

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00479

## 汉族人肾透明细胞癌细胞系的建立

翟羽佳<sup>1△</sup>, 谭晓洁<sup>1△</sup>, 侯建国<sup>2</sup>, 肖建如<sup>3</sup>, 徐丹枫<sup>4</sup>, 余永伟<sup>5</sup>, 常文军<sup>1</sup>, 林丽萍<sup>1</sup>, 曹广文<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433
3. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003
4. 第二军医大学长征医院泌尿外科, 上海 200003
5. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433

**[摘要]** **目的:**取汉族人临床标本,建立肾透明细胞癌(ccRCC)细胞系,初步研究该细胞系的生物学特性。**方法:**2005~2007年间共采集43例ccRCC新鲜手术标本(包括肾原位肿瘤、骨转移、淋巴结转移肿瘤及癌栓),于手术后30~60 min内用植块法进行体外培养,记录传代超过50代的细胞株的生长曲线,测定集落形成率,对细胞进行染色体分析,病理学检查,流式细胞术检测及NOD-SCID鼠荷瘤实验。**结果:**绝大部分原代细胞传代次数在5代内,其中5例可连续传代5代以上,4例传代超过10代。仅1例来源于骨转移组织的原代细胞(命名为RCC05-TXJ)及1例来源于原位ccRCC的原代细胞(命名为RCC05-ZYJ)可稳定连续传代。RCC05-TXJ经历21个月传110代,群体倍增时间19.2 h,染色体众数为75,集落形成率为41%;RCC05-ZYJ经历18个月传160代,群体倍增时间为16.5 h,染色体众数为55,集落形成率为37%。免疫组化显示CA9及CD133阳性,流式细胞术分析发现随细胞传代增多CA9及CD133表达明显增高( $P<0.05$ )。两株细胞在NOD-SCID鼠体内均有良好的致瘤及转移性,但是转移倾向明显不同。**结论:**应用汉族人肾透明细胞癌组织成功建立了2个转移潜能不同的细胞系,随着传代次数增加,肿瘤干细胞比例增加。

**[关键词]** 肾透明细胞癌;细胞系;汉族

**[中图分类号]** R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0479-06

### Establishment of clear cell renal cell carcinoma lines of Han nationality in China

ZHAI Yu-jia<sup>1△</sup>, TAN Xiao-jie<sup>1△</sup>, HOU Jian-guo<sup>2</sup>, XIAO Jian-ru<sup>3</sup>, XU Dan-feng<sup>4</sup>, YU Yong-wei<sup>5</sup>, CHANG Wen-jun<sup>1</sup>, LIN Li-ping<sup>1</sup>, CAO Guang-wen<sup>1\*</sup>

1. Department of Epidemiology, Faculty of Medical Services, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433
3. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003
4. Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003
5. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To establish clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) cell lines from clinical ccRCC specimens of Han nationality in China and to characterize the biological features. **Methods:** From 2005 to 2007, fresh surgical samples of ccRCC were obtained from 43 patients; the samples included primary tumor *in situ*, osseous metastasis, lymph node metastasis, and cancerous embolus. The samples were cultured *in vitro* using explant-culture method within 30-60 min after surgery. Analysis on cell growth and colony-forming efficiency was recorded for the lines which were passaged for over 50 generations. Chromosome examination, pathological examination and tumorigenesis in NOD-SCID mice were used to determine their malignancy. Flow cytometry was used to determine expression of CA9 and CD133. **Results:** Most of the primary cells could only be passaged for less than 5 generations; 5 lines could be serially passaged for over 5 passages, 3 lines for over 10 passages, and only 2 lines could be stably passaged. One line, named RCC05-TXJ, was from osseous metastatic ccRCC and had been serially passaged for

**[收稿日期]** 2007-12-29 **[接受日期]** 2008-01-22

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30370788,30571609). Supported by National Natural Science Foundation of China (30370788,30571609).

**[作者简介]** 翟羽佳,硕士生, E-mail: zhaiyujia.1982@163.com; 谭晓洁,博士生, E-mail: xjtan2003@yahoo.com.cn

△共同第一作者(Co-first authors)

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070420, E-mail:gcao@smmu.edu.cn

110 generations in 21 months; the average doubling time was 19.2 h, average chromosome number was 75, and colony forming efficiency was 41%. Another line, named RCC05-ZYJ, was from primary ccRCC specimen and had been serially passed for 160 generations in 18 months; the average doubling time was 16.5 h, average chromosome number was 55, and the colony forming efficiency was 37%. Immunohistological analysis demonstrated that both lines expressed CA9 and CD133. Flow cytometry analysis found that expression levels of CA9 and CD133 increased with the passages. Both RCC05-ZYJ and RCC05-TXJ lines were able to form tumor and to metastasize in NOD-SCID mice; however, their metastatic ability was obviously different.

**Conclusion:** We have established 2 ccRCC cell lines with different metastatic potentials from the clinical ccRCC specimens of Han nationality in China. The ratio of tumor stem cells increases with the passages.

**[KEY WORDS]** clear cell renal cell carcinoma; cell line; Han nationality in China

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 479-484]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是最常见的肾脏肿瘤,约占成人肾肿瘤的85%。近30年RCC的发病率和病死率持续上升<sup>[1-5]</sup>。近30%的RCC患者初诊时即发现转移,其平均生存期为6~12个月,2年生存率为10%~20%<sup>[6]</sup>。RCC患者术后1年转移发生率为59%,2年为83%,3年为93%<sup>[7]</sup>。1962年, Ishihara等<sup>[8]</sup>报道了世界上第一个“人肾细胞癌细胞系”。至今已有许多实验室建立了不同病理类型的肾癌细胞系,包括来自原发及转移部位,它们在研究肾癌的发生、发展、转移中发挥了重要的作用。采用细胞系作为研究对象进行体外实验及体内动物模型的构建逐渐成为研究惯例。但是,由于全世界人种的遗传背景和生活条件的差异,肿瘤发病率和病死率也有所不同。对汉族人新鲜肾癌细胞的培养是研究中国人RCC转移特性的相关基因分子基础的最重要步骤。在此基础上建立起来的中国人肾细胞癌转移流行病学研究无论是对RCC的流行因素的预防还是治疗都具有重要意义。为此,本室应用体外细胞培养技术建立了转移性肾透明细胞癌(ccRCC)细胞系及低转移细胞系,现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

1.1 标本来源 透明细胞癌标本均来源于2005年1月至2007年9月第二军医大学长海医院及长征医院泌尿外科肾癌根治手术的患者以及长征医院骨科转移癌切除标本,共采集43例,其中肾原位肿瘤28例,骨转移3例,淋巴结转移5例及癌栓7例。男性患者33例,女性患者10例,平均年龄为(50.3±13.36)岁,最小年龄为29岁,最大为73岁,经病理证实,均为肾透明细胞癌。

1.2 细胞培养方法 采用植块法无菌条件下取新鲜肿瘤组织(取下后均在1h内进行培养),将其切成1mm×1mm×1mm大小的组织块,用D-Hanks液清洗离心2遍,用含20%胎牛血清(杭州四季青)

的RPMI-1640培养基1.5ml悬浮,放入培养瓶中。在37℃、5%CO<sub>2</sub>、100%湿度的条件下培养。24h后换液。

1.3 绘制生长曲线 将对数生长期细胞 $3 \times 10^4$ 个种于24孔板中,加2ml培养液。从第2日起,每日计算4个孔中的细胞数,取平均值作细胞生长曲线,计算群体倍增时间。

1.4 软琼脂集落形成率测定 用0.6%软琼脂RPMI-1640培养基覆盖24孔板孔底,凝固后再注入含细胞( $1 \times 10^3$ /孔)的0.3%软琼脂RPMI-1640培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养12d,共计算6孔集落形成率。集落形成率=集落数/接种细胞数×100%。

1.5 染色体核型分析 在肿瘤细胞液中加入终浓度为0.04~0.1μg/ml的秋水仙素放入培养箱中培养6h,收集分裂细胞,离心 $14\,000 \times g$ ,10min,加37℃的0.075mol/L的KCl溶液100ml,20min,再加5ml甲醇冰醋酸固定17min,离心再重复固定2次。滴冰载玻片,干燥后Giemsa染色。显微镜下数100个细胞染色体数目。

1.6 动物实验 细胞悬液( $2 \times 10^6$ 个细胞)分别注射4只5周龄NOD-SCID鼠(第二军医大学肿瘤研究所提供)背部皮下,观察注射处肿瘤生长状况。当瘤体长到约1cm<sup>3</sup>处死NOD-SCID鼠并做病理检查。将移植瘤原位移植,即Orthotopic移植,是在充分考虑肿瘤与微环境相互作用的基础上,将人癌细胞移植到受体动物对应的组织或器官,以期得到较高的成瘤率及自发转移率。

1.7 冻存与复苏 按常规方法进行。

1.8 病理学检查 H-E染色,免疫组化分别作CA9及CD133(DAB染色)并分析结果。

1.9 流式细胞仪分析 分别取两细胞系高代数及低代数细胞,流式细胞仪(高低代数差异超过60代)分析CA9及CD133表达情况,为确保实验稳定性重复1次。

## 2 结果

**2.1 培养细胞生长情况** 大部分组织培养后 2~3 d, 开始有细胞贴壁生长, 2 周后细胞长满培养瓶底, 培养发现 93% 原代细胞传代困难且在传代培养过程中出现静止状态, 其中 1 例原代培养最长时间达 2 个月左右。88.4% 的细胞在原代培养的过程中出现细胞老化, 消化困难, 无法贴壁及受到成纤维细胞的干扰导致无法继续传代。5 株原代细胞可连续传代 5 代以上, 4 株连续传代超过 10 代的细胞, 其供体年龄均在 50 岁左右。其中 1 例来源于骨转移组织的原代细胞 (RCC05-TXJ) 可稳定传代, 该株细胞传 4~5 代后细胞生长相对稳定, 平均 5~6 d 传代 1 次, 第 5 代开始冻存部分细胞, 10 代左右出现生长缓慢趋于静止状态, 传代 2~3 次后该现象消失, 45~50 代细胞生长速度加快, 传代时间由 5~6 d 减少到 3 d 左右, 50 代后趋于稳定, 现已连续传代 110 代。另 1 例来源于肾原位肿瘤的原代细胞 (RCC05-ZYJ) 也可稳定传代, 该株细胞传 4~5 代后细胞生长相对稳定, 平均 3~4 d 传代 1 次, 第 5 代开始冻存部分细

胞, 无生长缓慢情况, 随传代次数增加, 传代时间缩短为 2~2.5 d, 现已连续传代 160 代。

**2.2 形态学观察** 人原代 RCC 细胞于光学显微镜下观察, 细胞均呈贴壁生长, 局部有组织重叠现象, 失接触抑制 (图 1A)。大多数肿瘤细胞呈上皮型细胞形态 (图 1B), 也有少部分呈现成纤维型细胞形态 (图 1C), 或与正常肾上皮细胞的轮状生长相似 (图 1D)。细胞呈圆形、梭形及多边形等。同一培养瓶内常可见到生长形态不同的细胞群 (图 1E), 部分可见到小空泡 (图 1C)。50 代前 RCC05-TXJ 细胞体积大, 形态不规则, 细胞轮廓不明显 (图 1F), 50 代后 RCC05-TXJ 细胞体积明显减小, 细胞核膜、核仁轮廓明显, 核仁清晰, 胞质少, 核糖体颗粒丰富, 大部分细胞双核或多核, 核质比例倒置。随着代数的增加, 细胞形态由大部分细胞呈椭圆形偏圆、小部分三角形及小菱形逐渐变为不规则型且体积减小, 周边有少量的细胞分泌物 (图 1G)。RCC05-ZYJ 细胞体积相对 RCC05-TXJ 略小且随传代次数增加无明显变化, 形态为不规则形, 其他特性与 RCC05-TXJ 基本一致 (图 1H)。

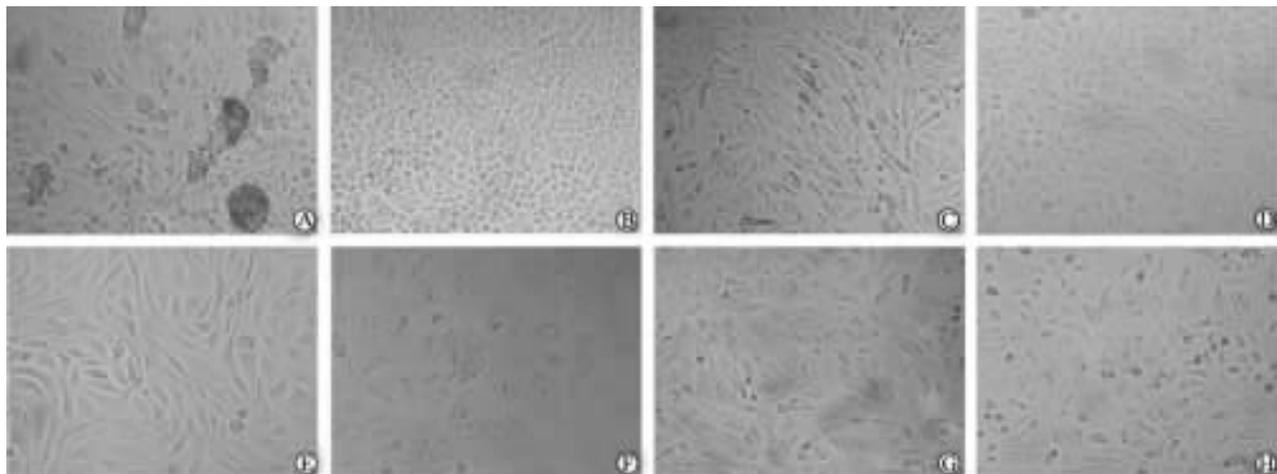


图 1 培养过程中细胞形态学观察

Fig 1 Observation of cell morphology

A: Primary cells with loss-contact inhibition; B: Primary RCC cells with epithelial cell morphology; C: Primary RCC cells with fibroblast morphology; D: Ring-like growth pattern of primary RCC cells; E: Different growth shape patterns of primary RCC cells; F: RCC05-TXJ generation 5; G: RCC05-TXJ generation 89; H: RCC05-ZYJ generation 135. Original magnification:  $\times 100$

**2.3 倍增时间及生长曲线** 43 例原代细胞倍增时间 14.5~101 h。RCC05-TXJ 50 代前接种第 4 日进入指数生长期, 第 7 日生长最快, 之后逐渐减慢。50 代后细胞生长趋于稳定, 接种第 3 日进入指数生

长, 第 5 日生长最快, 之后逐渐减慢。细胞倍增时间为 19.2 h。RCC05-ZYJ 生长相对稳定, 接种第 3 日进入指数生长, 第 4 日生长最快, 之后逐渐减慢。细胞倍增时间为 16.5 h。生长曲线见图 2。

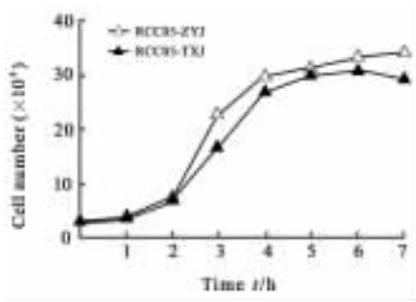


图2 细胞生长曲线

Fig 2 Growth curve of the cells

2.4 集落形成率 两细胞系分别计算6个孔内集落形成率,集落形成率较稳定,RCC05-TXJ为41%,RCC05-ZYJ为37%。

2.5 染色体分析 对100个处于分裂中期的细胞染色体进行计数,RCC05-TXJ细胞系染色体数主要集中在60~80之间,染色体众数为75,RCC05-ZYJ细胞系染色体数主要集中在50~70之间,染色体众数为55。提示两者均存在超二倍体等情况。

2.6 动物实验 两细胞系均具有良好的原位致瘤效率,RCC05-TXJ接种90d后形成1cm×1.2cm×1cm左右的移植瘤。处死实验动物见肿瘤呈鱼肉状,质软,无坏死。RCC05-ZYJ接种45d后形成1cm×1cm×1cm左右的移植瘤,质较RCC05-TXJ所致肿瘤略硬,其余特征与RCC05-TXJ所致肿瘤相似。两种肿瘤组织体外培养细胞形态与原细胞株一致。两细胞系所成移植瘤均在鼠间传代6代,RCC05-TXJ成瘤时间由皮下接种时90d减少到7d,在鼠间传代中自第4轮起出现肺部白色结节,取出白色结节,病理证实为肾癌肺转移(图3),RCC05-ZYJ成瘤时间由皮下接种时45d减少到7d,第3轮起出现局部转移灶,其中一轮出现肺门淋巴结转移。

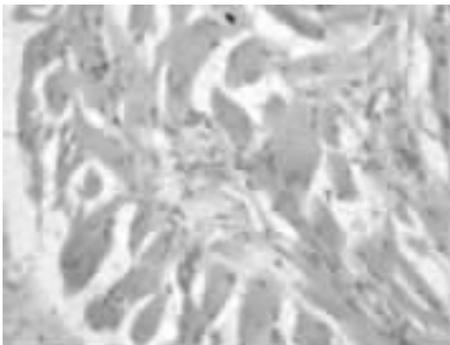


图3 肺转移病理切片

Fig 3 Pathological section of lung metastasis

Original magnification: ×100

2.7 复苏 复苏率达80%以上,复苏后的细胞生长状态与原培养细胞一致。

2.8 病理学检查 H-E染色见RCC05-TXJ核质比例失调,核异形、双核;RCC05-ZYJ核大深染(图4)。两细胞系免疫组化分析CA9、CD133均呈强阳性(图5、图6)。

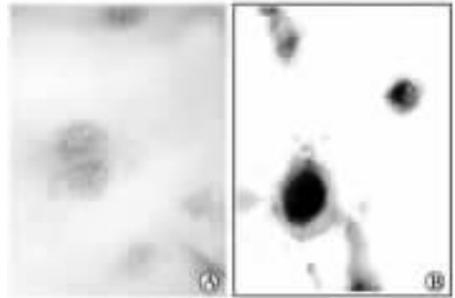


图4 RCC05-TXJ(A)及RCC05-ZYJ(B)H-E染色结果

Fig 4 H-E staining of RCC05-TXJ(A) and RCC05-ZYJ cells(B)

Original magnification: ×400

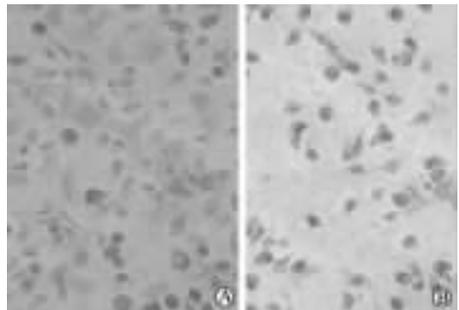


图5 RCC05-TXJ免疫组化染色结果  
Fig 5 Immunohistochemical staining of RCC05-TXJ cells(DAB staining)

A:CA9;B:CD133. Original magnification: ×100

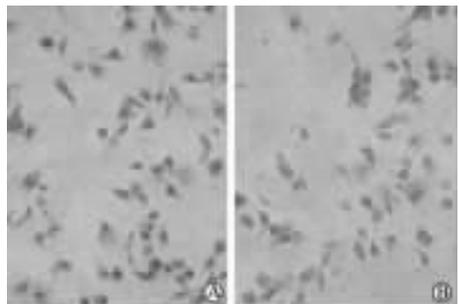


图6 RCC05-ZYJ免疫组化染色结果  
Fig 6 Immunohistochemical of RCC05-ZYJ cell(DAB staining)

A:CA9;B:CD133. Original magnification: ×100

2.9 流式细胞仪分析 CA9、CD133 的表达 随着细胞代数的增加 CA9 及 CD133 的表达明显增加

( $P < 0.05$ ), 重复结果较稳定(图 7、图 8)。

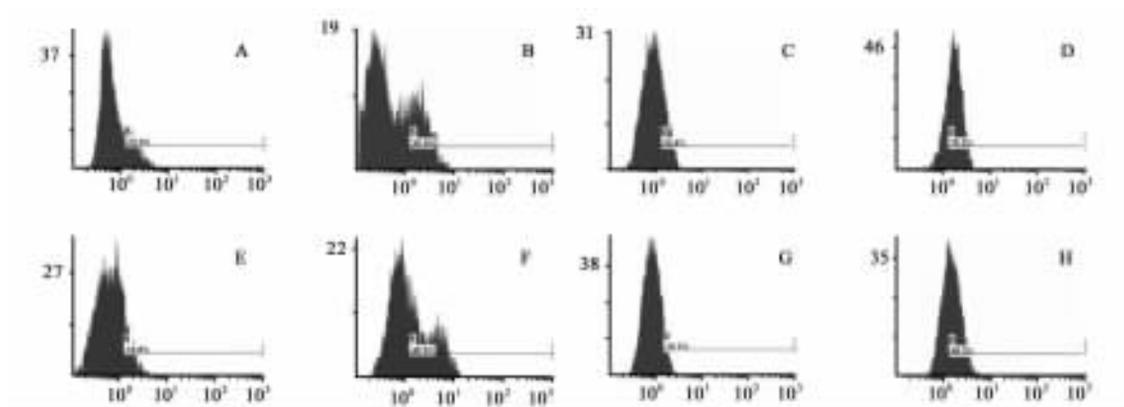


图 7 流式细胞术检测图

Fig 7 Result of flow cytometry

A: RCC05-ZYJ generation 25 (CA9); B: RCC05-ZYJ generation 135 (CA9); C: RCC05-ZYJ generation 25 (CD133); D: RCC05-ZYJ generation 135 (CD133); E: RCC05-TXJ generation 18 (CA9); F: RCC05-TXJ generation 88 (CA9); G: RCC05-TXJ generation 18 (CD133); H: RCC05-TXJ generation 88 (CD133)

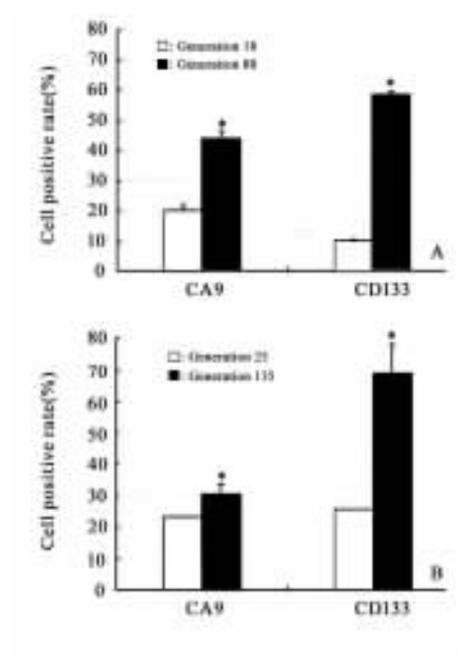


图 8 流式细胞术分析检测结果

Fig 8 Result of flow cytometry

A: RCC05-TXJ, \*  $P < 0.05$  vs generation 18; B: RCC05-ZYJ, \*  $P < 0.05$  vs generation 25.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

肿瘤细胞的生长与体内微环境存在密切关系,但是在体外培养的过程中无法提供与体内相似的微环境,这给体外细胞建系工作带来很大的困难。Matsuda 等<sup>[9]</sup>认为在培养过程中细胞形态学的异质

性有利于细胞的生长。本研究中发现细胞培养过程中细胞增殖活力很不一致,大部分原代细胞在传代培养过程中都会出现静止状态从而使传代无法进行,形态学较一致的原代细胞更容易生长和传代。目前细胞建系成功的关键还不是非常明确,就本室 43 例原代细胞培养以及 2 例成功建立的细胞系来看,肾癌原代细胞的培养与以下因素有关:(1)供体肿瘤发现的年龄,发生时间较早且带瘤生存时间长者转移细胞株的培养相对容易,培养过程中细胞状态较好,老化相对较慢。但是如果供体年龄过于年轻,其恶性程度较高,组织坏死较多,有活性的肿瘤细胞不易找到,反而不易培养。(2)文献报道的 RCC 男女发病率比例 2 : 1,ATCC 现存的肾癌细胞系供体也均为男性,本实验室培养的原代细胞传代在 5 代以上者仅 1 株供体为女性,这与肾癌发病的性别比例及在培养过程中供体为女性的原代细胞具有原代培养时间长、细胞贴壁困难、增殖周期长、传代时不易消化、细胞容易老化等特点有关,故考虑供体的性别与原代细胞的培养可能存在一定联系。(3)培养过程中形态学较一致的原代细胞较易建系成功。细胞形态学上异质性很高的原代细胞相对容易老化,不易消化且贴壁困难。(4)在培养过程中成纤维细胞增殖迅速无法消除是导致培养失败的另一重要原因。

目前认为,肿瘤群体中只有干细胞具有很强的

迁徙运动能力,很强的自我更新和分化特质,因此(至少在部分肿瘤中)转移瘤的形成应当主要由干细胞完成。研究发现 CD133 是干细胞的较特异性的细胞表面标志物<sup>[10]</sup>,表达于神经元干细胞,也表达于肝细胞癌、结肠直肠癌及前列腺癌等肿瘤干细胞表面<sup>[11-12]</sup>。由于我室建立的细胞系在传代过程中逐渐具有转移潜能或现有转移的细胞转移倾向日趋明显且经流式细胞仪分析显示 RCC05-TXJ 及 RCC05-ZYJ 细胞系在传代的过程中肾透明细胞癌转移特异性标志物 CA9<sup>[13]</sup>的表达明显增高,故本课题组推测肾癌细胞体外传代及建系的过程可能是干细胞不断自我筛选和富集的过程。经流式细胞仪分别检测两系低代数和高代数细胞表面干细胞特异性标志物 CD133 表达量差异明显,高代数细胞表达明显升高,提示随着代数的增加该系具有干细胞特性的细胞逐渐增多。

本室所建立的两细胞系在形态学及病理学上均具有明显的恶性肿瘤特征;动物实验结果表明 RCC05-TXJ 及 RCC05-ZYJ 具有良好的成瘤性,可形成稳定的免疫缺陷动物原位模型;RCC05-TXJ 细胞系具有向肺部转移的特性,RCC05-ZYJ 细胞系经不断传代及动物实验发现其逐渐具有转移倾向,有望建立免疫缺陷动物的转移模型;流式细胞仪结果提示在建系的过程中肾癌干细胞逐渐富集。实验证实两细胞系不仅能够提供与临床肿瘤较为相似的内环境,可用来研究正常肾细胞与肿瘤细胞在生物学、免疫、代谢及遗传学方面的差异,也可以为肾癌的实验及临床研究提供稳定的材料来源。

## [参考文献]

[1] Chow W H, Devesa S S, Warren J L, Fraumeni J F Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States[J]. JAMA, 1999, 281: 1628-1631.

- [2] McLaughlin J K, Lipworth L, Tarone R E. Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma[J]. Semin Oncol, 2006, 33: 527-533.
- [3] Mathew A, Devesa S S, Fraumeni J F Jr, Chow W H. Global increases in kidney cancer incidence, 1973-1992 [J]. Eur J Cancer Prev, 2002, 11: 171-178.
- [4] 上海肿瘤研究所. 1998年上海市区恶性肿瘤发病率[J]. 肿瘤, 2001, 21: 312.
- [5] 上海肿瘤研究所. 2003年上海市区恶性肿瘤发病率[J]. 肿瘤, 2006, 26: 694.
- [6] Jungwirth A, Schally A V, Pinski J, Groot K, Armatas P, Halmos G. Growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-4-71 inhibits *in vivo* proliferation of Caki-I renal adenocarcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 5810-5813.
- [7] Hutson T E, Pharmed D. Renal cell carcinoma: diagnosis and treatment, 1994-2003 [J]. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2005, 18: 337-340.
- [8] Ishihara T, Moore G E, Sandberg A. The *in vitro* chromosome constitution of cells from human tumors[J]. Cancer Res, 1962, 22: 375-379.
- [9] Matsuda M, Osafune M, Nakano E, Kotake T, Sonoda T, Watanabe S, et al. Characterization of an established cell line from human renal carcinoma[J]. Cancer Res, 1979, 39: 4694-4699.
- [10] Richardson G D, Robson C N, Lang S H, Neal D E, Maitland N J, Collins A T. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells[J]. J Cell Sci, 2004, 117 (Pt 16): 3539-3545.
- [11] Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity[J]. Int J Cancer, 2007, 120: 1444-1450.
- [12] O'Brien C A, Pollett A, Gallinger S, Dick J E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. Nature, 2007, 445: 106-110.
- [13] Li G, Feng G, Gentil Perret A, Genin C, Tostain J. CA9 gene expression in conventional renal cell carcinoma: a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy [J]. Clin Exp Metastasis, 2007, 24: 149-155.

[本文编辑] 曹 静