doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.14.025 [http://www.crter.org]
曲绍政，李书忠，高甲科，张金锋. 骨肉瘤干细胞的分离与鉴定[J].中国组织工程研究，2013，17(14):2641-2648.

骨肉瘤干细胞的分离与鉴定*

曲绍政[1]，李书忠[1]，高甲科[1]，张金锋[2]

1 青岛大学医学院附属医院，山东省青岛市 266000
2 青岛市海慈医疗集团，山东省青岛市 266000

文章亮点：

1 此问题的已知信息：骨肉瘤干细胞具有较强自我更新和增殖分化的能力，以及致瘤性等其它肿瘤干细胞的特征，但对骨肉瘤干细胞的研究较少，其来源及发生机制尚不完全明确。

2 文章增加的新信息：骨肉瘤干细胞在一定条件下能够分离培养，证明骨肉瘤干细胞的存在，并且骨肉瘤干细胞能够高表达 CD133、Oct3/4 以及 Nanog 等多种肿瘤干细胞的标记物，这些高表达的肿瘤干细胞标记物可以是骨肉瘤免疫生化检测诊断的方法之一。

3 临床应用的意义：骨肉瘤干细胞的存在为骨肉瘤的发生及诊断治疗提供辅助信息，并且为骨肉瘤以及其它骨肿瘤的生物治疗提供了一个新的方法。

关键词：

干细胞；干细胞学术探讨；骨肿瘤；骨肉瘤；肿瘤干细胞；阿霉素；长春新碱；CD133；Nanog；Stro-1；悬浮细胞

摘要

背景：骨肉瘤是最常见的骨原发性恶性肿瘤，其发生可能与骨肉瘤干细胞有关。

目的：评估骨肉瘤干细胞分离、培养和鉴定方法以及其相关肿瘤标记物的表达。

方法：在无血清条件下以及无血清联合抗肿瘤药物的条件下应用免疫磁珠分选法对骨肉瘤干细胞进行分离、培养，分选出 Stro-1 阳性、CD133 阳性骨肉瘤干细胞，采用免疫荧光染色、蛋白质印迹法等检测骨肉瘤肿瘤干细胞标记物 CD133、Oct3/4 以及 Nanog 等的表达水平以及致瘤性能。

结果与结论：骨肉瘤干细胞在接种培养 2-10 d 后形成悬浮细胞球，增殖潜伏期约为 24 h，Stro-1 阳性干细胞能够形成悬浮细胞球，Stro-1 阴性细胞则不能形成悬浮细胞球。此外，骨肉瘤干细胞还能高表达 Oct3/4、Nanog 和 CD133 等，CD133 阳性骨肉瘤干细胞高表达 CD133 分子，侵袭力更强，而 CD133 阴性细胞则不能表达 CD133 分子，侵袭力相对较弱。塞来昔布对骨肉瘤干细胞的形成具有一定程度的抑制作用，能够降低肿瘤新生血管中血管内皮生长因子的表达。

曲绍政★，男，1986 年生，山东省烟台市人，汉族，青岛大学医学院在读硕士，主要从事脊柱外科及骨肿瘤研究。
qushaozheng1986@163.com

通讯作者：李书忠，硕士，教授，主任医师，博士生导师，青岛大学医学院附属医院，山东省青岛市 266000
QYLSZ@163.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344(2013)14-02641-08

收稿日期：2012-12-10
修回日期：2013-02-20
(20121129003/SJ · C)

Isolation and identification of osteosarcoma stem cells

Qu Shao-zheng[1], Li Shu-zhong[1], Gao Jia-ke[1], Zhang Jin-feng[2]

1 The Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China
2 Qingdao Hiser Medical Group, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Osteosarcoma is the most common bone primary malignant tumors, and the occurrence of osteosarcoma may relate with osteosarcoma stem cells.

OBJECTIVE: To evaluate the isolation, culture and identification method of osteosarcoma stem cells, to investigate the expression of relative tumor markers.

Qu Shao-zheng★, Studying for master's degree, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China
qushaozheng1986@163.com

Corresponding author: Li Shu-zhong, Master, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, the Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China
QYLSZ@163.com

Received: 2012-12-10
Accepted: 2013-02-20

METHODS: The osteosarcoma stem cells were isolated and cultured with magnetic activated cell sorting method under serum-free condition and serum-free joint antineoplastic condition, in order to sort Stro-1 positive and CD133 positive osteosarcoma stem cells. The expression level and tumorigenic properties of CD133, Oct3 / 4 and Nanog markers of osteosarcoma cancer stem cells were tested with immunofluorescence staining and Western blotting methods.

RESULTS AND CONCLUSION: Suspended cell condensation could be seen in the osteosarcoma stem cells after culture for 2-10 days, the proliferation incubation period was about 24 hours, and the Stro-1 positive stem cells could form the suspended cell condensation, while the Stro-1 negative stem cells could not form the suspended cell condensation. In addition, osteosarcoma stem cells could highly express Oct3/4, Nanog and CD133, the CD133-positive osteosarcoma stem cells could highly express CD133 molecule with strong invasiveness, while the CD133 negative cells could not express CD133 molecule and the invasiveness was weak. Celecoxib could inhibit the formation of osteosarcoma stem cells to some extent, and could reduce the expression of tumor angiogenic blood vessels and vascular endothelial growth factor.

Key Words: stem cells; stem cell academic discussion; bone tumors; osteosarcoma; tumor stem cells; doxorubicin; vincristine; CD133; Nanog; Stro-1; suspended cells

Qu SZ, Li SZ, Gao JK, Zhang JF. Isolation and identification of osteosarcoma stem cells.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(14):2641-2648.

0 引言

骨肉瘤是起源于间叶组织的恶性肿瘤，由间充质干细胞或成骨细胞分化受阻引起，是骨组织常见的恶性肿瘤[1-3]。骨肉瘤干细胞类似于骨发生细胞、成骨细胞，可产生类骨质，提示骨肉瘤来源于成骨细胞或成骨母细胞，但是尚缺乏足够的实验证据证明此观点[4]。骨肉瘤组织中不仅有成骨区域，也有成软骨区域和成纤维区域，表明骨肉瘤干细胞可能来源于具有多向分化潜能的细胞[5-6]。间充质干细胞是多能干细胞，不仅能分化成骨细胞，也能够分化成软骨、脂肪、肌腱、肌肉和骨髓间质细胞，因此，来源于间充质干细胞的肿瘤可以类似于骨肉瘤中的各种组织成分[7]。目前，用于分离骨肉瘤干细胞的方法主要有球细胞培养法、细胞表面标志分选法、侧群细胞分选法、高醛脱氢酶活性分选法等。随着肿瘤干细胞理论的提出，许多研究初步证实骨肉瘤干细胞特异性标志有Oct 3/4、Nanog和CD133等[8-9]。

Gibbs等[10]于2005年首次报道了在骨骼肉瘤(骨肉瘤与软骨肉瘤)中发现了干细胞样细胞。将活检获得的骨肉瘤和软骨肉瘤标本以及MC-63细胞株进行培养、筛选，单细胞悬液中有0.1%-1.0%可形成肉瘤细胞球，球内部分细胞具有较强的自我更新能力，将肉瘤球内单细胞接种至无血清培养基，可以继续形成肉瘤球；并且肉瘤球内细胞可被诱导分化至骨肉瘤或软骨肉瘤。Lapidot等[11]采用荧光激活细胞分选方法在骨肉瘤中分离出具有自我更新能力和致瘤性的肿瘤干细胞，并且肿瘤单细胞悬液的成球率为10^{-2}-10^{-3}，与恶性胶质瘤乳腺癌的单细胞悬液成球概率相当。研究显示此类细胞除了具有较强自我更新和分化增殖能力外，还表达间充质干细胞特异性表面标记物Stro-1、CD44与CD105等，以及胚胎多能干细胞的标志基因Oct 3/4与Nanog。此外，悬浮的骨肉瘤细胞球与贴壁的骨肉瘤细胞相比，具有更高的Oct 3/4和Nanog基因表达强度。随后，Fujii等[12]和Wilson等[13]也应用荧光激活细胞分选的方法在骨肉瘤细胞系中分离出具有肿瘤干细胞特征的骨肉瘤悬浮细胞，即骨肉瘤类肿瘤干细胞。Wilson等[13]则在一项对多种人骨肉瘤细胞和犬科动物骨肉瘤细胞系的研究中发现，肿瘤细胞在无血清软琼脂培养基中经过多次传代后也都可形成肿瘤悬浮细胞球，而转至普通培养基后则会贴壁生长。在肿瘤球中Oct3/4和Nanog表达较高，而贴壁生长的肿瘤细胞中则几乎没有。这进一步说明Oct3/4和Nanog对

于维持骨肉瘤干细胞特性非常重要，是其特异性标志。

骨肉瘤肿瘤干细胞具有哪些特征？采用哪些方法可以分离并进行检测？这些问题均有待于大量的实验研究进行解决并证实。文章对上述问题进行简明阐述，为骨肉瘤肿瘤干细胞的起源、发生、发展以及检测方法等基础研究提供可参考的理论信息，为骨肉瘤的诊断和治疗提供具有重要价值的信息。理论上能治疗大多数疾病。⑥干细胞是较好的免疫治疗和基因治疗载体[8]。

目前，已开展一些补肾中药干预干细胞移植治疗中的研究，一些补肾中药可在体外诱导间充质干细胞分化并促进间充质干细胞移植成功[9-10]。相关的大量研究表明[11]，许多补肾中药可促进骨髓造血干细胞增殖分化，并可促进神经干细胞增殖分化，对其他干细胞的移植也有诱导分化为成骨细胞、神经细胞及肝细胞等作用，而且，补肾中药可防治造血干细胞治疗中的不良反应[12-13]。

1 资料和方法

1.1 资料来源 文章采用检索 CNKI 数据库和万方数据库的方法获取研究文献[14-15]，检索时间范围 2003 至 2012 年，检索词为“骨肿瘤；肿瘤干细胞”，检索出相关研究文献 22 篇，纳入研究的文献共 6 篇[16-21]。

1.2 入选标准 ①研究的主题包括骨肿瘤干细胞的分离、培养、鉴定、特征以及药物干预等。检索的文献中排除与研究主题无关的文献 11 篇。②研究所撰写的文章类型包括原著、实验分析及病例分析等。检索文献中排除综述类文章 1 篇。③文献内容筛选如下，检索的文献中无血清条件下培养分离人骨肉瘤细胞系肿瘤干细胞的研究文献共 3 篇，3 篇文献为同一实验项目，且为同一组实验人员进行的研究，定为重复研究文献，选取其中 1 篇进行深入分析。同样对骨肉瘤类肿瘤干细胞 Nanog mRNA 基因表达研究的 2 篇文献也为重复文献，选取其中 1 篇进行深入分析。在药物对人骨肉瘤类肿瘤干细胞移植瘤微血管生成影响的研究中，同样检索出重复的 2 篇研究文献，选取其中 1 篇进行深入分析。④文章研究的内容分类为无血清条件下骨肉瘤肿瘤干细胞的分离鉴定，无血清条件下结合抗癌药物分离骨肉瘤肿瘤干细胞并检测鉴定，CD133 阳性骨肿瘤干细胞的分离鉴定，Nanog mRNA 基因在骨肉瘤类肿瘤干细胞中的表达，以及其它相关研究。

1.3 资料提取 纳入研究的 6 篇文献见表 1。

表 1 纳入研究分析的 6 篇文献文题及来源

文题	作者	文献来源	发表时间
人骨肉瘤细胞株 U2-OS 中分离并鉴定肿瘤干细胞[16]	欧阳振，王栓科，康学文，等	中国组织工程研究与临床康复	2007
Nanog mRNA 在骨肉瘤类肿瘤干细胞中的表达和意义[17]	韩兴文，王栓科，康学文，等	第四军医大学学报	2009
赛来昔布对人骨肉瘤类肿瘤干细胞移植瘤微血管生成的影响[18]	张培根，王栓科，康学文，等	中国矫形外科杂志	2009
三维无血清条件培养结合抗癌药物分离人骨肉瘤肿瘤干细胞[19]	周松，李锋，肖骏，等	实用癌症杂志	2010
应用低浓度长春新碱分离并鉴定 MG-63 细胞系中的骨肉瘤干细胞[20]	娄楠，王宕，赵建武，等	中国老年学杂志	2010
$CD133^+$骨肉瘤细胞的获取及其干细胞特性的初步鉴定[21]	黄毓婧，何爱娜，孙元珏，等	中国癌症杂志	2012

2 结果

2.1 人骨肉瘤细胞株U2–OS中分离的肿瘤干细胞 欧阳振等+人骨肉瘤细胞株U2-OS中分离肿瘤干细胞进行了实验研究。首先进行细胞培养，选取原代培养的骨肉瘤细胞，采用胰蛋白酶进行消化降解，充分吹打成单细胞悬液后丢弃上清液，用无血清DMEM/F12培养基重悬细胞，培养基内含表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、L–谷氨酰胺、胰岛素、青霉素和链霉素，pH值为7.2–7.5。调整细胞浓度为2×10^6/L进行细胞接种，置入37 ℃、体积分数5%CO_2培养箱中培养。隔日加1 mL培养液，培养5–7 d，待培养基中悬浮的肉瘤细胞球体积变大后，吸取培养基并离心，用无血清培养基重新吹打成单细胞悬液，按1∶2或1∶3比例传代。

将无血清培养基培养的骨肉瘤细胞球接种于96孔板，置于培养箱内分别培养0，1，2，3，4，5，6，

7 d，结束前4 h每孔加入噻唑蓝溶液，继续培养4 h后，用二甲基亚砜震荡溶解蓝紫色结晶，并应用全自动荧光酶标仪在490 nm波长下测定吸光度值。

将骨肉瘤干细胞球与小鼠抗人Stro-1单克隆抗体在4 ℃条件下反应15 min，磷酸盐缓冲液洗涤2次后，与大鼠抗小鼠IgM免疫磁珠4 ℃条件下反应15 min，将免疫标记好的干细胞放入细胞分离系统的细胞分离柱内，无免疫磁珠标记的细胞流出分离柱，而免疫标记的细胞则由于磁场的作用滞留于分离柱中，获取免疫磁珠标记的细胞。将免疫标记阳性和阴性的细胞计数后调整细胞浓度，并接种于培养瓶内，观察细胞增殖情况。

提取细胞内RNA，置于PCR扩增仪后进行反转录、变性和延伸处理。PCR扩增产物行琼脂糖凝胶电泳，并进行染色观察。

收集干细胞球第3次传代5 d后所形成的细胞球，离心后丢弃上清液，用含血清培养液重悬，接种于预先包被多聚赖氨酸的玻片上，置于6孔板中，在37 ℃、体积分数5%CO_2培养箱中培养，倒置显微镜下定期动态观察细胞的分化和生长情况。当干细胞球在含血清培养基中分化14 d后，取出有分化细胞贴壁的玻片，进行骨形态蛋白和Ⅰ型胶原酶的免疫细胞化学染色观察。

结果观察发现原代骨肉瘤细胞离心后置于无血清培养基中，3 d后数个细胞能够形成大小不等的圆形类细胞球，悬浮生长，大部分细胞不能形成细胞球。细胞球传代后2 d即可见到次代肿瘤细胞球的形成，以后体积逐渐增大，形态规则。肿瘤干细胞的增殖潜伏期约为24 h，传代后1-2 d即可见肿瘤干细胞形成，以后体积逐渐增大。肿瘤干细胞对数倍增时间约为传代后第3-5天。用免疫磁珠法分选的Stro-1阳性细胞，接种于无血清培养基后24-48 h即可形成和原代肿瘤干细胞球形态一样的干细胞球，Stro-1阴性细胞却不能形成肿瘤细胞球。RT-PCR检测结果可见Stro-1阳性细胞和Stro-1阴性细胞mRNA扩增产物的吸光度值分别为1.58±0.24和0.37±0.68。用含血清培养基重悬肿瘤细胞球后二三天开始贴壁，7 d后小干细胞球中的细胞几乎全部贴壁分化。之后可以见到部分细胞形态开始发生变化，形态变圆并有部分突起。对分化2周的细胞进行免疫细胞化学染色，部分细胞呈圆形或不规则形状，胞膜染色为棕黄色或棕褐色，表现为骨形态蛋白阳性。部分细胞胞浆染色为棕黄色，核深染，Ⅰ型胶原酶呈阳性表达。

2.2 三维无血清条件培养结合抗癌药物分离的人骨肉瘤肿瘤干细胞 周松等[19]和娄楠等[20]对三维无血清培养基结合抗肿瘤药物分离骨肉瘤干细胞进行了研究，2组实验同样应用肿瘤细胞的培养传代，并应用免疫化学染色等方法对检测细胞进行观察，结果见表2。

表2 周松等[19]和娄楠等[20]研究中三维无血清培养基结合抗肿瘤药物分离骨肉瘤干细胞的实验结果

第一作者	实验方法	实验结果		
		单克隆细胞球形成	免疫荧光染色观察	类肿瘤干细胞的致瘤性
周松[19]	三维无血清条件培养结合阿霉素分离骨肉瘤干细胞	24 h后存活细胞增殖形成单克隆球，7-10 d后单克隆球包含30-40个子细胞	单克隆球内存在大量Oct3/4和Nanog染色阳性细胞	单细胞克隆球的单细胞悬液注入小鼠体内后有新生肿瘤形成
娄楠[20]	三维无血清条件培养结合低浓度长春新碱分离骨肉瘤干细胞	48-72 h后可见大小不等的只有数个细胞的类细胞球，2 d后可见到肿瘤细胞球的形成	发现存在干细胞标志物CD133、Oct3/4、Nanog、nestin、多药耐药基因MDR1、ABCG2表达阳性	肿瘤干细胞的增殖潜伏期约为22.8 h，传代后24-48 h即可见传代肿瘤干细胞形成

三维细胞培养模式已经成为细胞体外培养的主要方法，该细胞培养方法能够更倾向于体内细胞生长的微环境，使细胞能够更好的表达其在体内时的生物学行为，使细胞反应的整个过程及环境更贴近于体内，有利于对体内细胞反应作出判断和评估，从而获得更准确的实验结果。上述2组实验中，在三维培养基中种植培养单个肿瘤细胞，并通过抗肿瘤药物阿霉素以及长春新碱的筛选、富集作用，获得由单个肿瘤干细胞增殖、聚集形成的肿瘤干细胞克隆球。抗肿瘤药物阿霉素和长春新碱对肿瘤干细胞具有杀伤作用，因此，绝大多数肿瘤干细胞被抗肿瘤药物杀死，而剩下一小部分的肿瘤干细胞逃脱了抗肿瘤药物的杀伤作用，并且增殖聚集形成肿瘤干细胞克隆球。

文章研究实验中应用三维无血清条件结合抗肿瘤药物分离培养骨肉瘤干细胞，无论是应用阿霉素还

是应用长春新碱均能见到克隆细胞球形成，免疫荧光染色可见Oct3/4和Nanog表达阳性细胞，并且分离出的骨肉瘤单克隆干细胞能够增殖分化出子代肿瘤干细胞，这些肿瘤干细胞增殖聚集形成肿瘤组织，表现出较强的致瘤性。

2.3 CD133阳性骨肉瘤干细胞的分离 黄毓婧等[21]对CD133阳性骨肉瘤干细胞的分离进行了实验研究，并对CD133阳性骨肉瘤干细胞的特征进行了分析。实验应用免疫磁珠分选法分离人骨肉瘤细胞株MG-63中的CD133阳性干细胞，应用流式细胞学分析、蛋白质印迹法检测和免疫荧光染色测定CD133阳性干细胞的纯度，应用CCK-8法、平板集落形成试验、划痕试验及Transwell侵袭试验，研究CD133阳性干细胞的生物学特性。

流式细胞仪测定CD133肿瘤干细胞的阳性率为90.0%-99.9%，阴性率为89.0%-99.0%。免疫组化染色鉴定CD133阳性肿瘤干细胞和CD133阴性肿瘤干细胞，结果显示CD133阳性肿瘤干细胞表达CD133，而CD133阴性肿瘤干细胞基本不表达CD133。蛋白质印迹法检测CD133阳性肿瘤干细胞和CD133阴性肿瘤干细胞中CD133的表达水平，结果显示CD133阳性肿瘤干细胞中CD133呈现高表达，而CD133阴性肿瘤干细胞中CD133基本不表达。细胞增殖试验结果显示CD133阳性肿瘤干细胞的生长增殖明显快于CD133阴性肿瘤干细胞的生长增殖。平板集落形成试验结果显示CD133阳性肿瘤干细胞形成的集落数为(24.60±4.88)个，CD133阴性细胞形成的集落数为(13.60±2.97)个，二者的结果具有显著性差异。划痕试验结果显示CD133阳性肿瘤干细胞比CD133阴性肿瘤干细胞的迁移更远。Transwell侵袭试验结果显示CD133阳性肿瘤干细胞的侵袭能力明显强于CD133阴性肿瘤干细胞。

文章研究中对CD133阳性表达肿瘤干细胞和CD133阴性表达肿瘤干细胞进行了对比，发现CD133只在阳性细胞中表达，而在阴性细胞中几乎不表达，并且CD133阳性肿瘤干细胞的侵袭力更强，可以作为骨肉瘤检测诊断的方法之一。

2.4 Nanog mRNA在骨肉瘤类肿瘤干细胞中的表达 韩兴文等[17]对Nanog mRNA基因在骨肉瘤类肿瘤干细胞中的表达进行了研究。采用无血清培养法从骨肉瘤细胞株U2-OS、MG-63中分离培养悬浮细胞球，免疫磁珠分选Stro-1阳性细胞，反转录聚合酶链反应检测Stro-1阳性细胞、Stro-1阴性细胞及悬浮生长细胞中Nanog mRNA的表达。

结果显示细胞株U2-OS于培养5-7 d形成典型的悬浮细胞球，细胞株MG-63于培养7-10 d形成悬浮细胞球，其中细胞比例与报道的脑及乳腺恶性肿瘤比例相似。重复培养后均有相似数量的悬浮细胞球形成。将悬浮细胞球置入含有特级胎牛血清的培养基中，12 h后可见细胞球局部贴壁，24 h后可见贴壁分化的细胞从细胞球底部生长出来。将免疫磁珠法分选出来的Stro-1阳性细胞进行接种培养，24-48 h后形成悬浮细胞球，Stro-1阴性细胞未见悬浮细胞球形成并且这些Stro-1阴性细胞逐渐裂解、死亡。反转录聚合酶链反应检测在163 bp和229 bp区域出现了典型的条带。U2-OS中Stro-1阳性细胞和阴性细胞Nanog mRNA扩增产物的灰度值分别为1.69±0.14和0.19±0.35，阳性细胞和阴性细胞之间的Nanog mRNA表达具有统计学差异。MG-63中Stro-1阳性细胞、Stro-1阴性细胞和悬浮细胞球Nanog mRNA扩增产物的灰度值分别为1.24±0.22，0.21±0.44，1.56±0.18，Stro-1阳性细胞和Stro-1阴性细胞之间的Nanog mRNA表达具有统计学差异，悬浮细胞球和Stro-1阴性细胞之间的Nanog mRNA表达也具有统计学差异。

2.5 赛来昔布对人骨肉瘤类肿瘤干细胞移植瘤微血管生成的影响 张培根等[18]对cox-2抑制剂赛来昔布影响人骨肉瘤类肿瘤干细胞移植瘤微血管的生成进行了研究。应用无血清培养法从骨肉瘤细胞株MG-63中分离出类肿瘤干细胞建立裸鼠移植瘤模型。30只成瘤裸鼠随机分塞来昔布组和对照组，对比观察肿瘤体积、抑瘤率，免疫组化技术检测血管内皮生长因子的表达及CD34标记的微血管密度值。

结果无血清培养7-10 d可见数个悬浮细胞球，不形成细胞球的细胞则坏死裂解。类肿瘤干细胞的增殖潜伏期约为24 h，传代后24-48 h可见传代的肿瘤干细胞形成，并且逐渐增多。肿瘤细胞球接种成瘤后给予塞来昔布进行干预，与对照组进行比较发现，其抑瘤率达23.2%，且与对照组的肿瘤体积差异具有统计学意义。免疫组化检测发现对照组中血

管内皮生长因子染色阳性率为80%，而塞来昔布干预组血管内皮生长因子染色的阳性率仅有40%，且结果之间的差异具有统计学意义。应用免疫组化检测还发现，CD34在微小血管内皮呈棕黄色表达，对照组微血管密度值为29.0±5.0，塞来昔布干预组微血管密度值为21.0±5.5，结果之间的差异仍具有统计学意义。

肿瘤的生长经过2个阶段，从无血管的缓慢生长阶段转变为有血管的快速生长阶段。肿瘤生长和转移的必要条件之一就是肿瘤新生血管的形成，丰富的血供为肿瘤的生长、侵袭提供足够的营养物质。血管内皮生长因子是骨肉瘤血管生成最关键的刺激因子，骨肉瘤干细胞自身能够合成和分泌血管内皮生长因子。Cox-2能够诱导表达血管内皮生长因子促进骨肉瘤组织中新生血管的形成，从而促进肿瘤的生长。选择性抑制肿瘤组织内新生血管的形成，使肿瘤组织无血液供应的营养来源，从而抑制肿瘤组织的生长。

Cox是一种膜结合蛋白，是分解花生四烯酸转化成前列腺素的关键酶，诱导型cox-2具有启动肿瘤细胞生长和肿瘤血管生成，并促进肿瘤浸润和转移的作用。塞来昔布通过抑制cox-2减少血管内皮生长因子的产生从而发挥抗肿瘤新生血管形成，是目前肿瘤治疗的新方法。对于高度血管化的骨肉瘤，减少或者封闭血管内皮生长因子对抗骨肉瘤微血管的生成具有明显的效果。因此，cox-2可能是抗骨肉瘤微血管生成的一个辅助治疗干预途径。

3 讨论

肿瘤的组织结构多种多样，其中间质成分对肿瘤组织的支持和营养发挥的重要作用，而实质是肿瘤的主要成分，决定肿瘤的生物学特点。通常根据肿瘤实质形态识别肿瘤的组织来源，并根据其分化成熟程度和异型性大小来确定肿瘤的恶性程度大小。随着对肿瘤实质细胞研究的深入，研究发现其中含量较少的部分实质细胞与正常组织干细胞在表面标志和生物学特性上有很多相似之处，具有特殊的生物学行为，这些较少的实质细胞与肿瘤的生长、增殖、发生和发展关系密切，并由此推断肿瘤是由干细胞增殖分化失调引起，由此提出了肿瘤干细胞的概念[22]。肿瘤干细胞概念的提出对肿瘤组织的治疗尤其是生物学治疗具有重要的意义。

肿瘤干细胞的数量很少，只占极少数，但它可不断复制出带有突变基因的细胞，使肿瘤体积不断增大并发生转移，并且与肿瘤的恶性程度有关，因此，专家学者认为肿瘤干细胞可能来源于正常干细胞。正常干细胞通过积累突变获得不稳定的增殖能力而转化为肿瘤干细胞，肿瘤是一种干细胞模式的疾病[23]。

近年来，随着对肿瘤来源于肿瘤干细胞这一观点的深入研究，发现肿瘤干细胞具有不同于正常干细胞的独特特征，能够自我更新，具有多向分化潜能，以及高度的侵袭能力，能够在一定的条件下长期生存，繁殖生长，聚集形成肿瘤[24-25]。肿瘤干细胞决定着肿瘤的发生、发展以及转归，因此，清除肿瘤干细胞对恶性肿瘤的长期治疗具有重要的意义[26-29]。而在骨肉瘤乃至骨肿瘤的研究领域中，国内外学者对骨肿瘤干细胞的研究少之又少。骨肉瘤干细胞的分离以及生物学鉴定与治疗是今后骨肉瘤研究中的热点。

Nanog、Oct3/4为多能胚胎干细胞的标志基因，是细胞生长和自我更新所必需的，目前多种肿瘤中可检测到Oct3/4、Nanog基因的表达。Nanog能激活很多与自我更新、多能性相关基因的表达[30]。Nanog可以调节Oct3/4的表达，二者共同维持肿瘤干细胞的多能性。缺少Oct3/4时，干细胞虽然仍能表达Nanog，但会出现分化现象[31]。Oct3/4是一种在胚胎干细胞、胚胎性肿瘤中高表达的转录因子，有2种亚型Oct3/4A和Oct3/4B，这2种亚型有相同的C端激活区，但N端激活区不同。有研究显示提高体内Oct3/4表达量能够增加胚胎干细胞的恶性潜能，而且在多种肿瘤组织有发现有Oct3/4的存在[32]。

CDl33是一种细胞膜糖蛋白，最初证实为神经上皮干细胞标志物，随后陆续发现系脑肿瘤、结肠癌等多种肿瘤干细胞的标志物[33-35]。Tirino等[9]曾对3种骨肉瘤细胞系SAOS2、MG63、U2OS进行研究，在3种细胞系中都检测到了CD133分子的阳性表达，约占总细胞数的3%-5%。CD133阳性细胞多处于DNA合成后期和细胞分裂期，而CD133阴性细胞则处于细胞静止期和DNA合成前期。CD133阳性细胞表现为增殖细胞核抗原Ki-67阳性、表达ABCG2；而CD133阴性细胞则相反。Ki-67是一种仅表达于增殖细胞的蛋白，

这说明CD133阳性细胞增殖旺盛并可能与药物抵抗有关。Tirino等[36]最近报道在人骨肉瘤标本中分离出CDl33阳性骨肉瘤干细胞，实验证实该细胞表达干细胞基因Oct3/4、Nanog、Sox-2、Nestin，并能向间质细胞分化，接种至免疫缺损小鼠后发现，该肿瘤干细胞具有很强的肿瘤诱发能力。

骨肉瘤是常见的骨组织恶性肿瘤，好发于儿童和青少年，侵袭性强，易发生转移，化疗联合肿瘤切除是骨肉瘤主要的治疗方法，对非转移性骨肉瘤的治疗效果明显提高，而对发生转移的骨肉瘤，其治疗效果，尤其是远期治疗效果并未得到明显改善，因此，骨肿瘤干细胞的研究对于骨肉瘤的生物治疗具有重要的意义[37-38]。

文章对骨肉瘤干细胞的分子表达以及基因表达进行研究，应用无血清培养基进行分离培养，结果发现骨肉瘤干细胞克隆球以及悬浮细胞球，证明骨肉瘤干细胞的存在，但是对其分离培养的研究仍较少，仍需大量实验进一步深入研究证明。应用免疫组化染色能够发现CD133阳性表达以及Oct3/4、Nanog的阳性表达，提示CD133以及Oct3/4、Nanog可以成为骨肉瘤检测诊断的靶点，而且为骨肉瘤的生物治疗提供了重要的信息。

总之，目前对于骨肉瘤干细胞的研究刚刚起步，进一步的深入研究将会展现更多骨肉瘤干细胞的特性，包括骨肉瘤干细胞的来源、生物学特点、特异性标记、分离鉴定方法、对化疗药物的反应、转移模式等，这些成果对于骨肉瘤治疗的创新研究都将会提供重要支持。

作者贡献：曲绍政进行实验设计，曲绍政、高甲科、张金锋进行实验实施及评估，并解析相关数据，曲绍政对对文章负责，李书忠对文章进行审校。

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：实验获得所在单位的伦理委员会批注，符合伦理学标准。

作者声明：文章为原创作品，数据准确，内容不涉及泄密，无一稿两投，无抄袭，无内容剽窃，无作者署名争议，无与他人课题以及专利技术的争执，内容真实，文责自负。

4 参考文献

[1] Tang N, Song WX, Luo J, et al. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. Clin Orthop Relat Res. 2008;466(9):2114-2130.
[2] Lewis IJ, Nooij MA, Whelan J, et al. Improvement in histologic response but not survival in osteosarcoma patients treated with intensified chemotherapy: a randomized phase III trial of the European Osteosarcoma Intergroup. J Natl Cancer Inst. 2007;99(2):112-128.
[3] Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, et al. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival--a report from the Children's Oncology Group. J Clin Oncol. 2008;26(4):633-638.
[4] 李力韬,郭乔楠.骨肉瘤干细胞的研究现状与进展[J].西部医学,2012,24(5):1027-1029.
[5] Kansara M, Thomas DM. Molecular pathogenesis of osteosarcoma. DNA Cell Biol. 2007;26(1):1-18.
[6] 朱忠胜,张春林.骨肉瘤干细胞研究现状[J].国际骨科学杂志,2011,32(5):296-299.
[7] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284(5411):143-147.
[8] Wang L, Park P, Lin CY. Characterization of stem cell attributes in human osteosarcoma cell lines. Cancer Biol Ther. 2009;8(6):543-552.
[9] Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, et al. Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. PLoS One. 2008;3(10):e3469.
[10] Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. Neoplasia. 2005;7(11):967-976.
[11] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature. 1994;367(6464):645-648.
[12] Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T, et al. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. Int J Oncol. 2009;34(5):1381-1386.
[13] Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, et al. Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. Vet J. 2008;175(1):69-75.
[14] 中国知网.中国学术期刊总库 [DB/OL].2013-1-12.https://www.cnki.net
[15] 万方数据库.万方数据知识服务平台 [DB/OL].2013-1-12.http://www.wanfangdata.com.cn/
[16] 欧阳振,王栓科,康学文,等.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.
[17] 韩兴文,王栓科,康学文,等.Nanog mRNA在骨肉瘤类肿瘤干细胞中的表达和意义[J].第四军医大学学报,2009,30(6):513-516.
[18] 张培根,王栓科,康学文,等.赛来昔布对人骨肉瘤类肿瘤干细胞移植瘤微血管生成的影响[J].中国矫形外科杂志,2009,17(1):59-62.
[19] 周松,李锋,肖骏,等.三维无血清条件培养结合抗癌药物分离人骨肉瘤肿瘤干细胞[J].实用癌症杂志,2010,25(1):5-8.
[20] 娄楠,王宕,赵建武,等.应用低浓度长春新碱分离并鉴定MG-63细胞系中的骨肉瘤干细胞[J].中国老年学杂志,2010,30(5):645-647.

[21] 黄毓婧,何爱娜,孙元珏,等.CD133+骨肉瘤细胞的获取及其干细胞特性的初步鉴定[J].中国癌症杂志,2012,22(10):729-734.
[22] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001;414(6859):105-111.
[23] Zapperi S, La Porta CA. Do cancer cells undergo phenotypic switching? The case for imperfect cancer stem cell markers. Sci Rep. 2012;2:441.
[24] Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. N Engl J Med. 2006;355(12):1253-1261.
[25] 裘剑如.人骨肉瘤干细胞小鼠模型的建立及相关研究[D].上海:上海交通大学,2008:1-41.
[26] Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. Trends Cell Biol. 2005;15(9):494-501.
[27] Singh SK, Clarke ID, Hide T, et al. Cancer stem cells in nervous system tumors. Oncogene. 2004;23(43):7267-7273.
[28] Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, et al. Therapeutic implications of cancer stem cells. Curr Opin Genet Dev. 2004;14(1):43-47.
[29] Jordan CT. Targeting the most critical cells: approaching leukemia therapy as a problem in stem cell biology. Nat Clin Pract Oncol. 2005;2(5):224-225.
[30] Zhao R, Daley GQ. From fibroblasts to iPS cells: induced pluripotency by defined factors. J Cell Biochem. 2008;105(4):949-955.
[31] Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell. 2003;113(5):643-655.
[32] 田飞,丰盛梅,邓廉夫.骨肉瘤干细胞研究进展[J].中国骨肿瘤骨病,2011,10(2):188-191.
[33] Yin S, Li J, Hu C,et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. Int J Cancer. 2007;120(7):1444-1450.
[34] Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E,et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. Eur J Cancer. 2007;43(5):935-946.
[35] Terry J, Nielsen T. Expression of CD133 in synovial sarcoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2010;18(2):159-165.
[36] Tirino V, Desiderio V, Paino F, et al. Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. FASEB J. 2011;25(6):2022-2230.
[37] Heare T, Hensley MA, Dell'Orfano S. Bone tumors: osteosarcoma and Ewing's sarcoma. Curr Opin Pediatr. 2009;21(3):365-372.
[38] Niswander LM, Kim SY. Stratifying osteosarcoma: minimizing and maximizing therapy. Curr Oncol Rep. 2010;12(4):266-270.