



(10) 授权公告号 CN 114807038 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 10

(21) 申请号 202210126912.8

US 2013344490 A1, 2013. 12. 26

(22) 申请日 2022. 02. 11

SG 142969 A1, 2008. 06. 27

(65) 同一申请的已公布的文献号

CA 3099260 A1, 2018. 11. 15

申请公布号 CN 114807038 A

CN 114703138 A, 2022. 07. 05

(43) 申请公布日 2022. 07. 29

CN 110291080 A, 2019. 09. 27

(83) 生物保藏信息

CN 103609519 A, 2014. 03. 05

CCTCC NO: C2021105 2021. 12. 09

JP 2014000038 A, 2014. 01. 09

(73) 专利权人 四川大学华西第二医院

向理科等. 骨原发性恶性纤维组织细胞瘤21例光镜、电镜、组化和免疫组化研究. 重庆医科大学学报. 2000, (第3期), 228-230.

地址 610000 四川省成都市武侯区人民南路三段20号

周香香. Klotho调控IGF-1R信号通路在非霍奇金淋巴瘤中的作用及机制研究. 中国博士学位论文全文数据库(电子期刊)医药卫生科技辑. 2017, E072-48.

(72) 发明人 顾玲 徐郡 李圆圆 刘瀚旻

Chioureas, Dimitrios等. ALK plus Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL)-Derived Exosomes Carry ALK Signaling Proteins and Interact with Tumor

(74) 专利代理机构 成都天嘉知识产权代理有限公司 51211

专利代理师 向丹

Microenvironment. CANCERS. 2022, 第14卷(第12期), 全文.

(51) Int. Cl.

C12N 5/09 (2010. 01)

C12N 5/077 (2010. 01)

A01K 67/027 (2006. 01)

C12R 1/91 (2006. 01)

审查员 陈杰

(56) 对比文件

AU 2009312532 A1, 2010. 05. 14

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

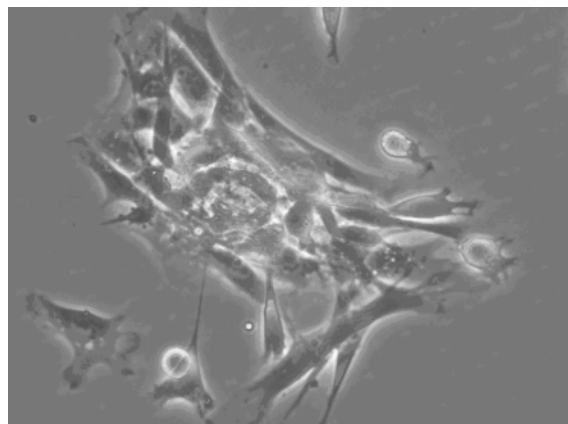
(54) 发明名称

一种小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT及其应用

养体系和类器官体系模型以及淋巴瘤细胞所导致的成纤维细胞肿瘤化生的机制模型等的应用。

(57) 摘要

本发明公开了一种小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT及其应用, 该细胞株来源于人淋巴瘤细胞裸鼠移植瘤模型中的瘤体组织微环境, 其细胞名称为小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT, 保藏编号为CCTCC NO: C2021105, 保藏日期: 2021年12月09日, 保藏单位: 中国典型培养物保藏中心。该细胞株为国内外首次建立的源自移植瘤体的淋巴瘤相关小鼠成纤维细胞肿瘤细胞株, 可在构建小鼠成纤维细胞肿瘤动物模型、淋巴瘤微环境模型、3D肿瘤培



1. 一种小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT,其特征在於:来源于人淋巴瘤细胞裸鼠移植瘤模型中的瘤体组织微环境,其细胞名称为小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT,保藏编号为CCTCC NO:C2021105,保藏日期:2021年12月09日,保藏单位:中国典型培养物保藏中心。

2. 将权利要求1所述小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT在构建小鼠成纤维细胞肿瘤动物模型中的应用。

3. 将权利要求1所述小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT在构建淋巴瘤微环境模型中的应用。

4. 将权利要求1所述小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT在构建3D肿瘤培养体系和类器官体系模型中的应用。

5. 将权利要求1所述小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT在构建淋巴瘤细胞所导致的成纤维细胞肿瘤化生的机制模型中的应用。

6. 将权利要求1所述小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT在构建淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤与淋巴瘤微环境的关系模型中的应用。

7. 将权利要求1所述小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT在构建淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤与淋巴瘤化疗耐药的关系模型中的应用。

一种小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,具体的说,是一种小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT及其应用。

背景技术

[0002] 淋巴瘤是一组起源于淋巴造血系统的恶性肿瘤,属于常见肿瘤之一,近年来发病率逐渐上升,主要表现为无痛性淋巴结肿大,肝脾肿大,全身各组织器官均可受累,伴发热、盗汗、消瘦、瘙痒等全身症状。根据瘤细胞分为霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma,简称HL)和非霍奇金淋巴瘤(non Hodgkin lymphoma,简称NHL)两类。

[0003] 肿瘤微环境,即肿瘤细胞产生和生活的内环境,其中不仅包括了肿瘤细胞本身,还有其周围的成纤维细胞、免疫和炎性细胞、胶质细胞等各种细胞,同时也包括附近区域内的细胞间质、微血管以及浸润在其中的生物分子。由于肿瘤微环境与肿瘤细胞所处的内外环境密切相关,因此,肿瘤微环境对肿瘤的发生、发展和转归也具有重要的影响。

[0004] 肿瘤微环境中,癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)是活化的成纤维细胞,是构成实体肿瘤微环境的主要细胞成分;CAFs通过分泌纤连蛋白和胶原蛋白等细胞外基质蛋白,重塑肿瘤细胞外基质微环境;CAFs还可与肿瘤细胞以及肿瘤微环境中的其它细胞直接或通过分泌生物活性分子间接相互作用;从而促进肿瘤生长、转移、诱导血管生成,甚至参与诱导肿瘤耐药,影响患者预后。CAFs是一种具有高度异质性的细胞,可来源于多种前体细胞,包括:骨髓间充质干细胞、组织中固有成纤维细胞、星形细胞、上皮细胞间质转化、内皮细胞间质转化、纤维细胞和其他细胞,如周细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞和肿瘤干细胞等。由于不同来源的CAFs在肿瘤的进展中起不同的作用,因此构建不同来源的CAFs细胞有助于深入探索肿瘤病理。

[0005] 王翠等在“股骨头坏死(ONFH)患者滑膜组织来源的类成纤维细胞对人Burkitt淋巴瘤(BL)Raji细胞增值的影响”,《复旦学报(医学版)》,2015 Jan., 42(1), 77-83,中通过分离ONFH患者滑膜组织来源的类成纤维细胞,将其与Raji细胞共同培养,发现在类成纤维细胞的刺激下,通过调节Raji细胞中P53、P21及CD9的表达可显著促进Raji细胞的增殖,表明ONFH可能会进一步促进淋巴瘤细胞的增殖。因此,在临床上使用高剂量糖皮质激素治疗BL时需特别注意并发的ONFH对肿瘤的潜在促进作用,尤其对于那些易于并发ONFH的患者。ONFH患者滑膜组织中培养的类成纤维细胞属于炎性反应活化的成纤维细胞,虽然细胞来源与CAF相似但并不属于肿瘤微环境,未被肿瘤细胞“驯化”。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT,是一株瘤体来源小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞株,该细胞株为国内外首次建立的源自移植瘤体淋巴瘤相关小鼠成纤维细胞肿瘤细胞株。为此,本发明还提供了该细胞株在构建小鼠

成纤维细胞肿瘤动物模型、淋巴瘤微环境模型、3D肿瘤培养体系和类器官体系模型、淋巴瘤细胞所导致的成纤维细胞肿瘤化生的机制模型、淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤与淋巴瘤微环境的关系模型、淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤与淋巴瘤化疗耐药的关系模型中的应用。

[0007] 本发明通过下述技术方案实现：一种小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT,来源于人淋巴瘤细胞裸鼠移植瘤模型中的瘤体组织微环境,其细胞名称为小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT,保藏编号为CCTCC NO:C2021105,保藏日期：2021年12月09日,保藏单位：中国典型培养物保藏中心,保存单位地址为中国湖北省武汉市武汉大学。

[0008] 所述小鼠成纤维细胞肿瘤细胞株来源于人间变性大细胞淋巴瘤细胞Karpas299裸鼠移植瘤模型,取自移植瘤瘤体,是一株淋巴瘤相关小鼠成纤维细胞肿瘤细胞株。该细胞株的原代细胞来源于人间变性大细胞淋巴瘤细胞株接种于裸鼠裸区皮下所形成的移植瘤;取肿块剪碎成组织块,体外接种培养,去除悬浮细胞,获得贴壁生长细胞;细胞传代10代后,形态相对均一,以长梭形为主,可见不规则三角形或多角形,胞浆可见突起,核浆比倒置,核仁清晰,无接触抑制,可交叉重叠生长,细胞密集时成团聚集;在体外稳定无限传代,具高致瘤性;命名为小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT。

[0009] 本发明涉及的小鼠成纤维细胞肿瘤细胞株HXLyAF-KT具有以下生物学特性：

[0010] 经转录组测序分析,为小鼠来源细胞。

[0011] 经western blotting检测结果显示：该细胞高表达S100A4、 α -SMA、Vimentin、HSP47、FAP、 β -catenin、PDGFR- α 和PDGFR- β ,为成纤维细胞来源肿瘤。

[0012] HXLyAF-KT细胞在RPMI 1640完全培养基中贴壁生长,以长梭形为主,可见不规则三角形或多角形,胞浆可见突起,体外培养生长良好,按 $2.5 \times 10^5/55\text{cm}^2$ 密度接种,3~4天传代一次,已经体外连续培养超过6个月,传代超过60代,群体倍增超过135代,连续传代过程中细胞形态和增殖动力学稳定、遗传学特征稳定,状态良好;经液氮或超低温冻存、复苏后性状不变,为一株永生化细胞株。

[0013] 采用台盼蓝染色细胞计数法绘制HXLyAF-KT细胞的生长曲线,计算细胞倍增时间为31~34小时,增殖速率稳定,可见分裂相,分裂后细胞仍贴壁;证实细胞株具有增殖动力学稳定性。

[0014] 采用PI染色法和染色体核型分析证实,HXLyAF-KT细胞为混合克隆细胞,DNA倍体异常。

[0015] 本发明还提供了将上述小鼠成纤维细胞肿瘤细胞株HXLyAF-KT在构建小鼠成纤维细胞肿瘤动物模型中的应用,在构建3D肿瘤培养体系和类器官体系模型中的应用,在构建淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤与淋巴瘤微环境的关系模型中的应用。

[0016] 本发明还提供了该小鼠成纤维细胞肿瘤细胞株在构建小鼠成纤维细胞肿瘤动物模型中的应用,在构建淋巴瘤微环境模型中的应用,在构建3D肿瘤培养体系和类器官体系模型中的应用,在构建淋巴瘤细胞所导致的成纤维细胞肿瘤化生的机制模型中的应用,在构建淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤与淋巴瘤微环境的关系模型中的应用,在构建淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤与淋巴瘤化疗耐药的关系模型中的应用。为淋巴瘤治疗提供新的思路和靶点,为探索靶向CAF的肿瘤治疗新方法提供研究平台。

[0017] 本发明与现有技术相比,具有以下优点及有益效果：

[0018] (1) 本发明为目前首次建立的移植瘤瘤体来源淋巴瘤相关小鼠成纤维细胞肿瘤细胞株HXLyAF-KT, 该细胞株具有高致瘤性, 可用于建立小鼠成纤维细胞肿瘤动物模型, 并构建3D肿瘤培养体系和类器官体系。将HXLyAF-KT细胞接种裸鼠, 接种后3天即可在皮下触及肿块, 5天后肿块迅速生长, 致瘤率100%, 且成瘤细胞与体外培养的HXLyAF-KT细胞来源一致。

[0019] (2) 本发明可将小鼠成纤维细胞肿瘤细胞株HXLyAF-KT应用于淋巴瘤微环境的研究中, 获取体外建立淋巴瘤微环境的研究平台, 获取淋巴瘤细胞导致成纤维细胞肿瘤化生的相关数据, 获取淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤与淋巴瘤微环境的关系的相关数据, 为其在治疗淋巴瘤过程中获取淋巴瘤化疗耐药等相关数据。

附图说明

[0020] 图1为倒置相差显微镜下HXLyAF-KT细胞观察图($\times 200$)。

[0021] 图2 为透射电镜下HXLyAF-KT细胞超微结构图($\times 6000$)。

[0022] 图3为HXLyAF-KT细胞生长曲线图。

[0023] 图4为HXLyAF-KT细胞周期图。

[0024] 图5为Western blotting检测HXLyAF-KT细胞S100A4、 α -SMA、Vimentin、HSP47、FAP、 β -catenin、PDGFR- α 和PDGFR- β 表达图。

[0025] 图6 为HXLyAF-KT细胞裸鼠皮下肿瘤形成实验图。

[0026] 图7为HXLyAF-KT细胞裸鼠皮下肿瘤生长曲线图。

具体实施方式

[0027] 下面将本发明的发明目的、技术方案和有益效果作进一步详细的说明。

[0028] 应该指出, 以下详细说明都是示例性的, 旨在对所要求的本发明提供进一步的说明, 除非另有说明, 本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。其中, 移植瘤体或移植瘤瘤体是指肿瘤细胞皮下接种部位生长的肿瘤块。

[0029] 实施例1:

[0030] 本实施例涉及小鼠淋巴瘤相关成纤维细胞肿瘤细胞HXLyAF-KT的分离和建株, 具体步骤如下:

[0031] (1) 将处于对数生长期的人间变性大细胞淋巴瘤细胞Karpas299按 3×10^6 个/100 μ l/只, 接种于雌性 Balb/c (nu/nu) 小鼠(8周龄, 体重20~22g) 裸区皮下; 隔日观察接种部位肿瘤生成情况, 接种21天后肿块体积约428.5 mm³, 取瘤块制成细胞悬液; 重悬在含10%胎牛血清(Thermo公司)的RPMI 1640培养基(Gibco公司)中, 置37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5% CO₂培养箱培养。6天后可见贴壁细胞生长, 去除上清和悬浮细胞, 每2~3天换液, 30天后培养皿中悬浮细胞基本去除, 贴壁细胞多形性, 呈簇状生长, 用0.25%胰酶-EDTA(Hyclone公司)消化传代, 此后每10~14天传代一次, 接种85天后细胞形态较之前均一, 细胞增殖加快, 110天后细胞增殖明显快, 细胞以长梭形、不规则三角形或多角形为主。

[0032] (2) HXLyAF-KT细胞传代时的初始密度为 2.5×10^5 个/55cm², 当细胞增殖到80%融合时1:5到1:10传代。

[0033] (3) HXLyAF-KT细胞冻存前48小时换液,使细胞处于对数生长期,计数细胞,无菌条件下,将细胞转入离心管,1200转/分离心5分钟,弃上清,加入冻存液,调整细胞浓度为 $1\sim 3\times 10^6$ 个/ml,充分混匀,移入无菌冻存管,4℃,30min; -20℃,60min; -80℃过夜,次日移入液氮。

[0034] (4) 复苏时,从液氮中取出冻存管,迅速置于37℃温水中,待冻存物融化后,将细胞悬液移入加入5ml RPMI 1640培养基的离心管中,轻柔混匀,1200转/分,离心5分钟,弃上清,细胞沉淀中加入RPMI 1640完全培养基,混匀,转移入培养皿,置37℃、饱和湿度、5% CO₂培养箱培养。

[0035] (5) HXLyAF-KT细胞经反复如上述步骤(3)和步骤(4)冻存复苏,稳定生长,不影响细胞的生物学特征,显微镜下见细胞形态比较均一,梭形、不规则三角形或多角形,贴壁生长,细胞倍增时间维持在31~34小时。

[0036] 上述步骤中,RPMI 1640完全培养基的配方采用90% RPMI 1640培养基和10%胎牛血清。冻存液的配方采用45% RPMI 1640培养基,50%胎牛血清和5% DMSO (Sigma公司)。

[0037] 实施例2:

[0038] 本实施例是针对实施例1所述细胞株HXLyAF-KT进行的生长和生物学特性鉴定,具体操作如下:

[0039] (1) 细胞形态学观察:

[0040] 取对数生长期的HXLyAF-KT细胞于倒置显微镜下观察活细胞形态,如图1所示,细胞贴壁生长,以长梭形为主,可见不规则三角形或多角形,胞浆可见突起,核浆比倒置,核仁清晰,无接触抑制,可交叉重叠生长,细胞密集时成团聚集;3%戊二醛预固定,1%四氧化钨再固定,醋酸铀和枸橼酸铅染色JEM-1400FLASH透射电镜下观察细胞超微结构,如图2所示,可见细胞核呈不规则形,有切迹,核膜清晰,核仁明显,核凹,胞浆粗面内质网增多,游离核糖体丰富,胞浆可见空泡和内质网、线粒体等细胞器。

[0041] (2) 倍增时间测定:

[0042] 离心收集对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 2×10^3 个/ 3.8cm^2 ,接种于12孔板中,置37℃、5%CO₂、21%O₂培养箱中培养12天,每天用台盼蓝染色计数细胞。以时间为横坐标,细胞数为纵坐标,绘制细胞生长曲线,计算细胞倍增时间为31~34小时,可见细胞株经反复传代,群体倍增次数到200多代,仍然保持增殖动力学稳定性。

[0043] (3) PI染色法监测细胞周期:

[0044] 收获 1×10^6 个细胞,4℃预冷PBS洗2次,4℃ 75% 乙醇固定过夜,4℃ PBS洗2次,PI室温避光染色10min,流式细胞仪检测细胞周期,结果如图3所示,HXLyAF-KT细胞为混合克隆细胞,DNA倍体异常。

[0045] (4) 转录组测序检测证实HXLyAF-KT细胞细胞为小鼠来源细胞。

[0046] (5) western blotting检测结果显示:该细胞高表达S100A4、 α -SMA、Vimentin、HSP47、FAP、 β -catenin、PDGFR- α 和PDGFR- β ,为成纤维细胞来源肿瘤,如图4所示。

[0047] 以上结果显示,淋巴瘤细胞可以导致成纤维细胞肿瘤化生。

[0048] 实施例3:

[0049] 本实施例涉及将实施例1所述细胞株HXLyAF-KT用于构建小鼠成纤维细胞肿瘤动物模型,采用裸鼠成瘤实验,具体实验过程如下:

[0050] 将处于对数生长期的HXLyAF-KT细胞按 3×10^6 个/200 μ l/只,接种于3只雌性Balb/c (nu/nu) 小鼠(5周龄,体重15~19g)裸区皮下;隔日观察接种部位肿瘤生成情况,结果如图6和图7所示,接种2天后可在裸鼠皮下触及米粒大小肿块,接种5天后肿瘤迅速生长,隔天测量肿块大小,可见肿块体积从第5天的120 mm^3 生长到第25天的2338 mm^3 ,25天后取瘤块,留取部分组织行多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,染色。

[0051] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明做任何形式上的限制,凡是依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化,均落入本发明的保护范围之内。

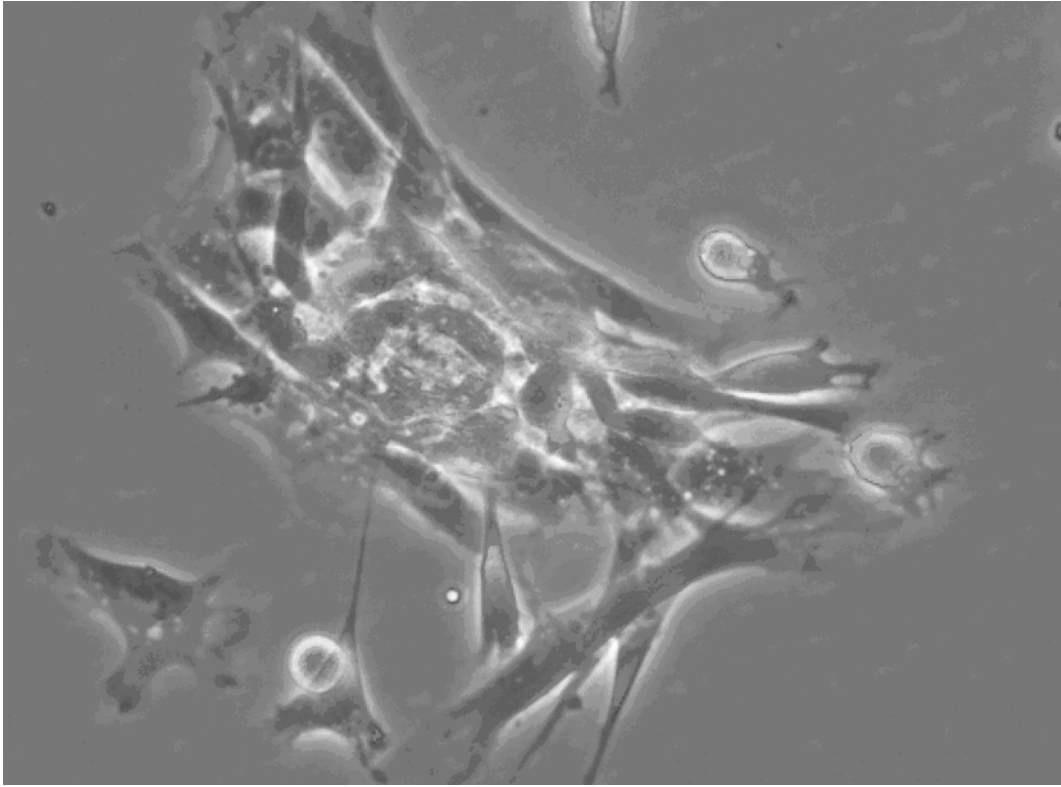


图1

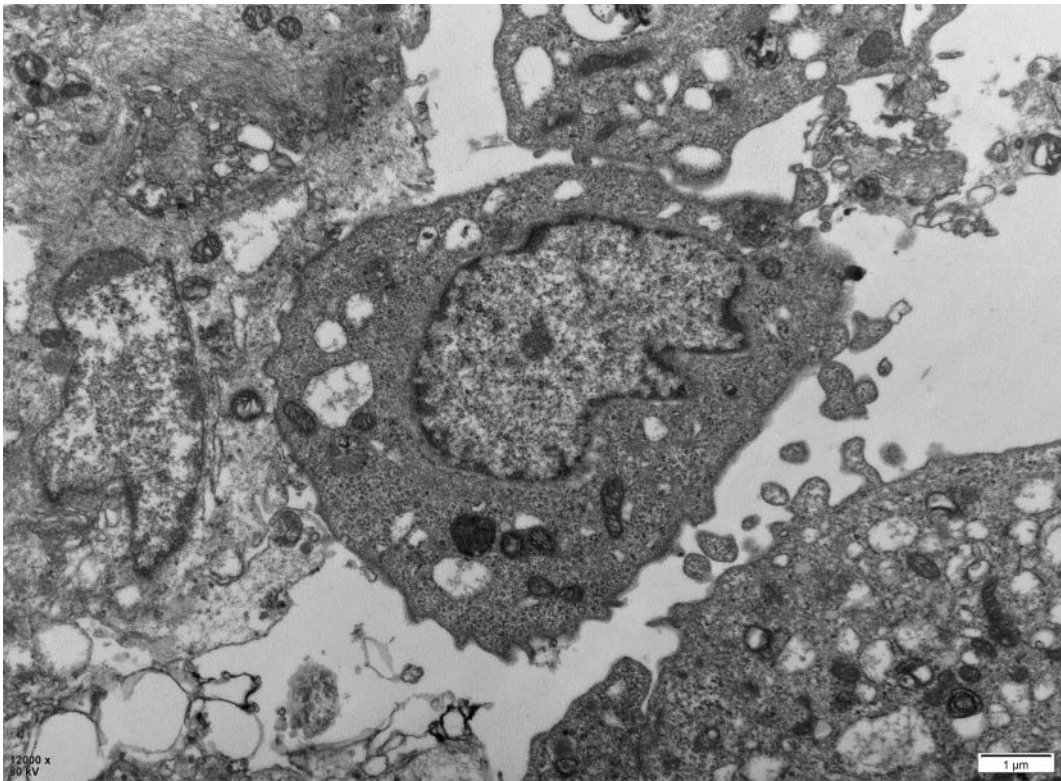


图2

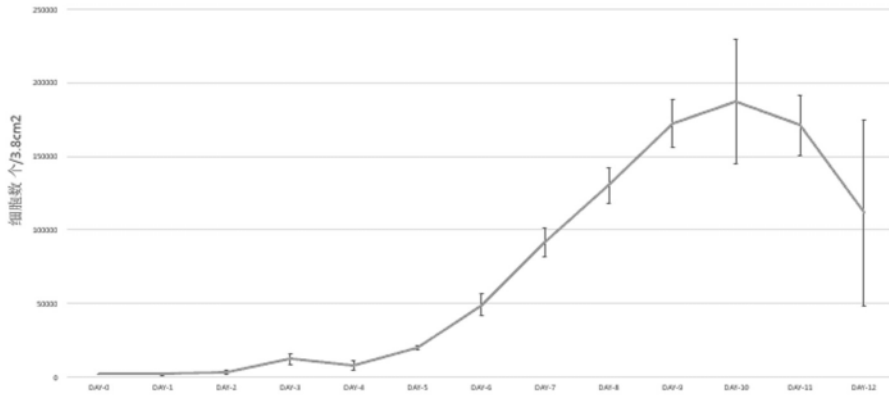


图3

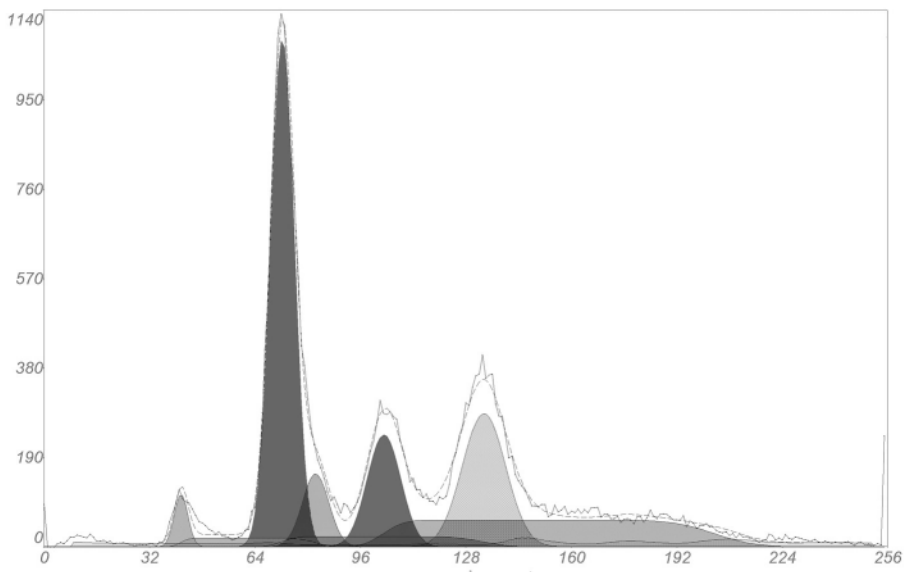


图4

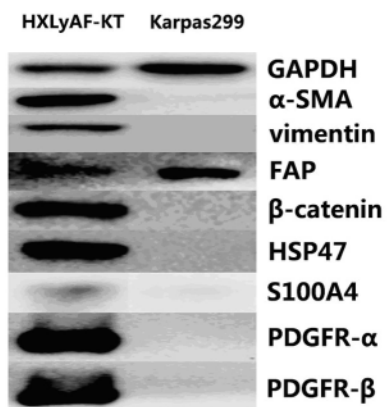


图5

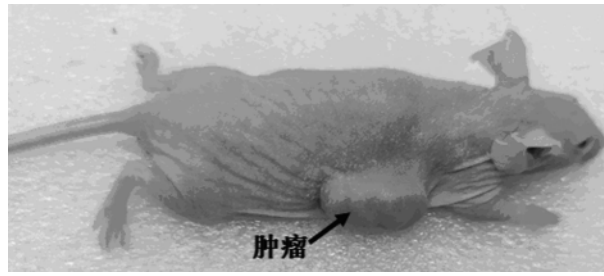


图6

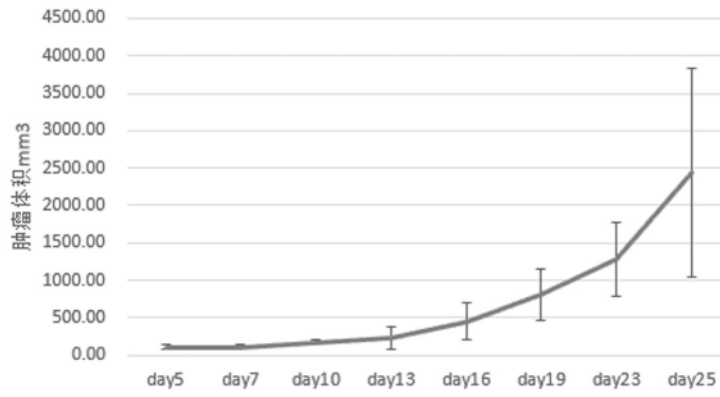


图7