

利用带电荷高分子水凝胶调控软骨肉瘤细胞生长*

韩玉龙^{1,2} 刘振齐^{2,3} 沙保勇^{1,2} 王琳^{1,2} 周丽宏²

陈咏梅^{2,3} 段震峰⁴ 卢天健² 徐峰^{1,2△}

1 (西安交通大学 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049)

2 (西安交通大学 生物仿生工程与生物力学研究中心, 西安 710049)

3 (西安交通大学 理学院, 西安 710049)

4 (哈佛大学 麻省总医院, 波士顿, 美国)

摘要: 为构建软骨肉瘤体外标准模型, 本文制备了聚 N,N-二甲基丙烯酰胺 (PDMAAm)、聚 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸钠 (PNaAMPS) 和聚甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵 (PMETAC) 三种高分子水凝胶, 研究了三种凝胶的弹性模量、含水率、所带电荷对软骨肉瘤细胞形态、贴壁和团聚结构的影响。结果表明, 不同带电荷高分子水凝胶会影响细胞形态参数在 6 h 的形态分布, 细胞在负电荷凝胶 PNaAMPS 上铺展的形态为梭形, 在中性电荷水凝胶 PDMAAm 上铺展的形态偏圆形, 而在正电荷水凝胶 PMETAC 上不铺展。长期的培养结果表明, 中性凝胶 PDMAAm 可以促进软骨肉瘤细胞形成团聚。因此, 中性 PDMAAm 高分子水凝胶具有制备方法简单、使用便捷、成分清晰等特点, 对于建立软骨肉瘤体外标准模型具有重要意义。

关键词: 软骨肉瘤; 团聚; 高分子水凝胶; 细胞形态

中图分类号 R318.08 文献标志码 A 文章编号 1001-5515(2013)04-0782-07

DOI:10.7507/1001-5515.20130148

Regulation of Chondrosarcoma Cell Growth Using Synthesized Hydrogels with Different Electric Charges

Han Yulong^{1,2} Liu Zhenqi^{2,3} Sha Baoyong^{1,2} Wang Lin^{1,2} Zhou Lihong²

Chen Yongmei^{2,3} Duan Zhenfeng⁴ Lu Tianjian² Xu Feng^{1,2}

1 (MOE Key Laboratory of Biomedical Information Engineering, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

2 (Bioinspired Engineering and Biomechanics Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

3 (School of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

4 (Center for Sarcoma and Connective Tissue Oncology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, MA, USA)

Abstract: To develop standard *in vitro* chondrosarcoma models, we synthesized three hydrogels (i. e., PDMAAm, PNaAMPS and PMETAC) and investigated the influence of Young's modulus, swelling ratio and electric charges on the behavior of chondrosarcoma cells seeded on the hydrogels, including morphology, adhesion and aggregation. Results showed that the morphology of chondrosarcoma cells at 6h was dependent on the charges of hydrogels; cells present spindle-shaped and round-shaped morphology on negative charged and neutral hydrogel, respectively, while no cells spreaded on positive charged hydrogel. Chondrosarcoma cells formed aggregates on neutral PDMAAm after further culture. The hydrogels can be synthesized easily and has the characteristics of ease at use with defined components, which holds great potential for developing standard chondrosarcoma models *in vitro*.

Key words: Chondrosarcoma; Aggregate; Hydrogel; Morphology

* 国家重大国际(地区)合作研究资助项目(11120101002);高等学校学科创新引智计划项目资助(111 计划, B06024);青年千人计划资助项目;新世纪人才计划项目资助(NCET-12-0437);国际科技合作与交流专项项目资助(2013DEFG02930)和中国博士后科学基金资助项目(2013M532054)

△通讯作者。E-mail: fengxu@mail.xjtu.edu.cn

引言

软骨肉瘤是一种常见的恶性骨肿瘤, 临床治疗时只能通过手术切除来实现治疗目的。软骨肉瘤细胞在人体内处于特定生理环境中, 呈现特定的形态, 能形成高密度的细胞团聚结构^[1]。软骨肉瘤的细胞形态与其侵袭和转移过程密切相关^[2], 而肿瘤细胞形成的团聚结构, 导致肿瘤组织具有异质性的特点, 即不同部位的肿瘤细胞在形态和功能方面存在一定差异。这种异质性加剧了营养物质、药物等因素的梯度分布, 进而促进了肿瘤的转移与侵袭^[3]。因此, 对软骨肉瘤细胞团聚结构展开深入研究将有助于软骨肉瘤的临床治疗。

目前, 肿瘤细胞被广泛用于癌症致癌机理、基因功能、药物筛选等研究中。但是, 在普通培养板/培养瓶中, 肿瘤细胞处于非生理状态下, 不具备肿瘤组织的异质性特点, 也无法形成团聚结构。组织工程技术的推广加速了肿瘤体外模型的发展, 并提供了一系列可以构建更真实肿瘤模型的技术, 如细胞打印技术和水凝胶法。细胞打印技术虽能精确控制肿瘤细胞的微环境^[4], 但目前其推广受到设备昂贵、工艺复杂等因素的制约。因此, 利用水凝胶模拟细胞微环境成为肿瘤体外模型构建中备受青睐的新方法。Matrigel 凝胶是实验室中常用于阻止细胞贴壁的天然凝胶, 来源于体内的细胞外基质, 在化学成分和力学性能上均能很好地模拟肿瘤细胞的微环境, 促进肿瘤细胞的团聚行为^[5]。但 Matrigel 凝胶存在成份构成不清晰、批次间差异等实验不确定性因素, 故用于体外构建肿瘤标准模型还存在一定局限性。与之相比较, 高分子水凝胶凭借清晰的化学成份, 成为 Matrigel 凝胶的替代品。高分子水凝胶的弹性模量和含水率等力学性能在很大范围内可人工调控, 在一定程度上可模拟体内生理条件下细胞外基质的力学微环境, 从而影响肿瘤细胞的形态和迁移等行为^[6]。但是高分子水凝胶由于生物相容性欠佳, 经常需要表面处理(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列修饰)来弥补其生物相容性的不足, 这些表面处理在一定程度上增加了高分子水凝胶合成的难度。因此, 制备生物相容性好且不需额外表面处理的高分子水凝胶来模拟软骨肉瘤细胞微环境, 是建立标准软骨肉瘤模型的基础。本文分别制备了 3 种成分明确、力学性能可控、带不同电荷的聚 N,N-二甲基丙烯酰胺(PDMAAm, 电中性)、聚 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸钠(PNaAMPS, 负电荷)和聚甲基丙烯酰氧乙

基三甲基氯化铵(PMETAC, 正电荷)高分子水凝胶, 然后分别对 3 种不同高分子水凝胶材料的力学性能(弹性模量)和含水率进行测定。在此基础上, 在未经蛋白修饰的高分子水凝胶上进行软骨肉瘤细胞(SW-1353)培养研究, 记录软骨肉瘤形态的变化, 研究细胞形态参数的分布以及高分子水凝胶对细胞团聚行为的影响(见图 1)。该研究旨在筛选出一种对软骨肉瘤细胞生物相容性较好的高分子水凝胶, 建立一种简单、便捷的软骨肉瘤细胞团聚结构的体外构建方法, 以期对软骨肉瘤病理学的研究和新型有效治疗手段的开发奠定基础。

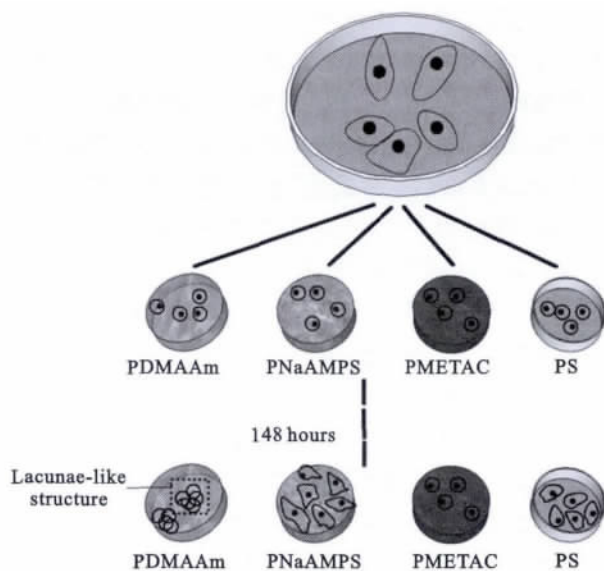


图 1 采用水凝胶模拟软骨肉瘤细胞外基质过程的示意图

Fig. 1 Sketch map mimicking ECM of chondrosarcoma

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试剂 N,N-二甲基丙烯酰胺(Tokyo Kasei), 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸(AMPS)(山东省煜源化学有限公司), 甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵(Alfa Aesar), N,N-亚甲基双丙烯酰胺(国药集团), α -酮戊二酸(上海科丰), RPMI 1640 培养基(Hyclone), 胎牛血清(Hyclone), 青霉素 G 纳-硫酸链霉素混合液(Hyclone)。

1.1.2 细胞株 软骨肉瘤细胞 SW-1353 购至 ATCC。

1.1.3 仪器 紫外光联仪(美国, UVP), 荧光倒置显微镜(OLYMPUS, IX81), 细胞培养箱(Thermo, model371), 电子万能试验机(深圳新三思材料检测

有限公司, CMT6503), 电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司, 101-0型)。

1.2 高分子水凝胶的制备

本研究制备了3种带不同电荷的高分子水凝胶, 分别为中性的PDMAAm凝胶、正电荷的PMETAC凝胶及负电荷的PNaAMPS凝胶。实验中, 分别将高分子凝胶的单体按照浓度为1 mol/L, 交联剂浓度为4 mol%, 引发剂浓度为0.1 mol%来配置水溶液, 配好的水溶液置于准备好的玻璃模具中, 在紫外灯(365 nm)下照射10 h, 待形成凝胶之后取出, 备用。

1.3 高分子水凝胶处理及其力学性能的测定

1.3.1 高分子水凝胶的处理

将凝胶置于超纯水中浸泡, 每12 h换水1次, 浸泡5 d, 以除去凝胶中未反应的化学物质。之后用磷酸盐缓冲溶液(PBS)缓冲液浸泡, 每12 h换液1次, 浸泡2 d。经过超纯水及PBS平衡后的水凝胶用24孔板模具切成直径15 mm, 厚度为2~3 mm的圆柱体, 随后高压蒸汽(121°C, 20 min)灭菌, 备用。

1.3.2 弹性模量的测量

去除灭菌后高分子水凝胶表面的水分, 用游标卡尺精确测量材料的直径及厚度, 然后将其置于电子万能试验机的专用夹具上, 以0.2~0.3 mm/min(具体为材料厚度的10%)的速率开始压缩, 每种样品测量3次, 取平均值。根据测量数据绘制出材料的压缩应力-应变曲线, 该曲线在应变为0~0.1之间线性部分的平均斜率即为材料的弹性模量。

1.3.3 含水率的测量

去除灭菌后高分子水凝胶表面的水分, 称重, 记为凝胶湿重(W_{wet}), 然后将凝胶置于80°C的电热鼓风干燥箱24 h, 待其水分完全除去, 称重, 记为凝胶干重(W_{dry})。每种材料测3个样品, 取平均值。由实验所得凝胶的 W_{wet} 和 W_{dry} , 按照以下公式得到凝胶的含水率: 含水率(%) = $(W_{wet} - W_{dry}) / W_{wet} \times 100\%$ 。

1.4 细胞培养与形态观察

SW-1353细胞生长需要RPMI-1640培养基添加10 mL/L的胎牛血清。细胞培养条件是37°C和5 mL/L CO₂。将处于对数期的细胞消化离心后, 接种到3种水凝胶上(同种凝胶试验设3组平行), 细胞浓度为 2×10^4 个/cm²。接种细胞6 h后照相, 随后每隔24 h照相, 每块凝胶每次照相5张。用Image-Pro Plus 6.0测量所得照片中细胞的周长(P)及面积(A), 利用公式 $S = 4\pi A / P^2$ 计算细胞形态参数, 分析细胞形态分布。

2 结果与讨论

2.1 高分子水凝胶的性能表征

为比较水凝胶力学性能与体内环境的相似性, 对所合成3种高分子水凝胶的弹性模量和含水率进行了测量。图2(a)给出了3种高分子水凝胶的分子结构, 凝胶呈透明状, 根据化学结构可推测, PNaAMPS凝胶由于Na⁺离子的电离, 其表面呈负电性, PMETAC凝胶由于氯离子电离, 表面呈正电性, 而PDMAAm凝胶分子式中不存在可电离的单元, 表面呈电中性。PDMAAm(中)、PMETAC(正)和PNaAMPS(负)3种高分子水凝胶的弹性模量如图2(b)所示, 分别为(142 ± 3.4)、(104 ± 15.4)和(21 ± 2.4) kPa。细胞外基质的弹性模量对细胞的贴附、分化、运动以及铺展行为具有重要影响; 传统塑料培养皿的弹性模量大约为1.4 GPa^[7], 体内软骨组织的弹性模量0.6 kPa^[8]。我们制备的这3种高分子水凝胶的弹性模量较传统的培养皿更接近于体内软骨组织弹性模量, 可以使细胞处于与体内更相近的力学微环境中, 而且高分子水凝胶的弹性模量在一定范围内可由化学反应所调控, 对精确控制细胞力学微环境具有重要意义。

实验中所用高分子水凝胶的含水率测定结果如图2(c)所示, PNaAMPS凝胶(负)的含水率高达(96 ± 0.0004)%, PMETAC凝胶(正)为(93 ± 0.005)%, PDMAAm凝胶(中)为(89 ± 0.002)%。传统培养板为塑料材质, 含水率极低, 体内软骨组织的含水率约为70%^[9]。因此, 与传统的培养板相比, 我们制备的高分子水凝胶具有较高的含水率, 可使细胞处于与体内更相近的化学微环境中。但高含水率水凝胶对细胞生长的影响机制还有待深入研究。

2.2 高分子水凝胶对细胞形态的影响

肿瘤细胞形态的变化与肿瘤的发展密切相关, 如在软骨肉瘤的发生过程中会发生间质-上皮转化过程, 即细胞形态从间质细胞的梭形转化为上皮细胞的圆形^[10]。为了描述细胞在不同高分子水凝胶上形态的变化, 我们对细胞接种到凝胶上生长6 h后的形态进行了记录, 结果如图3(a)所示。在PNaAMPS凝胶(负)、PDMAAm凝胶(中)、培养板(对照组)上, 细胞有明显的铺展行为, 而在PMETAC凝胶(正)上, 细胞大多呈圆形, 表明该材料对细胞的亲和性不佳, 细胞不能很快贴壁铺展。为进一步量化细胞形态, 对细胞在6 h处的细胞形

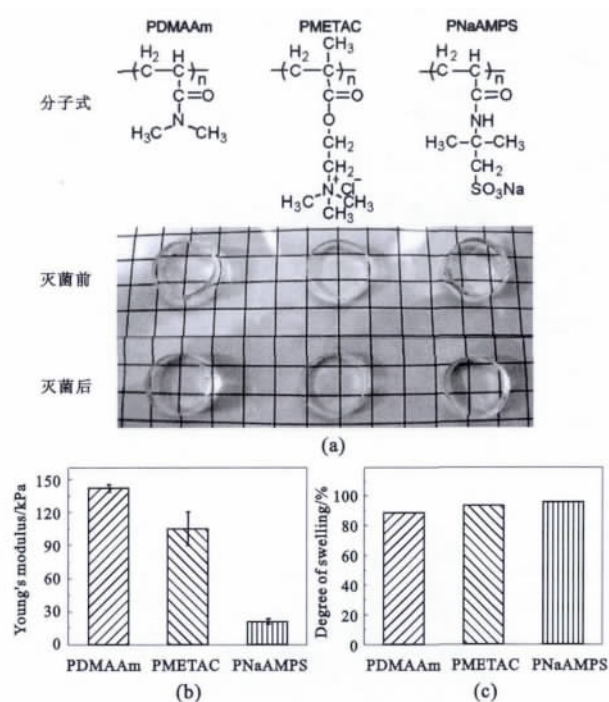


图 2 3 种高分子水凝胶的力学特征

(a) 分子式与照片(背景正方形边长为 7 mm); (b) 杨氏模量; (c) 含水率

Fig. 2 Characterization of three kinds of hydrogels

(a) molecular formula and photos; (b) Young's modulus; (c) Degree of Swelling

态参数(S)进行计算,结果如图 3(b~d)所示。细胞形态参数($S = 4\pi A/P^2$, A 为细胞面积, P 为细胞周长)是描述细胞形态的重要参数,当 S 接近于 1 时,细胞处于圆形,未铺展,而当 S 接近与 0 时,细胞处于铺展状态^[11]。在 PNaAMPS 凝胶(负)表面,细胞形态参数集中分布在 0.2~0.4;在 PDMAAm 凝胶(中)上,细胞形态参数集中分布在 0.4~0.5 附近;而在 PMETAC 凝胶(正)上,细胞形态参数分散较均匀,无明显的集中趋势,说明细胞形态处于一种分散的状态,没有与凝胶发生明显的相互作用。为定量描述 3 种高分子水凝胶的生物相容性,进一步对细胞在凝胶上的铺展比率进行量化。当 $S < 0.3$ 时认为细胞铺展,并对细胞铺展比率进行计算,结果如图 3(e)所示。软骨肉瘤细胞在 PNaAMPS 凝胶(负)、PDMAAm 凝胶(中)、PMETAC 凝胶(正)上的铺展比率分别为 $(36.0 \pm 1.9)\%$ 、 $(24.0 \pm 5.7)\%$ 和 $(28.0 \pm 6.0)\%$ 。

从细胞形态参数的分布来看,软骨肉瘤细胞在 PNaAMPS 凝胶(负)上的铺展程度高于其它两种高

分子水凝胶,而在 PDMAAm 凝胶(中)和 PMETAC 凝胶上相对较差。根据我们前期的研究结果可知,细胞的贴壁情况与高分子水凝胶表面的带电荷情况密切相关^[12]。PNaAMPS 凝胶(负)表面带负电荷,能大量吸附培养基中的胎牛血清蛋白,促进细胞黏附,与我们在本试验中观察到的结果相符。中性电荷的高分子水凝胶,其表面吸附的蛋白量相对较少,不利于细胞的吸附,与我们的试验结果一致。对表面带正电荷的高分子水凝胶而言,有研究表明其可以提高细胞的黏附,且比在培养板上的贴壁效率高^[13],并可促进细胞的贴壁与增殖^[14]。但在本研究中,正电荷的 PMETAC 凝胶并未促进软骨肉瘤细胞的贴壁与增殖,这可能是因为在人体内,软骨肉瘤细胞处于一种负电荷的环境^[15],完全相反的电荷不利于细胞的贴壁和生长。

2.3 高分子水凝胶对细胞团聚影响

活体中软骨肉瘤细胞常形成细胞团聚,分泌大量的细胞外基质,最终形成肿瘤组织。不同电荷的高分子水凝胶在影响细胞铺展行为的同时,也会影响软骨肉瘤细胞的团聚行为。为了研究不同高分子水凝胶对软骨肉瘤形态和结构的影响,我们记录了凝胶表面的软骨肉瘤细胞团聚结构随时间的变化关系。试验中,每隔 24 h 拍照,持续到 148 h。图 4(a)为 SW-1353 细胞在不同基质上生长 148 h 的照片。SW-1353 细胞在 PDMAAm 凝胶(中)表面形成软骨窝的类似结构;在 PNaAMPS 凝胶(负)表面贴壁生长形态良好;在 PMETAC 凝胶(正)上则没有铺展。如图 4(a)所示,在 PDMAAm 凝胶(中)表面生长的细胞聚集并形成细胞团聚,这种团聚结构由中间的圆形细胞以及四周梭形细胞构成;在团聚之间,细胞则较为疏散,形成一种细胞浓度的梯度分布。在 PNaAMPS 凝胶(负)上,虽然细胞贴壁性能较好,但细胞形态并未发生明显变化,大部分细胞呈梭形或多角形,没有发现聚集结构,也不存在细胞浓度的分布差异。细胞在 PMETAC 凝胶(正)上不能正常生长繁殖。

为进一步观察细胞在 PDMAAm 凝胶(中)上形成的聚集结构,将这种结构(见图 4b)与图 4(c)所示的软骨肉瘤临床样本切片进行比较^[16]。软骨肉瘤在体内会形成球状细胞聚集体,分散在大量的细胞外基质当中。细胞在 PDMAAm 凝胶(中)上形成的细胞团聚和不均匀的细胞浓度分布,与体内的肿瘤组织极为相似,而这种结构在培养板上是不存在的,也是首次观察到软骨肉瘤细胞在体外的团聚行为。

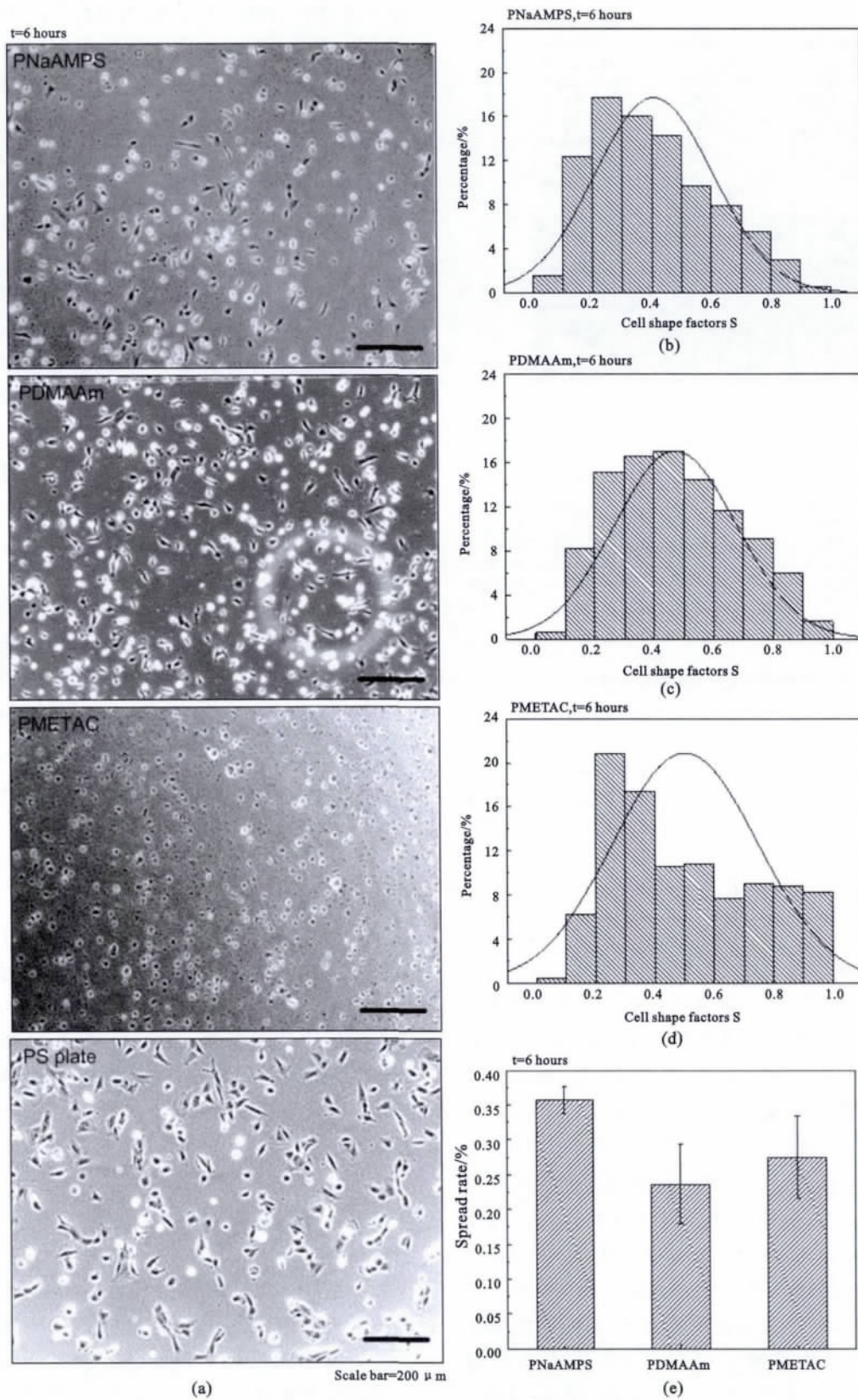


图 3 凝胶对软骨肉瘤细胞(SW-1353)形态和铺展的影响

(a) 细胞在接种 6 h 后的照片; (b)~(d) 细胞在 PNaAMPS、PDMAAm 和 PMETAC 三种水凝胶上接种 6 h 后的细胞形态参数分布; (e) 软骨肉瘤细胞在凝胶上的铺展比率

Fig. 3 Effects of hydrogels of different charge on cell shape and spreading

(a) phase-contrast micrographs of chondrosarcoma cell(SW-1353) on various gels at 6h; (b-d) Cell shape factor distribution at 6h on PNaAMPS (b), PDMAAm(c) and PMETAC(d); (e) Spread ratio of chondrosarcoma cell(SW-1353) on various gels at 6h

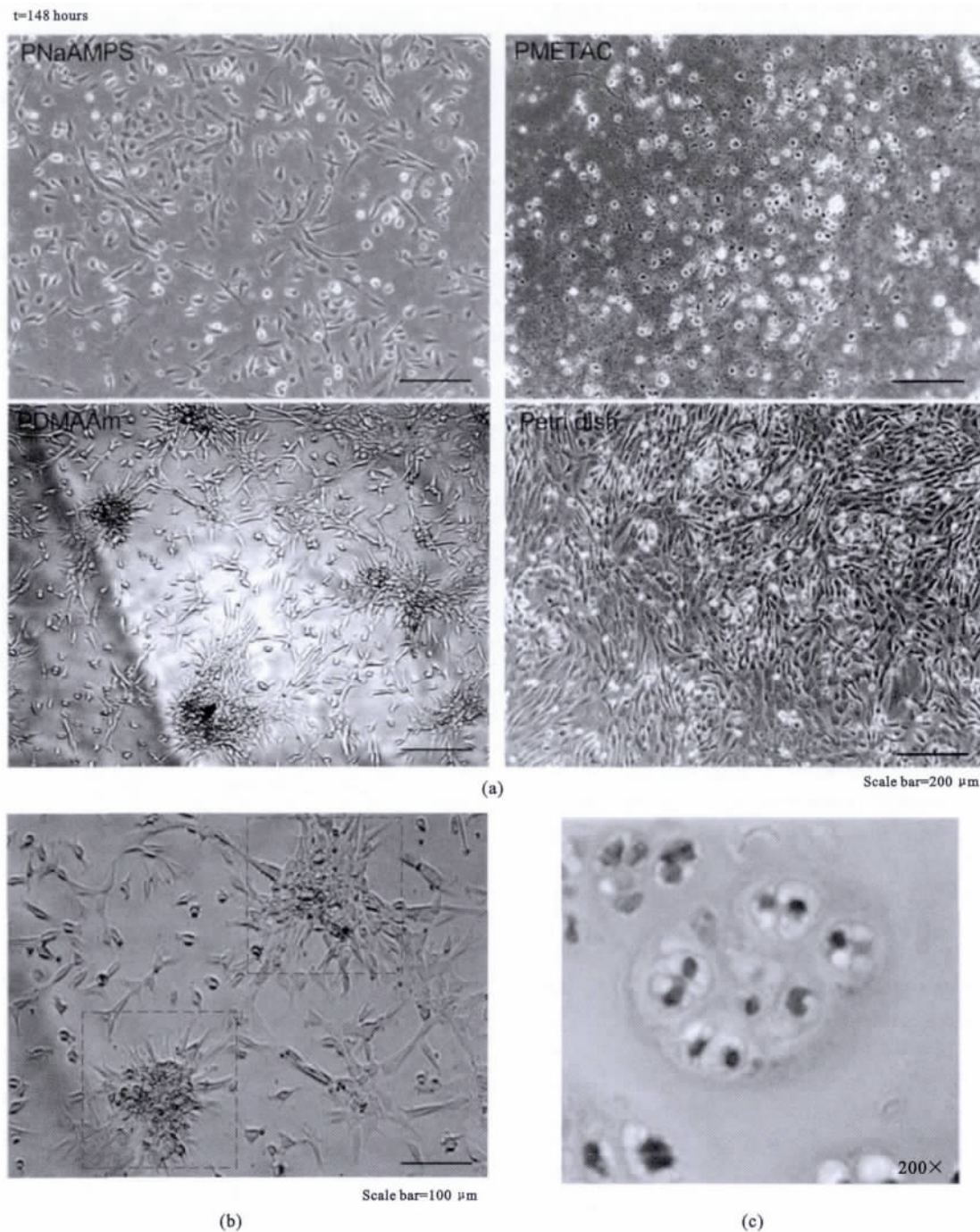


图 4 软骨肉瘤细胞在不同凝胶上生长 148 h 后的形态

(a) 细胞在 PNaAMPS、PDMAAM、PMETAC 及培养板上的显微照片；(b) 细胞在 PDMAAm 上形成的细胞团聚；(c) 软骨肉瘤组织切片 (H&E 染色)

Fig. 4 Different phenotypes of chondrosarcoma cells on hydrogels of different charge after 148h

(a) Phase-contrast micrographs of chondrosarcoma cell(SW-1353) on various gels at 148h; (b) Cell aggregate on PDMAAm; (c) Histological section from clinical sample(H&E staining)

PDMAAm 凝胶(中)虽然在细胞贴附性能上不如 PNaAMPS 凝胶(负),但其可以促进肿瘤微结构的形成,在形态上模拟肿瘤在体内的结构,故 PDMAAm 凝胶(中)在制备体外软骨肉瘤模型中具有

很大应用前景。

3 结论

本文制备了 3 种不同电荷高分子水凝胶

(PMETAC、PDMAAm 和 PNaAMPS),初步测定了这3种水凝胶的力学性能,并研究了凝胶对软骨肉瘤细胞(SW-1353)生长及形成团聚的影响。研究发现,这3种高分子水凝胶在弹性模量和含水率方面均比传统的培养板更接近体内软骨肉瘤细胞的微环境,PNaAMPS 凝胶(负)可以促进细胞的贴壁,PMETAC 凝胶(正)不支持细胞的生长,而 PDMAAm 凝胶(中)可以促进细胞形成肿瘤团聚。这种团聚结构使细胞处于一种不均匀的分布状态,与体内的软骨肉瘤结构非常相似,因此带中性电荷的 PDMAAm 高分子水凝胶较其他两种电荷高分子水凝胶更易构建出体内软骨肉瘤结构。综上所述,中性 PDMAAm 高分子水凝胶的合成过程简单,成分清晰,重复性高,并且不需任何额外的修饰步骤,在构建软骨肉瘤体外模型方面具有重要应用前景,对于软骨肉瘤治疗手段的发现具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] CHANO T, OKABE H, SAEKI Y, et al. Characterization of a newly established human chondrosarcoma cell line, CS-OKB [J]. *Virchows Arch*, 1998, 432(6): 529-534.
- [2] BELLETTI B, NICOLOSO M S, SCHIAPPACASSI M, et al. Stathmin activity influences sarcoma cell shape, motility, and metastatic potential[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(5): 2003-2013.
- [3] GRIFFITH L G, SWARTZ M A. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro* [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(3): 211-224.
- [4] 周丽宏,陈自强,黄国友,等.细胞打印技术及应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(12): 95-104.
- [5] LANG S H, SHARRARD R M, STARK M, et al. Prostate epithelial cell lines form spheroids with evidence of glandular differentiation in three-dimensional Matrigel cultures[J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(4): 590-599.
- [6] TZVETKOVA-CHEVOLLEAU T, STEPHANOU A, FUARD D, et al. The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(10): 1541-1551.
- [7] KWON S, JEONG S, KANG Y. Topography and near-field image measurement of soft biological samples in liquid by using a tuning fork based bent optical-fiber sensor [J]. *Rev Sci Instrum*, 2011, 82(4): 043707.
- [8] GUILAK F, JONES W R, TING-BEALL H P, et al. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 1999, 7(1): 59-70.
- [9] BOLLET A J, NANCE J L. Biochemical findings in normal and osteoarthritic articular cartilage. II. chondroitin sulfate concentration and chain length, water, and ash content [J]. *J Clin Invest*, 1966, 45(7): 1170-1177.
- [10] FITZGERALD M P, GOURRONC F, TEOH M L, et al. Human chondrosarcoma cells acquire an Epithelial-Like gene expression pattern via an epigenetic Switch: evidence for Mesenchymal-Epithelial transition during sarcomagenesis [J]. *Sarcoma*, 2011: 598218.
- [11] MOHSENY A B, MACHADO I, CAI Y, et al. Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease [J]. *Lab Invest*, 2011, 91(8): 1195-1205.
- [12] CHEN Y M, YANG J J, GONG J P. Adhesion, spreading, and proliferation of endothelial cells on charged hydrogels [J]. *J Adhesion*, 2009, 85(11): 839-868.
- [13] SCHNEIDER G B, ENGLISH A, ABRAHAM M, et al. The effect of hydrogel charge density on cell attachment [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(15): 3023-3028.
- [14] HATTORI S, ANDRADE J D, HIBBS J B, et al. Fibroblast cell proliferation on charged hydroxyethyl methacrylate copolymers [J]. *J Colloid Interface Sci*, 1981, 104(1): 72-78.
- [15] SCHÖRLE C M, FINGER F, ZIEN A, et al. Phenotypic characterization of chondrosarcoma-derived cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2005, 226(2): 143-154.
- [16] MATSUURA S, ODA Y, MATONO H, et al. Overexpression of A disintegrin and metalloproteinase 28 is correlated with high histologic grade in conventional chondrosarcoma [J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(3): 343-351.

(收稿:2012-03-30 修回:2012-07-06)