

凝胶侵袭模型对胶质瘤细胞体外侵袭力研究的应用初探

谢蕊繁 张所军 高宝成 万锋 雷霆

【摘要】 目的 初步探讨凝胶侵袭模型用于人胶质瘤细胞体外侵袭力研究的可行性,观察普通培养的胶质瘤细胞与胶质瘤干细胞在凝胶侵袭模型中侵袭力的差异,为胶质瘤的体外研究寻求新的实验手段。**方法** 经纯化的 I 型和 III 型胶原与 MEM 培养基混合制备凝胶液,将原代培养的胶质瘤细胞经悬滴法制成的细胞球和胶质瘤干细胞所形成的细胞球种植于其中,每个细胞球含 $(10 \sim 15) \times 10^3$ 个细胞,在添加含有不同药物浓度基质金属蛋白酶抑制剂 GM6001 (0、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$) 的相应培养基中培养 4 d,测量不同药物浓度组肿瘤细胞侵袭距离及其差异。**结果** 不同处理组胶质瘤细胞在凝胶侵袭模型中生长良好,最初的细胞球形态呈规则圆形,随着时间的推移肿瘤细胞侵袭距离逐渐增加;且对 GM6001 的抑制作用表现出不同程度的剂量依赖性,以 75 $\mu\text{mol/L}$ GM6001 对普通培养的胶质瘤贴壁细胞的侵袭抑制作用最为明显(均 $P = 0.000$);而 25 $\mu\text{mol/L}$ GM6001 对胶质瘤干细胞球的侵袭抑制作用最显著($P = 0.002, 0.012, 0.000$)。**结论** 凝胶侵袭模型适用于普通贴壁培养的胶质瘤细胞和胶质瘤干细胞球。

【关键词】 神经胶质瘤; 肿瘤浸润; 胶原; 基质金属蛋白酶类; 细胞,培养的

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2010.05.006

The primary study on the application of gelatum invasive model as an invasiveness assay for glioma cells in vitro XIE Rui-fan, ZHANG Suo-jun, GAO Bao-cheng, WAN Feng, LEI Ting. Department of Neurosurgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China

Corresponding author: WAN Feng (Email: wanruiyan@hotmail.com)

【Abstract】 Objective To investigate the feasibility of applying gelatum invasive model as an invasiveness assay for human glioma cells in vitro, observe the differences of invasiveness between adherently cultured differentiated human glioma cells and human glioma stem cells (GSCs), and validate it as a novel method for in vitro glioma invasiveness research. **Methods** The spheres $[(10-15) \times 10^3 \text{ cells/sample}]$ formed by hanging drops from primary cultured adherent glioma cells and glioma stem cells spheres were planted respectively into gelatum invasive model and cultured in the corresponding medium with matrix metalloproteinases (MMPs) inhibitor GM6001 at different concentrations (0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$) in 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 . The distance of cells migration in the 2 groups was recorded by microscope ($\times 240$) and measured through Photoshop software, and then analysed by SPSS 16.0. **Results** The initial adherent cells spheres showed spherical and cells grew well in gelatum invasive model, and invaded in the gelatum with time. The inhibitory effects of GM6001 on invasiveness of the 2 groups were distinctive and showed a dose-dependent manner compared with the controls. GM6001 at 75 $\mu\text{mol/L}$ had the greatest inhibitory effect on human glioma differentiated cells ($P = 0.000$, for all) after 4 d culture compared with the controls, whereas for human glioma stem cells spheres it was at 25 $\mu\text{mol/L}$ ($P = 0.002, 0.012, 0.000$). **Conclusion** The gelatum invasive model represents a useful and valid invasiveness assay which is applicable to both adherently cultured glioma cells and glioma stem cells spheres.

【Key words】 Glioma; Neoplasm invasiveness; Collagen; Matrix metalloproteinases; Cells, cultured

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30801177)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医

院神经外科

通信作者:万锋 (Email: wanruiyan@hotmail.com)

胶质瘤是一种易复发、预后差的中枢神经系统肿瘤,强侵袭性是其恶性行为特点之一。其侵袭过程主要与肿瘤细胞黏附和基质降解有关,目前开展的胶质瘤细胞侵袭性的实验研究大多是针对后者,其中以 Transwell 侵袭小室测定法最具代表性,但这种方法尚存在部分技术本身的缺陷。为此,本研究将类似于体内基质的含 I 型胶原和 III 型胶原成分的凝胶侵袭模型作为胶质瘤细胞的生长间质,采用可减弱肿瘤细胞侵袭力的基质金属蛋白酶(MMPs)抑制剂,以观察在不同浓度广谱基质金属蛋白酶抑制剂环境下胶质瘤细胞和胶质瘤干细胞(GSCs)侵袭力的改变,并比较它们之间的差异,从而验证凝胶侵袭模型应用于胶质瘤侵袭力研究的可行性。

材料与方法

一、材料

1. 细胞来源 原代肿瘤细胞取自华中科技大学同济医学院附属同济医院神经外科 1 例 49 岁女性胶质母细胞瘤患者的手术标本,为世界卫生组织(WHO)病理分级 IV 级。本实验所用细胞经体传代至第 5 代。

2. 主要试剂与仪器 人碱性纤维母细胞生长因子(bFGF)、人表皮生长因子(EGF)和人血小板源性生长因子(PDGF-AB)均购自美国 Peprotech 公司。BIT 营养液购自加拿大 Stemcell 公司。小牛血清、MEM 培养基和 DMEM 培养基由美国 Gibco 公司提供。DMEM/F12 培养基由美国 HyClone 公司提供。PureCol 胶为荷兰 Inamed 公司产品。基质金属蛋白酶抑制剂 GM6001 为德国 Merck 公司产品。倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司。

二、研究方法

1. 细胞培养 人胶质母细胞瘤手术标本经磷酸盐缓冲液(PBS)清洗、剪碎、胰蛋白酶消化和滤网过滤收集细胞,经普通培养的胶质瘤细胞采用含有体积分数为 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养,胶质瘤干细胞以含 20 ng/ml 表皮生长因子、碱性纤维母细胞生长因子、血小板源性生长因子和体积分数为 20% BIT 营养液的 DMEM/F12 培养基培养。原代胶质瘤干细胞经流式细胞术检测、体外自我更新能力实验、多向分化、干细胞标志物检测(图 1)及体内成瘤实验鉴定。

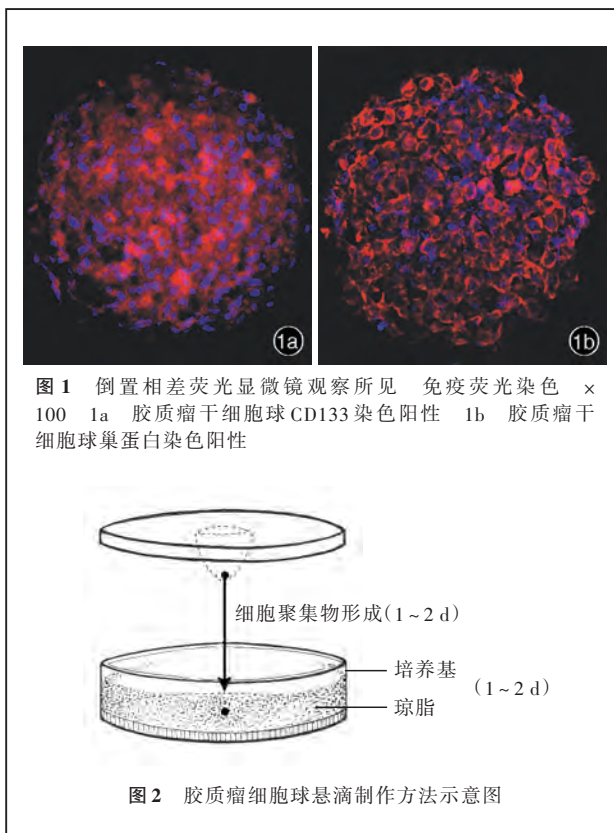


图 1 倒置相差荧光显微镜观察所见 免疫荧光染色 $\times 100$ 1a 胶质瘤干细胞球 CD133 染色阳性 1b 胶质瘤干细胞球巢蛋白染色阳性

图 2 胶质瘤细胞球悬滴制作方法示意图

2. 细胞悬滴制作 对于常规含血清、贴壁培养的胶质瘤细胞,为了形成细胞球样结构,每滴细胞悬滴用 $30 \mu\text{l}$ 培养基重悬 $(10 \sim 15) \times 10^3$ 个细胞制成,接种于直径 100 mm 的平皿盖上,平皿中盛 10 ml 灭菌水防止悬滴蒸发干涸。将平皿盖内面朝下放置,在重力作用下 1~2 d 后细胞悬滴逐渐聚集形成细胞聚集物。然后将其置于底部包被了 2% 琼脂的培养皿中 1~2 d,由于细胞完全不能黏附于琼脂上,细胞聚集物进一步折叠、翻滚生长,并逐渐变圆形成细胞球^[1](图 2)。

3. 凝胶侵袭模型制备 将含有 97% I 型胶原的 PureCol 胶、10 \times MEM 培养基和 0.10 mol/L 氢氧化钠在低温条件下按 8 : 1 : 1 混匀,并调节 pH 值至 7.20。将上述凝胶液以 $500 \mu\text{l}$ /孔铺至 24 孔板中,然后将制备好的胶质瘤干细胞球接种于各孔中,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存 30~60 min,待凝胶固化、细胞球被包埋其中后,覆盖含有不同浓度 GM6001 (25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基,同时设不添加 GM6001 的培养基作为对照。置培养箱中常规培养,每天观察各组细胞的侵袭距离,并在同等放大倍数($\times 240$)下拍照记录。

4. 图像分析 采用 Photoshop 图文工具对各个

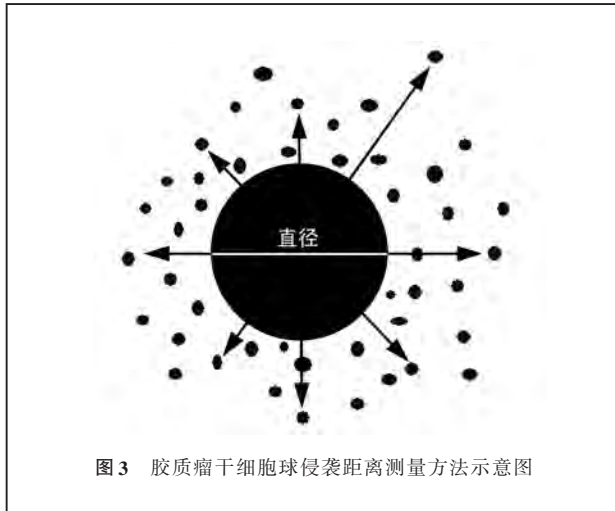


图 3 胶质瘤干细胞球侵袭距离测量方法示意图

胶质瘤干细胞球分别沿 8 个不同的轴向测量侵袭至最远细胞两端之间的距离,再减去体外培养第 0 天细胞球的直径并除以 2,即得出每一细胞球在 8 个方向上的平均侵袭距离(图 3),然后 Sigmaplot 软件制图。采用 SPSS 16.0 计算机软件进行数据计算和统计分析,计量资料进行单因素方差分析,不同浓度组之间的两两比较行 Scheffe 检验。统计推断的检验水准均为 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、原代常规贴壁培养胶质瘤细胞侵袭距离的观察

胶质瘤贴壁细胞最初呈规则圆形,以后肿瘤细胞逐渐从球的边缘侵袭出来,侵袭距离随着时间的推移逐渐延伸(图 4)。随着侵袭抑制剂 GM6001 药物浓度的增加,肿瘤细胞的迁移距离逐渐受到抑制并呈剂量依赖性,当 GM6001 药物浓度达到 $75 \mu\text{mol/L}$ 时其抑制作用最强($P = 0.000$;表 1,2)。

二、原代胶质瘤干细胞球侵袭距离的观察

胶质瘤干细胞球最初呈规则圆形,以后肿瘤细胞逐渐从球的边缘侵袭出来,侵袭距离随着时间的推移逐渐延伸(图 5);当侵袭抑制剂 GM6001 药物浓度为 $25 \mu\text{mol/L}$ 时即产生明显的抑制作用($P = 0.002, 0.012, 0.000$),但随着药物浓度的继续增加,并未显示出明显的剂量依赖性(表 3,4)。

讨 论

肿瘤细胞的侵袭和转移是影响患者预后的重要因素,其主要依赖细胞外基质(EM)和基底膜的降

表 1 不同 GM6001 浓度组原代胶质瘤贴壁细胞侵袭距离的比较($\bar{x} \pm s, \text{cm}$)

组 别	样本例数	2 d	3 d	4 d
0 $\mu\text{mol/L}$ 组(1)	4	11.50 \pm 2.49	16.77 \pm 2.21	19.16 \pm 2.79
25 $\mu\text{mol/L}$ 组(2)	4	8.75 \pm 2.73	11.68 \pm 4.74	15.63 \pm 1.83
50 $\mu\text{mol/L}$ 组(3)	4	8.10 \pm 1.02	10.09 \pm 1.06	11.16 \pm 0.48
75 $\mu\text{mol/L}$ 组(4)	4	4.79 \pm 1.02	8.41 \pm 1.00	8.94 \pm 0.81
100 $\mu\text{mol/L}$ 组(5)	4	6.71 \pm 1.85	8.61 \pm 0.86	10.30 \pm 0.68
F 值		14.502	36.210	12.832
P 值		0.000	0.000	0.000

表 2 不同 GM6001 浓度组原代胶质瘤贴壁细胞侵袭距离的两两比较

组间两两比	P 值			组间两两比	P 值		
	2 d	3 d	4 d		2 d	3 d	4 d
(1) : (2)	0.061	0.001	0.018	(2) : (4)	0.008	0.027	0.000
(1) : (3)	0.022	0.000	0.000	(2) : (5)	0.162	0.038	0.001
(1) : (4)	0.000	0.000	0.000	(3) : (4)	0.026	0.247	0.129
(1) : (5)	0.002	0.000	0.000	(3) : (5)	0.337	0.309	0.552
(2) : (3)	0.654	0.275	0.003	(4) : (5)	0.189	0.886	0.349

注:两两比较行 Scheffe 检验

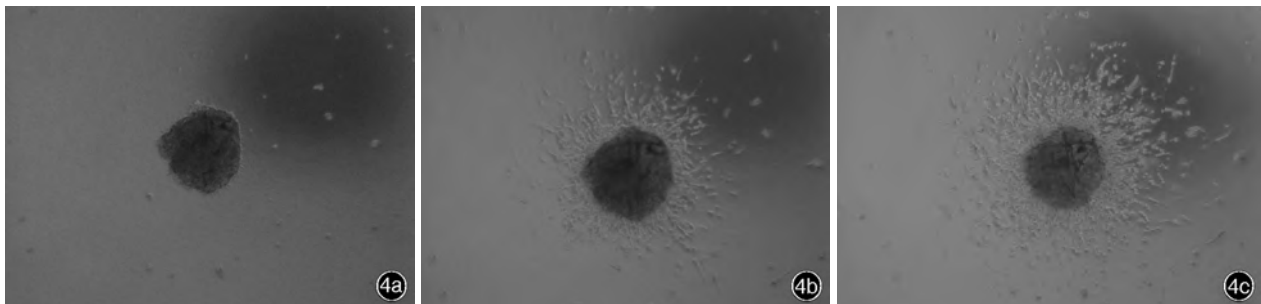


图 4 倒置相差显微镜观察原代胶质瘤贴壁细胞在凝胶侵袭模型中的侵袭距离,可见肿瘤细胞随着时间的推移逐渐由球内向球外在凝胶内侵袭迁移 $\times 240$ 4a 体外培养第 0 天 4b 体外培养第 2 天 4c 体外培养第 4 天

表 3 不同 GM6001 浓度组原代胶质瘤干细胞球侵袭距离的比较($\bar{x} \pm s, \text{cm}$)

组别	样本例数	2 d	3 d	4 d
0 $\mu\text{mol/L}$ 组(1)	4	5.50 \pm 1.18	6.94 \pm 1.09	11.34 \pm 2.42
25 $\mu\text{mol/L}$ 组(2)	4	2.91 \pm 1.34	4.85 \pm 1.09	4.30 \pm 1.02
50 $\mu\text{mol/L}$ 组(3)	4	5.16 \pm 0.92	5.00 \pm 0.78	4.73 \pm 1.15
75 $\mu\text{mol/L}$ 组(4)	4	5.86 \pm 0.65	7.27 \pm 0.29	6.88 \pm 0.80
100 $\mu\text{mol/L}$ 组(5)	4	4.07 \pm 0.99	5.87 \pm 0.81	6.48 \pm 1.00
F 值		11.869	27.942	10.632
P 值		0.000	0.000	0.000

表 4 不同 GM6001 浓度组原代胶质瘤干细胞球侵袭距离的两两比较

组间两两比	P 值			组间两两比	P 值		
	2 d	3 d	4 d		2 d	3 d	4 d
(1):(2)	0.002	0.012	0.000	(2):(4)	0.001	0.004	0.002
(1):(3)	0.675	0.019	0.000	(2):(5)	0.152	0.207	0.009
(1):(4)	0.649	0.676	0.000	(3):(4)	0.383	0.006	0.010
(1):(5)	0.079	0.186	0.000	(3):(5)	0.176	0.282	0.033
(2):(3)	0.007	0.850	0.592	(4):(5)	0.029	0.084	0.616

注:两两比较行 Scheffe 检验

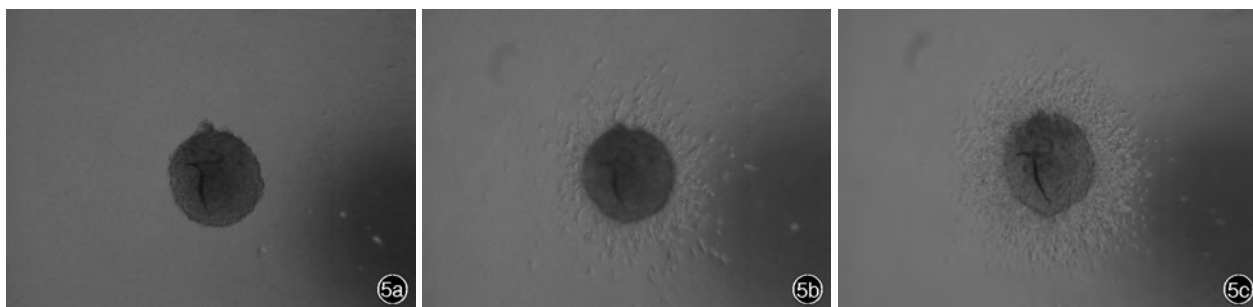


图 5 倒置相差显微镜观察原代胶质瘤干细胞球在凝胶侵袭模型中的侵袭距离,可见肿瘤细胞随着时间的推移逐渐由球内向球外在凝胶内侵袭迁移 $\times 240$ 5a 体外培养第 0 天 5b 体外培养第 2 天 5c 体外培养第 4 天

解。针对这一过程,目前应用最为广泛的体外实验研究方法是 Transwell 侵袭小室测定法,它们都以含 LN/IV 型胶原的 Matrigel 及微孔膜形成的人工基底膜作为细胞迁移的间质,并将细胞条件培养液作为趋化剂诱导细胞侵袭,然后通过固定、染色观察移至微孔膜下层的细胞数目。尽管这种方法可以很好地模拟基底膜的结构,但细胞的侵袭力测定仍然因趋化梯度的存在、Transwell 小室内低血清的培养条件,以及固定染色过程中细胞的丢失而受到不同程度的干扰。因此在本实验中,我们采用了一种可以将细胞完全包被于模拟的基质间质中的凝胶侵袭模型,培养液可均匀渗透其中并作用于细胞,这种三维结构避免了上述技术所存在的缺陷,并能更接近肿瘤细胞在体内的空间状态及生长情况。此外,鉴于基质金属蛋白酶及金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)在肿瘤发生发展中扮演了重要的调控角色^[2-5],我们还运用了一种人工合成的广谱基质金属蛋白酶抑制剂 GM6001,迄今尚未发现该抑制剂对细胞存在毒性。通过观察在不同浓度 GM6001 的培养条件下各组胶质瘤细胞的侵袭距离及其差异,判断凝胶侵袭模型研究肿瘤细胞侵袭力的适用性。

同时,我们在本项实验中还引入了胶质瘤干细胞,后者由于具有显著的干细胞特性而被认为是导致胶质瘤发生发展的“元凶”^[6,7]。已有研究表明,胶质瘤干细胞主要通过上调基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和-9(MMP-9)的表达促进胶质瘤细胞在体内外的侵袭和迁移^[8]。将胶质瘤干细胞和普通培养的胶质瘤贴壁细胞一起作为本实验的研究对象,不仅可以进一步验证凝胶侵袭模型是否具有广泛的应用前景,还可比较二者侵袭力的差异。

在本研究中我们发现,两种细胞在凝胶侵袭模型中生长状态良好,其侵袭距离随着时间地推移而逐渐增加。在无 GM6001 存在的条件下,普通培养的胶质瘤贴壁细胞短期内侵袭力强于胶质瘤干细胞,但就二者表现出的随时间变化趋势而言,胶质瘤干细胞在体外培养至第 4 天即呈现明显的侵袭加速表现,这可能与其独有的干细胞特性有关。在将 GM6001 同时作用于两种细胞时,其对药物浓度的敏感性也显示出不同程度的差异。当 GM6001 药物浓度 $\leq 75 \mu\text{mol/L}$ 时,普通培养的胶质瘤贴壁细胞的侵袭力随药物浓度的升高而逐渐减弱,而胶质瘤干细胞在 GM6001 药物浓度为 $25 \mu\text{mol/L}$ 时即出现

明显的侵袭抑制,提示胶质瘤干细胞对基质金属蛋白酶抑制剂具有更高的敏感性。

综上所述,本实验方法不影响肿瘤细胞的正常生长并能很好地模拟肿瘤细胞在体内的生存结构及条件,弥补了Transwell侵袭小室测定法本身固有的技术局限性。此外,Transwell侵袭小室测定法测量的是侵袭细胞的数目,而本实验方法测量的是细胞侵袭的距离,而且可动态观察随时间的延长细胞侵袭距离的改变。对于悬浮培养细胞球如肿瘤干细胞球,本法更为可行;对于常规贴壁培养的细胞,可以通过上述悬滴制备方法制成细胞球;对于不同肿瘤细胞,因为侵袭力不同,需要预实验确定在体外凝胶中的侵袭天数,以获得最显著的实验差异;对于生长迅速的细胞,因为细胞球自身的快速生长和膨胀,对侵袭距离的测量会有一定影响。如果能将凝胶侵袭模型固定进行免疫组织化学染色,还可看到侵袭距离最远细胞的一些蛋白质标志物的表达情况,而且在对本法的后期实验研究中还有望将模型中侵袭最远的细胞分离出来进行深入的分子

生物学分析,从而更为深入地研究胶质瘤细胞的侵袭力及其机制。

参 考 文 献

- [1] Del Duca D, Werbowetski T, Del Maestro RF. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *J Neurooncol*, 2004, 67:295-303.
- [2] Nakada M, Kita D, Futami K, et al. Roles of membrane type 1 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. *J Neurosurg*, 2001, 94:464-473.
- [3] Murray GI, Duncan M, Arbuckle E, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut*, 1998, 43:791-797.
- [4] 刘伟, 王长坤. 基质金属蛋白酶与胶质瘤浸润性的关系. *中国现代神经疾病杂志*, 2004, 4:233-235.
- [5] 周宏旭, 于士柱. 基质金属蛋白酶-2、9与胶质瘤间质血管形成关系的研究进展. *中国现代神经疾病杂志*, 2005, 5:112-115.
- [6] Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:425-436.
- [7] Fang JS, Deng YW, Li MC, et al. Isolation and identification of brain tumor stem cells from human brain neuroepithelial tumors. *Zhong Hua Yi Xue Za Zhi*, 2007, 87:298-303.
- [8] 赵红宇, 金辉, 于宏伟, 等. 基质金属蛋白酶对胶质瘤干细胞侵袭作用的影响. *中国肿瘤临床*, 2009, 36:388-392.

(收稿日期:2010-07-03)

· 小 词 典 ·

中英文对照名词词汇(一)

阿霉素 adriamycin(ADM)
 癌胚抗原 carcinoembryonic antigen(CEA)
 C-Jun 氨基末端激酶 C-Jun N-terminal kinase(JNK)
 伴镶边空泡的远端型肌病
 distal myopathy with rimmed vacuole(DMRV)
 北美放射学会
 Radiological Society of North America(RSNA)
 北美症状性颈动脉内膜切除术试验
 North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial
 (NASCET)
 表观扩散系数 apparent diffusion coefficient(ADC)
 表面通透性 permeability surface(PS)
 表皮生长因子 epidermal growth factor(EGF)
 表皮生长因子受体 epidermal growth factor receptor(EGFR)
 丙卡巴肼 procarbazine(PCB)
 补体结合试验 complement fixation test(CFT)
 程序性死亡 programmed cell death(PCD)
 持续气道正压通气
 continuous positive airway pressure(CPAP)
 磁共振波谱 magnetic resonance spectroscopy(MRS)
 磁共振体层血管造影
 magnetic resonance tomographic angiography(MRTA)
 达峰时间 time to peak(TTP)

达卡巴嗪 dacarbazine(DTIC)
 单纯疱疹病毒 herpes simplex virus(HSV)
 单核苷酸多态性 single nucleotide polymorphism(SNP)
 单核细胞趋化蛋白-1
 monocyte chemotactic protein-1(MCP-1)
 蛋白基因产物9.5 protein gene product 9.5(PGP9.5)
 蛋白激酶B protein kinase B(PKB)
 [丝氨酸/苏氨酸激酶 serine/threonine kinase(AKT)]
 蛋白激酶C protein kinase C(PKC)
 碘化丙啶 propidium iodide(PI)
 电解可脱式弹簧圈 Guglielmi detachable coil(GDC)
 β -淀粉样蛋白 amyloid- β protein(A β)
 β -淀粉样蛋白前体 amyloid β -protein precursor(APP)
 凋亡蛋白酶激活因子1
 apoptotic protease activating factor-1(APAF-1)
 凋亡抑制蛋白 inhibitor of apoptosis protein(IAP)
 凋亡抑制因子 apoptosis inhibitor(API)
 端粒重复序列扩增
 telomeric repeat amplification protocol(TRAP)
 短暂性脑缺血发作 transient ischemic attack(TIA)
 多排螺旋CT multi-detector spiral CT(MSCT)
 多药耐药基因1 multidrug resistance gene 1(MDR1)