

人小细胞肺癌细胞株 H446 侧群细胞的生物学特征

王 波^{1,2}, 杨 欢³, 黄玉政⁴, 严茹红³, 刘芬菊⁵, 张军宁¹

Biologic characteristics of the side population of human small cell lung cancer cell line H446

Bo Wang^{1,2}, Huan Yang², Yu-Zheng Huang³,
Ru-Hong Yan², Fen-Ju Liu⁴, Jun-Ning Zhang¹

- 1. 苏州大学附属第一医院放疗科, 江苏 苏州 215006
- 2. 苏州大学附属第二医院肿瘤科, 江苏 苏州 215004
- 3. 苏州大学附属第二医院检验科, 江苏 苏州 215004
- 4. 江苏省寄生虫病防治研究所, 江苏 无锡 214064
- 5. 苏州大学放射医学与公共卫生学院, 江苏 苏州 215123

- 1. Department of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215006, P. R. China
- 2. Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215004, P. R. China
- 3. Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215004, P. R. China
- 4. Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi, Jiangsu 214064, P. R. China
- 5. School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, P. R. China

通讯作者: 张军宁
Correspondence to: Jun-Ning Zhang
Tel.: 86. 512. 67780388
Email: junningzhang@gmail. com

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30870585)

Grant: National Natural Science Foundation of China (No. 30870585)

收稿日期: 2009-06-30

接受日期: 2009-12-28

[Abstract] **Background and Objective:** Recently, the theory of cancer stem cells (CSCs) has presented new targets and orientations for tumor therapy. The major difficulties in researching CSCs include their isolation and purification. The aim of this study is to identify and characterize the side population (SP) cells in small cell lung cancer (SCLC) cell line H446, which lays the foundation for the isolation and purification of CSCs. **Methods:** Fluorescence-activated cell sorting (FACS) was used to sort SP and non-SP (NSP) cells from H446. Both subgroups were cultivated to survey the capacity to form into suspended tumor cell spheres. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time PCR were used to evaluate the expression levels of the mRNA of CD133, ABCG2, and nucleostemin in both subgroups. The capacity of proliferation and the differences in drug resistance of both subgroups and unsorted cells were tested by the MTT method. The differentiation ability of both subgroups was determined by FACS. Proliferation was determined by subcutaneous tumor formation in nude mice. **Results:** The percent of Hoechst 33342 negative cells was about (5.1 ± 0.2)% in H446 by fluorescence microscopy. The percent of SP cells was (6.3 ± 0.1)% by flow cytometry. SP cells had a stronger capability of forming into tumor spheres than NSP cells. The mRNA expression levels of ABCG2, CD133, and nucleostemin in SP cells were 21.60 ± 0.26, 7.10 ± 0.14, and 1.02 ± 0.08 folds higher than that in NSP cells ($P < 0.01$, $P < 0.01$, and $P > 0.05$, respectively). In vivo, SP cells showed better proliferative ability and tougher viability when treated with drugs. SP cells can differentiate into NSP cells, but NSP cells cannot differentiate into SP cells. SP cells had a greater ability to form tumors. **Conclusions:** The H446 cell line contained some SP cells with stem cell properties. CD133 and ABCG2 may be cancer stem cell markers of SCLC. **Key words:** Small cell lung cancer, side population, cancer stem cells, CD133, ABCG2

【摘 要】 背景与目的: 肿瘤干细胞学说的提出为肿瘤治疗提供了新的靶点和方向, 但肿瘤干细胞的分离纯化一直是个难题。本研究拟从小细胞肺癌细胞株 H446 中分离并鉴定出具有干细胞特性的侧群 (SP) 细胞, 研究其生物学特征, 为肿瘤干细胞的分离纯化奠定基础。方法: 采用荧光激活细胞分选 (FACS) 技术分选得到 H446 细胞中 SP 细胞和非侧群 (NSP) 细胞, 并检测纯度。观察形成悬浮肿瘤细胞球的能力, 采用逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 及荧光定量 PCR 检测这两种细胞亚群中 CD133、ABCG2、Nucleostemin mRNA 水平。MTT 法比较 SP 细胞、NSP 细胞及未分选细胞体外增殖能力及耐药性差异, 流式细胞仪检测体

外分化能力,裸鼠成瘤实验检测体内成瘤能力。**结果:**荧光显微镜下 H446 细胞中 Hoechst33342 阴性细胞约为 $(5.1 \pm 0.2)\%$ 。流式细胞分选结果显示, H446 中 SP 细胞比例为 $(6.3 \pm 0.1)\%$ 。SP 细胞在无血清培养基中形成悬浮肿瘤细胞球的能力强于 NSP 细胞。CD133、ABCG2 在 SP 细胞中的表达是 NSP 细胞的 (21.60 ± 0.26) 倍、 (7.10 ± 0.14) 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Nucleostemin 在 SP 细胞中的表达是非 SP 细胞的 (1.02 ± 0.08) 倍,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SP 细胞体外增殖能力及耐药存活能力均明显强于 NSP 细胞及未经分选的细胞 ($P < 0.01$); SP 细胞在体外可分化为 NSP 细胞,但 NSP 细胞在体外不可分化为 SP 细胞; SP 细胞在裸鼠体内具有较强的致瘤性。**结论:**人小细胞肺癌细胞株 H446 中存在具有肿瘤干细胞特性的 SP 细胞, CD133、ABCG2 可能是人小细胞肺癌干细胞的分子标志物。

关键词:小细胞肺癌;侧群细胞;肿瘤干细胞;CD133;ABCG2

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A

文章编号:1000-467X(2010)03-0272-07

近年来,Goodell 等^[1]在用 DNA 染料 Hoechst33342 为骨髓细胞染色并进行流式细胞术分析时发现有一小群细胞染色偏低,且这群细胞具有一定程度的自我更新和分化能力,具有类似干细胞的特性,遂把这一小部分染色偏弱的细胞命名为 side population cells,即 SP 细胞,中文称为侧群细胞或边缘细胞群。已有研究在多种成体组织、胚胎及肿瘤细胞中发现了 SP 细胞^[2],此类细胞常常高表达肿瘤干细胞分子标志物和 ABCG2/BCRP1,与肿瘤干细胞相似,具有较强的成瘤能力,并对多种化疗药物耐药。

小细胞肺癌占肺癌总数的 20% ~ 25%,对化学治疗及放射治疗敏感,但易复发和发生远处转移,文献报道局限期小细胞肺癌的 5 年生存率为 7%^[3],广泛期仅为 1%^[4]。近几年提出的肿瘤干细胞学说认为,在大部分肿瘤中潜伏着的极少量肿瘤干细胞是肿瘤复发和转移的根源^[5]。目前大多学者认为 SP 细胞中富集肿瘤干细胞,在肿瘤干细胞分子标志物未知的情况下,可以借助 SP 细胞来研究肿瘤干细胞^[6]。本实验旨在从人小细胞肺癌细胞株 H446 中分离 SP 细胞,鉴定其干细胞特性,并探寻小细胞肺癌干细胞分子标志物。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Gibco 公司;普通含血清培养基 (serum-supplemented medium, SSM) 为 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基;无血清培养基 (serum-free

medium, SFM) 由不含牛血清的 RPMI-1640 培养基,并添加终浓度 20 ng/mL 重组表皮生长因子 (EGF, 购自 PeproTech 公司) 和终浓度 10 ng/mL 碱性成纤维生长因子 (bFGF, 购自 PeproTech 公司) 组成。Hoechst33342、PI 购自 Sigma 公司,维拉帕米购自 Tocris 公司,羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 购自同仁化学公司,Trizol 购自 Gibco 公司,噻唑蓝 (MTT) 购自 Sigma 公司。逆转录试剂盒购自 Promega 公司,PCR 引物购自上海生物工程公司,实时 PCR 50 μ L 冻干粉购自 Bioneer 公司。

1.2 主要仪器

实验所用主要仪器包括 FACS Aria II 流式细胞仪 (BD 公司)、超净工作台 (Airtech 公司)、CO₂ 恒温细胞培养箱 (Thermo 公司)、荧光显微镜 (LEICA)、普通 PCR 仪 (Eppendorf)、Bioneer Exicycler 实时 PCR 仪 (Bioneer) 和倒置显微镜 (Olympus)。

1.3 细胞系

人小细胞肺癌细胞株 H446 购自中国科学院上海生命科学院细胞库。

1.4 实验动物

4 ~ 6 周龄的裸鼠 36 只,体质量 18 ~ 20 g,雄性,购于上海中国科学院实验动物中心。实验动物合格证号为 SCXK(沪)2007-0005。

1.5 方法

1.5.1 荧光显微镜观察 Hoechst33342 染色 选取对数生长期的 H446 细胞,弃去旧培养液,加入含 2% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 2 mL,再加入 Hoechst33342 至终浓度为 5 μ g/mL, 37℃ 孵育 90 min, PBS 洗 2 次,加入含 2% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 1 mL。将溶于二甲基亚砜 (DMSO) 的 5 mmol/L 的 CFSE 液用 PBS 稀释成 5 mmol/L,取 1 mL 加入培养皿中,置于 37℃ 培养箱孵育 15 min, 4℃ 预冷的含 2% 胎牛血清的 PBS 洗 2 次,于倒置荧光显微镜下观察, Hoechst33342 染色阴性细胞应无或弱蓝色荧光。随机取 5 个 100 倍视野,分别计数 100 个细胞,计算 Hoechst33342 染色阴性细胞百分比 (Hoechst33342 阴性细胞数/CFSE 阳性细胞数)。

1.5.2 流式细胞仪分选及纯度检测 选取对数生长期细胞,制成单细胞悬液,设实验管和对照管,细胞密度均调整为 1×10^6 /mL。对照管加入维拉帕米 (终浓度为 100 μ g/mL), 37℃ 水浴 20 min 后,对照管和实验管分别加入终浓度为 5 μ g/mL 的 Hoechst33342, 37℃ 水浴 90 min, 每 15 min 振荡混匀 1 次,低温离心机离心 5 min 弃上清液,用 4℃ 含 2%

胎牛血清的 PBS 洗 2 遍,重悬于 4℃ 含 2% 胎牛血清的 PBS 液中,检测前 30 min 加入碘化丙啶 (PI) 至终浓度为 1 μg/mL,去除死细胞干扰,最后上流式细胞仪分选 SP 及 NSP 亚群。此实验全程避光。取部分分选出的 SP、NSP 细胞立即重新上流式细胞仪做纯度检测。

1.5.3 无血清培养 将分选出的 SP 和 NSP 细胞先分别接种于 SSM 培养,后分别取对数生长期细胞,用 PBS 液清洗,胰酶消化,重悬于 SFM 中,接种于培养瓶中(1:1 接种),继续在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,观察肿瘤球细胞形成情况。

1.5.4 逆转录聚合酶链反应和定量 PCR 将分选出的 1 × 10⁶ 个 SP 和 NSP 细胞分别加入 Trizol 提取总 RNA。取 5 μg 总 RNA,严格按逆转录试剂盒说明书操作。PCR 反应体系为:2 × PCR mix 10 μL、cDNA 模板 1.0 μL,上、下游引物各 1.0 μL (10 μmol/L),用 ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 循环参数为:94℃ 预变性 5 min,1 个循环;94℃ 30 s,55℃ (ABCG2/nucleostemin/CD133/GAPDH) 30 s,72℃ 30 s,35 个循环扩增;最后 72℃ 10 min 结束反应。将扩增产物 8 μL 上样于 1% ~ 2% 的琼脂凝胶上,电泳(80 V,30 min),溴乙锭(EB)染色 10 min,凝胶成像系统分析照相。引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 1。定量 PCR 反应体系为 50 μL,在配套冻干粉中加入 DEPC-H₂O 45 μL,cDNA 模板(1:100 稀释)1.0 μL,上、下游引物各 2.0 μL (10 μmol/L)。循环参数为:94℃ 预变性 5 min,1 个循环;94℃ 30 s, 55℃ (CD133/ABCG2/nucleostemin/GAPDH)30 s,72℃ 30 s,收集荧光,40 个循环扩增;60℃ 作熔解曲线,结束反应。应用 2^{-ΔΔCT} 法^[7] 分析 SP 细胞与 NSP 细胞目的基因和内参基因的 Ct 值,NSP 细胞组数据标准化为 1,计算 SP 细胞与 NSP 细胞各基因的相对表达差异。

1.5.5 细胞增殖实验 分别将 1000 个 SP、NSP 及未分选(Total)细胞接种于 96 孔板,每组设 5 个复孔,接种 9 板,空白对照组为完全培养基。培养 1 ~ 9 d,每天取一板,加入 20 μL MTT(5 mg/mL),37℃ 孵育 4 h,加入 150 μL DMSO 室温下振荡,30 min 后全自动荧光酶标仪在 570 nm 波长下测定吸光度(A)值,取均值减空白对照值,根据各组细胞每一天的 A 值计算细胞的增殖率,第 n 天细胞的增殖率 = 第 n 天的 A 值/第 1 天的 A 值 × 100%。以增殖率为纵坐标,时间为横坐标绘制细胞增殖曲线。

1.5.6 耐药性差异的检测 分别将 600 个 SP、NSP 及未分选(Total)细胞接种于 96 孔板,每组设 5 个复孔。阴性对照组加完全培养基,加药组加入终浓度为 0.2 PPC(血浆峰值浓度)的顺铂,同时分别取相同数量的细胞设为未加药组,培养 2 周。MTT 法检测 3 种细胞的 A₅₇₀ 值,以未加药细胞 A₅₇₀ 为对照,按下式计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率 = (1 - 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值) × 100%。

表 1 CD133、ABCG2、nucleostemin、GAPDH 基因引物序列
Table 1 Primer sequences of CD133, ABCG2, nucleostemin, and GAPDH genes

Gene	Primer sequence (5'-3')	Fragment length(bp)
CD133	Forward:CTGGGGCTGCTGTTTATTATTCTG	337
	Reverse:ACGCCCTTGCTCCTTGCTAGTGTTC	
ABCG2	Forward:ATGAAACCTGGTCTCAACG	317
	Reverse:GAGTCTGCCACTTTATCCA	
Nucleo- stemin	Forward:GTTCCAAACAGTGCTCCCT	305
	Reverse:CTGGCATCCAACACCTCTA	
GAPDH	Forward:GGATTTGGTCGTATTGGG	205
	Reverse:GGAAGATGGTGATGGGATT	

1.5.7 SP 及 NSP 分化能力测定 分别收集体外培养 10 d 后的 SP 及 NSP 细胞,制成单细胞悬液,用 Hoechst33342 复染,流式细胞仪分析 SP 及 NSP 细胞中的 SP 细胞比例。

1.5.8 体内致瘤能力分析 将 36 只裸鼠(4 ~ 8 周龄)随机分成 6 组。将 SP 细胞及 NSP 细胞制成细胞悬液后分别以 1 × 10³、1 × 10⁴、1 × 10⁵ 个细胞,接种于裸鼠右侧腋窝皮下。每天观察裸鼠致瘤情况并记录致瘤时间。于 10 周时处死裸鼠,观察裸鼠成瘤率,用游标卡尺测量瘤体最长径(a)与最短径(b),计算肿瘤体积(V, mm³),V = ab²π/6,并称量实验后瘤重。

1.6 统计学分析

所有实验均重复 3 次以上,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较用 t 检验,采用 Graphpad Prism 软件分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 荧光显微镜下可观察到 Hoechst33342 阴性细胞 荧光显微镜下可见所有 H446 细胞的胞浆和胞核经 CFSE 染色呈现绿色荧光,大部分胞核经 Hoechst33342 染色呈现蓝色荧光,少部分胞核蓝色荧光较弱或无荧光。计数 Hoechst33342 阴性细胞约占(5.1 ± 0.2)%,见图 1。

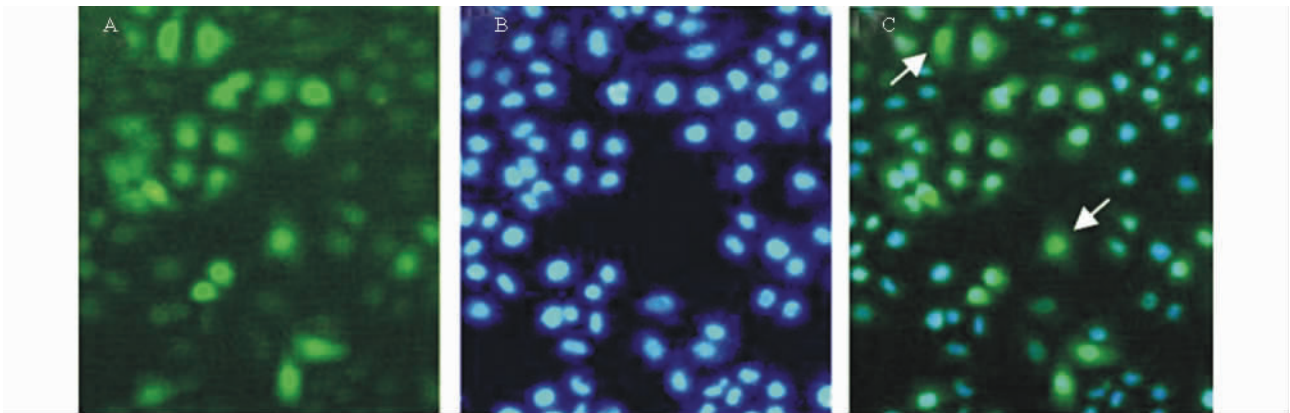


图 1 荧光显微镜下观察 Hoechst 33342 染色阴性 H446 细胞 (×100)

Figure 1 Observation of negative-stained cells in H446 with Hoechst 33342 by fluorescence microscope (×100)
A, all nuclei and cytoplasm counterstained green with CFSF; B, H446 nuclei stained blue with Hoechst 33342; C, A and B merged.

2.2 H446 细胞中 SP 细胞检测

流式细胞仪可检测到 H446 细胞中有 SP 细胞的存在,SP 细胞的比例为(6.3 ±0.1)% (图 2A);经维拉帕米阻断 ABCG2 后,SP 细胞比例减少至(0.1 ±0.0)% (图 2B)。SP 细胞的分选纯度为(98.4 ±0.1)% (图 2C),NSP 细胞的分选纯度为(97.6 ±0.1)% (图 2D)。分选后的 SP 细胞及 NSP 细胞形态上无明显差异,无菌收集分选的 SP 细胞及 NSP 细胞备用。

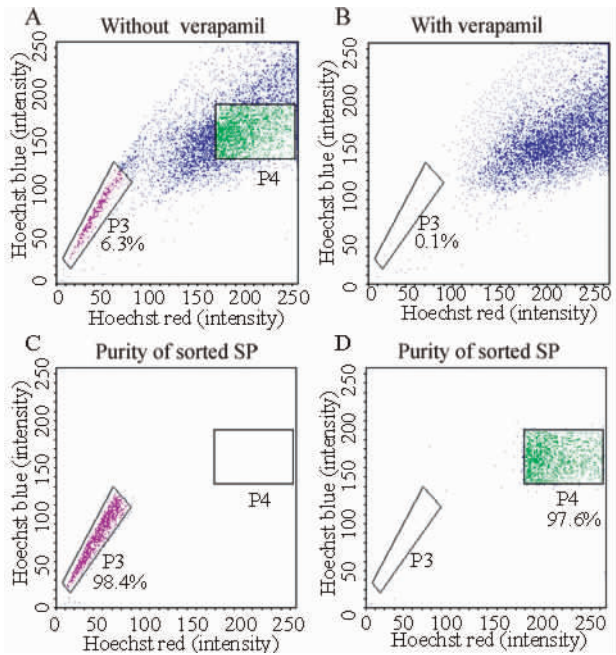


图 2 流式细胞仪分析 H446 细胞中的 SP 细胞
Figure 2 Analysis of side population (SP) cells among H446 cells by fluorescence-activated cell sorting (FACS)
A, Hoechst 33342; B, verapamil + Hoechst 33342; C, purity of sorted SP cells; D, purity of sorted NSP cells.

2.3 SP 细胞在无血清培养基中形成悬浮肿瘤细胞球的能力强于 NSP 细胞

7 d 后,SP 细胞、NSP 细胞均可在无血清培养基内形成悬浮肿瘤细胞球。SP 细胞形成的悬浮肿瘤细胞球较致密(图 3A);而 NSP 细胞形成的悬浮肿瘤细胞球疏松,形态不规则(图 3B)。

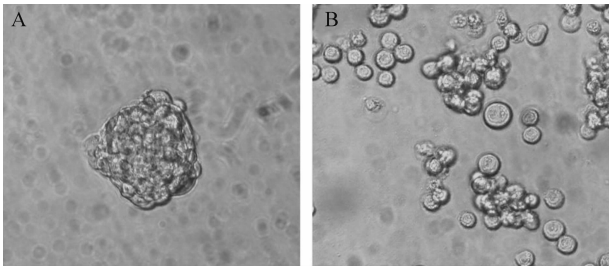


图 3 SP 细胞和 NSP 细胞在无血清培养基内生长情况 (×200)

Figure 3 The growth of SP and NSP cells in serum-free medium (SFM) (×200)
A, suspended tumor cell spheres in SP cells; B, suspended tumor cell spheres in NSP cells.

2.4 CD133、ABCG2 在 SP、NSP 细胞中的表达

RT-PCR 检测结果显示:CD133 在 SP 细胞中高表达,在 NSP 中低表达;ABCG2 在 SP 细胞中高表达,在 NSP 中低表达;nucleostemin 在 SP 和 NSP 细胞中均高表达(图 4A)。荧光定量 PCR 结果显示:ABCG2、CD133、nucleostemin mRNA 在 SP 细胞中的表达与 NSP 细胞相比的相对表达倍数分别为 21.60 ±0.26 (P <0.01)、7.10 ±0.14 (P <0.01)、1.02 ±0.08 (P >0.05) (图 4B)。ABCG2、CD133、nucleostemin GAPDH 溶解曲线峰值均在同一位置,说明定量 PCR 扩增反应是特异的,无杂带生成。

SP、NSP 细胞中 CD133、GAPDH 荧光定量 PCR 部分扩增曲线及熔解曲线见图 4C、D。

2.5 SP 细胞、NSP 细胞及未经分选细胞的体外增殖能力

以增殖率为纵坐标,时间为横坐标,绘制细胞增殖曲线,可发现 SP 细胞组增殖能力显著强于 NSP 组和 Total 组($P<0.01$),见图 5。

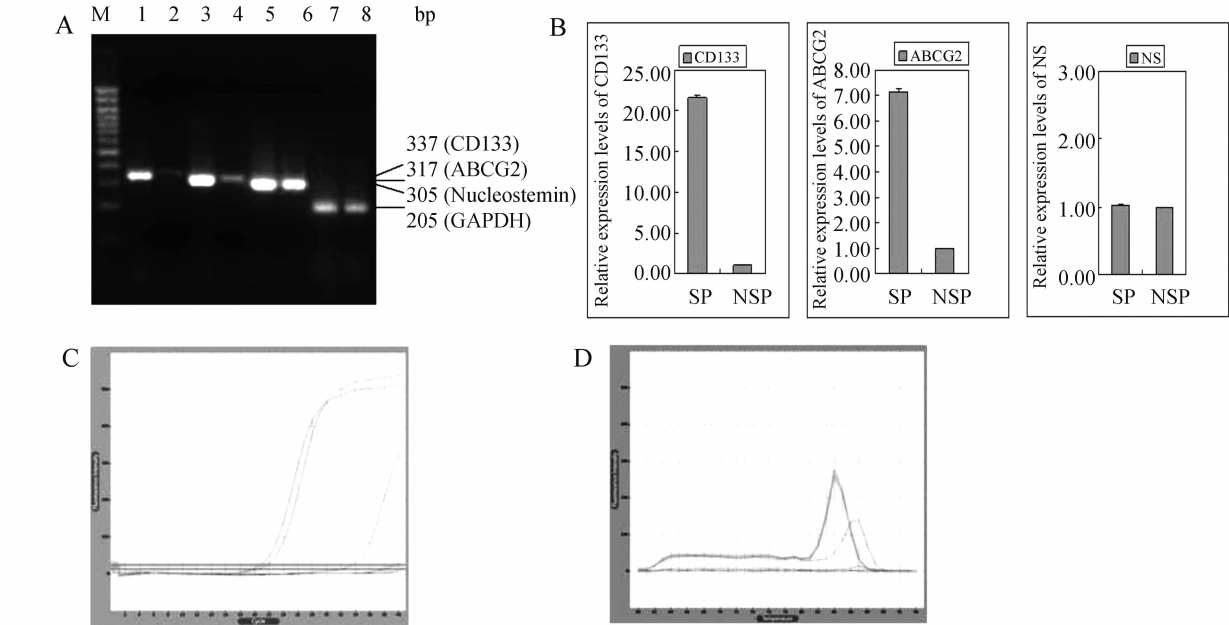


图 4 SP 细胞和 NSP 细胞中 CD133、ABCG2 及 nucleostemin mRNA 的表达

Figure 4 Expression of CD133, ABCG2, and nucleostemin mRNA in SP and NSP cells
A, semi-quantitative analysis of CD133, ABCG2, and nucleostemin mRNA in SP and NSP cells. Lane M, marker; lanes 1,3,5, and 7, SP cells; lanes 2,4,6, and 8, NSP cells. B, relative quantitative analysis of CD133, ABCG2, and nucleostemin in SP and NSP cells. C, real-time PCR amplification curves of CD133 and GAPDH in SP and NSP cells. D, real-time PCR dissociation curves of CD133 and GAPDH in SP and NSP cells.

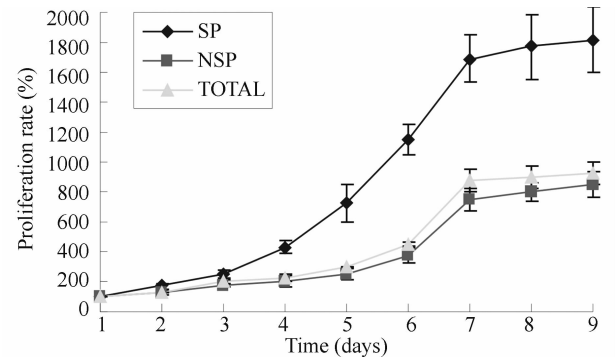


图 5 SP、NSP 及 Total 细胞体外增殖曲线
Figure 5 Proliferation curves of SP, NSP, and Total cells

2.7 SP 细胞和 NSP 细胞在体外分化

分选出的 SP 及 NSP 细胞体外培养 10 d 后,重新 Hoechst33342 染色后上流式细胞仪分析。结果

2.6 SP 细胞、NSP 细胞及未经分选细胞的体外耐药存活能力

MTT 结果表明,SP、NSP 及 Total 细胞的增殖抑制率分别为(32.0 ± 0.81)%、(67.3 ± 1.58)% 和 (66.5 ± 1.53)%,SP 细胞的增殖抑制率显著低于 NSP 及 Total 细胞($P<0.01$),表明 SP 细胞耐药存活能力明显强于 NSP 细胞及未经分选的细胞。

显示,SP 细胞组的 SP 细胞比例为(20.6 ± 0.1)%,而 NSP 细胞组的 SP 细胞比例仅为(0.3 ± 0.0)%。结果表明:SP 细胞可分化为 NSP 细胞,而 NSP 细胞不可分化为 SP 细胞(图 6)。

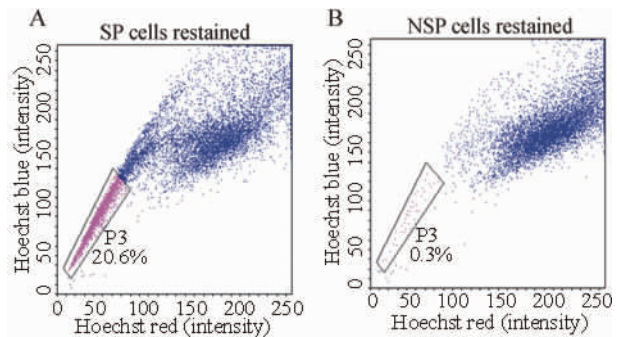


图 6 SP 细胞及 NSP 细胞体外分化能力测定
Figure 6 Differentiation of SP (A) and NSP (B) cells

2.8 SP 细胞在裸鼠体内具有较强的致瘤性

实验过程中各组裸鼠未发生意外死亡。各组裸鼠致瘤时间、成瘤率、瘤体积及瘤重见表 2。实验结果显示,SP 细胞及 NSP 细胞的致瘤能力的差异有统计学意义($P < 0.01$),仅 1×10^3 个 SP 细胞即可致

瘤,而至少 1×10^5 个 NSP 细胞才能致瘤,并且 1×10^5 个 SP 细胞致瘤的体积和重量均明显大于 1×10^5 个 NSP 细胞,致瘤时间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 SP 细胞及 NSP 细胞体内致瘤能力比较
Table 2 Comparison of tumorigenesis in vivo between SP cells and NSP cells

Cell numbers injected	Tumor formation time (days)		Tumorigenesis ratio		Tumor volume (mm ³)		Tumor weight (g)	
	SP	NSP	SP	NSP	SP	NSP	SP	NSP
1×10^3	37.5 ± 4.2	—	2/6 ^a	0/6	27.0 ± 3.6	—	0.14 ± 0.03	—
1×10^4	30.1 ± 5.5	—	5/6 ^a	0/6	190.0 ± 54.7	—	0.95 ± 0.29	—
1×10^5	28.7 ± 4.0 ^b	32.9 ± 5.7	6/6 ^a	4/6	962.0 ± 267.2 ^a	154.0 ± 41.5	4.87 ± 1.31 ^a	0.75 ± 0.20

^a $P < 0.01$, ^b $P > 0.05$, vs. NSP cells.

3 讨 论

目前,分离肿瘤干细胞最权威的方法是首先确定肿瘤干细胞的特异性标志物,然后根据这些特异性标志物分离出肿瘤干细胞,但是由于大部分肿瘤至今尚未发现特异性标志物,无法通过这种方法分离出肿瘤干细胞。而荧光激活细胞分选技术(FACS)分选 SP 细胞作为一种不通过寻找特异性标志物来研究肿瘤干细胞的方法,是一种新的研究途径^[6]。

研究人员已经在多种肿瘤细胞株或组织,如中枢神经系统肿瘤^[8]、卵巢癌^[9]以及最近的黑色素瘤^[10]、鼻咽癌^[6]、胰腺癌^[11]等组织中分离出 SP 细胞,并进一步证明了其干细胞特性。本研究利用流式细胞仪等技术,分选出人小细胞肺癌细胞株 H446 中的 SP 细胞,并对该细胞亚群的生物学特征进行体外检测,为进一步研究肺癌干细胞提供实验依据。

本研究用两种方法检测了 SP 细胞。首先是 Hoechst33342 染色后用 CFSE 复染,荧光显微镜下观察 SP 细胞的特征。根据 Goodell 等^[1]的报道,Hoechst33342 染色胞核可产生不同强度蓝色荧光,而阴性或低染的细胞即为 SP 细胞。在图 1 中可见到胞核呈现不同强度蓝色荧光,少数细胞核阴性或低染。其次是用荧光激活细胞分选技术检测并分选 SP 细胞。其原理是 Hoechst33342 在紫外光激发下可发出蓝色和红色两种荧光^[1],在分析 SP 细胞时,蓝色荧光和红色荧光可同时被检测,SP 细胞可在两变量散点图中同时被观察到。比较这两种方法,我们发现用荧光显微镜观察 SP 细胞的方法虽然直观,但因只观察了一种荧光,并受曝光时间等因素影

响,检测 SP 细胞特异性不如荧光激活细胞分选技术。

目前普遍认为肿瘤干细胞与正常干细胞有着不可分割的关系^[12]。本研究通过绘制生长曲线、耐药性差异检测、分化能力测定及裸鼠成瘤等实验,验证分选出的 SP 细胞是否具备干细胞基本特性。结果表明 SP 细胞不仅在体外具有高度增殖活性、较强的耐药性及多向分化能力,而且具备高度体内成瘤能力。本研究进一步检测了干细胞基因 CD133、ABCG2、nucleostemin 在 SP 细胞及 NSP 细胞中的表达。现在有研究表明 CD133 为髓母细胞瘤、结肠癌等多种实体瘤的肿瘤干细胞标志物^[13,14]。三磷酸腺苷(ATP)结合转运蛋白 G 超家族成员 2(ATP-binding cassette superfamily G member2,简称 ABCG2),又称乳腺癌耐药蛋白(BCRP)或米托蒽醌耐药相关蛋白(MXR),是 1998 年从人肿瘤细胞系 MCF-7 中分离出来的一个与多药耐药相关的膜转运蛋白^[15]。ABCG2 在多种来源的干细胞膜表面都有表达,而在大多数成熟细胞中不表达,现在普遍认为它是干细胞的决定因子。有研究发现,乳腺癌细胞系和胶质瘤细胞系的 SP 细胞高表达 ABCG2,并且加入米托蒽醌培养后,SP 比例可升高,可能是这种药物选择作用使患者体内肿瘤细胞的 SP 比例增加,从而导致耐药。因此 ABCG2 可能可以用作肿瘤治疗的靶点^[16]。本实验显示 CD133 及 ABCG2 在 SP 细胞及 NSP 细胞中表达有显著性差异,提示 CD133 及 ABCG2 可能是人小细胞肺癌干细胞较特异的分子标志物。

肿瘤干细胞还有一个重要特征就是可以在无血清培养条件下经表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)等多种细胞生长因子诱导形成悬浮生

长的细胞团块,称为肿瘤细胞球(spheres)^[17]。本实验将分选后的 SP 细胞接种于无血清培养基中,发现 SP 细胞形成肿瘤细胞球的能力强于 NSP 细胞,这个现象也说明了分选后的 SP 细胞富集了肿瘤干细胞。

应用荧光激活细胞分选技术分选 SP 细胞,是肿瘤干细胞研究中的一种有效方法。然而这种方法也有其自身局限性,主要表现为 SP 细胞不能完全体现肿瘤干细胞的特性。虽然大量研究证据表明 SP 细胞与干细胞的分子表型和特性具有一致性,但也有实验存有异议。如 Triel 等^[18]研究表明,并非从所有组织分离出来的 SP 细胞都具有干细胞的特性。因此,FACS 分选出的 SP 细胞需要进一步提纯。本研究提示 FACS 分选联合 CD133 及 ABCG2 的筛选,将可能进一步纯化小细胞肺癌干细胞。

本研究检测并分选出小细胞肺癌细胞株 H446 中具有干细胞特性的 SP 细胞,并研究了其部分生物学特性,为小细胞肺癌的起源及治疗的研究提供了重要的实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functiona properfies of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo [J]. J Exp Med, 1996,183 (4):1797-1806.

[2] 王宁,陈凇. SP 细胞分选与肿瘤干细胞关系的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2008,25,16(2):199-202.

[3] Carbone DP. The biology of lung cancer [J]. Semin Oncol, 1997,24(4):388-401.

[4] 周际昌. 实用肿瘤内科学 [M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2003:537-555.

[5] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancers tem cells [J]. Nature, 2001,414 (6859):105-111.

[6] Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line [J]. Cancer Res, 2007,67(8):3716-3724.

[7] Lival KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the

2[Delta Delta C (T)] method [J]. Methods, 2001,25 (4):402-408.

[8] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [J]. Nature, 2004, 432(7015):396-401.

[9] Bapai SA, Mali AM, Koppikar CB, et al. Stem and progenitor-like cells contribute to the a ggressive behave of human epithelial ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2005,65(8):3025-3029.

[10] Grichnik JM, Burch JA, Schulteis RD, et al. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell [J]. J Invest Dermatol, 2006,126(1):142-153.

[11] Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007,6(1):92-97.

[12] 陈骅,黄强,兰青,等. 肿瘤起源细胞学说与争论 [J]. 癌症, 2006,25(6):779-784.

[13] 李茗初,邓永文,伍军,等. 髓母细胞瘤中脑肿瘤干细胞的分离培养及鉴定 [J]. 癌症, 2006,25(2):241-246.

[14] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. Nature, 2007,445 (7123):111-115.

[15] Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al. A mutidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998,95 (26):15665-15670.

[16] Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, et al. Ovarian cancer aide population defines cells with stem cell-like character-iatics end Mullerian inhibiting substance responsiveness [J]. Pros Natl Acad Sci USA, 2006,103(30):11154-11159.

[17] Singh SK, Clarke ID, Terassaki M, et al. Identilication of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. Cancer Res,2003,63(18):5821-5828.

[18] Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, et al. Side PoPulation cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics [J]. Exp Cell Res, 2004,295(5):79-90.

[编辑:张 菊]