

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.12.002

人肺癌细胞系 NCI-H1650 中肿瘤干细胞的分离及鉴定^{*}

丁 曼,张岸梅,朱 波[△]

(第三军医大学新桥医院肿瘤科/全军肿瘤诊治研究所,重庆 400037)

[摘要] 目的 在人肺癌细胞系 NCI-H1650 中分离出肺癌干细胞及鉴定。方法 将 NCI-H1650 细胞在含人胰岛素、重组人表皮生长因子(EGF)、重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、牛血清清蛋白(BSA)的无血清培养基中连续培养,用紫杉醇刺激诱导干细胞,通过流式细胞术、免疫荧光的方法分析肺癌干细胞标志物 CD133 和 CD326 的表达;采用 RT-PCR 和 Western blot 的方法检测干细胞相关标记物 Oct4、Nanog 和 Sox-2 的表达。结果 经无血清连续培养结合紫杉醇诱导的 NCI-H1650 细胞呈球形悬浮生长,相比于有血清培养的 NCI-H1650 细胞,其干细胞标志物 CD133 和 CD326 高表达,干细胞相关标志物 Oct4、Nanog 和 Sox-2 表达水平提高($P<0.05$)。结论 采用体外无血清连续培养结合紫杉醇刺激诱导 NCI-H1650 细胞能有效分离出其中干细胞。

[关键词] 肺肿瘤;肿瘤干细胞;培养基,无血清

[中图分类号] R734;R329.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)12-1588-04

Isolation and identification of lung cancer stem cells from NCI-H1650 cell line^{*}

Ding Man, Zhang Anmei, Zhu Bo[△]

(Institute of Cancer, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To isolate and identify the lung cancer stem like cells from the cell line NCI-H1650. **Methods** The NCI-H1650 cells were continuously cultured in serum-free medium with human insulin, recombinant epidermal growth factor (EGF), recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) and bovine serum albumin(BSA), and paclitaxel was adopted to induce the stem cells. Flow cytometry and immunofluorescent staining were used to analyze the expression levels of lung cancer stem cell marker CD133 and CD326. The expressions of stem cell related marker Oct4, Nanog and Sox-2 were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** The NCI-H1650 cells continuously cultured by serum-free medium and induced by combining paclitaxel induction showed the spherical suspension growth. Compared with NCI-H1650 cells cultured by serum, CD133 and CD326 had significantly high expression and the expression levels of Oct4, Nanog and Sox-2 were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Adopting the serum-free culture in vitro combined with paclitaxel for inducing NCI-H1650 cells can effectively isolate the stem cells among them.

[Key words] lung neoplasms; neoplastic stem cells; culture media, serum-free

作为全球发病率最高的恶性肿瘤,肺癌恶性程度高且预后差,是恶性肿瘤中致死的首要病因,对人类健康产生了严重的危害^[1]。随着现代医学发展,肺癌的早期诊断和综合治疗均有一定进步,其临床疗效也有相对的改善,但多数患者在中晚期确诊而不能进行手术治疗,且肺癌对放、化疗有所抵抗,因此患者总体 5 年生存率低于 15%^[2]。肿瘤干细胞理论提出肿瘤源于肿瘤干细胞,这群细胞具有自我更新、多向分化和无限增殖的潜能,是肿瘤对放、化疗抵抗,以及肿瘤复发和转移的根源^[3]。有研究表明,肿瘤干细胞可能作为一个新的靶点在临床上来进行治疗。但是,肿瘤组织中的干细胞水平极少,因此分离并鉴定肿瘤干细胞能为后续研究工作提供一个良好的基础。肺癌中同样存在这样一群干细胞,即肺癌干细胞。Ho 等^[4]在 2007 年采用侧群细胞分选法有效分选出非小细胞肺癌干细胞,证实了肺癌干细胞的存在。目前已有多种肺癌细胞株已分选出具有干细胞特性的肿瘤细胞,如 H466、A549、H460 等^[5-7]。肺癌的发生、发展、侵袭转移、复发、耐药等均与肺癌干细胞相关,因此,能有效富集肺癌干细胞对肺癌的进一步研究尤为重要。肿瘤干细胞的分离及鉴定中,通常选用细胞表面标

志物的方法。CD133 是公认的经典肿瘤干细胞标志物,已在肺癌^[8]、前列腺癌^[9]、乳腺癌^[10]、脑胶质瘤^[11]、结肠癌^[12]等多种恶性肿瘤中发现。本研究采用无血清连续培养结合紫杉醇诱导干细胞的方法分离出干细胞,并用一系列肿瘤干细胞表面标志物或相关标志物鉴定,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 细胞株:非小细胞肺癌细胞株 NCI-H1650 购自美国典型培养物收藏中心(ATCC);主要试剂:RPMI1640 培养基购自 HyClone 公司,胎牛血清(FBS)购自 TBD 公司,0.25%胰酶/DMEM/F12 培养基购自 HyClone 公司,重组人胰岛素购自 Sigma 公司,重组人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、重组人碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自 PeproTech 公司,牛血清清蛋白(BSA)购自 Sigma 公司;紫杉醇注射液购自山西普德药业有限公司,CD133 及 CD326 流式细胞仪抗体购自 Miltenyi 公司;CD133 及 CD326 免疫荧光抗体购自 Biorbyt 公司,异硫氰酸荧光素(FITC)及 3H-吖啶噻嗪类染料 Cy3 标记的羊抗兔二抗购自碧云天公司;逆转录试剂盒及 RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司;

^{*} 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81302025)。 作者简介:丁曼(1990—),医师,在读硕士研究生,主要从事干细胞相关研究。 [△] 通讯作者, Tel:13594611534; E-mail: b. davis. zhu@gmail. com。

Oct4 抗体、Nanog 抗体及 Sox-2 抗体均购自 Abcam 公司,β-actin 抗体购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 NCI-H1650 细胞培养:细胞在 37℃,5%CO₂ 培养箱内饱和湿度条件下培养,培养液为 RPMI1640,加入 10%标准 FBS、青霉素和链霉素。取对数生长期的细胞进行实验。细胞球培养:取 NCI-H1650 细胞,去掉原培养液,胰酶(0.25%)消化后用原培养液终止消化,移入离心管离心(800 r/min,5 min)后弃去上清液。加入含有重组人胰岛素、EGF、bFGF、BSA 及 DMEM/F12 培养基的无血清培养液,制成单细胞悬液种植在 6 孔板中(密度为 20 000 个/孔),每个孔 4 mL 培养液。2~3 d 后取上清液,离心后加入无血清培养液移入新培养瓶中,细胞成球生长,6 孔板中继续加入无血清培养液,2~3 d 后再次取上清离心后移入培养瓶,并换液及传代。成球生长细胞传代 2 次后,按照 1×10⁶ 个/mL 细胞加入 0.2 ng/mL 的紫杉醇培养,24 h 后离心换液。紫杉醇刺激后细胞大量死亡,换液后每天观察细胞状态,2~3 d 换液 1 次,直至细胞生长状态恢复如加紫杉醇前。实验取紫杉醇刺激后培养瓶中第 5 代细胞球。此过程细胞球均在 37℃,5%CO₂ 培养箱内饱和湿度条件下培养。

1.2.2 流式细胞检测 将不同代数的细胞球离心(1 000 r/min,5 min)后,调整其浓度至 1×10⁷ /mL,在 100 μL 细胞液中加入荧光素标记的 CD133 抗体(鼠抗人)和 CD326 抗体(鼠抗人)各 1 μg,于室温下放置 30 min 后,用 PBS 离心并洗涤 2 次,再加入 200 μL PBS 重悬细胞,即可上机检测 CD133 及 CD326 的阳性率。

1.2.3 免疫荧光检测 取第 5 代细胞球,甩片离心(800 r/min,5 min),将细胞球甩片到玻片上,用冰冻的 4%多聚甲醛固定 20 min,用 PBS 洗 3 次后使用 5%BSA 封闭 20 min,将玻片甩干。加入兔抗人 CD133 一抗(1:200)或者兔抗人 CD326 一抗(1:200),置入 4℃冰箱过夜孵育。次日,于冰箱中取出玻片,室温下放置 10 min,用 PBS 洗 3 次后加入 FITC 标记或 Cy3 标记的羊抗兔二抗(1:500),在 37℃避光孵育 30 min。之后用 PBS 洗 3 次,避光下用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色 3 min,PBS 洗 3 次后用抗荧光淬灭封片剂封片,最后在激光共聚焦显微镜下观察并照相。

1.2.4 RT-PCR 检测 采取 NCI-H1650 细胞及细胞球使用 Trizol 法提取总 RNA 后,按照 Takara 逆转录试剂盒及 RT-PCR 试剂盒说明操作。采用 2^{-ΔΔCT} 法进行分析。引物由生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列,见表 1。

1.2.5 Western blot 检测 取 NCI-H1650 细胞及细胞球用蛋

白裂解液提取蛋白,制备成蛋白样品并用 BCA 法检测蛋白水平。进行 12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),经电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。PVDF 膜用 5%BSA 在室温下封闭 1 h,再加入兔抗人 Oct4 抗体、Nanog 抗体及 Sox-2 抗体(1:200)、鼠抗人 β-actin 抗体(1:1 000),放置于冰箱 4℃过夜。次日用 TBST 洗 3 次后加入对应二抗(稀释比例为 1:1 000),在 37℃水浴锅中孵育 30 min,再次用 TBST 缓冲液(Tris-HCl 缓冲盐溶液+吐温溶液)洗 3 次后用显影剂在凝胶成像仪中曝光并记录成像。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS13.0 统计软件分析。计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

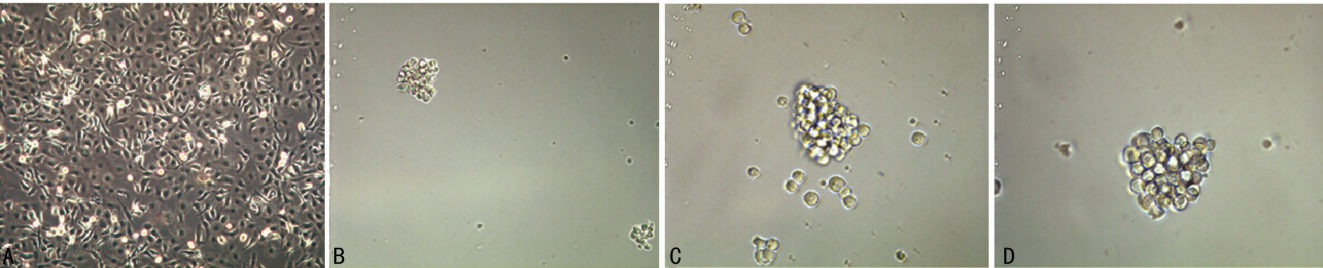
表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
β-actin	上游 TGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTG	201
	下游 GTGCCACCAGACAGCACTGTGTTG	
Oct4	上游 AGCCCTCATTTCCACCAGGCC	456
	下游 TGGGACTCCTCCGGGTTTTG	
Sox2	上游 ATGTCCCAGCACTACCAGAGC	266
	下游 GTGTGGATGGGATTGGTGTCTC	
Nanog	上游 GGAGGGTGGAGTATGGTTGG	201
	下游 TGAGGCAGGAGAATGGCGTG	

2 结 果

2.1 NCI-H1650 细胞及细胞球培养结果 NCI-H1650 细胞在有血清培养基培养下,在培养瓶底部呈梭形贴壁生长(图 1A)。而在连续的无血清培养下,有少部分细胞呈圆形悬浮生长,但细胞成球较小,细胞大小基本一致,折光性较好(图 1B)。经紫杉醇刺激后多次传代,悬浮生长的细胞逐渐增多,其细胞球体积也逐渐变大,第 5 次传代后仍保持良好的克隆形成能力(图 1C、D)。表明紫杉醇刺激后连续无血清培养能成功诱导形成 NCI-H1650 细胞形成悬浮生长的细胞球。

2.2 免疫荧光结果 在激光共聚焦显微镜下可见,细胞质和细胞膜与 FITC 标记的 CD133 的二抗结合呈绿色荧光,即 CD133 阳性;细胞质和细胞膜与 Cy3 标记的 CD326 的二抗结合呈红色荧光,即 CD326 阳性;细胞核用 DAPI 染色呈蓝色。表明紫杉醇刺激后连续无血清培养能成功诱导形成 NCI-H1650 干细胞,见图 2。



A:NCI-H1650 有血清贴壁生长细胞(×100);B:NCI-H1650 细胞球生长第 3 天(×200);C:紫杉醇刺激后 NCI-H1650 细胞球第 3 代(×200)
D:紫杉醇刺激后 NCI-H1650 细胞球第 5 代(×200)。

图 1 显微镜下观察 NCI-H1650 细胞及细胞球生长情况

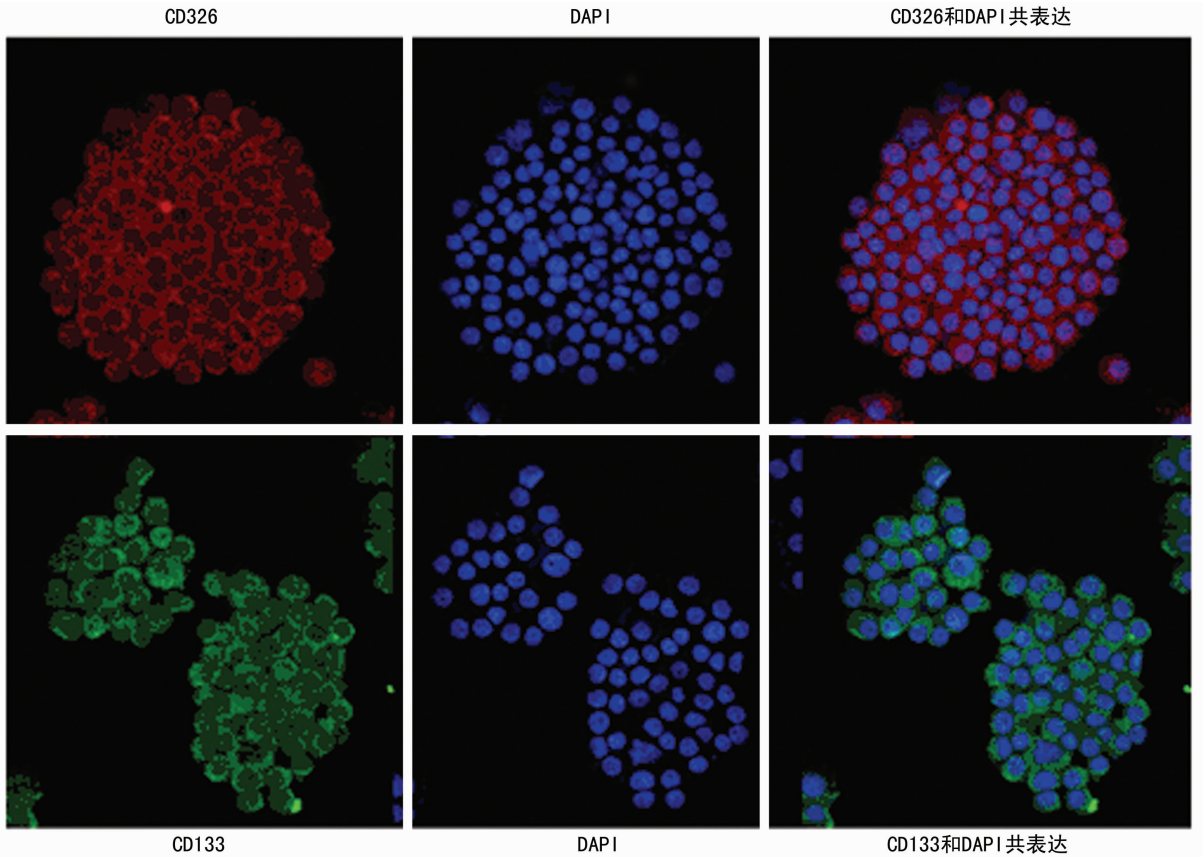
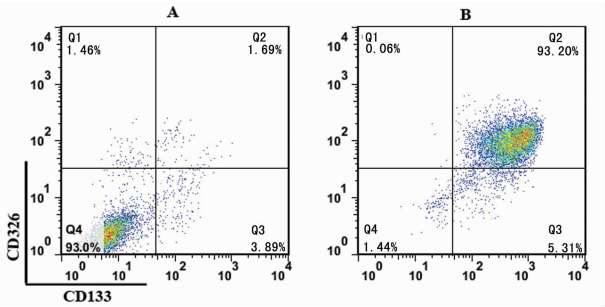


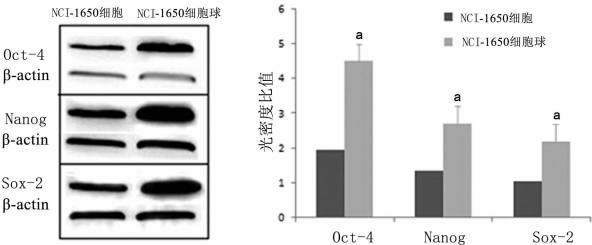
图 2 免疫荧光检测 NCI-H1650 细胞球干细胞标志 (×1 200)

2.3 流式细胞结果 在 NCI-H1650 细胞中,CD133⁺ 和 CD326⁺ 双阳性细胞率仅为 1.69%(图 3A),而第 5 次传代后的细胞球中 CD133⁺ 和 CD326⁺ 双阳性细胞率为 93.20%(图 3B),高于有血清培养的 NCI-H1650 细胞。表明采用此种方法能成功诱导 NCI-H1650 干细胞。



A:NCI-H1650 细胞;B:NCI-H1650 细胞球。

图 3 流式细胞术检测干细胞标志



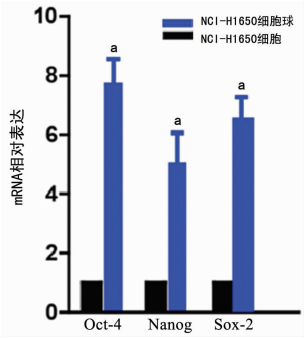
^a: $P<0.05$,与 NCI-H1650 细胞球比较。

图 4 Oct-4、Nanog、Sox-2 蛋白表达水平

2.4 Western blot 结果 与 NCI-H1650 细胞比较,NCI-H1650 细胞球中 Oct4、Nanog 和 Sox-2 的蛋白高表达,二者光

密度比值比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.5 RT-PCR 检测结果 NCI-H1650 细胞的 Oct4、Nanog 和 Sox-2 的基因表达水平均低于其细胞球表达水平,见图 5。



^a: $P<0.05$,与 NCI-H1650 细胞球比较。

图 4 Oct-4、Nanog、Sox-2 的 mRNA 表达水平

3 讨 论

随着从不同肿瘤中分离得到肿瘤干细胞及鉴定的证据渐多,肿瘤干细胞的理论也得到了更多人的认同。肿瘤组织由明显异质性的细胞群体构成,其中的极少细胞具有干细胞的生物学特性,即自我更新、增殖克隆、分化潜能、侵袭迁移、高致瘤性、耐药性以及对抗放疗抵抗性^[13]。

目前,肿瘤干细胞主要根据其表面标志物进行分选和鉴定。CD133 最初是作为造血干细胞及造血祖细胞的分子标志物^[14],但越来越多的研究发现,CD133⁺ 肿瘤细胞也具有自我更新等干细胞特性,因此也成为多种肿瘤干细胞的分子标志物,包括肝癌、胰腺癌、卵巢癌等。CD326 又称上皮细胞黏附分子(EpCAM),其在肝癌、肺癌等肿瘤干细胞中呈高表达,也是目前公认的肺癌干细胞标志物之一。因此,本研究采用这两个

分子标志物鉴定诱导的 NCI-H1650 干细胞。现已有大量报道从肺癌组织中分离干细胞,然而该方法组织来源困难,分离技术难度高,且分选出的干细胞活性不足,限制了对肺癌干细胞生物学特性的进一步研究。此外,还有大量报道用另一种肺癌细胞株 A549 进行体外诱导肺癌干细胞。然而 NCI-H1650 来源于晚期肺腺癌患者,与 A549 相比具有更强的侵袭转移能力,而且 NCI-H1650 是 EGF 受体突变细胞株,诱导其干细胞具有重要的研究价值及临床意义。

目前得到肺癌干细胞主要通过侧群细胞分选法、磁珠分选法和无血清连续培养法,但以上方法分出细胞少、价格昂贵、分选出后不易存活。本实验室曾用无血清连续培养的方法分离出卵巢癌细胞株 A2780 中的干细胞^[15],但应用此种方法诱导 NCI-H1650 干细胞得到干细胞量少,加入紫杉醇后能明显提高干细胞的富集。本研究采用连续无血清条件培养基结合药物刺激的方法培养悬浮细胞球,从而富集肺癌干细胞。本研究发现,NCI-H1650 中存在极少一部分具有自我更新能力的细胞,经过无血清连续培养后可悬浮生长成为肿瘤干细胞球,其具有形成连续克隆的能力。流式检测发现这种细胞球高表达肺癌干细胞标志物 CD133 和 CD326,同时免疫荧光染色也发现细胞球共表达 CD133 和 CD326。为了进一步验证细胞球的干细胞特性,本研究采用 RT-PCR 及 Western blot 检测了干性标志物 Oct4、Sox2 及 Nanog 的表达,结果发现细胞球中这 3 种分子的表达高于有血清贴壁培养的 NCI-H1650 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明使用药物联合无血清培养的方法成功诱导了 NCI-H1650 肺癌干细胞。肿瘤干细胞已成为肿瘤方面的研究热点,其分离和鉴定对基础及临床研究均具有重要意义。本研究采用无血清联合药物诱导培养方法,成功诱导出肺癌干细胞,为后续肿瘤干细胞的生物学特性研究奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61 (4): 212-236.
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [3] Shiozawa Y, Nie B, Pienta KJ, et al. Cancer stem cells and their role in metastasis[J]. Pharmacol Ther, 2013, 138 (2): 285-293.
- [4] expression in catecholaminergic neurons and in glial cell [J]. Neuroscience, 2004, 128(1): 27-38.
- [12] Bedaub J, Hirt L, Granziera C, et al. astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia[J]. Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(5): 477-482.
- [13] 李燕华,李瑶宣,李吕力,等. 脑缺血大鼠 AQP-9mRNA 表达与钙离子浓度的改变及其关系[J]. 临床神经病学杂志, 2008, 21(2): 129-133.
- [14] 王振华,刘云会,马腾,等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注早期血脑屏障通透性变化的研究[J]. 中国医科大学学报,

- [4] Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67 (10): 4827-4833.
- [5] Sung JM, Cho HJ, Yi H, et al. Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371(1): 163-167.
- [6] Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population [J]. Cell Death Differ, 2008, 15(3): 504-514.
- [7] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer[J]. Cell, 2005, 121(6): 823-835.
- [8] Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2009, 36(3): 446-453.
- [9] Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(9): 1213-1218.
- [10] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [11] Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 7011-7021.
- [12] 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.
- [13] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414 (6859): 105-111.
- [14] Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Blood, 1997, 90(12): 5002-5012.
- [15] 谢伟,龙海霞,张恒,等. 人卵巢癌细胞系 A2780 中肿瘤干细胞的分离及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33 (4): 356-359.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2015-01-07)

(上接第 1587 页)

- 2012, 41(12): 1073-1076.
- [15] 王兴盛,盛莉,姚小梅,等. 大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障超微结构的改变[J]. 天津医药, 2006, 34(3): 188-189.
- [16] Gao DK, Zhang XK, Jiang XF, et al. Resveratrol reduces the elevated level of MMP-9 induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice[J]. Life Sci, 2006, 78 (22): 2564-2570.
- [17] 王社军,杜长生,唐红,等. 大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障通透性的改变[J]. 武警医学, 2005, 16(10): 745-747.

(收稿日期:2014-11-08 修回日期:2015-01-26)