

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.32.010

人胰腺癌 PANC-1 细胞株中不同亚群放射敏感性的比较分析*

王 磊,胡晨曦,夏铀铀,宋大安,黎世秋,蒋晓东[△]
(江苏省连云港市第一人民医院肿瘤放疗科 222002)

[摘要] 目的 研究人胰腺癌 PANC-1 细胞株中干性细胞放射敏感性,并探讨其放射抗拒的可能机制。方法 应用流式细胞仪分选 CD44⁺CD24⁺、CD44⁻CD24⁺、CD44⁺CD24⁻ 和 CD44⁻CD24⁻ 细胞亚群;照射后,计算放射增敏比;利用流式细胞术检测凋亡及周期分布,并结合 DCFH-DA 探针检查各亚群活性氧簇(ROS)水平。结果 PANC-1 细胞中 CD44⁺ 细胞比例约为 92.0%,CD24⁺ 细胞比例约为 4.7%。照射前 4 组凋亡差异无统计学意义($P>0.05$);照射后 CD44⁺CD24⁺ 的凋亡比例最低($P<0.01$)。照射前后 CD44⁺CD24⁺ 的 G₀/G₁ 期比例最高,显著高于其他 3 组($P<0.01$)。照射后 CD44⁺CD24⁻、CD44⁻CD24⁺ 和 CD44⁻CD24⁻ 放射增敏比分别为 1.61、1.81、1.94;照射后 CD44⁺CD24⁺ ROS 水平最低,平均荧光强度显著低于其他 3 组($P<0.01$)。结论 人胰腺癌 PANC-1 细胞株中干性细胞大多处于静止期,且低 ROS 水平,因此考虑胰腺癌干性细胞的放射抗拒与此有关。

[关键词] 胰腺肿瘤;PANC-1;干性细胞;放射敏感性

[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)32-4493-03

Comparison analysis of radiosensitive in different subsets of pancreatic adenocarcinoma PANC-1 cell line*

Wang Lei, Hu Chenxi, Xia Youyou, Song Daan, Li Shiqiu, Jiang Xiaodong[△]
(Department of Radiation Oncology, Lianyungang First People's Hospital, Lianyungang, Jiangsu 222002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the radiosensitivity of stem cells in pancreatic adenocarcinoma PANC-1 cell line and the possible mechanism of its radiation resistance. **Methods** Using flow cytometry, the cells were isolated and sorted into CD44⁺CD24⁺, CD44⁻CD24⁺, CD44⁺CD24⁻, and CD44⁻CD24⁻. Multi-target click model was used to fit cell survival curves and determine the sensitizer enhancement ratio. The apoptosis and cycle distribution of the four cell subsets were determined using flow cytometry, and the level of ROS was determined by DCFH-DA probe. **Results** The ratio of CD44⁺ and CD24⁺ in the sorted PANC-1 cell line was 92.0% and 4.7% respectively. Before radiation, there was no statistically significant difference between four groups ($P>0.05$); After treated with 6MV-X ray, The ratio of apoptosis was the lowest in CD44⁺CD24⁺ ($P<0.01$); The percentage G₀/G₁ cell was the highest in CD44⁺CD24⁺ ($P<0.01$), the sensitizer enhancement ratio of CD44⁺CD24⁻, CD44⁻CD24⁺ and CD44⁻CD24⁻ were 1.61, 1.81, 1.94, respectively. The level of ROS in CD44⁺CD24⁺ was lower ($P<0.01$). **Conclusion** Tumor stem cells of pancreatic adenocarcinoma have properties of a lower level of ROS and relative stationary that maybe the reasons of radio resistance.

[Key words] pancreatic neoplasms; PANC-1; stem cell; radiosensitive

胰腺癌是恶性程度高、进展快、预后极差的消化道恶性肿瘤,80%患者临床确诊时已处于中晚期,70%~80%死于广泛转移^[1]。而放射治疗是中晚期胰腺癌姑息治疗的主要手段,并成为延长生存期的有效手段^[2]。临床资料证实,放疗对于提高胰腺癌的局部控制率及改善临床症状有着明显优势。但是胰腺癌细胞对放射治疗不敏感,极易局部复发及远处转移。而近年研究表明,肿瘤存在干性细胞,且是导致其复发、转移和治疗耐受的根源^[3]。本研究利用流式细胞仪对 PANC-1 细胞株进行检测并分选,得到该细胞株中的 CD44⁺CD24⁺ 干性细胞亚群和其他 3 个亚群;通过检测各亚群细胞经射线照射后的克隆形成、细胞凋亡、周期分布和活性氧簇(ROS)水平,分析各亚群细胞的放射敏感性,并初步探讨胰腺癌干性细胞放射抗拒的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人胰腺癌细胞 PANC-1 购自中国科学院上海生命科学研究院;DMEM 培养基、DMEM/F-12 培养基及 B27 添加剂均购自美国 GIBCO 公司;标准胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司;细胞凋亡及周期分布试剂盒购自南京凯基

生物公司;DCFH-DA 荧光探针购自美国的 Sigma 公司;流式细胞仪购自美国 Beckman-Coulter 公司;直线加速器购自德国 Siemens Primus 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与照射条件 培养条件:含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F-12 完全培养液(含 1%的青霉素和链霉素),5%的 CO₂、恒温 37℃培养箱。照射条件:使用德国 Siemens Primus 直线加速器,6 MV X 射线室温下源皮距照射,剂量率为 300 cGy/min,六孔板上方覆盖 1.5 cm 剂量补偿垫,固定源皮距,SSD=100 cm,机架角度为 0°,射野大小为 15 cm×15 cm,单次照射。

1.2.2 流式细胞仪检测及分选 细胞生长到对数生长期后,弃培养基,PBS 洗 1 次,加入无 EDTA 胰酶于 37℃培养箱内消化 2 min,待细胞变圆后加入含血清的培养基 5 mL 左右终止消化,吹打混匀后移入无菌离心管,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清。细胞沉淀用 PBS 1 次,加入 CD24⁻ PE、CD44⁻ FITC (1:100 稀释)于 4℃冰箱轻摇孵育 1 h,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗 1 次,500 μL PBS 悬浮,流式细胞分选

* 基金项目:江苏省连云港市科技局项目基金(SH1218)。 作者简介:王磊(1982—),主治医师,硕士,主要从事胰腺癌的基础及临床工作。
[△] 通讯作者,E-mail:jxdysy1970@163.com。

仪进行分选,分选后细胞培养用含 10% FBS 的 DMEM/F-12 完全培养液(含 1%的青霉素和链霉素及 B27),放于 37℃的 CO₂ 培养箱。

1.2.3 流式细胞术测细胞凋亡 分选后的各组细胞经射线照射(照射剂量为 2 Gy)24 h 后,用无 EDTA 胰酶消化成细胞悬液,收集照射处理前后的细胞,冷的 PBS 洗涤 2 次(1 500 r/min 离心 5 min),弃上清,用 100 μL Annexin V-FITC binding buffer 重悬细胞,再分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 PI,4℃避光反应 30 min,再加入 400 μL 的 binding buffer 混匀后利用流式细胞仪检测。

1.2.4 克隆形成实验 取对数生长期的各胰腺癌亚群细胞,按一定数量($10^2\sim10^5$ 个/孔)接种于 6 孔培养板中,每组设 3 个复孔。继续培养 24 h 后,室温下予 X 线照射。照射剂量分别为 0、2、4、6、8 Gy。继续培养 10~14 d,镜下计数大于或等于 50 个细胞的克隆数。终止培养,固定,快速 Giemsa 染色,按说明书操作,将培养板倒置并叠加一张带有网格的透明胶片,肉眼直接计数直径大于或等于 0.2 mm 的克隆数。克隆形成率(PE)=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$,细胞存活分数(SF)=实验组 PE/0 Gy 组 PE $\times 100\%$,计算各放射剂量点的 SF,根据单击多靶模型 $[S=1-(1-eD/D_0)N]$ 以 GraphPad prism5 绘图软件进行曲线拟合作图。实验重复 3 次。放射增敏比(SER)= $D_q(CD44^+CD24^+)/D_q(CD44^+CD24^-,CD44^-CD24^+,CD44^-CD24^-)$, $D_q=D_0\times\ln N$ 。

1.2.5 细胞周期分析 处理同 1.2.3,收集照射处理前后的细胞,70%冷乙醇固定,4℃24 h,将固定后的细胞用 PBS 洗涤 1 次,100 μL RNAase 37℃水浴 30 min,离心后加入 400 μL PI 4℃避光 30 min,流式细胞仪检测。实验重复 4 次。

1.2.6 细胞内 ROS 测定 处理同 1.2.3,收集照射处理前后的细胞,细胞用温 PBS 洗 1 次,加入 1 mL 无血清培养基配置的 DCFH-DA(10 μmol/L),恒温 37℃的 CO₂ 培养箱孵育 30 min,弃培养基,加入温 PBS 洗 3 次,无 EDTA 胰酶消化成细胞

悬液,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 悬浮,流式细胞仪检测波长(使用 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长),结果用平均荧光强度(MFI)表示。实验重复 4 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件行统计分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,均数比较采用单因素方差分析及 *t* 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PANC-1 细胞中各细胞占比 PANC-1 细胞中 CD44⁺细胞比例约为 92.0%,CD24⁺细胞比例约为 4.7%,CD44⁺CD24⁺(0.6 $\pm$ 0.2)%、CD44⁺CD24⁻(89.3 $\pm$ 2.6)%、CD44⁻CD24⁺(4.1 $\pm$ 1.3)%和 CD44⁻CD24⁻(6.0 $\pm$ 1.7)%。见图 1。

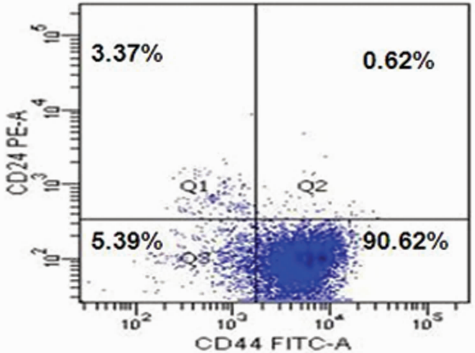
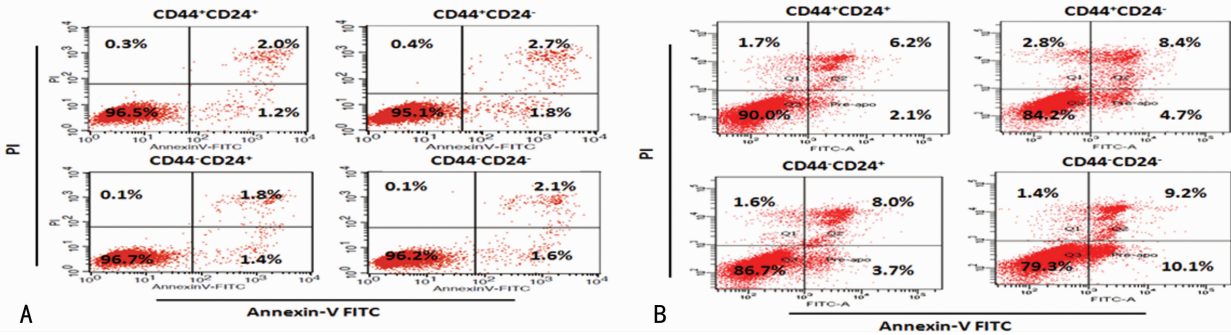


图 1 PANC-1 细胞内各亚群所占比例情况

2.2 各细胞亚群凋亡情况 放射线照射前,CD44⁺CD24⁺(3.3 $\pm$ 0.6)%、CD44⁺CD24⁻(4.0 $\pm$ 0.8)%、CD44⁻CD24⁺(3.4 $\pm$ 0.7)%和 CD44⁻CD24⁻(3.5 $\pm$ 0.8)%,各组之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。放射线照射 24 h 后,CD44⁺CD24⁺(6.8 $\pm$ 1.1)%、CD44⁺CD24⁻(10.4 $\pm$ 2.7)%、CD44⁻CD24⁺(13.0 $\pm$ 3.1)%和 CD44⁻CD24⁻(26.3 $\pm$ 2.4)%,CD44⁺CD24⁺凋亡比例最低($P<0.05$)。见图 2。



A:各细胞亚群经放射线照射前凋亡情况;B:各细胞亚群经放射线照射后凋亡情况。

图 2 放射线照射前后各亚群细胞凋亡情况

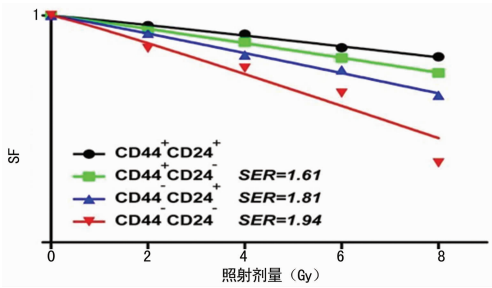


图 3 各亚群细胞克隆形成实验

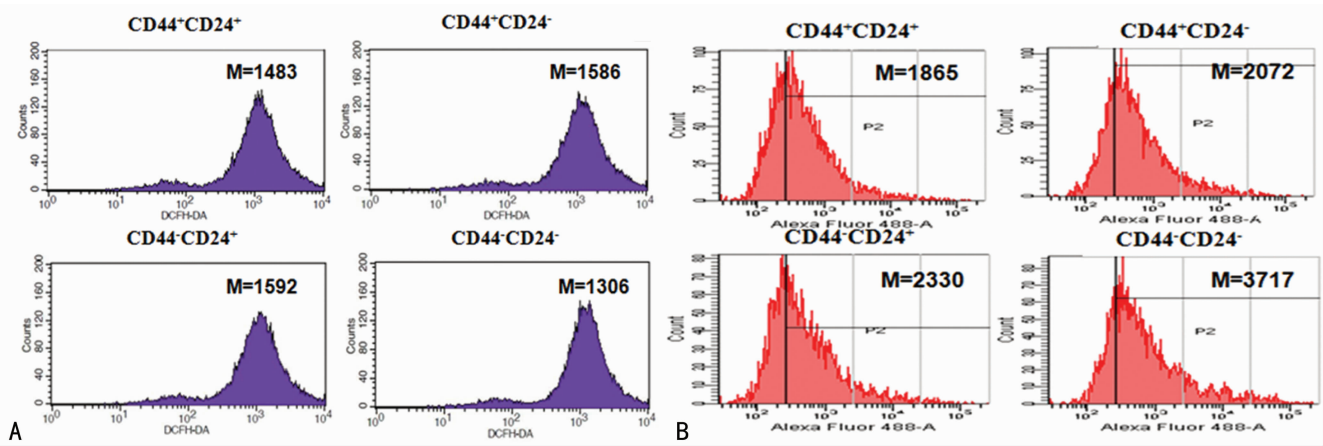
2.3 各亚群细胞克隆形成实验分析 经 2、4、6、8 Gy 剂量 X 射线照射后,CD44⁺CD24⁺、CD44⁺CD24⁻、CD44⁻CD24⁺、CD44⁻CD24⁻的 SF 发生不同程度改变,其中 CD44⁺CD24⁺ SF 下降幅度最低,CD44⁺CD24⁻与 CD44⁻CD24⁺次之,CD44⁻CD24⁻下降最明显,见图 3。

2.4 各亚群细胞周期分布 放射线照射前后,CD44⁺CD24⁺的 G₀/G₁ 期比例均最高,与其他 3 组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

2.5 各细胞内 ROS 水平 放射线照射前,CD44⁻CD24⁻ ROS 水平最低,MFI 低于其他 3 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 放射线照射前后各亚群细胞周期分布(±s)

细胞亚群	细胞周期分布					
	G ₀ /G ₁		S		G ₂ /M	
	照射前	照射 24 h 后	照射前	照射 24 h 后	照射前	照射 24 h 后
CD44 ⁺ CD24 ⁺	63.8±1.7	67.2±3.4	20.2±3.3	18.9±2.1	16.0±1.6	13.9±2.5
CD44 ⁺ CD24 ⁻	58.2±2.2	57.7±2.9	24.1±4.2	22.2±3.1	17.7±2.4	18.1±3.7
CD44 ⁻ CD24 ⁺	53.4±2.7	50.3±4.6	25.1±1.9	23.7±1.6	21.5±2.7	26.0±2.3
CD44 ⁻ CD24 ⁻	50.1±3.4	42.8±2.7	25.8±2.5	27.7±1.9	24.1±3.8	29.5±4.1



A:细胞经放射线处理前;B:细胞经放射线处理后。
图 4 放射线照射前后各亚群细胞内 ROS 水平

放射线照射 24 h 后,CD44⁺CD24⁺ ROS 水平最低,MFI 低于其他 3 组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 4。

3 讨 论

胰腺癌对放射治疗不敏感,甚至表现出抗拒,导致其预后差。随着研究的深入,人们发现胰腺癌干细胞是导致肿瘤复发、转移和耐药的根源^[4]。本课题研究证实,胰腺癌干性细胞的放射抗拒的原因可能与干细胞大多处于静止期,且干细胞内低 ROS 水平有关。

肿瘤干细胞学说认为^[5-11],肿瘤组织中存在极少量的瘤细胞,在肿瘤中充当干性细胞的角色,这些细胞具有无限增殖的潜能,在启动肿瘤形成和生长中起着决定性作用。Huang 等^[12]应用流式细胞仪在胰腺癌 PANC-1 细胞株中分选出 CD44⁺CD24⁺ 细胞,发现其在体外增殖率低于 CD44⁻CD24⁻ 细胞,但成瘤率高 20 倍,认为 PANC-1 中 CD44⁺CD24⁺ 细胞有肿瘤干性细胞的特性,因此本课题选取此细胞株为研究对象,开展了一系列的研究。经过流式检测和分选,获得了 4 个亚群的细胞。本实验所分选出的 CD44⁺ 细胞比例明显高于 Huang 等^[12]的实验结果,原因有可能为细胞传代次数多后,部分细胞存在变异可能。克隆形成实验结果显示 CD44⁺CD24⁺ SF 下降幅度最低,CD44⁺CD24⁻ 与 CD44⁻CD24⁺ 次之,CD44⁻CD24⁻ 下降最明显($SER=1.94$);在检测凋亡的实验中,放射线照射前,4 组细胞凋亡比较,差异无统计学意义($P>0.05$),而照射 24 h 后 CD44⁺CD24⁺ 细胞的凋亡比例最低,CD44⁻CD24⁻ 细胞凋亡最明显,结合以上两项结果表明更具胰腺癌干性细胞特性的 CD44⁺CD24⁺ 细胞对放射抗拒。周期结果显示,放射线照射前后,CD44⁺CD24⁺ 的 G₀/G₁ 期比例最高,说明更具有肿瘤干性细胞特性的 CD44⁺CD24⁺ 是一群相当静止的细胞,有慢周期特点。肿瘤干性细胞自身处于静止期,导致其放射抗拒。Lee 等^[13]通过 CD44⁺CD24⁺ESA⁺ 肿瘤干性细胞移植瘤模型也证实了胰腺癌干性细胞对放射化学治

疗抵抗。他们用放射治疗联合吉西他滨化疗干预上述模型时发现移植瘤的生长不仅不被抑制反受到刺激。

实验结果显示,放射线照射前不具有胰腺癌干性细胞特性的 CD44⁻CD24⁻ ROS 水平最低,MFI 低于其他 3 组;而放射线照射 24 h 后,CD44⁻CD24⁻ ROS 水平最高,而最具有干性细胞特性的 CD44⁺CD24⁺ ROS 水平最低。ROS 是一类含氧的比氧气更加活泼的物质,包括过氧化氢(H₂O₂)、超氧阴离子(O₂⁻)、羟自由基(OH⁻)等^[14]。细胞内 ROS 产生的一个重要来源是线粒体。ROS 具有较高的反应活性,易于快速与细胞内的大分子物质反应,引起与许多病理过程有关的细胞结构的广泛损伤,进而触发细胞凋亡。放射治疗的主要生物学效应即是通过组织水分子电离或激发产生活性很强的 OH⁻,引起细胞 DNA 损伤或通过脂质过氧化途径诱导细胞凋亡^[15]。肿瘤干性细胞的放射抗拒与其细胞内的低 ROS 水平有关。肿瘤干性细胞高效率的 DNA 修复是化学治疗和放射治疗抵抗的重要机制;干性细胞得到细胞免的保护等。胰腺癌为乏氧肿瘤,缺氧可上调端粒酶及 CXCR4^[16] 的表达,因此,肿瘤的耐药性、侵袭性增加。

以上研究表明,更具胰腺癌干性细胞特性的细胞亚群表现出对放射诱导的凋亡抗拒,且初步分析其可能原因为,胰腺癌干性细胞为一群相当静止的细胞,其慢周期导致放射抗拒,此外干性细胞内低 ROS 水平是导致其放射耐受的重要原因之一,为以后胰腺癌的治疗提供新的靶点。

参考文献

[1] Lacobuzio-Donahue CA,Fu B,Yachida S,et al.DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer[J].J Clin Oncol,2009,27(20):1806-1813.
[2] 田碧.胰腺癌的治疗现状[J].肿瘤基础(下转第 4498 页)

0.050~0.075 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 本组资料中多数患者在 0.050 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 时即可达到满意的镇痛镇静效果。两组患者在治疗过程中,各时间点 CVP、HR 指标较为稳定,提示药物对循环影响小。因文献报道患者使用后出现低血压,尤其是推注时明显^[8],提示给药时初始宜慢,不要推注。在整个治疗过程中,瑞芬太尼较芬太尼组缩短了机械通气时间,减少了 ICU 的住院时间,与研究结果相似^[9-10],这可能与其无蓄积作用有关。尽管目前瑞芬太尼价格较贵,但其减少了 ICU 住院时间,一些研究显示其还能减少住 ICU 相关并发症如呼吸机肺炎等,因此瑞芬太尼总体上不增加或可减少医疗费用^[11-12]。瑞芬太尼使用后未见严重不良反应发生,其他不良反应较少。

总之,瑞芬太尼在 ICU 机械通气患者的镇痛镇静治疗过程中,起效快,作用强,合并使用镇静药物少,可缩短机械通气及 ICU 住院时间,值得在临床治疗此类患者中推广应用。

参考文献

- [1] 马朋林,王宇,席修明,等.重症加强治疗病房清醒患者不良住院经历调查分析[J].中国危重病急救医学,2008,20(6):553-557.
- [2] Patel SB,Kress JP. Sedation and analgesia in the mechanically ventilated patient[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012,185(5):486-497.
- [3] Katn T,Koitaishi T,Ouehi T, et al. The utility of bispectral index monitoring for sedated patients treated with low-dose remifentanyl[J]. J Clin Monit Comput, 2012,26(7):459-463.
- [4] PARKG. Remifentanyl in the ICU: a new approach to patient care[J]. Curr Anaesthes Crit Care, 2002,13(6):313-

320.

- [5] 夏婧,张玮,钱传云. 镇静治疗对 ICU 危重患者应激的预防作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2009,25(1):64-65.
- [6] 盛娅仪,徐振邦. 瑞芬太尼的药理学和临床应用[J]. 中国新药与临床杂志, 2001,20(2):142-146.
- [7] Glass PS,Gan TJ,Howell S. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl [J]. Anesth Analg, 1999,89:S7-S14.
- [8] Dahaba AA,Grabner T,Rehak PH, et al. Remifentanyl versus morphine analgesia and sedation for mechanically ventilated critically ill patients: a randomized double blind study[J]. Anesthesiology, 2004,101(10):640-646.
- [9] 刘坤彬,王东浩,马赞,等. 瑞芬太尼在重症监护病房机械通气患者镇痛镇静中的应用研究[J]. 中华危重病急救医学, 2013,25(3):167-170.
- [10] Cevik F,Celik M,Clark PM, et al. Sedation and analgesia in intensive care: a comparison of fentanyl and remifentanyl[J]. Pain Res Treat, 2011,11(3):311-320.
- [11] Al MJ,Hakkaart L,Tan SS, et al. Cost-consequence analysis of remifentanyl-based analgo-sedation vs. conventional analgesia and sedation for patients on mechanical ventilation in the Netherlands[J]. Crit Care, 2010,14(6):R195.
- [12] Tan JA, Ho KM. Use of dexmedetomidine as a sedative and analgesic agent in critically ill adult patients: a meta-analysis[J]. Intensive Care Med, 2010,36(6):926-939.

(收稿日期:2015-06-14 修回日期:2015-07-17)

(上接第 4495 页)

- 与临床, 2014,27(1):86-89.
- [3] Li C,Heidt DG,Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2007,67(3):1030-1037.
- [4] Gelmini S,Mangoni M,Serio M, et al. The critical role of SDF-1/CX-CR4 axis in cancer and cancer stem cells metastasis[J]. J Endocrinol Invest, 2008,31(9):809-819.
- [5] Dirks P. Cancer stem cells: Invitation to a second round [J]. Nature, 2010,466(7302):40-41.
- [6] Li YF,Xiao B,Tu SF, et al. Cultivation and identification of colon cancer stem cell-derived spheres from the Colo205 cell line[J]. Braz J Med Biol Res, 2012,45(3):197-204.
- [7] Nakanishi Y,Seno H,Fukuoka A, et al. Dclk 1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine [J]. Nat Genet, 2013,45(1):98-103.
- [8] Chen J,Li Y,Yu TS, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy[J]. Nature, 2012,488(7412):522-526.
- [9] Machado HL,Kittrell FS,Edwards D, et al. Separation by cell size enriches for mammary stem cell repopulation activity[J]. Stem Cells Transl Med, 2013,2(3):199-203.

- [10] Driessens G,Beck B,Caauwe A, et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis[J]. Nature, 2012,488(7412):527-530.
- [11] Hinohara K,Kobayashi S,Kanauchi H, et al. ErbB receptor tyrosine kinase/NF-kB signaling controls mammosphere formation in human breast cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012,109(17):6584-6589.
- [12] Huang P,Wang CY,Gou SM, et al. Isolation and biological analysis of tumor stem cells from pancreatic adenocarcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2008,14(24):3903-3907.
- [13] Lee HJ,You DD,Choi DW, et al. Significance of CD133 as a cancer stem cell markers focusing on the tumorigenicity of pancreatic cancer cell lines[J]. J Korean Surg Soc, 2011,81(4):263-270.
- [14] 熊珊珊,石英英,石汉平. 活性氧与肿瘤研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014,21(13):1045-1048.
- [15] Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy[J]. J Phar Sci, 2007,96(30):2181-2196.
- [16] 张建波,仲伟霞. 胰腺癌 CXCL12/CXCR4 通路研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012,19(8):634-637.

(收稿日期:2015-06-03 修回日期:2015-08-16)