

研究论文

条件性重编程人源肿瘤细胞初步研究

赵鸿雁 赵旋 陈如章 高基民*

(温州医科大学检验医学院, 生命科学学院, 温州 325035)

摘要 该研究利用条件性重编程技术培养来源于人肺癌、乳腺癌组织的原代细胞。细胞计数结果显示, 利用条件性重编程技术可以在体外较短时间内获取大量细胞, 并可在体外传代较长时间。制备培养的原代细胞的染色体标本并进行显带处理, 结果显示, 原代细胞的染色体为多倍体。STR分析结果显示, 培养的细胞基本保留了其来源组织的分子遗传学特性。HE染色显示, 培养的原代细胞中存在明显的多核仁以及明显的核分裂像。免疫组化结果显示, 体外培养的原代细胞高表达CD44以及EpCAM, 不表达ER、CK7等常见的表面标志物。体外悬浮培养、类器官培养以及流式细胞术结果表明, 利用条件性重编程技术培养的原代细胞存在干细胞特性。综上所述, 利用条件性重编程技术可在短时间内在体外获得较多的原代肿瘤细胞, 并且所获得的肿瘤细胞具有部分干细胞的特征。

关键词 条件性重编程; 原代细胞; 干细胞

Preliminary Study on Conditional Reprogramming of Human Tumor Cells

ZHAO Hongyan, ZHAO Xuan, CHEN Ruzhang, GAO Jimin*

(Institute of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract The study used conditional reprogramming techniques to culture primary cells derived from human lung and breast cancer tissues. Cell count results showed that a large number of cells can be obtained in a short time *in vitro* using conditional reprogramming techniques and can be passaged *in vitro* for a longer period of time. Chromosomal specimens of the cultured primary cells were prepared and subjected to banding treatment, and the results showed that the chromosomes of the primary cells were polyploid. The STR analysis showed that the cultured cells substantially retained the molecular genetic properties of the tissue from which they were derived. HE staining showed significant polynuclear and distinct mitotic figures in the cultured primary cells. The results of immunohistochemistry showed that the primary cells cultured *in vitro* expressed CD44 and EpCAM, and did not express common surface markers such as ER and CK7. *In vitro* suspension culture, organ-like culture and flow cytometry results showed that the primary cells cultured by the conditional reprogramming technique had the characteristics of stem cells. In summary, the conditional reprogramming technique can obtain more primary tumor cells *in vitro* in a short time, and the tumor cells have the characteristics of partial stem cells.

Keywords conditional reprogramming; primary cells; stem cells

收稿日期: 2019-05-15 接受日期: 2019-09-03

国家自然科学基金(批准号: 81573110)和温州市重大科技专项(批准号: ZJ2017014)资助的课题

*通讯作者。Te: 0577-86699341, E-mail: jimingao@yahoo.com

Received: May 15, 2019

Accepted: September 3, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81573110) and Science and Technology Major Projects of Wenzhou (Grant No.ZJ2017014)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699341, E-mail: jimingao@yahoo.com

网络出版时间: 2019-11-12 12:26:26

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1054.020.html>

肿瘤是指机体在各种物理、化学或生物性因素作用下, 发生损伤, 局部组织细胞异常增生所形成的新生物。随着社会的不断发展, 肿瘤逐渐成为威胁人类健康的重大因素, 且发病人群越来越年轻化。目前临床上肿瘤的治疗多采取手术切除、放疗、化疗等方法, 特异性差、对病人的损伤大, 且易复发。因此, 有学者提出精准医疗这一概念^[6-7]。几十年来, 科学家一直在努力开发用于研究人体原发性肿瘤和正常细胞增殖的方法^[2-4]。迄今为止, 传统细胞系仍然是细胞生物学和人体肿瘤研究的主要材料。然而, 肿瘤细胞系的构建成功率低(1%~10%), 取决于组织疾病的起源和进展情况且原发性肿瘤存在复杂的异质性, 这些异质性无法在细胞系中体现, 极大地限制了基础医学和转化医学的发展^[3]。条件性重编程(conditional reprogramming, CR)细胞培养技术是指在Rho激酶抑制剂(Y-27632)存在的培养体系中, 将经过辐射处理的3T3-J2细胞(小鼠胚胎成纤维细胞)与获取的人原代细胞共培养, 使人原代细胞获得部分干细胞特性和在体外无限制扩增的能力, 并保留原有肿瘤的遗传学和生物学特性^[18]。CR技术在没有任何外源性基因导入的情况下, 即可在短时间内获取大量的人原代细胞, 使得在体外长期稳定地扩增人原代肿瘤细胞成为了一种可能^[1,5]。本文旨在利用CR技术建立体外稳定扩增人乳腺癌细胞和肺癌细胞的体系, 为后续转化医学的研究和精准医疗打下基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集来自温州医科大学第一附属医院心胸外科、甲乳外科的肿瘤组织标本, 所有组织标本取材均告知患者及其家属, 并经过患者本人及其家属的同意, 且经温州医科大学伦理审查委员会审查批准所有组织在处理以及保存前均经病理专家确认为恶性肿瘤。

1.2 试剂及仪器

3T3-J2细胞购自美国Kerafast公司; DMEM培养基、谷氨酰胺混合物、胎牛血清、高糖DMEM培养基、F-12培养基、青霉素/链霉素双抗、谷氨酰胺、0.05% EDTA-胰酶、0.25% EDTA-胰酶购自Life Technologies公司; 霍乱毒素、秋水仙素、细胞消化液购自Sigma公司; 胶原酶、透明质酸酶、氢化可的松、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、

胰岛素、Triton-X 100、4%多聚甲醛、中性树胶购自索莱宝公司; 庆大霉素、两性霉素B购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 小牛血清BCS购自Hyclone公司; Y-27632购自Enzo公司; HE染色剂购自碧云天生物技术公司; 抗体CD44、p63、二抗、DAB显色液购自DAKO公司; PE-Anti Human CD44购自Biolegend公司; FITC-Anti Human EpCAM购自Abcam公司; 基质胶购自美国Corning公司。

6孔和24孔细胞培养板以及6孔超低吸附培养板购自美国Costar公司; CO₂细胞培养箱购自美国Forma Scientific公司; 倒置显微镜购自Nikon公司。

1.3 人原代细胞的分离纯化

将外科手术中切除的肿瘤组织放入含有1%双抗的DMEM培养基中, 立即用冰盒运输至实验室。去除组织中多余坏死组织以及脂肪组织后立即用PBS清洗多次, 然后在含有0.1%的胶原酶IV、10%胎牛血清的DMEM培养基中剪成1 mm³的碎片。37 °C培养箱中消化2 h, 用胶头滴管吸取培养基至无菌离心管中200 ×g离心4 min, 去除上清后, 加入培养基重悬下层沉淀。

1.4 人原代细胞的传代培养

获取的原代细胞与饲养细胞在条件性培养基中按照细胞数为4:1的比例进行共培养。饲养层细胞为经过30戈瑞X射线辐射处理的3T3-J2鼠成纤维细胞; 条件性培养基为DMEM/F12(V/V, 3:1)培养基, 并添加10%胎牛血清, 多种生长促进因子包括0.125 μg/mL EGF、5 μg/mL胰岛素、25 μg/mL氢化可的松、8.6 ng/mL霍乱毒素以及10 μmol/mL Y-27632。细胞放入37 °C、5% CO₂培养箱培养, 每2~3天更换1次饲养层细胞。更换饲养层细胞时先用PBS润洗细胞, 之后加0.05%胰酶于37 °C培养箱中消化1~2 min, 饲养细胞对胰酶较为敏感, 此时轻拍6孔板底部, 饲养细胞即从培养板脱落, 从而实现分离。肿瘤细胞传代时需先按照上述操作去除饲养细胞, 之后用细胞消化液消化3~8 min, 吸取细胞消化液于离心管中, 300 ×g离心5 min后, 加入条件性培养基传代培养。

1.5 人原代细胞的染色体标本制备

取处于对数生长期的人原代细胞, 向其中加入秋水仙素至终浓度为0.2 μg/mL, 继续培养3 h, 之后终止培养。500 ×g离心6 min, 去除上清液后使用适量0.075 mol/L的KCl重悬细胞沉淀, 37 °C水浴

20 min后, 向悬液中加入1 mL固定液, 轻轻混匀后, 500 ×g离心6 min去除上清液。向沉淀中加入8 mL固定液, 混匀后室温下静置固定20 min, 500 ×g离心6 min。之后重复固定1次, 500 ×g离心6 min, 依据细胞沉淀的量, 加入适量的固定液, 混匀后制备成磨砂状悬液。吸取2滴悬液滴加在干净的载玻片上, 轻轻吹散悬液后于火焰上烤干。70 °C烘烤2 h使标本老化。将老化处理的标本放于37 °C水浴预热的0.025%胰蛋白酶液中消化2 min, 用生理盐水漂洗标本, 终止消化, 之后用Gimsa染液染色15 min, 流水缓慢冲洗标本, 最后将标本放于室温下晾干, 显微镜下观察染色体形态。

1.6 短串联重复序列(short tandem repeat, STR)分析

取适量的细胞或组织, 向其中加入适当的细胞裂解液(200 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L EDTA、400 mmol/L NaCl、0.1 mg/mL蛋白酶K), 并于60 °C水浴过夜。吸取少量裂解液, 加入9倍体积的超纯水进行稀释。最后取少量稀释液体作为模板, 根据Amp FISTR Identifier Plus(AB)试剂盒进行操作, 依照指定程序进行PCR扩增反应, 最后GeneMapper ID-X软件分析基因型。

1.7 HE染色

取对数生长期的人原代细胞, 以 5×10^5 个/孔的细胞数接种于6孔板的玻片上, 培养2~3天后取出细胞爬片, 4%多聚甲醛固定20 min后用PBS漂洗细胞3次, 每次5 min; 常温下用苏木素染色5~8 min后, 流水冲洗10 min; 伊红染色1~2 min后, 流水洗涤细胞爬片; 室温风干后, 用中性树胶封片, 显微镜下镜检。

1.8 免疫组化

固定前处理同HE染色。固定后细胞爬片用0.5% Triton-X 100溶液室温下对细胞进行通透处理, 处理后用PBS洗涤3次, 每次5 min。滴加3% H_2O_2 于细胞爬片上, 室温下作用15 min后, PBS洗涤爬片3次。2% BSA室温封闭30 min, PBS洗涤3次, 之后滴加稀释好的一抗, 放入湿盒中, 4 °C孵育过夜。PBS洗涤3次, 之后加入稀释好的二抗, 室温下孵育, PBS洗涤3次。之后加入二抗, 于湿盒中室温下孵育2 h。PBS洗涤细胞, 滴加DAB溶液室温下显色8~10 min。用蒸馏水冲洗爬片, 之后用苏木素染色3~5 min。再将玻片用流水冲洗。接下来依次从75%浓度到85%浓度再到95%浓度最后到100%浓度的酒精中梯度脱水(各个浓度的酒精脱水2 min)。二甲苯之中透化, 待玻

片干燥后, 用中性树胶封片, 显微镜下镜检。

1.9 人原代细胞的悬浮培养

取生长状态良好的人原代细胞, 利用0.05%胰酶-EDTA去除饲养细胞后, 再利用Accutase细胞消化液将原代细胞消化为单细胞悬液。向培养皿中加入原代细胞培养基终止消化, 将细胞悬液收集于15 mL离心管之中, 300 ×g离心5 min。吸弃上清, 加入1 mL条件性培养基重悬细胞沉淀, 镜下计数。将细胞悬液的密度调整为 1×10^5 /mL, 之后将细胞悬液加入6孔低吸附培养板之中, 每孔2 mL。晃动6孔板, 使孔中的细胞分布均匀, 再将细胞放入培养箱之中培养。之后每天显微镜下观察细胞生长情况。

1.10 细胞球接种

将基质胶与条件性培养基按照5:1的比例混匀, 迅速将其放在冰上。收集悬浮培养的细胞球悬液于离心管之中, 4 °C 500 ×g离心5 min。去除上清, 将细胞沉淀与基质胶混匀。迅速将基质胶转移至6孔低吸附培养板中央。37 °C培养箱中孵育30 min。向孔中加入2 mL条件性培养基。放入培养箱中继续培养。2天后, 显微镜下观察细胞球生长情况, 并拍照记录。

1.11 流式细胞术检测人细胞CD44、EpCAM表达情况

取培养的原代细胞, 将细胞处理为单细胞悬液, 300 ×g离心5 min。去除上清, 用PBS溶液重悬细胞, 之后将细胞悬液转移至96孔尖底板中, 2 500 r/min离心3 min, 弃去上清。按照1:200的滴度, 在冰上利用PBS稀释PE-CD44、FITC-EpCAM抗体, 配制成染色液。向每孔中加入50 μL细胞染色液重悬细胞沉淀。4 °C避光孵育20 min。2 500 r/min离心3 min, 弃去上清。向孔中加入PBS溶液重悬细胞。离心后重复该步骤1次。利用200 μL PBS重悬细胞, 将悬液转移至流式管中, 流式细胞术检测细胞表面分子表达情况。

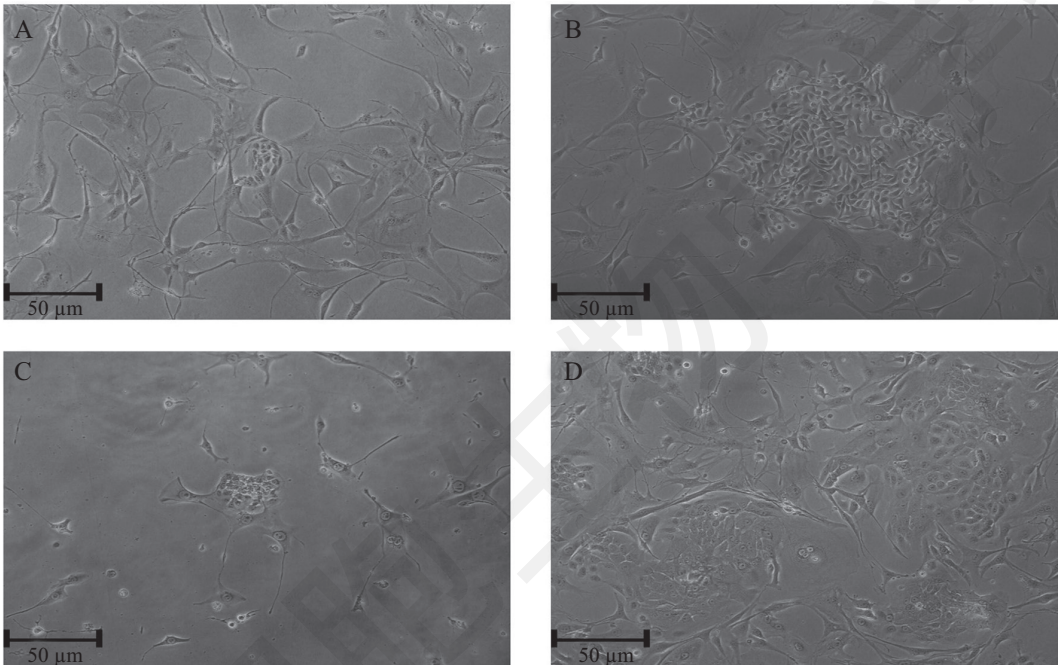
2 结果

2.1 利用条件性重编程技术可扩增原代肺癌细胞以及原代乳腺癌细胞

患者基本信息见表1, 在获取肿瘤细胞后, 利用条件性重编程细胞培养技术对原代肿瘤细胞进行培养, 显微镜下可见类似“鱼眼状”上皮细胞(图1A和图1B: 人乳腺癌细胞; 图1C和图1D: 人肺癌细胞), 并可在较长时间内持续传代(图2)。

表1 患者基本信息
Table 1 Patient basic information

编号 Number	性别 Gender	疾病类型 Type of disease	组织学类型 Histological type
1	Female	Breast cancer	Invasive cancer
2	Female	Breast cancer	Invasive cancer
3	Female	Breast cancer	Intraductal carcinoma
4	Female	Breast cancer	Invasive cancer
5	Male	Lung cancer	Adenocarcinoma
6	Male	Lung cancer	Carcinoma <i>in situ</i>



A: 新生原代乳腺癌细胞克隆群; B: 传代后乳腺癌细胞; C: 新生原代肺癌细胞克隆群; D: 传代后肺癌细胞。
A: clonal population of newborn primary breast cancer cells; B: breast cancer cells after passage; C: clonal group of newborn primary lung cancer cells; D: lung cancer cells after passage.

图1 原代肺癌细胞及原代乳腺癌细胞生长情况
Fig.1 Primary lung cancer cells and primary breast cancer cell growth

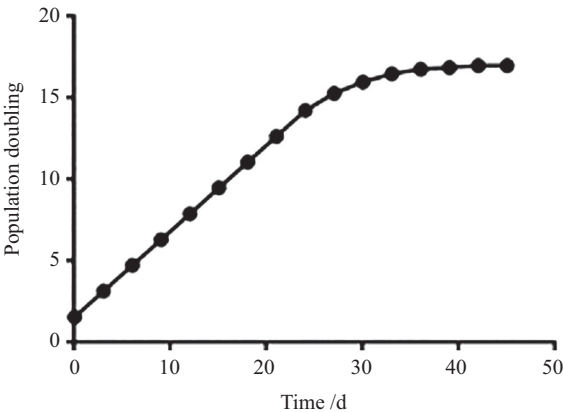


图2 原代肿瘤细胞的细胞倍增代数曲线
Fig.2 Cell multiplication algebra curve of primary cancer cells

2.2 利用条件性重编程技术培养的肿瘤组织源性原代细胞染色体为多倍体

肿瘤细胞的染色体多存在缺失、倒位或多倍体等异常现象,为确认利用条件性重编程技术培养的肿瘤组织源性的原代细胞中是否存在肿瘤细胞,我们制备了原代细胞的染色体标本,并对其进行了G显带处理(图3)。从图3中可以看出,利用条件性重编程技术培养的肿瘤组织源性的原代细胞的染色体中,存在多倍体。

2.3 原代肿瘤细胞及其来源组织的STR结果对比分析

为确认利用条件性重编程技术扩增的原代细胞是否保留了其来源肿瘤组织的分子遗传学特性,我们选取了一株目前传代时间最久的原代细胞,对该细胞以及其来源组织进行了STR鉴定分析,分析

结果显示,原代细胞保留了其来源组织的大部分分子遗传学特性(表2和表3)。

2.4 原代细胞的HE染色及免疫组化鉴定

为了进一步确定利用条件性重编程技术扩增的肿瘤组织源性原代细胞中是否存在肿瘤细胞,我们将原代细胞制成细胞爬片,并对细胞爬片进行了HE染色鉴定以及免疫组化鉴定。在HE染色片中可见明显的细胞核分裂相以及多核瘤巨细胞,经病理学专家镜检证实扩增的细胞中存在肿瘤细胞(图4)。同时,免疫组化结果显示,利用条件性重编程技术培养的原代细胞表达CD44、P63(图5),CK7、ER、PR以及HER-2等常见细胞表面标志物(数据未展示)。

2.5 条件性重编程技术培养的原代细胞具有干细胞特性

前已述及,细胞免疫组化结果显示,利用条件



A、B: 利用条件性重编程技术培养的原代细胞中的染色体; C: 正常来源细胞中的染色体。

A,B: chromosomes in primary cells cultured using conditional reprogramming techniques; C: chromosomes in normal cells.

图3 不同细胞中的染色体分布情况

Fig.3 Chromosome distribution in different cells

表2 利用条件性重编程技术培养的原代细胞STR的鉴定结果

Table 2 Identification of primary cell STRs cultured using conditional reprogramming techniques

短串联重复序列 STR sites	等位基因 Alleles
D3S1358	15
VWA	17/18
D16S539	11/13
CSF1PO	10/15
TPOX	8
Yindel	2
D19S433	14/15.2
TH01	9
FGA	23/26
D22S1045	13/16
D5S818	10/12
D13S317	8/12
SE33	19
D10S1248	13
D1S1656	13/15
AMEL	XY
D7S820	11

表3 原代细胞的来源组织的STR鉴定结果

Table 3 Source of primary cells STR identification of tissues

短串联重复序列位点	等位基因
STR Sites	Alleles
D3S1358	15/17
VWA	14/17
D16S539	10/13
CSF1PO	12
TPOX	8
Yindel	1
D19S433	13/15
TH01	6/9
FGA	18/24
D22S1045	16/17
D5S818	11/12
D13S317	8/9
SE33	19
D10S1248	13/14
D1S1656	13/15
AMEL	XY
D7S820	8/11

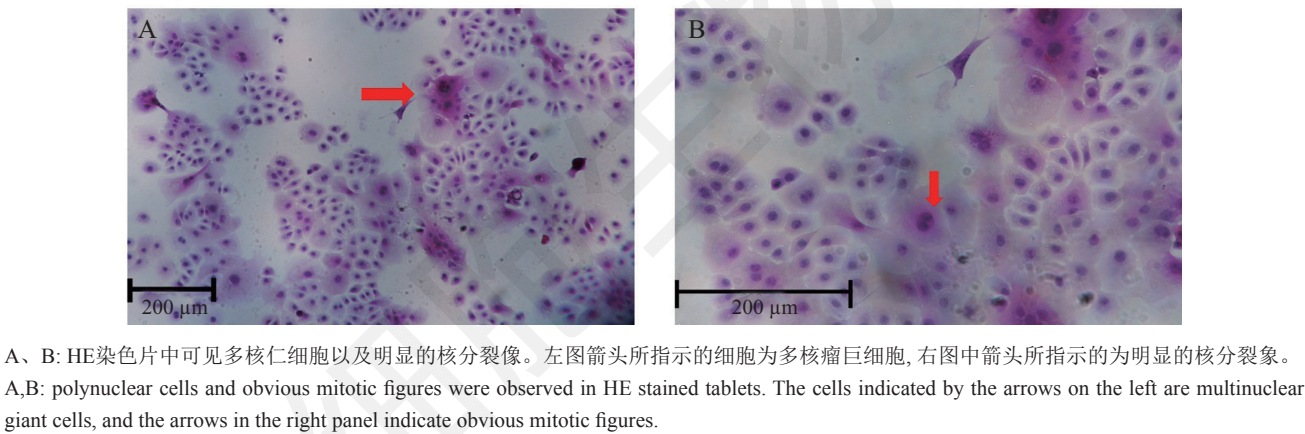


图4 利用条件性重编程技术培养的原代细胞的HE染色片

Fig.4 HE stained tablets of primary cells cultured using conditional reprogramming techniques

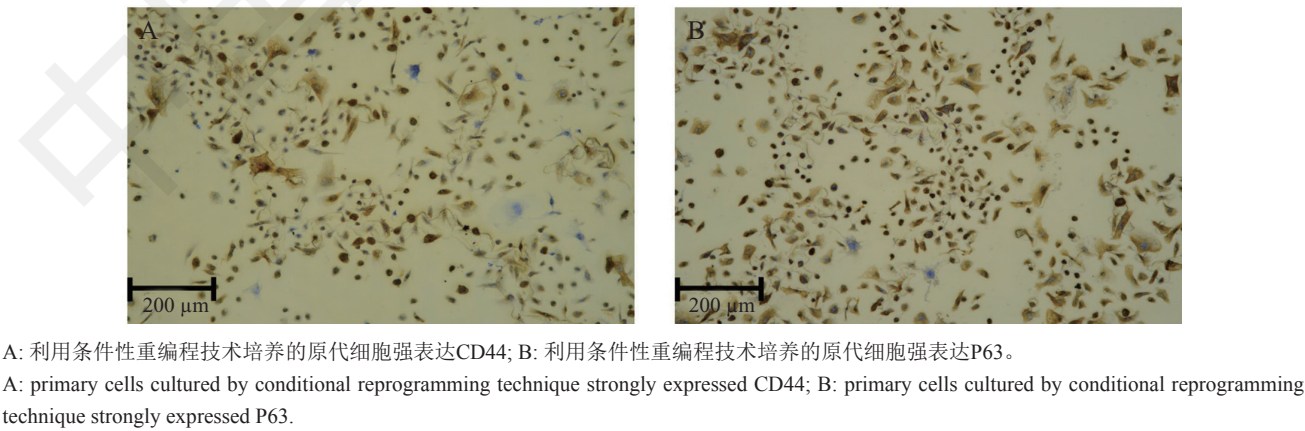


图5 利用条件性重编程技术培养的原代细胞的免疫组化鉴定结果

Fig.5 Immunohistochemical identification results of primary cells cultured using conditional reprogramming techniques

性重编程技术培养的原代肿瘤细胞强表达常见的干细胞标志物CD44。为进一步探究培养的原代细胞是否存在干细胞特性,我们将培养的原代细胞处理为单细胞悬液后,在超低吸附培养板中继续培养细胞,观察细胞能否自发形成干细胞样细胞球,结果显示,在悬浮培养的条件下原代细胞可自发形成细胞球。将细胞球接种于基质胶中,对细胞球进行类器官样培养,结果显示,细胞球可继续增长并相互融合(图6)。之后,我们利用流式细胞术检测原代细胞表面表达常见的干细胞表面标志物CD44以及常见的上皮细胞标志物EpCAM的表达情况,结果显示,原代细胞强表达CD44,不表达EpCAM(图7)。

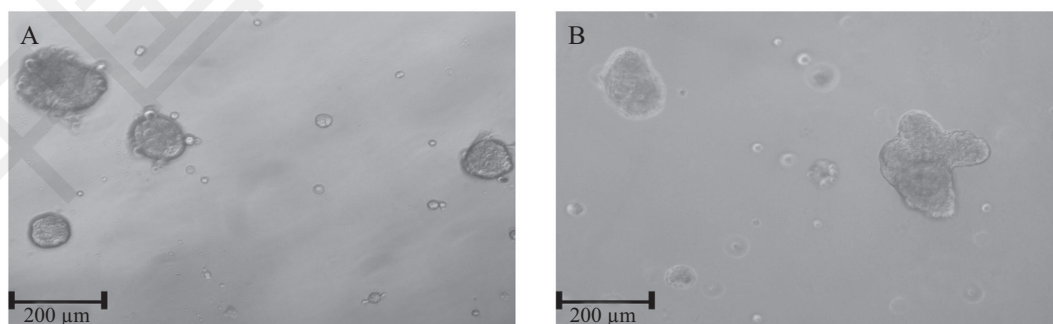
3 讨论

恶性肿瘤危害人类健康,降低生活质量。数据显示,2018年全球新增约1 800万恶性肿瘤患者,960万恶性肿瘤患者死亡,其中肺癌和乳腺癌患者的新发病例数以及死亡数高居榜首^[8]。而在我国,肺癌患者人数为78.7万,乳腺癌患者人数为30.4万,分别位列恶性肿瘤病例人数第一、第五^[9]。由于个体间差异以及肿瘤细胞的异质性,不同的恶性肿瘤患者对不同化疗药物的反应存在较大差异,部分患者在接受常规的化疗之后很快出现了肿瘤的复发和转移^[10]。另外,部分恶性肿瘤患者携带罕见突变,运用常规的化疗手段进行治疗往往收效甚微。选择合适的化疗方案,不仅可以增加患者的生活质量,延长患者生存期,同时也可以减少医疗资源的过度使用以及浪费。因此,建立临床相关的个体化肿瘤模型,筛

选最佳的化疗药物组合,发现肿瘤发生发展以及耐药的新机制,具有广泛的应用前景以及临床价值^[11]。

传统的原代细胞培养方法耗时长,且成功率较低,不适于建立个体化肿瘤模型。目前使用较多的个体化细胞培养模型包括:过表达*hTERT*^[12-14]、*c-myc*^[15]等基因,诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)、3D细胞培养^[16]、异体移植模型(patient-derived xenograft, PDX)^[17]等。然而,这些方法操作复杂、耗时较长,且价格昂贵,不利于个体化肿瘤模型的大规模建立推广。近年新开发的条件性重编程原代细胞技术具有在体外无需基因修饰,可在短时间内获取大量的原代细胞,价格相对较低等优势。目前,利用该方法建立的个体化肿瘤模型,并进行相应研究的例子已有很多:研究者利用条件性重编程细胞技术,体外扩增了一名具有20年复发性呼吸道乳头状瘤病史的患者的肿瘤细胞,通过药敏实验以及基因分析选择了针对该患者的最佳化疗方案,并成功治愈了该患者^[18]; Beglyarova等^[19]利用条件性重编程技术,培养出了原代胰腺癌细胞,并发现MYC-ERCC3相互作用在胰腺癌的发生发展过程中的起重要作用,可作为临床上治疗胰腺癌的潜在靶标; Timofeeva等^[20]利用条件性重编程技术扩增了前列腺肿瘤细胞,并确定它可作为研究人前列腺的个体化模型。以上研究充分展示了条件性重编程技术在个体化治疗领域的潜力。因此本文采用条件性重编程原代细胞培养方法,体外培养肿瘤细胞。

体外培养的肿瘤细胞,由于外界理化因素的作用,其各项生物学特性可能会发生改变,无法准确地

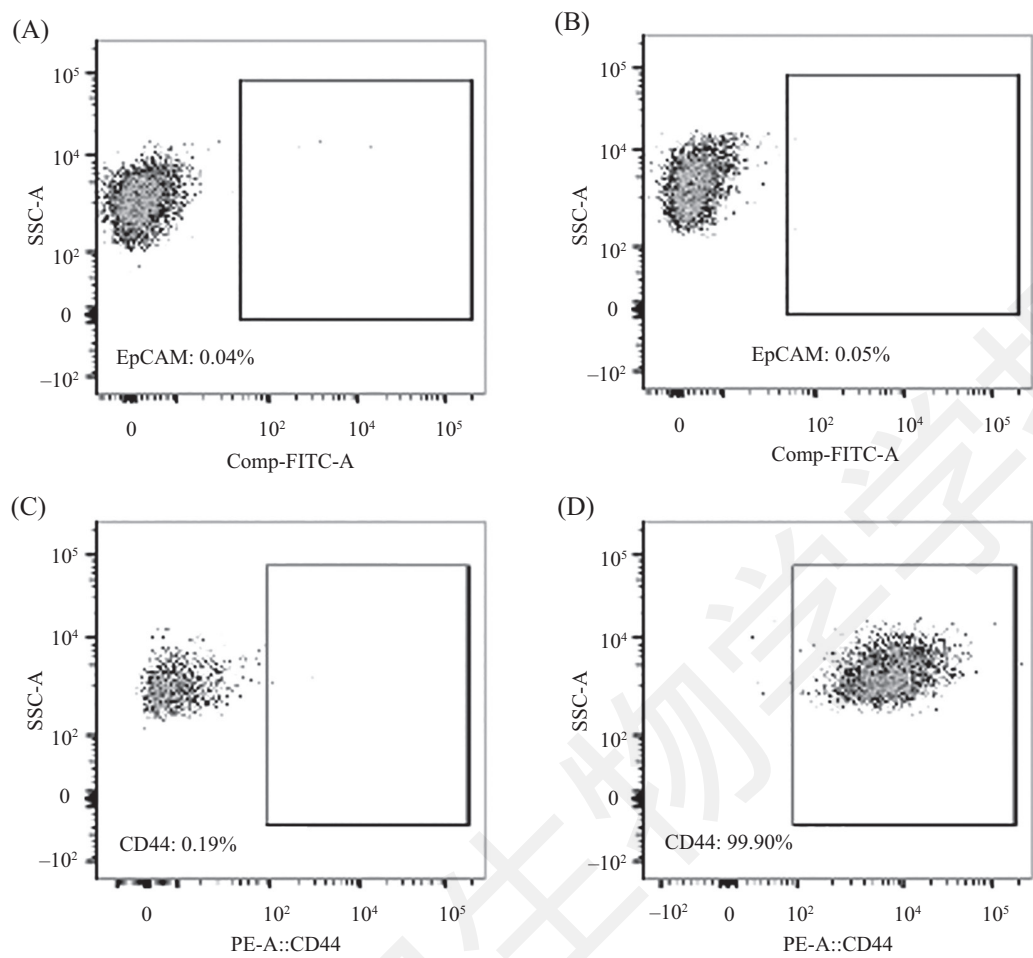


A: 悬浮培养下的原代细胞自发形成的细胞球; B: 类器官培养下的原代细胞球继续生长并相互融合。

A: the cell sphere formed spontaneously by the primary cells in suspension culture; B: the primary cell spheres under the culture of the organoids continue to grow and fuse with each other.

图6 原代细胞的悬浮培养以及类器官培养

Fig.6 Suspension culture of primary cells and organ-like culture



A: 空白对照; B: 原代细胞EpCAM的表达情况; C: 空白对照; D: 原代细胞CD44的表达情况。
A: blank control; B: expression of primary cell EpCAM; C: blank control; D: expression of primary cell CD44.

图7 原代细胞CD44、EpCAM的表达情况
Fig.7 Expression of primary cells CD44 and EpCAM

反映出体内细胞的特点。故在本实验中, 我们对利用条件性重编程技术培养的原代细胞的不同生物学特性进行了研究。在本研究中, 我们利用条件性重编程技术, 成功扩增出了原代乳腺癌细胞以及原代肺癌细胞, 并通过STR分析技术明确了利用条件性重编程技术扩增的原代细胞保留了其来源组织的遗传特性。同时通过染色体分析、HE染色确定了利用条件性重编程技术培养的原代细胞中含有肿瘤细胞。另外, 为进一步对扩增的细胞进行鉴定, 我们对扩增的原代细胞进行了免疫组化染色鉴定。有趣的是, 除了CD44以及P63以外, 原代细胞并不表达常见的肺癌、乳腺癌细胞表面标志物(ER、PR、CK7等)。查询资料得知, 乳腺癌细胞在体外培养的条件下, 细胞表面的ER、PR表达会下调^[21], 这与我们的细胞免疫组化结果相符。另外有报道称, 在原代肺

癌细胞中, CD44、CD90阳性的细胞, 表现出间充质干细胞的特征^[22], 并可在干细胞培养体系中形成细胞球。另外有研究者发现, 原代肺癌细胞中, 部分细胞表现出间充质细胞的特征: 不表达CK7、EpCAM等常见上皮细胞标志物^[23]。由此我们推测, 利用条件性重编程技术扩增的细胞, 具有间充质干细胞的特征。我们通过悬浮培养、流式细胞术, 确定了利用条件性重编程技术培养的原代细胞表达CD44, 可悬浮培养, 但不表达EpCAM。结合免疫组化结果, 我们推测, 利用条件性重编程技术培养的原代细胞, 是具有部分间充质干细胞特性的原代肿瘤细胞。总之, 我们验证了利用条件性重编程细胞培养技术, 可以在较短时间内扩增出大量的原代肿瘤细胞, 所扩增的原代细胞保留了大部分源组织的分子遗传学特性, 可以用于建立个体化肿瘤模型, 同时原代细胞具

有了部分干细胞特性。

参考文献 (References)

- Chapman S, Liu X, Meyers C, Schlegel R, McBride AA. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *J Clin Invest* 2010; 120(7): 2619-26.
- Cunderlikova B. Issues to be considered when studying cancer *in vitro*. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 85(2): 95-11.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, *et al*. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51(5): 1417-23.
- Gravina G. L, Mancini A, Colapietro A, Delle Monache S, Sferra R, Vitale F, *et al*. The small molecule ephrin receptor inhibitor, GLPG1790, reduces renewal capabilities of cancer stem cells, showing anti-tumour efficacy on preclinical glioblastoma models. *Cancers (Basel)* 2019; 11(3): 359.
- Liu X, Krawczyk E, Suprynowicz FA, Palechor-Ceron N, Yuan H, Dakic A, *et al*. Conditional reprogramming and long-term expansion of normal and tumor cells from human biospecimens. *Nat Protoc* 2017; 12(2): 439-51.
- Persson F, Rossing P. Urinary proteomics and precision medicine for chronic kidney disease: current status and future perspectives. *Proteomics Clin Appl* 2019; 13(2): e1800176.
- 王红阳. 精准医疗时代的肿瘤生物标志物发展. 山东大学学报(医学版)[Wang Hongyang. Development of tumor biomarkers in the era of precision medicine. *Journal of Shandong University (Medical Sciences)*] 2018; 56(10): 1-2.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6):394-424.
- 数据“说”癌. 实用心脑血管病杂志. Data "say" cancer. *Practical Journal of Cardiopulmonary and Pulmonary Vascular Diseases* 2019; 27(02): 6
- 黎张燕, 唐欲博, 罗红鹤, 程超, 柯尊富, 陈孝. 人原代肺癌细胞体外长期培养及个体化药敏研究. 今日药学(Li Zhangyan, Tang Yubo, Luo Honghe, Cheng Chao, Ke Zunfu, Chen Xiao. Long-term culture and individualized drug sensitivity study of human primary lung cancer cells *in vitro*. *Pharmacy today*) 2017; 27(02): 113-7,26.
- 梁亚冰, 张满, 杜华, 杨凌. 食管鳞状细胞癌组织体外3D培养. 中国细胞生物学学报(Liang Yabing, Zhang Man, Du Hua, Yang Ling. 3D culture of esophageal squamous cell carcinoma *in vitro*. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2019; 41(3): 456-60.
- Wei S, Lin J, Wunderlich M, Chou FS, Mulloy JC. Immortalization of human AE pre-leukemia cells by hTERT allows leukemic transformation. *Oncotarget* 2016; 7(35): 55939-50.
- Petkov S, Kahland T, Shomroni O, Lingner T, Salinas G, Fuchs S, *et al*. Immortalization of common marmoset monkey fibroblasts by piggyBac transposition of hTERT. *PLoS One* 2018; 13(9): e0204580.
- Sayiner A, Suren D. Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in thyroid neoplasms. *J buon* 2018; 23(1): 229-33.
- Hirose S, Takayama N, Nakamura S, Nagasawa K, Ochi K, Hirata S, *et al*. Immortalization of erythroblasts by c-MYC and BCL-XL enables large-scale erythrocyte production from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2013; 1(6): 499-508.
- Chen YC, Yoon E. High-throughput cancer cell sphere formation for 3D cell culture. *Methods Mol Biol* 2017; 1612: 281-91.
- Liu X, Krawczyk E, Suprynowicz FA, Palechor-Ceron N, Yuan H, Dakic A, *et al*. Conditional reprogramming and long-term expansion of normal and tumor cells from human biospecimens. *Nat Protoc* 2017; 12(2): 439-51.
- Yuan H, Myers S, Wang J, Zhou D, Woo JA, Kallakury B, *et al*. Use of reprogrammed cells to identify therapy for respiratory papillomatosis. *N Engl J Med* 2012; 367 (13): 1220-7.
- Beglyarova N, Banina E, Zhou Y, Mukhamadeeva R, Andrianov G, Bobrov E, *et al*. Screening of conditionally reprogrammed patient-derived carcinoma cells identifies ERCC3-MYC interactions as a target in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2016; 22 (24): 6153-63.
- Timofeeva OA, Palechor-Ceron N, Li G, Yuan H, Krawczyk E, Zhong X, *et al*. Conditionally reprogrammed normal and primary tumor prostate epithelial cells: a novel patient-derived cell model for studies of human prostate cancer. *Oncotarget* 2017; 8 (14): 22741-58.
- Brown DD, Dabbs DJ, Lee AV, McGuire KP, Ahrendt GM, Bhargava R, *et al*. Developing *in vitro* models of human ductal carcinoma in situ from primary tissue explants. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 153(2): 311-21.
- Wang P, Gao Q, Suo Z, Munthe E, Solberg S, Ma L, *et al*. Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines. *PLoS One* 2013; 8(3): e57020.
- Tiran V, Lindenmann J, Brcic L, Heitzer E, Stanzer S, Tabrizi-Wizsy NG, *et al*. Primary patient-derived lung adenocarcinoma cell culture challenges the association of cancer stem cells with epithelial-to-mesenchymal transition. *Sci Rep* 2017; 7(1): 10040.