

高转移鼠源性淋巴瘤细胞模型的建立及其生物学特性的研究

陈利荣^{1#*} 贾艳梅^{1#} 李元宏¹ 郭松佳²

(¹山西医科大学汾阳学院医学检验系, 汾阳 032200; ²山西省人民医院分子诊断与治疗实验室, 太原 030012)

摘要 该文建立了高转移性小鼠淋巴瘤细胞模型, 并对其进行了生物学特性研究。LC1和LC2两个细胞系来自同一个小鼠淋巴瘤。通过细胞形态学观察, 用常规的细胞生长曲线检测法、染色体核型分析、体外成球实验、侵袭和转移实验及体内成瘤实验检测细胞系的生物学特性及体内外致瘤能力。LC1细胞生长速度低于LC2细胞, LC1细胞的群体倍增时间为(24.33±2.12) h, LC2细胞的群体倍增时间为(20.52±2.71) h, 差异显著。LC2与LC1比较, 淋巴细胞髓系分化抗原Gr1表达量稍有增加, 干细胞标记物Sca1和CD44表达均上调。LC1和LC2两个细胞系均为非整倍体核型, LC1和LC2细胞系非整倍体的比例分别为5.24%和89.12%。在不同的培养介质中LC2细胞系的克隆形成能力均比LC1强。LC2细胞系的迁移、侵袭能力及体内外致瘤能力明显比LC1强。该文发现, LC1细胞系在肾脏中出现少量转移灶, 在肝脏中未发现转移灶, 而LC2细胞系在肾脏中转移率为100%, 在肝脏中也有大量转移灶出现。该研究成功地建立了高转移性小鼠淋巴瘤细胞模型, 为研究淋巴瘤的高转移机制提供了良好的实验材料。

关键词 恶性演进; 非整倍体; 侵袭; 转移; 致瘤性

Establishment of a Highly Metastatic Murine Lymphoma Cell Model and Study on Their Biological Characteristics

CHEN Lirong^{1#*}, JIA Yanmei^{1#}, LI Yuanhong¹, GUO Songjia²

(¹Laboratory Medicine Department in Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China;

²Molecular Diagnosis and Treatment Laboratory of Shanxi Province People's Hospital, Taiyuan 030012, China)

Abstract This study established a highly metastatic murine lymphoma cell model. The malignant evolutionary cell subsets of mouse lymphoma cells were screened and their biological characteristics were studied. The biological characteristics and tumorigenicity of cell lines were examined by cell growth curve assay, chromosome karyotype analysis, spheroidization experiment *in vitro*, invasion and metastasis experiment and tumor formation experiment *in vivo*. The proliferative ability of LC2 was stronger than LC1, and the difference was significant. The population doubling time of LC1 cells was (24.33±2.12) h, and the population doubling time of LC2 cells was (20.52±2.71) h. Compared with LC1, the lymphocyte myeloid differentiation antigen marker Gr1 was slightly increased, and the expression levels of stem cell markers Sca1 and CD44 were up-regulated in

收稿日期: 2020-10-07 接受日期: 2020-12-01

山西省高校科技创新项目(批准号: 2019L0998)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 15135882918, E-mail: clr928418@163.com

Received: October 7, 2020 Accepted: December 1, 2020

This work was supported by Science and Technology Innovation Project of Universities in Shanxi Province (Grant No.2019L0998)

#These authors contribute equally to this work

Corresponding author. Tel: +86-15135882918, E-mail: clr928418@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5458>

LC2. Both LC1 and LC2 were aneuploid karyotypes, and the aneuploid ratios of LC1 and LC2 were 5.24% and 89.12%, respectively. The clone formation ability of LC2 was significantly stronger than that of LC1 in different culture media. The migration and invasion abilities of LC2 were also significantly stronger than those of LC1. The LC2 had stronger tumorigenic ability *in vivo* than the LC1. This study found that LC1 cell line had a small number of metastatic foci in the kidney, but had no metastasis foci in the liver, while LC2 cell line had a 100% metastasis rate in the kidney and a large number of metastatic foci in the liver. This study successfully established a high metastatic mouse lymphoma cell model, which provided a good experimental material for studying the mechanism of lymphatic cancer high metastasis.

Keywords malignant evolution; aneuploidy; invasion; metastasis; tumorigenicity

肿瘤的浸润和转移是恶性肿瘤的主要特征,也是直接影响其治疗效果及预后的主要原因。在当今的肿瘤研究中,由于条件所限,我们大多采用的是小鼠皮下移植瘤模型,而非原位移植模型。移植部位的局限性使得移植瘤大多表现出不转移或转移率极低的现象,极大地阻碍了我们对肿瘤转移的深入研究。为此,如果能真实模拟肿瘤患者体内的肿瘤细胞的生长、侵袭和转移的全过程,建立具有高转移的动物模型及相应的细胞系,将为临床抗转移药物的筛选提供理想的实验工具。本研究成功建立了小鼠淋巴瘤细胞高转移模型,从而为研究淋巴瘤的转移机制提供了良好的实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及耗材 细胞培养板和Tanswell培养小室(USA, #3422)均购自Corning公司; RPMI-1640培养液、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和100 U/mL青霉素、0.02% EDTA+0.25%胰蛋白酶、胎牛血清胰酶均购自Hyclone公司; Matrigel、秋水仙素购自上海雅吉生物科技有限公司; 吉姆萨染料购自Sigma公司; 抗鼠FITC-CD44、APC-Gr1、APC-Sca1抗体均购自Biolegend公司。

1.1.2 实验动物和细胞系 SPF级C57BL/6小鼠4周龄, 20 g左右, 雌雄各半, 购自山西医科大学实验动物中心, 涉及的动物实验均符合我单位动物伦理的相关条例。LC1和LC2细胞系由本实验室制备。

1.2 实验方法

1.2.1 LC1和LC2细胞的形态学观察 LC1和LC2来自我们实验室自己制备的同一株小鼠淋巴瘤细胞系的两个亚克隆。于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养癌细胞, RPMI-1640培养液中添加终浓度为10%灭活胎

牛血清、100 U/mL青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素。

1.2.2 LC1和LC2细胞的表型检测 取一定量的处于指数生长期的LC1和LC2细胞约 1×10^6 细胞/管, 在每管中分别加入50 μL 含1% FBS的PBS缓冲液, 并充分混匀, 于室温中静置1 min以上, 再分别加入连接有荧光素的直标抗体抗鼠FITC-CD44、APC-Gr1、APC-Sca1, 振荡混匀。设空白对照。冰中孵育20~60 min后, 用含1% FBS的PBS缓冲液(pH7.2~pH7.4)洗1~2次, 加入50 μL 1%的多聚甲醛固定, 上机进行检测。

1.2.3 细胞生长曲线和群体倍增时间测定 分别取500 μL 密度为 1×10^3 个/mL的LC1和LC2细胞悬液接种于24孔板常规培养。每隔24 h收集3孔细胞进行细胞计数, 连续计数7天。以时间为横轴, 细胞数目为纵轴绘制细胞生长曲线。按照Patterson公式计算细胞在对数生长期的群体倍增时间(T_d)= $t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$, t 代表培养时间, N_0 及 N_t 分别代表起始接种时和培养到 t 时的细胞数。

1.2.4 细胞周期检测 收集培养的LC1和LC2细胞, 用PBS洗2次, 以 1×10^6 个/mL混合于70%冷乙醇中, -20°C 下固定过夜。为除去黏连成团的细胞群, 细胞悬液用300目细胞筛网过滤后于1 000 r/min条件下离心5 min, 弃去上清。加1 mL碘化丙啶染液于管中, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光处理30 min, 上机进行检测。

1.2.5 细胞核型检测 向处于对数生长期的癌细胞中加入秋水仙素(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 培养4 h后用0.25%胰蛋白酶消化, 1 000 r/min离心5 min、用37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的0.075 mol/L KCl溶液低渗处理15~20 min, 然后离心收集癌细胞, 加0.5~1.0 mL新鲜固定液(甲醇:乙酸=3:1)预固定, 以1 000 r/min离心8~10 min, 弃去上清液, 用固定液(5~8 mL)反复操作3次, 每次20 min, 再以1 000 r/min离心8~10 min, 将少量新鲜固定液溶合收集的癌细胞制成悬液, 于预冷的干净载玻片上滴2~3滴细胞悬

液,冷风吹干,用10% Giemsa染色液染色,水洗,干燥,镜检。

1.2.6 悬浮培养和Matrigel成球实验 消化离心生长状态良好的细胞,弃上清,PBS清洗2次。用干细胞培养基(DMEM/F12+1×B27+20 ng/mL bFGF+20 ng/mL EGF)重悬细胞,计数。铺板:取超低吸附6孔细胞培养板,1 000个/孔,补加4 mL培养基;7天左右完成培养,观察成球状态。

取指数生长期细胞制成单细胞悬液,调整细胞悬液密度为 1×10^4 个/mL。取50 μ L细胞悬液与50 μ L基质胶Matrigel(提前化冻)混合,然后绕24孔板的边缘均匀接种一圈,并扫摇晃。使细胞与基质胶混合液均匀铺于孔板周缘,随后将孔板放入37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中培养30 min,待Matrigel凝固后于每孔上层覆盖1 mL完全培养基,重新放入细胞培养箱,定期换液和观察细胞成球情况。一般7~12天后统计成球结果,只统计直径 $>50 \mu\text{m}$ 的克隆。

1.2.7 细胞体外迁移能力测定 将Transwell培养小室置于24孔板中,浸泡1 h后消化细胞,无血清培养基溶合细胞,制成细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^4 个/mL,每孔加入100 μ L;下腔室中加入全培养基,血清含量为20%,培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育20~24 h;用PBS清洗Transwell 2次,用5%戊二醛于4 $^{\circ}$ C固定;用PBS反复清洗2次,0.1%结晶紫室温染色0.5 h,然后再用PBS反复清洗2次,用棉球把上表面细胞擦去,于显微镜下观察并计数。

1.2.8 细胞体外侵袭能力测定 预先化冻Matrigel,预冷枪头和无血清培养基,吸取100 μ L的Matrigel与300 μ L无血清培养基充分混合均匀后取25 μ L置于Transwell板上室,覆盖整个聚碳酸酯膜,37 $^{\circ}$ C孵育30 min后Matrigel聚合成胶。无血清培养基溶合各组细胞,制备成浓度为 5×10^5 个/mL单细胞悬液。将100 μ L细胞悬液(5×10^4 个/mL)滴加入Transwell培养板上室,再添加200 μ L无血清培养基。加入含20% FBS的全培养基于Transwell培养板下室,在37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养24 h。用湿棉签把Matrigel和聚碳酸酯膜上表面的细胞轻轻擦去,小心取出上室,用冰预冷的甲醇固定30 min,并用结晶紫染色10 min。在高倍镜下随机取6个视野观察附着于聚碳酸酯膜下表面的细胞,计数并取平均值,反复操作2次。

1.2.9 体内致瘤性检测 将处于对数生长期的LC1和LC2细胞,用胰酶消化后收集,PBS溶液溶合细胞

制成 5×10^6 个/mL细胞悬液。将8只C57BL/6小鼠分为实验组和对照组,每组4只,分别于左侧腹股沟皮下注射0.1 mL不同的细胞悬液,每隔2天测量并记录小鼠肿瘤的生长情况,最大瘤体直径达2.0 cm时处死全部瘤鼠,观察记录小鼠皮下肿瘤数目、大小及腹水形成情况。肉眼和切片检查肺、肝、脾、肾等脏器,判断是否有肿瘤转移。

1.2.10 统计学分析 重复各实验3次,统计学分析使用SPSS 17.0软件,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示数据。各组之间的统计学差异用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

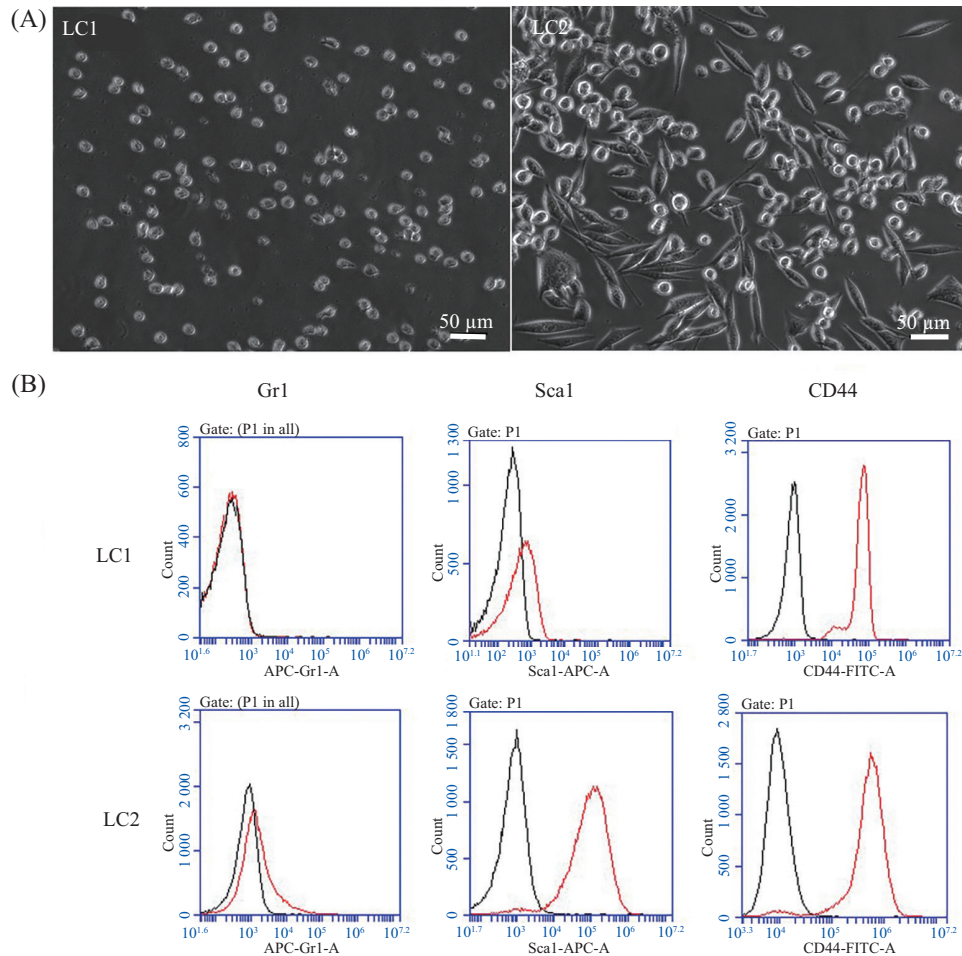
2 结果

2.1 LC1和LC2细胞系的形态和表型

我们建立的淋巴瘤克隆LC最初均为形态均一的悬浮细胞,在体外培养一段时间后会陆续出现少量细胞形态改变、胞体增大、黏附力增强等现象,且从悬浮状态转化为贴壁状态。我们用有限稀释法从LC细胞中克隆出两株单克隆细胞,将非黏附细胞克隆命名为LC1,黏附细胞克隆命名为LC2。LC1细胞大小一致,形态均一,与母细胞LC克隆相似均为圆形悬浮细胞,异质性较低;LC2细胞大小不一,形态各异,异质性较高,大部分为梭形贴壁细胞,少量圆形悬浮细胞。LC2与LC1细胞株相比,LC2比LC1细胞生长速度快,细胞形态由圆形向不规则形转变,细胞由小变大,核由小变大,且向巨核、不规则核改变,病理性核分裂增多(图1A)。细胞表面标记物检测结果表明,与LC1比较,LC2淋巴细胞髓系分化抗原Gr1(anti-granulocyte receptor-1)表达量稍有增加,干细胞标记物Sca1和CD44表达均上调,表明LC2细胞系中干细胞含量较高,恶性较强(图1B)。

2.2 LC1和LC2细胞系的增殖能力

对LC1和LC2细胞生长曲线检测结果显示,LC1细胞生长速度低于LC2细胞,LC1细胞的群体倍增时间为(24.33 ± 2.12) h,LC2细胞的群体倍增时间为(20.52 ± 2.71) h。LC2细胞群体倍增时间缩短,细胞生长速度增快。LC1细胞的 T_d 为LC2细胞的1.1~1.5倍,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2A)。LC1和LC2细胞的S期细胞比例呈逐渐上升趋势,而 G_1 和 G_2 期呈现下降趋势,差异显著($P < 0.05$,图2B和图2C)。提示与LC1细胞系比较,LC2细胞的分裂增殖能力明显增强。



A: 细胞形态; B: 细胞表型。图中黑色曲线为同种型抗体对照, 红色曲线为LC1/LC2细胞系中相应抗体的表达。

A: cell morphology; B: cell phenotype. The black curve is an isotype antibody control. The red curve shows the expression of corresponding antibodies in LC1/LC2 cell lines.

图1 LC1和LC2细胞系的形态和表型

Fig.1 Morphology and phenotype of LC1 and LC2 cell lines

2.3 LC1和LC2细胞系的核型分析

核型分析结果显示, 两种癌细胞系LC1和LC2的核型均为端着丝粒染色体, 属于典型的小鼠核型。细胞系LC1和LC2的细胞的染色体数目均呈非整倍性变化, 在LC1细胞系中98%的细胞为二倍体, 只发现少量非整倍体, 非整倍体以亚二倍体居多(图3A)。在LC2细胞系中发现80%以上细胞为非整倍体核型, 以超二倍体和亚四倍体居多。其中细胞系LC1的众数范围是28~50, LC2的众数范围是38~78, LC1细胞系中亚二倍体、二倍体和超二倍体所占比例分别为10.11%、89.07%、0.82%; LC2细胞系中亚二倍体、二倍体和超二倍体所占比例分别为19.21%、6.42%、74.37%(图3B)。LC1和LC2细胞系的非整倍体细胞比例分别为10.93%和93.58%, 差异均极显著。

2.4 LC1和LC2细胞系的克隆形成能力

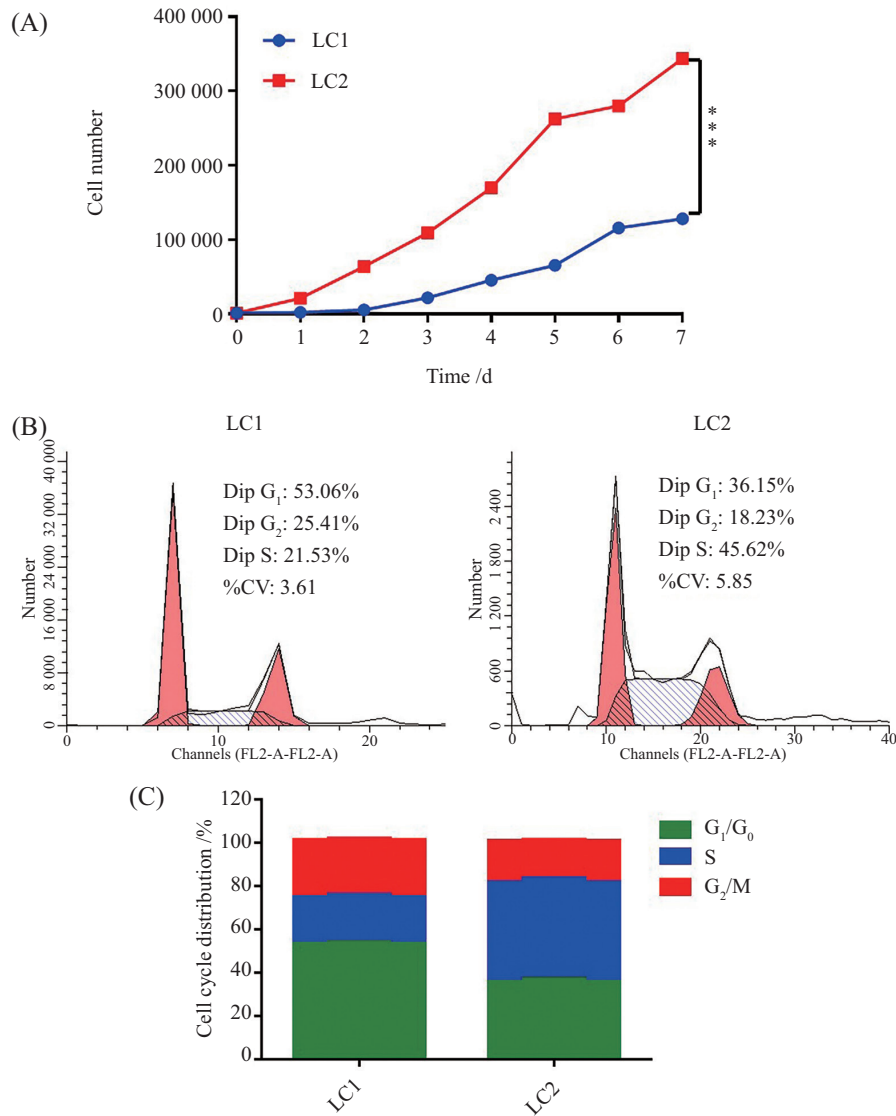
Matrigel克隆形成检测结果表明, 非整倍体含量和异质性较低的LC1细胞系成球率较低, 而非整倍体含量和异质性较高的LC2细胞系在体外成球能力较强(图4A), 差异极显著。F12悬浮培养成球检测结果表明, LC1细胞悬浮培养无法成球, 而LC2细胞悬浮培养成球能力较强(图4B)。

2.5 LC1和LC2细胞系的迁移和侵袭能力

细胞迁移实验结果表明, LC1细胞系的迁移能力较弱, LC2细胞系的迁移能力较强, 差异极显著(图5A)。细胞侵袭实验结果表明, LC1细胞系的侵袭能力较弱, LC2细胞系的侵袭能力较强, 差异显著(图5B)。

2.6 LC1和LC2细胞系的体内致瘤能力

体内致瘤实验结果表明, LC1和LC2细胞在免



A: 生长曲线; B: 细胞周期; C: 细胞周期分布统计结果。*** $P < 0.001$ 。

A: cell growth curve; B: cell cycle; C: the statistics of cell cycle distribution. *** $P < 0.001$.

图2 LC1和LC2细胞系增殖能力检测

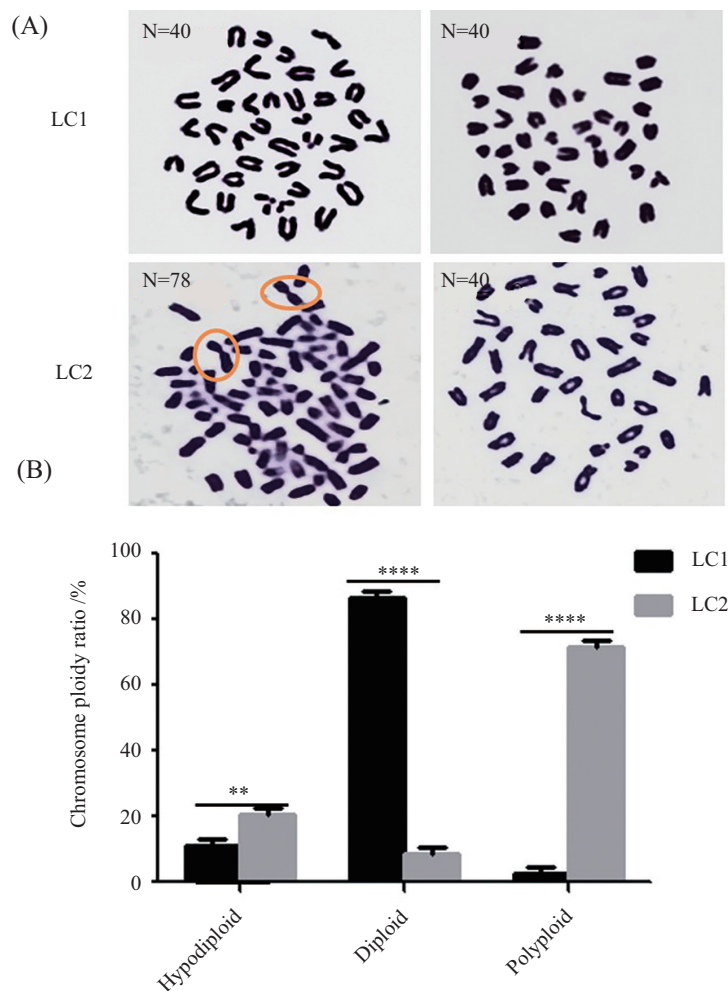
Fig.2 Proliferation of LC1 and LC2 cell lines

疫功能正常的小鼠皮下均可生成肿瘤, 其中LC1细胞系在细胞接种2周后开始陆续出现肿瘤结节, 成瘤率为75%; LC2细胞系在细胞接种1周后陆续出现肿瘤结节, 成瘤率为100%。LC2细胞系致瘤能力较强, LC2细胞系的肿瘤生长速度明显比LC1迅速, 二者差异显著(图6A)。LC2细胞系的迁移、侵袭能力及体内外致瘤能力明显比LC1强。我们发现, LC1细胞系在肾脏中出现少量转移灶, 在肝脏中未发现转移灶, 而LC2细胞系在肾脏中转移率为100%, 在肝脏中也有大量转移灶出现(图6B和表1)。综合以上结果表明, 非整倍体含量和异质性较高的LC2细胞系在体内致瘤能力较强, 细胞恶性较LC1细胞系高。

3 讨论

细胞增殖快就会导致细胞的生长周期缩短, 从LC1和LC2细胞系的生长曲线可以得知, LC2细胞的生长速度较快, 且差异具有显著性。目前研究结果表明, 恶性程度高的肿瘤细胞生长速度快, 容易发生转移, 说明肿瘤细胞的生长速度与肿瘤的迁移能力有着必然的联系。

倍性是组织细胞的生物学特性之一, 细胞核DNA含量可因细胞增殖周期的不同而有差异, 多数恶性肿瘤的进展与细胞核DNA含量的变化程度有关^[1]。以往研究结果表明, 肿瘤细胞的倍性与胃癌淋巴结转移及浸润程度有关, 可以成为独立的预后因



A: LC1和LC2细胞系的核型, 黄色圆圈内染色体为中着丝粒染色体; B: LC1和LC2细胞系中亚二倍体、二倍体和超二倍体所占比例。** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

A: the karyotypes of LC1 and LC2 cell lines, the chromosomes in the yellow circle are centromeric chromosomes; B: the proportion of hypodiploid, diploid and polyploid of LC1 and LC2 cell lines. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图3 两种癌细胞系LC1和LC2的核型分析

Fig.3 The karyotype analysis of LC1 and LC2 cell lines

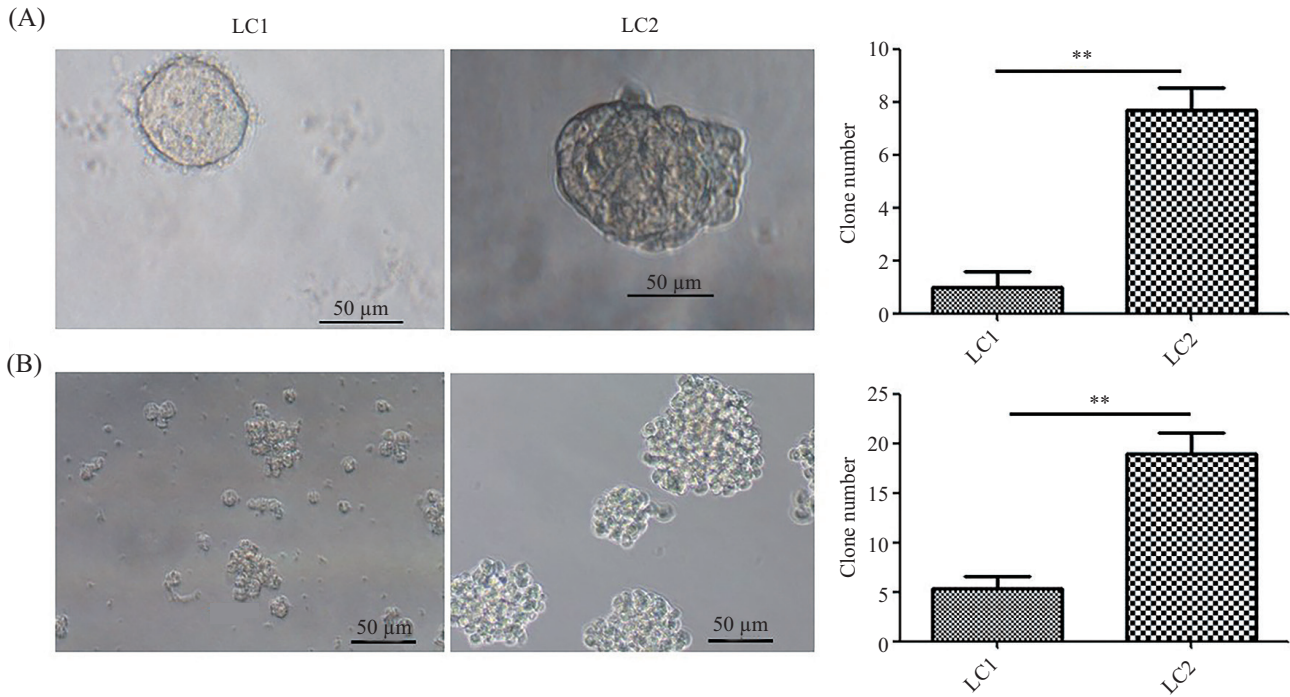
素^[2]。本研究结果显示, LC2细胞系的细胞核DNA含量较LC1细胞系显著增高, 细胞增殖活跃。

非整倍性是恶性细胞的标志。体细胞非整倍性是人类癌症最常见的特征^[3-4]。大约90%的实体瘤和75%的血液癌表现出非整倍性。癌细胞中超染色体的异常倍性会导致基因组不稳定^[5]。由于激活或抑制几种细胞内信号转导途径响应染色体拷贝数变异, 非整倍性会影响多个基因的转录^[6], 导致各种各样表型的产生, 进一步促成肿瘤异质性、耐药性和治疗失败^[7]。我们的研究结果也进一步证实了这一观点, LC2细胞系的染色体数目较多, 以多倍体居多, 而LC1细胞系的染色体数目以二倍体居多, LC2细胞系的恶性程度明显高于LC1细胞系。

肿瘤的发生和发展是个多基因、多步骤、多阶

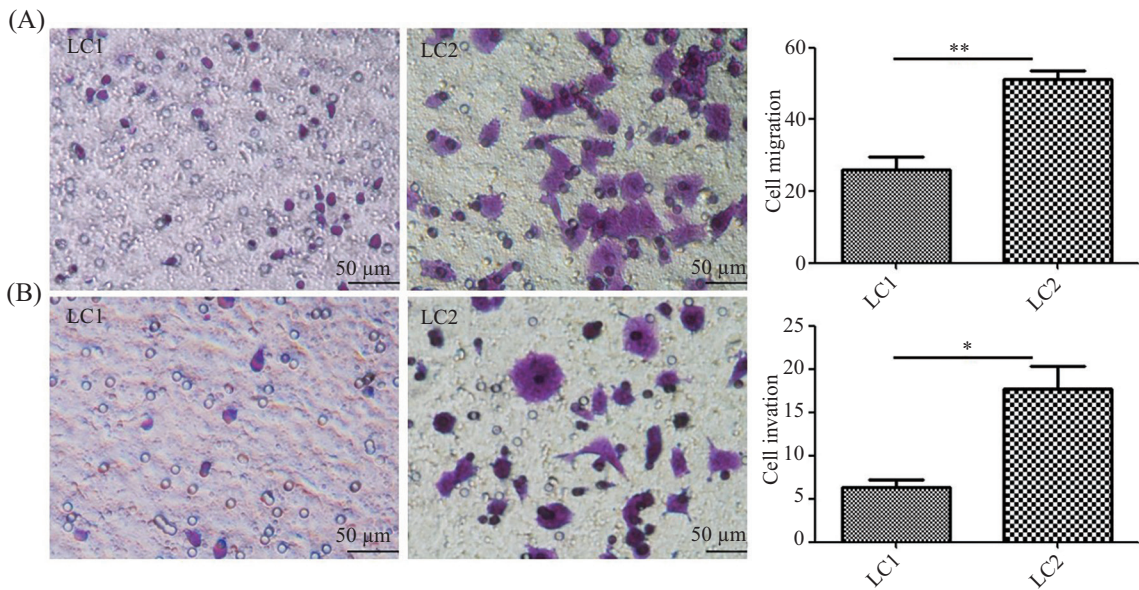
段的复杂过程。转移是恶性肿瘤的特性。近期研究表明, 不同脏器恶性肿瘤转移发生率不同, 同种肿瘤不同组织类型转移趋势也不同, 甚至同株肿瘤细胞中也存在各种亚群^[8]。由此可见, 单克隆肿瘤细胞来源的群体是一个基因型和表现型均完全相同的群体, 然而, 卵巢癌克隆株的转移灶组织中仍会存在转移能力及途径均不相同的瘤细胞亚群^[8]。我们的研究结果也证实了这一点, LC2细胞系是来自于LC1细胞系的亚群, 但是二者的致瘤性及转移侵袭能力截然不同。

肿瘤转移的发生取决于肿瘤细胞特性、宿主特性及二者的相互作用。肿瘤细胞独特的转移能力, 是成功转移过程中最主要的决定因素之一。近年来的研究显示, 肿瘤细胞的多种生物学特征可能与肿



A: Matrigel克隆; B: 悬浮培养无性系。 ** $P < 0.01$ 。
 A: clones of Matrigel; B: clones of suspension culture. ** $P < 0.01$ 。

图4 LC1和LC2细胞系的克隆形成能力
 Fig.4 Colony formation assay of LC1 and LC2 cell lines

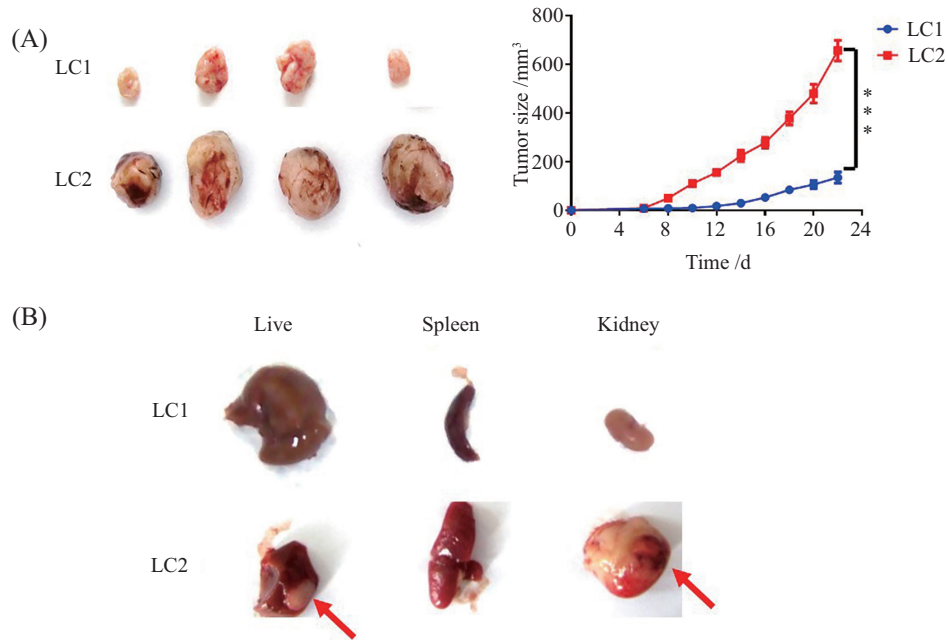


A: 细胞迁移; B: 细胞侵袭。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
 A: cell migration; B: cell invasion. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 细胞的迁移和侵袭实验
 Fig.5 Cell migration and invasion assay

瘤细胞的恶性行为和转移能力密切相关^[8-9]。本文细胞迁移能力实验结果提示, LC2细胞的高转移特性可能与其游走能力的增强有关。其迁移能力的增强促进了细胞的转移。

关于肿瘤是何时开始转移, 目前有两种观点, 一种观点认为, 转移通常在直径超过2 cm的原发性肿瘤中被诊断出来。因此, 转移能力被认为是肿瘤进展过程中相对较晚的过程^[10]。另一种观点认为,



A: LC1和LC2细胞系的皮下移植肿瘤及肿瘤生长曲线; B: LC1和LC2肿瘤细胞的侵袭转移灶。*** $P < 0.001$ 。红色箭头指转移灶。
A: xenografts and tumor growth of LC1 and LC2 cell lines; B: invasion and metastase of LC1 and LC2 tumor cells. *** $P < 0.001$. The red arrow indicates the metastatic focus.

图6 LC1和LC2细胞的成瘤及转移情况
Fig.6 Tumorigenicity and metastasis of LC1 and LC2 cell lines

表1 LC1和LC2细胞的成瘤及转移情况

Table 1 Tumorigenicity and metastasis of LC1 and LC2 cell lines

细胞系 Cell lines	肿瘤发生时间/d Tumor occurrence time /d	成瘤率/% Tumorigenicity rate /%	肝转移率/% Liver metastasis rate /%	肾转移率/% Renal metastasis rate /%
LC1	14	75	0	20
LC2	7	100	80	100

在肿瘤发生的早期阶段的一些肿瘤细胞就可能具有转移性特性^[11-12]。转移似乎是一个低效的过程。肿瘤细胞的转移潜能进入循环系统不一定是均匀的,只有少数细胞具有迁移到远端器官、增殖并成为转移性肿瘤的能力。

目前,虽然能够形成高转移的转移细胞的起源和真实身份仍然难以捉摸,但近几年的研究表明,具有肿瘤起始能力的肿瘤细胞亚群即癌症干细胞,它们也表达正常组织干细胞标记,癌症干细胞是在造血系统恶性肿瘤^[13]和实体瘤(包括乳腺癌)中发现的肿瘤亚群^[14-16]。WENG等^[17]研究结果证明,在乳腺肿瘤发生早期的细胞中CD44⁺/Sca1⁺细胞群可以在MMT小鼠的转移中起主要作用,并且可能存在致瘤和转移潜力。GONG等^[18]研究显示,在MMT肿瘤细胞群体内的一小部分乳腺癌起始细胞(breast cancer-initiating cell, BCIC)中干细胞标志物CD44和Sca1的

表达水平升高以致其快速转移。我们的研究结果发现,LC2与LC1比较,干细胞标志物Sca1和CD44的表达均上调,体内和体外功能检测结果均表明,LC2细胞系恶性程度高于LC1细胞系。我们已经证明,LC2小鼠淋巴瘤模型于肾部产生一致进展的癌转移。我们可以推定,具有干细胞标志物CD44和Sca1高表达的肿瘤细胞可以代表一群高转移细胞以及它在肿瘤发生和转移中发挥的作用。

在临床病例中,恶性淋巴瘤晚期最容易受侵犯的部位是肝脾,其次是肾脏,这是晚期淋巴瘤常见的转移现象。我们的实验结果基本与此吻合。癌细胞转移是癌基因与抑癌基因参与的一个多步骤、多因素调节的极其复杂的过程。恶性淋巴瘤肝转移机制的研究,需要建立相应的动物模型。以往的实验性研究模型表明,进入血液循环中的癌细胞真正能够存活的不到0.10%,形成转移灶者不到0.01%,说明

实验性模型转移率极低, 建立自发性转移模型更加困难。因此, 建立良好的自发性转移模型仍然是人癌转移模型研究领域的难题。

本研究建立了能反映临床肿瘤发生发展规律的各演变阶段的肿瘤高转移模型。本文通过有限稀释法进行单克隆化, 筛选出了具有高转移潜能的单克隆细胞株。我们从已建立的淋巴瘤肿瘤细胞系LC中克隆出了恶性更高的亚克隆细胞系LC2。本研究采用转移能力较低的细胞株成功建立了淋巴瘤肝肾高转移细胞模型, 它可以模拟癌细胞的侵袭、转移过程, 为淋巴瘤转移的靶点研究提供了很有价值的实验模型和理论基础。

参考文献 (References)

- [1] VEGA S L, LIU E, ARVIND V, et al. High-content image informatics of the structural nuclear protein NuMA parses trajectories for stem/progenitor cell lineages and oncogenic transformation [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 351(1): 11-23.
- [2] LUO G, HU Y, ZHANG Z, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of Ki-67 expression in patients with gastric cancer: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 50273-83.
- [3] DURRBAUM M, STORCHOVA Z. Consequences of aneuploidy in cancer: transcriptome and beyond [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2015, 200: 195-224.
- [4] WENZEL E S, SINGH A T K. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer [J]. *In Vivo*, 2018, 32(1): 1-5.
- [5] PASSERINI V, OZERI-GALAI E, DE PAGTER M S, et al. The presence of extra chromosomes leads to genomic instability [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10754.
- [6] DURRBAUM M, STORCHOVA Z. Effects of aneuploidy on gene expression: implications for cancer [J]. *FEBS J*, 2016, 283: 791-802.
- [7] SANSEGRET L, SWANTON C. The role of aneuploidy in cancer evolution. [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, 7(1): a028373.
- [8] 阮和云. 人卵巢癌定向淋巴道高转移细胞系的建立及生物学特性的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2007.
- [9] GUPTA G P, MINN A J, KANG Y, et al. Identifying site-specific metastasis genes and functions [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005, 70: 149-58.
- [10] SUHALL Y, CAIN M P, VANAJA K, et al. Systems biology of cancer metastasis [J]. *Cell Syst*, 2019, 9(2): 109-27.
- [11] LAWSON D A, BHAKTA N R, KESSENBROCK K, et al. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells [J]. *Nature*, 2015, 526(7571): 131-5.
- [12] LI F, TIEDE B, MASSAGUE J, et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis [J]. *Cell Res*, 2007, 17: 3-14.
- [13] BONNET D, DICK J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. *Nat Med*, 1997, 7(3): 730-7.
- [14] CHQRAFE-JAUFFRET E, GINESTIER C, IOVINO F, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1302-13.
- [15] ZUCCHI I, SANZONE S, ASTIGIANO S, et al. The properties of a mammary gland cancer stem cell [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(25): 10476-81.
- [16] CHO R W, WANG X, DIEHN M, et al. Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors [J]. *Stem Cells*, 2008, 26: 364-71.
- [17] WENG D, PENZNER J H, SONG B, et al. Metastasis is an early event in mouse mammary carcinomas and is associated with cells bearing stem cell markers [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(1): R18.
- [18] GONG J, WENG D, EGUCHI T, et al. Targeting the hsp70 gene delays mammary tumor initiation and inhibits tumor cell metastasis [J]. *Oncogene*, 2015, 34(43): 5460-71.