

DOI: 10.13376/j.cblls/2018075

文章编号: 1004-0374(2018)06-0628-09

细胞条件性重编程技术的研究进展

李娜¹, 李翔², 李一佳^{2*}, 陆彩霞^{1*}

(1 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118; 2 云南舜喜再生医学工程有限公司, 昆明 650000)

摘要: 细胞永生培养技术一直是个难点, 条件性重编程技术 (conditional reprogramming, CR) 可能解决这个问题。CR 技术通过将铯源 γ 射线辐照过的 Swiss-3T3-J2 小鼠成纤维细胞和人正常细胞或肿瘤细胞共培养, 向共培养体系中加入 Rho 相关蛋白激酶 (Rho-associated kinase, ROCK) 抑制剂 Y-27632, 使人正常细胞或肿瘤细胞获得部分干细胞特性和在体外无限制扩增的能力, 并且撤除 J2 细胞和 ROCK 抑制剂之后, 细胞能够重新定向分化为原细胞。CR 技术在再生医学、药物敏感性测试、基因表达谱分析和异种移植研究等领域具有广阔的发展前景, 但目前尚不清楚其具体机制。现从 CR 技术的研究现状、可能机制和实验方法进行综述, 以期为 CR 技术的研究和应用提供更多的理论基础。

关键词: 条件性重编程; 铯源 γ 射线; J2 小鼠成纤维细胞; ROCK 抑制剂 Y-27632

中图分类号: Q813; Q343 **文献标志码:** A

Research progress of cell conditional reprogramming technology

LI Na¹, LI Xiang², LI Yi-Jia^{2*}, LU Cai-Xia^{1*}

(1 Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, The Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China; 2 Yunnan Suns Regenerative Medicine Engineering Co., Kunming 650000, China)

Abstract: Cell immortalization has been difficult. Conditional reprogramming (CR) technology might be the solution. CR technology enables normal human cells and tumor cells to gain partial stem cell characteristics and proliferate indefinitely *in vitro* when co-cultured with irradiated Swiss-3T3-J2 mouse fibroblast feeder cells in the presence of Rho kinase inhibitor Y-27632. When cells were placed in conditions which mimic their natural environment, they retained the capacity to fully differentiate. CR cells have various applications including in regenerative medicine, drug sensitivity testing, gene expression profiling and xenograft studies. However, mechanisms of CR mediated immortalization are still unclear. This article summarized current research progress on CR mechanisms and experimental methods to provide theoretical evidences for future research and application.

Key words: conditional reprogramming; caesium γ ray; J2 mouse fibroblast cells; Rho kinase inhibitor Y-27632

在过去的几十年里, 科学家一直在寻找体外扩增原代肿瘤细胞和正常细胞的方法^[1-2]。到目前为止, 通过传统方法建立的各种细胞系已经被广泛应用于细胞生物学、分子生物学和肿瘤生物学的研究。然而, 由于传统细胞培养方法建立细胞系的成功率非常低, 并且不同组织来源的细胞建系的成功率差异巨大 (1%~10%)^[3], 严重阻碍了细胞体外研究的发展^[4]。2017年1月, 美国乔治城大学刘学峰课题组在 *Nature Protocol* 杂志上发表了关于条件性细胞重

编程技术 (CR) 的研究, CR 技术是指将铯源 γ 射线辐照过的 Swiss-3T3-J2 小鼠成纤维饲养细胞与人正常细胞或肿瘤细胞共同培养, 通过添加 Rho 相关蛋

收稿日期: 2017-10-09; 修回日期: 2018-03-20

基金项目: 云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019)

*通信作者: E-mail: lcx@imbcams.com.cn (陆彩霞);

Tel: 86+15987133528; E-mail: yijia.tsinghua@gmail.com (李一佳); Tel: 86+13669791551

白激酶(Rho-associated kinase, ROCK)抑制剂Y-27632,使正常细胞或肿瘤细胞获得部分干细胞特性和在体外无限制复制能力的一种细胞培养技术^[5]。CR技术在再生医学、药物敏感性测试、基因表达谱分析和异种移植研究等领域具有广阔的发展前景,美国国家癌症研究所将CR技术列入针对肿瘤学项目与药物发现项目的精准医疗计划中,但目前尚不清楚CR技术的具体机制,国内几乎没有关于CR技术研究的报道。因此,很有必要对CR技术的研究现状、可能机制和研究方法进行综述,以期对CR技术的研究和应用提供更多的理论基础。

1 细胞永生化的技术

1.1 传统细胞永生化的技术

在体外无限制地扩增哺乳动物来源的正常细胞和肿瘤细胞对再生医学和个体化医疗极其重要,使正常细胞获得永生化的传统方法有SV40病毒大T抗原转化法^[6]、hTERT基因过表达转化法^[7]和HPV E6/E7基因过表达转化法^[8],但这3种通过基因操纵来实现细胞永生化的方法会导致细胞基因组不稳定,细胞内p53和Rb调节通路出现异常,增加细胞的癌变几率。Wilding等^[9]研究发现,与原始细胞相比,经过以上3种方法处理过的细胞虽然会获得较强增殖能力,但是在传代的过程中会丢失一些重要的生物学和基因特性,细胞增殖能力逐渐降低,最终出现衰老现象^[10]。2015年,发现胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)能够在体外大量扩增并且保持稳定核型,也能够通过诱导分化为多种胚层的细胞,在再生医学领域具有巨大的潜在应用价值^[11-12]。iPSCs是通过向正常小鼠胚胎成纤维细胞或人成纤维细胞内导入Oct3/4、Sox2、c-MYC和Klf4等外源转录因子基因,使正常细胞获得干细胞特性,增殖能力明显增强并具有多向分化潜能的一类基因工程细胞^[12]。但Lister等^[13]发现,外源基因会改变细胞的基因组,包括基因的甲基化异常和组蛋白异常修饰,增加细胞基因突变风险。Taylor等^[14]发现,外源转录因子会改变iPSCs的免疫原性,使得iPSCs在临床上的应用存在很大风险。ESCs来源于早期胚胎或原始性腺,具有分化为机体几乎所有细胞类型的潜力,但ESCs的临床应用存在伦理问题,伦理争论的焦点主要集中在关于人类胚胎道德地位的争论和干细胞研究是否应该规范化的争论^[15]。除此之外,目前的

技术水平尚未达到定向诱导ESCs和iPSCs分化为特定细胞的水平,以上因素严重限制了ESCs和iPSCs在再生医学领域的应用。

1.2 CR技术

由于传统的细胞永生化的方法应用存在很多尚未解决的重要问题,因此,急需寻求一种新的方法。与传统方法相比,CR技术通过将铯源 γ 射线辐照过的Swiss-3T3-J2小鼠成纤维饲养细胞与人正常细胞或肿瘤细胞共同培养,添加Rho相关蛋白激酶(Rho-associated kinase, ROCK)抑制剂Y-27632,改变外部培养环境使细胞获得部分干细胞特性。与病毒大T抗原转化法、hTERT转化法、HPV E6/E7基因过表达转化法和iPSCs相比,CR技术并未改变细胞基因,维持了细胞基因组的稳定性和细胞免疫原性。与ESCs相比,CR技术不存在伦理问题。因此,作为一种全新的细胞体外永生化的技术,CR技术以其独特的优势展现出了良好的发展和应用前景。CR技术已经被广泛应用于再生医学领域,主要包括新细胞系的建立、组织再生医学、肿瘤个性化治疗、药物靶点发现、新药物发现、动物疾病模型建立、药物毒理及安全性评价的研究等。

1.2.1 细胞系的建立

CR技术能明显提高细胞的体外增殖能力,Reynolds等^[16]分别采用CR技术和常规细胞培养技术培养呼吸道表皮细胞,发现在相同的培养时间内,CR技术产生的细胞数量是常规培养技术的379倍。利用CR技术建立细胞系是该技术应用于再生医学的基础,Timofeeva等^[17]利用CR技术建立患者的前列腺癌细胞系,使得前列腺癌的体外研究成为可能。芬兰赫尔辛基大学的研究人员利用CR技术建立首批低药物抵抗性的前列腺癌细胞系^[18]。Yuan等^[19]利用CR技术在体外扩增来源于一名复发性呼吸道乳头瘤患者的肺正常组织和肿瘤组织细胞,并分别产生大量细胞群体。Crystal等^[20]采用CR技术培养并建立药物抵抗性肺癌患者的肺癌细胞系。除了肿瘤细胞之外,CR技术也被用来在体外建立人耳蜗祖细胞系^[21]和肺囊性纤维化支气管上皮细胞系^[22]。

1.2.2 组织再生医学

特定组织细胞的鉴定和体外扩增是组织再生医学研究的难点,而CR技术能够解决这个问题。Jensen等^[23]采用CR技术在体外扩增人食管上皮细胞(esophageal epithelial cells),扩增之后的细胞被移植至食管内腔进行组织修复,用于治疗嗜酸细胞

性食管炎等食管相关疾病。Wolf 等^[24]利用 CR 技术在体外扩增人呼吸道上皮细胞,用于呼吸系统疾病的研究和治疗。Reynolds 等^[16]采用同样方法扩增鼻气道上皮细胞,用于气道上皮组织损伤的修复。LaRanger 等^[25]采用 CR 技术在体外扩增人支气管上皮细胞,探究其对小鼠肺囊性纤维化的治疗作用。Avramescu 等^[26]在体外大量扩增患者来源的支气管和鼻腔上皮细胞,探究肺囊性纤维化的潜在致病因子。Miller 等^[27]通过 CR 技术在体外建立肺相关疾病模型,研究肺部疾病的发生和发展。Butler 等^[28]首先采用 CR 技术在体外大量扩增患者呼吸道上皮细胞,随后将扩增后的细胞植入呼吸道上皮损伤部位进行组织修复治疗。Chu 等^[29]通过将 CRISPR-Cas9 基因编辑技术与 CR 技术联合应用,揭示了 MUC18 基因的促炎作用。Alwhibi 等^[30]则利用 CR 技术在体外建立肝癌细胞系,用于研究 *Glossostemon bruguieri* 根部提取物的抗癌作用。

1.2.3 肿瘤个体化治疗

在肿瘤的治疗过程中,肿瘤细胞通常会对治疗方法和药物产生抗性,严重限制了常规治疗方法和药物的疗效。Crystal 等^[20]采用 CR 技术在体外培养来自对药物产生抗性的肺癌患者癌细胞,用不同药物及药物组合处理癌细胞,鉴定出适合治疗该患者肺癌的药物组合。Yuan 等^[19]利用 CR 技术在体外大量扩增呼吸道乳头瘤患者肺肿瘤组织细胞,Brady 等^[31]通过 CR 技术在体外建立患者来源的乳腺癌耐药细胞系,用于测试和选择适合于不同患者的治疗药物和治疗方法。Yun 等^[32]通过 CR 技术建立头颈部鳞状细胞癌细胞系(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC),揭示了 HNSCC 对 NVP-BKM120 产生耐药性的机制。CR 技术也被用来在体外建立原位癌和转移癌细胞低频突变位点的检测系统^[33]。Alamri 等^[34]在体外扩增黏液性表皮细胞瘤和唾液腺肿瘤细胞,用于化疗药物敏感性测试。Piotrowska 等^[35]在体外建立 MGH176、MGH700 等肺癌细胞系,探究肺癌对 EGFR 抑制剂 Rociletinib 产生耐药性的机制。CR 技术已被当做新一代肿瘤功能性诊断技术而得到广泛报道和应用^[36]。

1.2.4 新药物和药物靶点发现

CR 技术被用于癌症治疗新药物发现。研究人员利用 CR 技术建立对多种药物具有抵抗性的前列腺癌细胞系,并鉴定出能够有效杀伤该癌细胞的药物^[18]。Chen 等^[37]通过采用 CR 技术建立腺样囊性癌(adenoid cystic carcinomas, ACC)细胞系,鉴定出

瑞戈非尼(Regorafenib)是 ACC 的潜在治疗药物。CR 技术也被用来发现药物靶点, Panaccione 等^[38]采用 CR 技术培养腺样囊性癌组织内的肿瘤干细胞,发现 Notch1 和 SOX10 是腺样囊性癌的潜在新靶标。Beglyarova 等^[39]采用同样的方法鉴定出人胰腺癌的新靶标为 MYC 和 ERCC3 的相互作用,并且针对该靶标进行药物研发。Yuan 等^[40]利用 CR 技术培养神经内分泌宫颈癌(neuroendocrine cervical cancer, NCC)细胞,发现 MYC 是 NCC 的潜在靶标。Vondalova 等^[41]利用 CR 技术在体外建立患者来源的前列腺癌细胞系,发现顺铂和 LA-12 能够通过激活线粒体途径的细胞凋亡治疗前列腺癌。Hollevoet 等^[42]在体外建立胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)细胞系 GUMC108,发现抗间皮素免疫毒素 RG7787 可能是 PDAC 的潜在治疗药物。除此之外,CR 技术也为罕见癌症的治疗带来了希望^[43]。

1.2.5 建立动物疾病模型

CR 技术也被用来建立动物疾病模型,Chen 等^[37]采用 CR 技术扩增 ACC 细胞系,随后将 ACC 细胞移植入斑马鱼体内,建立 CR 技术/斑马鱼动物模型,该模型能够有效替代小鼠移植瘤(patient-derived xenograft, PDX)模型。Ellis 等^[44]采用同样方法扩增人前列腺癌细胞,建立 C57BL/6 小鼠前列腺癌移植瘤模型。Borodovsky 等^[45]分离并培养患者组织来源的肺癌和卵巢癌细胞,在体外建立癌细胞系,并将癌细胞接种至 B-NSG 小鼠皮下建立荷瘤小鼠模型。Bailey 等^[46]通过 CR 条件培养基在体外培养原代肾癌细胞系 GEMM,并将 GEMM 细胞移植入 SCID 小鼠皮下。小鼠表皮细胞和小鼠乳腺瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)诱导的肿瘤细胞用 CR 技术在体外扩增之后,植入裸鼠足垫^[47]。Brown 等^[48]在体外培养患者组织来源的乳腺导管原位癌(ductal carcinoma in situ, DCIS)细胞,以期 DCIS 动物体内模型的建立提供基础。除了建立肿瘤模型之外,CR 技术也被用来在体外培养人正常阴道表皮细胞系,建立单纯疱疹病毒感染阴道表皮细胞模型,用于寻找抗病毒药物^[49]。

1.3 CR 技术的可能机制

1.3.1 非典型 β -连环蛋白的激活

β -连环蛋白是 Wnt 信号通路下游信号转导蛋白,通过与细胞核内淋巴细胞增强因子(lymphocyte enhancer factor, LEF)和 T 细胞因子(T cell factor, TCF)相互作用,促进细胞生长、增殖和分化^[50]。CR 技

术能够提高人子宫颈细胞 (human ectocervical cells, HECs) 核内 β -连环蛋白的含量^[51], 诱导 HECs 表达表皮干细胞标志^[52]。Verheyen 等^[53] 研究发现, 蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 通过直接结合的方式使 β -连环蛋白去磷酸化并激活其蛋白活性。而糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 通过与 β -连环蛋白和轴蛋白形成三聚体, 促进 β -连环蛋白磷酸化并进入泛素化介导的蛋白降解途径, 抑制 β -连环蛋白的活性。经典的 β -连环蛋白激活途径是指 Akt 介导 GSK-3 磷酸化失活或 Wnt 信号通路的激活^[54]; 但 Suprynowicz 等^[52] 发现在利用 CR 技术培养细胞的过程中, CR 技术能够提高 Akt 下游 mTOR 蛋白表达水平, 通过其负反馈调节作用降低 Akt 的表达水平, Akt 磷酸化 GSK-3 的能力被抑制, 提高去磷酸化激活状态 GSK-3 的表达水平, 表明 Akt 介导 GSK-3 磷酸化失活的经典激活途径并未参与 β -连环蛋白激活过程; 且 CR 细胞和 LGK-974 细胞膜表面受体 LRP6 磷酸化的水平并未提高, 表明 CR 技术并未通过 Wnt 信号通路激活 β -连环蛋白, 但却发现 CR 技术能够提高 PP2A 的表达水平并促进 PP2A 与 β -连环蛋白结合, 使 β -连环蛋白发生去磷酸化而激活。抑制 PP2A 酶活性会同时降低活性 β -连环蛋白和细胞表面干细胞标志的表达水平, 表明 PP2A 在激活 β -连环蛋白的过程中扮演重要角色。除了 HECs, 该激活途径在人前列腺和乳腺细胞中也得到了证明, 提示非典型 β -连环蛋白激活途径参与多种细胞的永生过程^[52]。

1.3.2 抑制细胞凋亡

Rho/ROCK 信号通路能够调节细胞极性、运动、增殖和凋亡等一系列的细胞活动^[55]。ROCKs 通过使非肌球蛋白轻链 (non-myosin light chain, NMLC) 和肌动蛋白结合 LIM 激酶发生磷酸化控制肌动蛋白-细胞骨架的组装和细胞收缩, 介导质膜出泡、增强肌动蛋白-肌球蛋白收缩和激活细胞凋亡途径。ROCK 抑制剂 Y-27632 能够提高人胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs)^[56] 和表皮干细胞 (keratinocyte stem cells, KSCs)^[57] 在体外的增殖能力。Chapman 等^[58] 将成纤维饲养细胞与角化细胞共培养, 加入 Y-27632 之后, 角化细胞凋亡途径受到抑制, 并获得体外无限增殖能力。Liu 等^[59] 发现, 除了角化细胞之外, 成纤维饲养细胞与 Y-27632 培养体系还能够使其他组织来源的正常细胞和肿瘤细胞获得体外无限增殖的能力, ROCK 抑制剂 Y-27632 能够抑制

Rho 激酶活性, 抑制 Rho/ROCK 介导的细胞凋亡途径, 提高表皮细胞在体外的存活和增殖能力。c-Myc 在细胞生长、分化和凋亡中扮演重要角色, 低表达 c-Myc 能够促进细胞增殖, 而高表达或异常表达 c-Myc 会通过提高 p53 蛋白表达水平促进细胞发生凋亡^[60]。Dacic 等^[61] 通过向高表达 c-Myc 的人角化细胞中加入 ROCK 抑制剂 Y-27632, 发现 ROCK 抑制剂能够通过降低 p53 蛋白丝氨酸磷酸化水平, 降低 p53 蛋白下游目标基因 p21 和 DAPK1 的表达水平, 抑制 c-Myc 介导的细胞凋亡, 表明 CR 培养体系内的 ROCK 抑制剂 Y-27632 可能通过抑制 c-Myc 介导的细胞凋亡, 与 c-Myc 联合参与角化细胞永生化的过程。失巢凋亡 (anoikis) 是细胞脱离细胞外基质的黏附, 丧失细胞间与细胞和基质间的信号传递而诱导细胞发生的一种程序性细胞死亡过程^[62]。Zhang 等^[63] 研究发现, ROCK 抑制剂能够通过抑制小鼠前列腺干/祖细胞的失巢凋亡提高细胞的存活率, 促进细胞增殖。

1.3.3 调控细胞内基因表达水平

在 CR 培养体系中, Ligaba 等^[64] 发现 J2 饲养细胞能够调节角化细胞内约 215 个基因的表达, Y-27632 能调节约 293 个基因的表达。Reynolds 等^[65] 采用全转录组测序发现 ROCK 抑制剂 Y-27632 能够改变呼吸道上皮细胞的多种基因表达, 主要包括基底细胞骨架相关基因、细胞与细胞连接相关基因和细胞与细胞外基质作用相关基因。KRTs 是一种中间纤维基因, 广泛表达于呼吸道基底细胞内^[65], Y-27632 能够使基底细胞内 KRTs 基因表达水平提高 10 倍以上, 提示 Y-27632 可能通过 KRTs 介导的细胞骨架改变促进呼吸道基底细胞增殖^[66]; 但 Bove 等^[66] 发现 Y-27632 并不能提高人 II 型肺泡细胞内 KRTs 基因的表达水平, 提示 Y-27632 可能仅能提高呼吸道基底细胞内 KRTs 表达水平, 而对其他细胞无作用。在人的呼吸道中, 基底细胞通过桥粒蛋白与基底膜紧密连接, 而管腔细胞则通过紧密连接蛋白使细胞之间相互连接^[67]。Vermeer 等^[68] 研究发现, 细胞与细胞、细胞与细胞外基质的相互作用在细胞增殖和损伤修复中扮演重要角色。Y-27632 能够提高呼吸道细胞内桥粒基因表达水平, 同时降低几种与呼吸道表皮细胞紧密连接关键基因的表达水平, 提高呼吸道内管腔细胞和基底细胞的增殖能力, 但目前尚不清楚其具体机制。Y-27632 还能够下调 SPDEF 转录因子 (SAM pointed domain-containing Ets transcription factor) 和几种分化的上皮细胞表面

标志^[16]。CR 培养体系还能够影响细胞周期进程, Ligaba 等^[64]研究发现, 由于辐照过的 J2 细胞会分泌肝素结合性表皮生长因子 (heparin-binding epidermal growth factor, HB-EGF) 及其他生长因子, 提高细胞表面 EGFR、VEGFR2 和 HER2 的表达水平, 因此, J2 细胞能够提高 Cyclin A 和 Cyclin E 的表达水平, J2 与 ROCK 抑制剂联合应用能够提高 Rb 和 CDK1 磷酸化水平, 进而诱导细胞内增殖基因表达。

1.3.4 抑制细胞分化

除了影响细胞的增殖能力之外, CR 培养体系还能够降低人角化细胞分化相关基因的表达^[69], 使细胞保持低分化状态^[70]。Notch 信号通路在细胞分化和胚胎形态发生过程中扮演重要角色, 被激活之后, Notch 释放其细胞内部结构域 (notch intracellular domain, NICD), NICD 与转录抑制因子 RBP-J 结合, 进一步激活 Hes 和 Hey 等一系列基因发挥功能^[71]。Ligaba 等^[64]发现 CR 培养体系促使细胞分化程度的降低和 Notch 抑制剂 CHAC1 的高表达与 Hes4 基因的低表达具有相关性。Notch 介导的细胞分化的信号通路被抑制之后, 外皮蛋白 (involucrin) 表达水平降低, p63 基因表达水平升高^[72]。由于 Notch 信号通路在细胞分化过程中扮演极其重要的角色, J2 饲养细胞和 ROCK 抑制剂 Y-27632 可能通过抑制该信号通路, 维持细胞处于低分化状态。TGF β /Smad 信号通路在细胞增殖^[73]和维持胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 干性^[74]中扮演重要角色, TGF β 和其相关配体能够通过 Smad 调节细胞增殖、分化和凋亡, 维持组织稳态; 而 Ligaba 等^[64]发现 CR 技术能够抑制 TGF β 信号通路, 提示 TGF β 信号通路被抑制可能在 CR 技术介导的细胞增殖中扮演重要角色。虽然研究表明 CR 培养体系对 Notch 信号通路和 TGF β /Smad 信号通路的抑制在促使细胞处于低分化状态的过程中扮演重要角色, 但具体机制尚不清楚, 仍需进一步研究。

2 CR技术的实验方法

目前 CR 技术主要有两种细胞培养方法, 即传统的饲养细胞培养法和条件培养基培养法 (conditional medium, CM)。

2.1 饲养细胞培养法

饲养细胞培养法通过将肿瘤组织和正常组织来源的目的细胞与铯源 γ 射线辐照过的 J2 饲养细胞共同培养, 向培养体系中添加 ROCK 抑制剂 Y-27632 构建 CR 培养体系。大量扩增后利用两种细胞具有

不同的贴壁能力的特性, 采用酶消化法分离饲养细胞和目标细胞^[5]。具体实验步骤如下: (1) 制备 500 mL DMEM 完全培养基: 500 mL DMEM + 50 mL FBS + 5.5 mL L-谷氨酰胺 + 5.5 mL 青霉素和链霉素。4 $^{\circ}\text{C}$ 可储存 4 个月。制备 500 mL 完全 F 培养基 (1 \times): 373 mL DMEM 完全培养基 + 125 mL DMEM Nutrient Mix F12, 12.5 μg 皮质醇 (hydrocortisone), 62.5 ng EGF, 0.5 mL 胰岛素, 0.5 mL 两性霉素 B (amphotericin), 0.5 mL 庆大霉素 (gentamicin) 和 4.3 μL 霍乱毒素 (cholera toxin), 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ROCK 抑制剂 Y-27632, 用 0.2 μm 的无菌过滤器过滤培养液, 并将其储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 最多可储存两周。(2) Swiss-3T3-J2 小鼠成纤维细胞的培养: J2 细胞用完全 DMEM 培养液培养于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱内, 每周传代 2~3 次。(3) J2 细胞的辐照: 当细胞密度达到 90% 左右, 弃去培养基, 用 PBS 洗细胞两次, 用 0.05% EDTA 胰酶在室温下消化细胞 20 s, 倒置显微镜下观察细胞消化情况, 当细胞变圆并且将要离开培养瓶底部的时候, 轻拍培养瓶底使细胞悬浮。加入 4 mL 完全 DMEM 培养基终止消化, 4 $^{\circ}\text{C}$, 300 g/min 离心 5 min, 弃上清。用 10 mL DMEM 培养液悬浮细胞, 用铯源辐照器辐射悬浮细胞, 剂量为 30 Gy (= 3 000 rad), 时间为 1 h。(4) 组织分离原代细胞: 用完全 F 培养基稀释胶原酶和透明质酸酶, 按 3:1 的比例加入中性蛋白酶。将组织切碎并置于含有胶原酶、透明质酸酶和中性蛋白酶的 15 mL 离心管内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下消化 1~3 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 500 g/min 离心 5 min, 弃上清。用 10 mL 完全 DMEM 培养基重悬细胞, 100 μm 的细胞滤器过滤细胞悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 500 g/min 离心 5 min, 弃上清。(5) 共培养: 用完全 F 培养基将辐照的 J2 细胞立即与从组织中分离出的目的细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下混合培养。(6) 细胞分离: 用 PBS 清洗细胞, 0.05% EDTA 胰酶在室温下消化细胞 20 s, 用相差显微镜观察细胞消化情况, 当 J2 细胞变圆立即轻拍培养瓶, 使其脱离培养瓶壁, 用 PBS 终止消化, 此时贴壁能力强的目的细胞仍处于贴壁状态。去除饲养细胞之后采用胰酶/EDTA 消化表皮细胞 5 min, 通过这种方法分离饲养细胞与表皮细胞。分离出的表皮细胞可冷冻低温 (-80 $^{\circ}\text{C}$) 保存。

2.2 条件培养基培养法

传统的饲养细胞培养法主要利用培养的目的细胞与 J2 饲养细胞具有不同的贴壁能力, 采用酶消化不同时间的方法来分离细胞, 但这种方法并不适

用于与 J2 饲养细胞具有相近贴壁能力的细胞, 在应用上有很大的局限性; 且即使 J2 饲养细胞与目的细胞的贴壁能力有明显差异, 酶消化法也无法使这两种细胞完全分离, 导致分离出的目的细胞内会混杂有少量 J2 饲养细胞, 严重阻碍扩增后的目的细胞在科研和临床上的应用。Palechor-Ceron 等^[75]研究发现, 由于 CR 培养体系促使细胞永生化的仅仅需要饲养细胞产生的细胞因子, 而不需要饲养细胞与目的细胞的直接接触作用, 因此可以通过 J2 饲养细胞条件培养基 (conditional medium, CM) 培养法, 即先将铯源 γ 射线辐照过的 J2 细胞在完全 F 培养基内培养 48~72 h, 待细胞分泌足够的细胞因子之后, 采用 0.22 μm 过滤器除去培养液内的 J2 细胞并制成条件培养基。最后采用条件培养基培养目的细胞, 使 J2 饲养细胞与目的细胞在程序上得到分开, 并且培养效果与传统的饲养细胞培养法无显著区别。具体实验步骤如下: (1) CR 条件性培养基制备: 用完全的 F 培养基将照射过 (30 Gy, 1h) 的 J2 细胞浓度调整为 $(1 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^7)/30 \text{ mL}$, 培养细胞于 T175 培养瓶内。将 J2 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下孵育 72 h, 收集培养基上清, 将其转移到 50 mL 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$, 1 000 g 离心 5 min, 收集上清即为条件性培养基, 并采用 0.22 μm 过滤器过滤条件性培养基。将条件性培养基分装于 15 mL 离心管中, 使用时将条件性培养基与新鲜的 F 培养基按照 3:1 的比例混合, 并加入 10 $\mu\text{mol/L}$ Y-27632。所获得的 CM 能够在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下储存一周, 在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下储存 6 个月。(2) 细胞培养: 用上步所得到的条件培养基培养从组织中分离出的细胞, 其他细胞培养方法与饲养细胞培养法一致。

3 研究展望

CR 技术为细胞永生化的研究带来了希望, 在再生医学、药物敏感性测试、基因表达谱分析和异种移植等研究领域展现出了巨大的应用前景。目前 CR 技术已被广泛应用于再生医学领域, 包括新细胞系的建立、组织再生医学、肿瘤个性化治疗、药物靶点发现、新药物发现、动物疾病模型建立、药物毒理及安全性评价的研究等, 但尚不清楚 CR 技术的具体机制, 其可能机制是 ROCK 抑制剂和 J2 饲养细胞能够调节目细胞内约 508 个基因的表达水平, 进而调控非典型 β -连环蛋白的激活、细胞凋亡和细胞分化等细胞生命活动, 最终影响目的细胞在体外的增殖和存活能力, 但具体调控机制仍需

进一步探究。

目前 CR 细胞培养方法主要有传统的饲养细胞培养法和条件培养基培养法。饲养细胞培养法最主要的缺点是在细胞培养过程中, 由于细胞酶消化分离法的局限性, 导致饲养细胞与目的细胞的完全分离非常困难, 给细胞建系和应用带来了极大的不便。与饲养细胞培养法相比, 条件培养基培养法将 J2 饲养细胞与目标细胞在细胞培养程序上分离, 不仅解决了饲养细胞与目标细胞无法彻底分离的问题, 而且由于条件培养基储存和运输更加便捷, 条件培养基培养法更适合推广应用。

然而, 在原地培养肿瘤细胞的过程中, CR 技术仍有很大的局限性, 主要存在以下 3 个问题: 首先, 虽然 CR 培养体系能够提高肿瘤细胞等大多数细胞的增殖能力, 但却对成纤维细胞的增殖能力具有抑制作用^[76], 导致在药物敏感性分析研究中无法确定成纤维细胞对肿瘤细胞生长和肿瘤细胞耐药性的影响; 其次, 由于 Y-27632 会影响肌动蛋白和中间纤维的表达水平和蛋白质活性, 进而影响细胞的运动和迁徙, 这些干扰因素使得 CR 培养体系并不适合进行肿瘤细胞迁徙实验; 最后, 由于肿瘤组织内细胞具有异质性, 因此分离出来的细胞同时含有肿瘤细胞和正常细胞, 而 CR 培养体系对细胞不具备选择性, 会同时促进正常细胞和肿瘤细胞增殖, 严重影响肿瘤细胞或肿瘤组织内正常细胞系的建系过程。为了解决以上问题, 一方面需要病理医生能够正确判断和选择正常或肿瘤组织; 另一方面, 也需要采用血清或细胞表面标志物等方法^[17,37] 特异性分离正常或肿瘤原代细胞, 提高目的细胞的纯度。尽管如此, 同一 CR 培养体系也不可能同时适用于多种不同组织来源细胞的扩增培养, CR 技术的培养条件也应根据不同组织类型进行调整和优化。目前国内尚未有关于 CR 技术系统性的报道, 因此, 很有必要对该技术进行综述, 阐明该技术的分子机制和应用前景, 推广该技术在国内的研究和应用。

[参 考 文 献]

- [1] Cunderlikova B. Issues to be considered when studying cancer *in vitro*. Crit Rev Oncol Hematol, 2013, 85: 95-111
- [2] Kahn J, Tofilon PJ, Camphausen K. Preclinical models in radiation oncology. Radiat Oncol, 2012, 7: 223
- [3] Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, 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: 1417-23
- [4] Herrmann D, Conway JR, Vennin C, et al. Three-

- dimensional cancer models mimic cell-matrix interactions in the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 2014, 35: 1671-9
- [5] Liu X, Krawczyk E, Suprynowicz FA, et al. Conditional reprogramming and long-term expansion of normal and tumor cells from human biospecimens. *Nat Protoc*, 2017, 12: 439-51
- [6] Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol*, 2001, 11: 15-23
- [7] Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 2005, 26: 867-74
- [8] Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, et al. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*, 1989, 8: 3905-10
- [9] Wilding L, Bodmer WF. Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res*, 2014, 74: 2377-84
- [10] Wright WE, Shay JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol*, 1992, 27: 383-9
- [11] Curry EL, Moad M, Robson CN, et al. Using induced pluripotent stem cells as a tool for modelling carcinogenesis. *World J Stem Cells*, 2015, 7: 461-9
- [12] Seki T, Fukuda K. Methods of induced pluripotent stem cells for clinical application. *World J Stem Cells*, 2015, 7: 116-25
- [13] Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 471: 68-73
- [14] Taylor CJ, Bolton EM, Bradley JA. Immunological considerations for embryonic and induced pluripotent stem cell banking. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci*, 2011, 366: 2312-22
- [15] de Miguel-Berriain I. The ethics of stem cells revisited. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 82-83: 176-80
- [16] Reynolds SD, Rios C, Wesolowska-Andersen A, et al. Airway progenitor clone formation is enhanced by Y-27632-dependent changes in the transcriptome. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55: 323-36
- [17] Timofeeva OA, Palechor-Ceron N, Li G, 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: 22741-58
- [18] Saeed K, Rahkama V, Eldfors S, et al. Comprehensive drug testing of patient-derived conditionally reprogrammed cells from castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*, 2017, 71: 319-27
- [19] Yuan H, Myer S, Wang J, et al. Use of reprogrammed cells to identify therapy for respiratory papillomatosis. *N Engl J Med*, 2012, 367: 1220-7
- [20] Crystal AS, Shaw AT, Sequist LV, et al. Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science*, 2014, 346: 1480-6
- [21] Walters BJ, Diao S, Zheng F, et al. Pseudo-immortalization of postnatal cochlear progenitor cells yields a scalable cell line capable of transcriptionally regulating mature hair cell genes. *Sci Rep*, 2015, 5: 17792
- [22] Gentzsch M, Boyles SE, Cheluvharaju C, et al. Pharmacological rescue of conditionally reprogrammed cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56: 568-74
- [23] Jensen TJ, Foster C, Saye JW, et al. Conditional reprogramming of pediatric human esophageal epithelial cells for use in tissue engineering and disease investigation. *J Vis Exp*, 2017, 121. doi: 10.3791/55243
- [24] Wolf S, Perez GF, Mukharesh L, et al. Conditional reprogramming of pediatric airway epithelial cells: a new human model to investigate early life respiratory disorders. *Pediatr Allergy Immunol*, 2017, 28: 810-7
- [25] LaRanger R, Peters-Hal IJR, Coquelin M, et al. Reconstituting mouse lungs with conditionally reprogrammed human bronchial epithelial cells. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24: 559-68
- [26] Avramescu RG, Kai Y, Xu H, et al. Mutation-specific downregulation of CFTR2 variants by gating potentiators. *Hum Mol Genet*, 2017, 26: 4873-85
- [27] Miller AJ, Spence JR. *In Vitro* models to study human lung development, disease and homeostasis. *Physiology: Bethesda*, 2017, 32: 246-60
- [28] Butler CR, Hynds RE, Gowers KH, et al. Rapid expansion of human epithelial stem cells suitable for airway tissue engineering. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 194: 156-68
- [29] Chu HW, Rios C, Huang C, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in primary human airway epithelial cells reveals a proinflammatory role for MUC18. *Gene Ther*, 2015, 22: 822-9
- [30] Alwhibi MS, Khalil MM, Ibrahim MM, et al. Potential antitumor activity and apoptosis induction of *Glossostemon bruguieri* root extract against hepatocellular carcinoma cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 7218562
- [31] Brady SW, McQuerry JA, Qiao Y, et al. Combating subclonal evolution of resistant cancer phenotypes. *Nat Commun*, 2017, 8: 1231
- [32] Yun MR, Choi HM, Kang HN, et al. ERK-dependent IL-6 autocrine signaling mediates adaptive resistance to pan-PI3K inhibitor BKM120 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 2018, 37: 377-88
- [33] Anjanappa M, Hao Y, Simpson ER, et al. A system for detecting high impact-low frequency mutations in primary tumors and metastases. *Oncogene*, 2018, 37: 185-96
- [34] Alamri AM, Liu X, Blancato JK, et al. Expanding primary cells from mucoepidermoid and other salivary gland neoplasms for genetic and chemosensitivity testing. *BioRxiv*, 2018, 11. pii: dmm031716
- [35] Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA, et al. Heterogeneity underlies the emergence of EGFR T790M wild-type clones following treatment of T790M-positive cancers with a third-generation EGFR inhibitor. *Cancer Discov*, 2015, 5: 713-22

- [36] Friedman AA, Letai A, Fisher DE, et al. Precision medicine for cancer with next-generation functional diagnostics. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15: 747-56
- [37] Chen C, Choudhury S, Wangsa D, et al. A multiplex preclinical model for adenoid cystic carcinoma of the salivary gland identifies regorafenib as a potential therapeutic drug. *Sci Rep*, 2017, 7: 11410
- [38] Panaccione A, Chang MT, Carbone BE, et al. NOTCH1 and SOX10 are essential for proliferation and radiation resistance of cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 2083-95
- [39] Beglyarova N, Banina E, Zhou Y, 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: 6153-63
- [40] Yuan HE, Krawczyk E, Blancato J, et al. HPV positive neuroendocrine cervical cancer cells are dependent on Myc but not E6/E7 viral oncogenes. *Sci Rep*, 2017, 7: 45617
- [41] Vondalova Blanarova O, Safarikova B, Herudkova J, et al. Cisplatin or LA-12 enhance killing effects of TRAIL in prostate cancer cells through Bid-dependent stimulation of mitochondrial apoptotic pathway but not caspase-10. *PLoS One*, 2017, 12: e0188584
- [42] Hollevoet K, Mason-Osann E, Liu XF, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of the low-immunogenic antimesothelin immunotoxin RG7787 in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*, 2014, 1: 2040-9
- [43] Sharifnia T, Hong AL, Painter CA, et al. Emerging opportunities for target discovery in rare cancers. *Cell Chem Biol*, 2017, 24: 1075-91
- [44] Ellis L, Ku S, Li Q, et al. Generation of a C57BL/6 MYC-driven mouse model and cell line of prostate cancer. *Prostate*, 2016, 76: 1192-202
- [45] Borodovsky A, McQuiston TJ, Stetson D, et al. Generation of stable PDX derived cell lines using conditional reprogramming. *Mol Cancer*, 2017, 16: 177
- [46] Bailey ST, Smith AM, Kardos J, et al. MYC activation cooperates with Vhl and Ink4a/Arf loss to induce clear cell renal cell carcinoma. *Nat Commun*, 2017, 8: 15770
- [47] Saenz FR, Ory V, AIOtaiby M, et al. Conditionally reprogrammed normal and transformed mouse mammary epithelial cells display a progenitor-cell-like phenotype. *PLoS One*, 2014, 9: e97666
- [48] Brown DD, Dabbs DJ, Lee AV, et al. Developing *in vitro* models of human ductal carcinoma *in situ* from primary tissue explants. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 153: 311-21
- [49] Zhu Y, Yang Y, Guo J, et al. *Ex vivo* 2D and 3D HSV-2 infection model using human normal vaginal epithelial cells. *Oncotarget*, 2017, 8: 15267-82
- [50] Mosimann C, Hausmann G, Basler K. β -catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 276-86
- [51] Supryniewicz FA, Upadhyay G, Krawczyk E, et al. Conditionally reprogrammed cells represent a stem-like state of adult epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 20035-40
- [52] Supryniewicz FA, Kamonjoh CM, Krawczyk E, et al. Conditional cell reprogramming involves non-canonical β -catenin activation and mTOR-mediated inactivation of Akt. *PLoS One*, 2017, 12: e0180897
- [53] Verheyen EM, Gottardi CJ. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn*, 2010, 239: 34-44
- [54] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 2012, 149: 1192-205
- [55] Pertz O. Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci*, 2010, 123: 1841-50
- [56] Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 681-6
- [57] Terunuma A, Lingala RP, Park CJ, et al. Efficient procurement of epithelial stem cells from human tissue specimens using a Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16: 1363-8
- [58] Chapman S, Liu X, Meyers C, et al. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *J Clin Invest*, 2010, 120: 2619-26
- [59] Liu X, Ory V, Chapman S, et al. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *Am J Pathol*, 2012, 180: 599-607
- [60] Hoffman B, Liebermann DA. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene*, 2008, 27: 6462-72
- [61] Dakic AK, DiVito K, Fang S, et al. ROCK inhibitor reduces Myc-induced apoptosis and mediates immortalization of human keratinocytes. *Oncotarget*, 2016, 7: 66740-53
- [62] Gilmore AP. Anoikis. *Cell Death Differ*, 2005, 12 Suppl 2: 1473-7
- [63] Zhang L, Valdez JM, Zhang B, et al. ROCK inhibitor Y-27632 suppresses dissociation-induced apoptosis of murine prostate stem/progenitor cells and increases their cloning efficiency. *PLoS One*, 2011, 6: e18271
- [64] Ligaba SB, Khurana A, Graham G, et al. Multifactorial analysis of conditional reprogramming of human keratinocytes. *PLoS One*, 2015, 10: e0116755
- [65] Cole BB, Smith RW, Jenkins KM, et al. Tracheal basal cells: a facultative progenitor cell pool. *Am J Pathol*, 2010, 177: 362-76
- [66] Bove PF, Dang H, Cheluvvaraju C, et al. Breaking the *in vitro* alveolar type II cell proliferation barrier while retaining ion transport properties. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50: 767-76
- [67] Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, et al. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Exp Lung Res*, 2001, 27: 401-15
- [68] Vermeer PD, Einwalter LA, Moninger TO, et al. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature*, 2003, 422: 322-6
- [69] Ezratty EJ, Stokes N, Chai S, et al. A role for the primary cilium in notch signaling and epidermal differentiation during skin development. *Cell*, 2011, 145: 1129-41
- [70] Wang X, Pasolli HA, Williams T, et al. AP-2 factors act in concert with notch to orchestrate terminal differentiation in skin epidermis. *J Cell Biol*, 2008, 183: 37-48

- [71] Blanpain C, Lowry WE, Pasolli HA, et al. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev*, 2006, 20: 3022-35
- [72] Yugawa T, Nishino K, Ohno S, et al. Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced pluripotent stem cells through ROCK activation. *Mol Cell Biol*, 2013, 33: 4434-47
- [73] Upadhyay G, Yin Y, Yuan H, et al. Stem cell antigen-1 enhances tumorigenicity by disruption of growth differentiation factor-10 (GDF10)-dependent TGF- β signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 7820-5
- [74] James D, Levine AJ, Besser D, et al. TGF β /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 2005, 132: 1273-82
- [75] Palechor-Ceron N, Supryniewicz FA, Upadhyay G, et al. Radiation induces diffusible feeder cell factor(s) that cooperate with ROCK inhibitor to conditionally reprogram and immortalize epithelial cells. *Am J Pathol*, 2013, 183: 1862-70
- [76] Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 1975, 6: 331-43