0.74
30	15.64 \pm 0.56	29.75 \pm 1.13	43.12 \pm 0.91	60.51 \pm 0.64
40	30.26 \pm 1.00	45.18 \pm 0.81	59.31 \pm 0.91	81.26 \pm 0.71
50	31.11 \pm 0.86	42.38 \pm 1.22	55.36 \pm 0.42	70.42 \pm 1.06
60	31.80 \pm 0.84	41.27 \pm 1.26	51.98 \pm 0.25	65.86 \pm 0.69

表2 不同浓度阿霉素下对SW982细胞的抑制率药物浓度及时间方差分析结果

Table 2 Variance analysis results of the inhibition rate of SW982 cells, drug concentration and time in different concentrations of adriamycin

Item	Drug concentration	Time	Interaction
F	4 558.512	4 279.245	125.467
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01

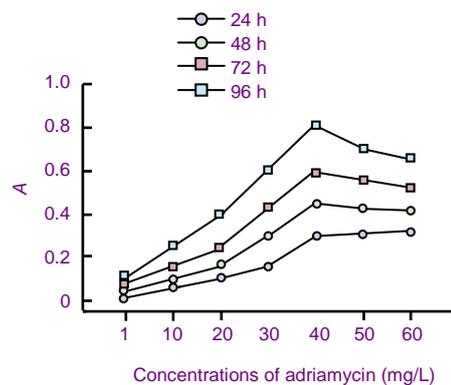
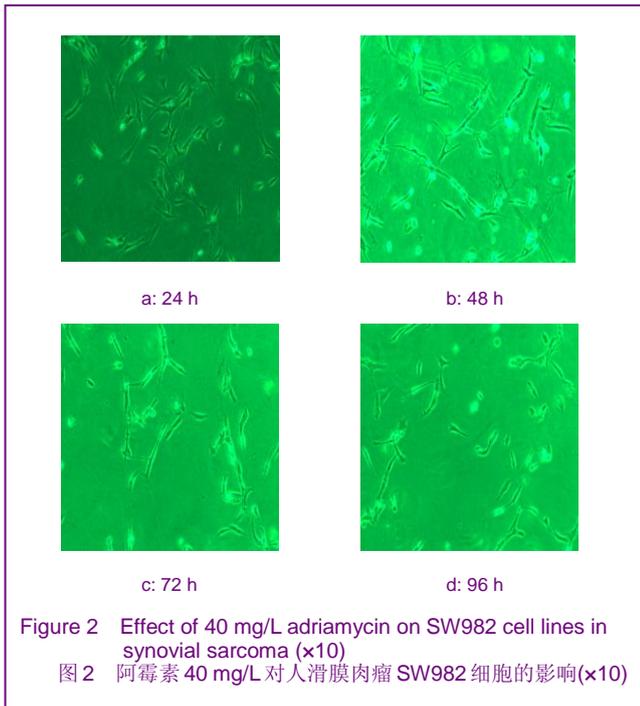


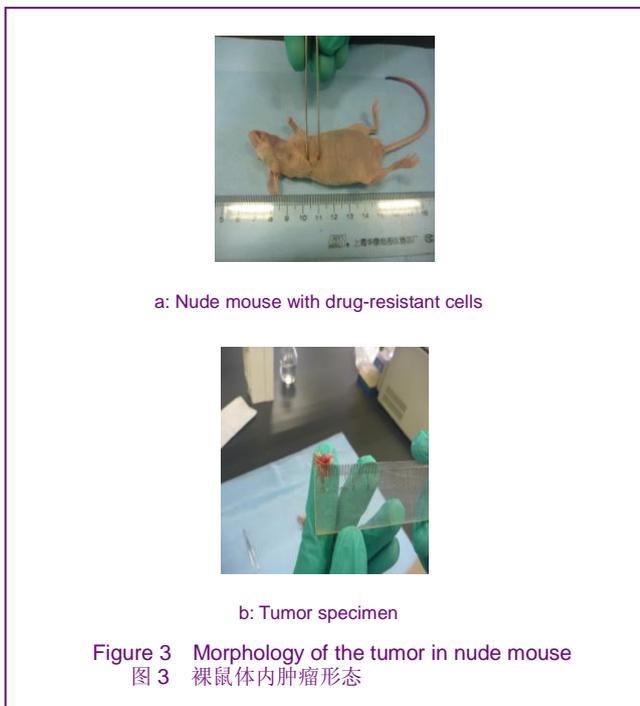
Figure 1 Inhibition rate of SW982 cells in different concentrations of adriamycin

图1 不同浓度阿霉素对人滑膜肉瘤SW982细胞生长的抑制

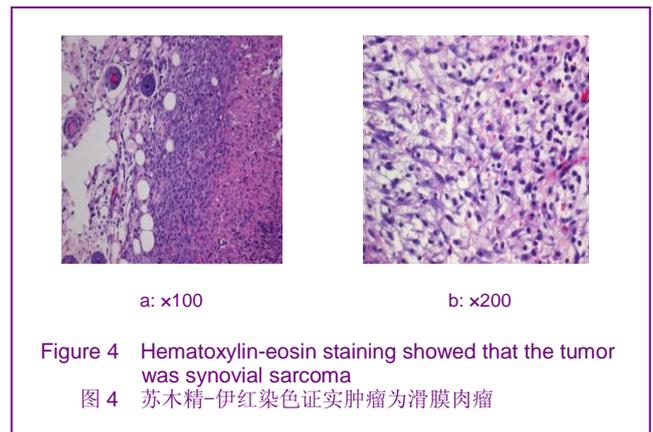
在血清体积分数为1%的培养液中加入阿霉素, 使其在阿霉素的浓度为40 mg/L的条件下进行细胞培养, 可见每隔24 h均会有大量细胞死亡, 细胞体积变小, 见图2。



2.4 裸鼠成瘤实验结果 耐药分选后的细胞及非耐药细胞在无菌条件下移植于裸鼠皮下，接种6周后全部处死老鼠。结果显示：非耐药细胞组全部无肿瘤生成，而耐药细胞组中接种 5×10^3 个细胞及 1×10^4 个细胞的2只裸鼠于接种3周后可在皮下触及较硬结节，并逐渐增大，取出瘤体，大小约0.5 cm，见图3。



经组织病理学鉴定其为滑膜肉瘤，见图4，提示耐药细胞中富含高侵袭性的肿瘤干细胞样细胞，而非耐药细胞中不含有肿瘤干细胞样细胞或含量极低。



3 讨论

自2003年Al-Hajj等^[10]和Clarke等^[11]首次从实体瘤乳腺癌中分离出了以 CD44⁺CD24⁻/lowLin⁻ 标志的肿瘤干细胞以来，目前已在肺癌、前列腺癌等多种实体瘤中发现肿瘤干细胞^[12-13]，并且在肝癌细胞系Huh7及人骨肉瘤细胞株U2-OS等多种细胞株中也发现其含有肿瘤干细胞^[14-15]。对于滑膜肉瘤而言，利用肿瘤干细胞理论在解释其生物学特性及耐辐射和化疗耐药方面有着独到之处，且肿瘤干细胞在肿瘤发生、发展、转移和术后局部复发中所起的作用揭开了人们对肿瘤起源研究崭新的一页^[16-20]。

目前国际上关于肿瘤干细胞常用的分离方法主要有：①免疫学分选法。包括荧光活化分选法和免疫磁珠分离法。②功能学分选法。即侧群细胞分选法。③其他方法，如无血清培养，药物筛选法等^[21]。由于免疫学分选法需要在明确细胞表面标记物的前提下才能使用，而滑膜肉瘤表面标记物尚未得知，故无法使用免疫学分选法。而无血清培养时由于细胞生存所需的微环境发生骤然变化将会导致肿瘤细胞短时间内大量死亡，剩余的肿瘤干细胞尚未发生扩增，故收集的干细胞样细胞的数目过于稀少。本文实验是根据肿瘤干细胞具有超强耐药的特点，利用降血清培养与药物筛选相结合的方法探寻滑膜肉瘤干细胞。此前已有学者利用化疗药物在小鼠乳腺癌TM40D细胞筛选其肿瘤干细胞^[22]。本文选用目前已知在软组织肉瘤化疗中疗效较为肯定且具有药物浓度依赖性的药物阿霉素对滑膜肉瘤细胞系SW982进行药敏实验，利用MTT法筛选出对SW982细胞抑制率最高的药物浓度。同时对高药物浓度下存活细胞利用肿瘤干细胞的高致瘤性及自我更新能力这两大特性进行干细胞鉴定。其结果是经过高浓度阿霉素所筛选的细胞具有高致

瘤性,可在裸鼠体内成瘤。而对照组采用相同数量的未经药物处理过的细胞却无法在裸鼠体内成瘤。这提示本实验可有效富集具有肿瘤干细胞特性的细胞,其优点是有益于在未知干细胞标记物的肿瘤中探寻具有高致瘤性的细胞群,进而富集肿瘤干细胞,且实验成本较其他方案低,周期短。其不足之处主要是所筛选的肿瘤干细胞的纯度不够,无法做到精确筛选。但是本研究在一定程度上缩小了寻找滑膜肉瘤干细胞的范围,进一步在实体肿瘤标本中寻找肿瘤干细胞奠定一定的工作基础,同时揭示了利用化疗药物富集具有高致瘤特性的肿瘤干细胞群具有一定的可行性。未来还将进一步探寻滑膜肉瘤干细胞特征性标记物,寻找真正根治滑膜肉瘤的方法。

致谢: 感谢新疆医科大学动物实验中心的王忠老师及新疆医科大学第一附属医院医学研究中心古丽老师给予的技术指导和帮助。

4 参考文献

- [1] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006; 66(19):9339-9344.
- [2] Sakai T, Eskander RN, Guo Y, et al. Flavokawain B, a kava chalcone, induces apoptosis in synovial sarcoma cell lines. *J Orthop Res.* 2012;30(7):1045-1050.
- [3] Wang ZQ, Zhao BC, Yu HG, et al. *Linchuang Neike Zazhi.* 2011;28(1):42-43.
王政强,赵炳超,于红刚,等.阿霉素诱导胃癌细胞凋亡中Notch1的作用及其临床意义[J].临床内科杂志,2011,28(1):42-43.
- [4] Mu F, Jin WD, Cai RJ. *Dier Junyi Daxue Xuebao.* 1999(3):25-27.
穆峰,金吴东,蔡瑞军.阿霉素诱导肺癌细胞凋亡的实验研究[J].第二军医大学学报,1999(3):25-27.
- [5] Moebus V, Jackisch C, Lueck HJ, et al. Intense dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and cyclophosphamide compared with conventionally scheduled chemotherapy in high-risk primary breast cancer: mature results of an AGO phase III study. *J Clin Oncol.* 2010;28(17): 2874-2880.
- [6] Chen R. *Shandong Yiyao.* 2007;47(18):57-58.
陈榕.晚期卵巢癌患者脂质体阿霉素二次化疗疗效观察[J].山东医药,2007,47(18):57-58.
- [7] Zhang XD, Wang WL. *Zhonghua Zhongliu Zazhi.* 1997;19(4): 260-263.
张晓东,王文亮.阿霉素诱导人肝癌细胞凋亡模型的建立[J].中华肿瘤杂志,1997,19(4):260-263.
- [8] Scurr M, Judson I. Neoadjuvant and adjuvant therapy for extremity soft tissue sarcomas. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2005;19(3):489-500, vi.
- [9] Paglino JC, van den Pol AN. Vesicular stomatitis virus has extensive oncolytic activity against human sarcomas: rare resistance is overcome by blocking interferon pathways. *J Virol.* 2011;85(18):9346-9358.
- [10] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3983-3988.
- [11] Clarke RB, Anderson E, Howell A, et al. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif.* 2003;36 Suppl 1: 45-58.
- [12] Chen YC, Hsu HS, Chen YW, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One.* 2008;3(7):e2637.
- [13] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005; 65(23):10946-10951.
- [14] Liang C, Liu L. *Zhejiang Ligong Daxue Xuebao.* 2011;28(4): 602-605.
梁晨,刘立.肝癌细胞系Huh7中肿瘤干细胞分离及鉴定[J].浙江理工大学学报,2011,28(4):602-605.
- [15] Ouyang Z. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2007;11(24):4706-4709.
欧阳振.人骨肉瘤细胞株U2-OS中分离并鉴定肿瘤干细胞[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(24):4706-4709.
- [16] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105-111.
- [17] Pardoll R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(12):895-902.
- [18] Li F, Tiede B, Massagué J, et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 2007;17(1):3-14.
- [19] Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med.* 2008;12(2):374-390.
- [20] Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2542-2556.
- [21] Dou J. *Nanjing: Southeast University Press,* 2009.
窦骏.肿瘤干细胞[M].南京:东南大学出版社,2009.
- [22] Li HZ, Yi TB, Wu ZY, et al. *Zhongguo Aizheng Zazhi.* 2008; 18(3):172-175.
李海志,易彤波,武正炎,等.悬浮培养联合化疗药物筛选乳腺癌干细胞[J].中国癌症杂志,2008,18(3):172-175.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 锡林宝勒日进行实验设计, 实验实施为黄哲, 实验评估为锡林宝勒日, 资料收集为黄哲, 黄哲成文, 锡林宝勒日审校, 黄哲对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。