

食管癌细胞株中肿瘤干细胞样细胞的分离培养及生物学鉴定

汪建林,孙志强,于静萍,孙苏平*

(南京医科大学附属常州第二医院放疗科,江苏 常州 213003)

[摘要] 目的:用无血清培养基方法从人食管癌细胞株 KYSE-150、TE-1 中分离富含肿瘤干细胞的细胞球并鉴定其生物学特性。方法:运用无血清培养基培养 KYSE-150、TE-1 细胞,观察细胞球的生成及在有血清培养基中的分化情况,利用 MTT 法以及 Transwell 小室法研究食管癌细胞球的增殖情况和侵袭能力,流式细胞仪检测分子标志 CD44、CD271 的表达。结果:KYSE-150、TE-1 细胞在无血清培养基培养条件下可以获得可稳定传代的细胞球,细胞球细胞的增殖能力和侵袭能力均高于其亲本细胞;无血清培养基培养下 KYSE-150 细胞球中 CD44⁺、CD271⁺、CD44⁺CD271⁺细胞分别为 (64.92 ± 11.04)%、(28.27 ± 6.79)%、(24.07 ± 5.39)% ,均显著高于亲本细胞 [(37.04 ± 6.30)%、(3.69 ± 0.49)%、(1.64 ± 0.11)% ,*P* 均 < 0.05]。TE-1 细胞球中 CD44⁺、CD271⁺、CD44⁺CD271⁺细胞占 (6.41 ± 0.87)%、(2.58 ± 0.17)%、(0.27 ± 0.53)% ,均显著高于亲本细胞 [(1.87 ± 0.18)%、(0.44 ± 0.10)%、(0.09 ± 0.02)% ,*P* 均 < 0.05]。结论:应用无血清培养基可以从 KYSE-150、TE-1 细胞系中分离出具有干细胞特性的食管癌细胞球,CD44、CD271 分子可能是食管癌干细胞的标志。

[关键词] 食管癌;肿瘤干细胞;无血清培养;细胞球

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1362-06

doi:10.7655/NYDXBNS20131006

Isolation and biological characteristics of cancer stem cells from esophageal cancer cell lines

Wang Jianlin, Sun Zhiqiang, Yu Jingping, Sun Suping*

(Department of Radiation Oncology, Changzhou Second Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213003, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a culture method of cancer stem cells (CSCs) from esophageal cancer cell lines KYSE-150 and TE-1 by serum-free medium(SFM) and identify their characteristics. **Methods:** KYSE-150 and TE-1 cells were cultured in serum-free medium. The cell spheres were observed and cell differentiation was induced by serum supplement. MTT assay and invasive assay were applied to examine the invasive ability of both cell spheres and their parental cells. CD44⁺, CD271⁺, CD44⁺CD271⁺ tumor spheroid cells were also detected by flow cytometry. **Results:** After SFM culture, KYSE-150 and TE-1 cells formed spheres, and could be passaged continuously. The differentiation of cell spheres recurred when serum was supplemented. The proliferation and invasive ability of cell spheres were higher than their parents cells. CD44⁺, CD271⁺, CD44⁺CD271⁺ in KYSE-150 cell spheres were (64.92 ± 11.04)%, (28.27 ± 6.79)%, (24.07 ± 5.39)%, which were significantly higher than those in parents cells [(37.04 ± 6.30)%, (3.69 ± 0.49)%, (1.64 ± 0.11)% ,*P* < 0.05]. CD44⁺, CD271⁺, CD44⁺CD271⁺ TE-1 cell spheres were (6.41 ± 0.87)%, (2.58 ± 0.17)%, (0.27 ± 0.53)%, which were also significantly higher than those in parents cells [(1.87 ± 0.18)%, (0.44 ± 0.10)%, (0.09 ± 0.03)% ,*P* < 0.05]. **Conclusion:** Esophageal cancer cell spheres can be isolated from KYSE-150 and TE-1 by culture with SFM. CD44 and CD271 may be the cell surface makers for these cancer stem cells.

[Key words] esophageal neoplasms; cancer stem cells; SFM; cell spheres

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1362-1367]

[基金项目] 江苏省卫生厅指导性科研项目(Z201220);常州市卫生局重大项目(ZD201105)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: ssp56@126.com .cn

食管癌(esophageal cancer, EC)是世界上最常见的六大恶性肿瘤之一,中国是世界上食管癌发病率和病死率最高的国家^[1]。越来越多的证据表明,肿瘤组织中存在对肿瘤形成和生长转移发挥重要作用的

细胞亚群,具有高转移性和抵抗化疗的特性,被称为肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)^[2-6]。虽然已有研究者从多种肿瘤组织和细胞系中分离出肿瘤干细胞^[7-10],但如何从体外有效地富集、培养肿瘤干细胞是研究其分子机制需解决的关键问题。本研究旨在探索利用无血清培养基从食管癌细胞系中富集肿瘤干细胞的方法,并对其中细胞球进行肿瘤干细胞特性鉴定,从而为体外深入研究食管癌干细胞特异性基因表达和异常信号转导通路提供良好的细胞模型基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人食管癌细胞系 KYSE-150、TE-1 购自上海生物细胞库。RPMI1640 培养基、胎牛血清和胰酶(Gibco 公司,美国);表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(PeproTech 公司,美国);B27(Invitrogen 公司,美国);四甲基偶氮唑盐(MTT)、DMSO(Sigma 公司,美国);Transwell 小室(Millipore 公司,美国),Matrigel 胶(BD 公司,美国);有血清培养基(serum-supplemented medium, SSM)为含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基,无血清培养基(serum-free medium, SFM)由 RPMI1640(1:1)、B27(1:50)、EGF(20 ng/ml)、bFGF(20 ng/ml)、胰岛素 5 μg/ml、转铁蛋白 10 μg/ml、0.5%BSA 组成;低黏附培养板(Corning 公司,美国);CD44 抗体(Abcam 公司,美国);CD271 抗体(BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

食管癌细胞系 KYSE-150、TE-1 细胞的培养和传代按常规方法用含 10%胎牛血清和 100 U/ml 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养基,在 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养,每 2 d 传代 1 次,取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 成球培养及诱导分化

用含 0.02% EDTA 的 0.25%的胰酶消化单层贴壁培养 KYSE-150、TE-1 细胞,加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基终止消化,离心弃去上清液,收集对数生长期 KYSE-150、TE-1 细胞,用无血清培养基重悬以 1×10^5 个/孔接种于 Corning 公司低黏附 6 孔培养板,在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养,每隔 1 d 加 1 ml 新鲜培养基。常规培养 3~4 d 后收集细胞球,机械吹打为单细胞悬液,以减少

细胞球中心的细胞凋亡,重悬于上述培养基,按 1:2 的比例传代。在 SFM 中培养 20 d 后形成的细胞球重新置于 SSM 中,诱导其分化,倒置显微镜观察细胞形态变化。

1.2.3 MTT 法检测 KYSE-150、TE-1 细胞及其细胞球增殖能力

将两种细胞和细胞球分别制成单细胞悬液按 1×10^4 个/孔的密度分别加入 96 孔板,每孔 200 μl,对照组只加培养基。在 37℃、5%CO₂ 条件下培养,每天取 6 孔细胞,加入 MTT 20 μl(5 mg/ml),37℃孵育 4 h,除去培养液,每孔加入 150 μl DMSO,摇晃 10 min。酶标仪测定光密度值 $D(490 \text{ nm})$,以光密度值和时间作为坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.4 Transwell 小室实验

按 1:4 比例将 Matrigel 胶与无血清 RPMI1640 培养液混匀后包被 Transwell 小室底部,室温风干后吸出培养板中残余液体,取对数生长期的 KYSE-150、TE-1 亲本细胞和 KYSE-150、TE-1 细胞球细胞制备单细胞悬液并计数,在 Transwell 侵袭小室内加入 1×10^4 个细胞和不含胎牛血清的 RPMI1640 培养基,培养小室外加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,每组细胞常规培养 12 h 后取出小室,擦去微孔膜上层细胞后结晶紫染色,PBS 漂洗,显微镜下观察小室膜下层细胞,每张片子随机记录 5 个视野的侵袭细胞数取平均数,每组实验各重复 3 次。

1.2.5 细胞表面标志物 CD44、CD271 的检测

收集培养 3 代以上悬浮培养的食管癌细胞球及普通培养的贴壁癌细胞,消化或机械吹打为单细胞悬液,离心后 PBS 重悬,调整细胞密度为 1×10^5 个/ml,加入鼠抗人 CD44-FITC、CD271-PEcy7 标记的单克隆抗体,以不加抗体为对照,4℃避光孵育,30 min 后 PBS 洗涤 2 遍去除未结合的抗体,1 h 内用流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

实验结果采用 SPSS18.0 统计软件检验分析,数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组数据间比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SFM 成球培养

无血清悬浮培养法能够培养出食管癌 KYSE-150、TE-1 细胞的细胞球,倒置相差显微镜下观察:大小不一的圆形或者椭圆形球状细胞团悬浮于培养

基中,细胞球由10~30个细胞组成,结构致密且不易吹散,细胞球边缘透亮,折光性较强,随着培养时间的延长,细胞球逐渐增大且形状趋于规则(图1)。

2.2 SSM 诱导分化

镜下观察大多数细胞球于6 h后开始贴壁,形状不规则;24 h后贴壁细胞数量明显增加,迁移出的细胞呈放射状分布;72 h大部分细胞球形态消

失,细胞呈贴壁生长,与正常血清培养条件下的细胞形态相似。

2.3 亲本细胞和细胞球细胞的增殖能力

用MTT比色法测定细胞球和贴壁细胞在不同时间段的吸光度值,并绘制细胞的生长曲线,通过生长曲线的走势来比较细胞增殖能力的差异,结果显示,KYSE-150、TE-1细胞球的增殖能力显著高于普

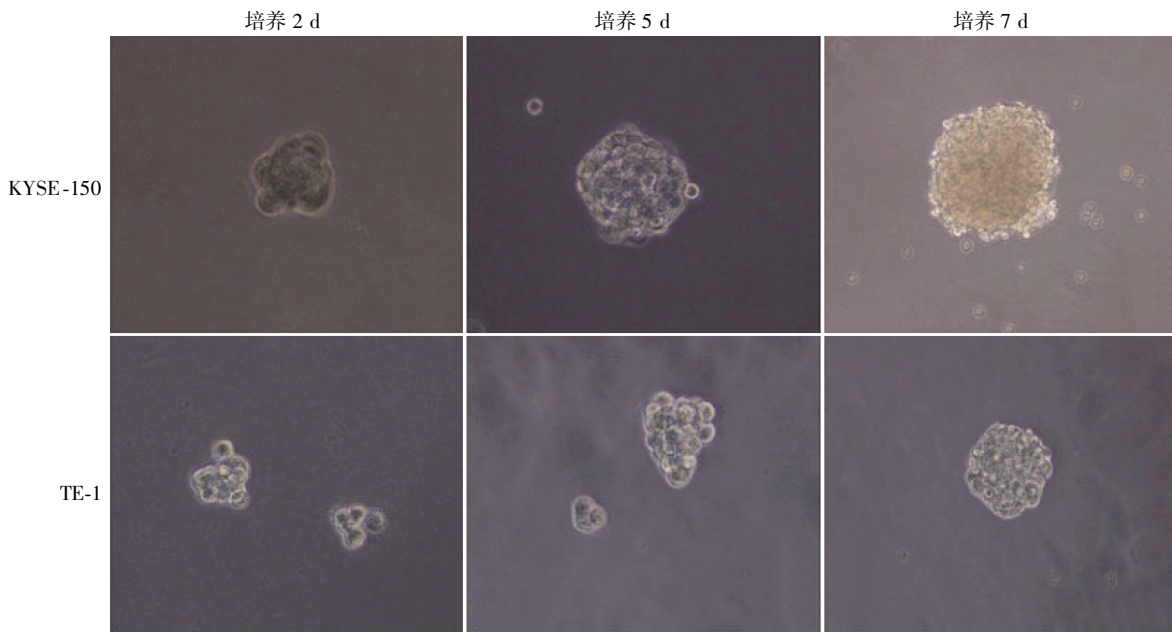


图1 倒置显微镜观察细胞成球(×200)

Figure 1 The growth of cell spheres, as illustrated by phase contrast microscopy(×200)

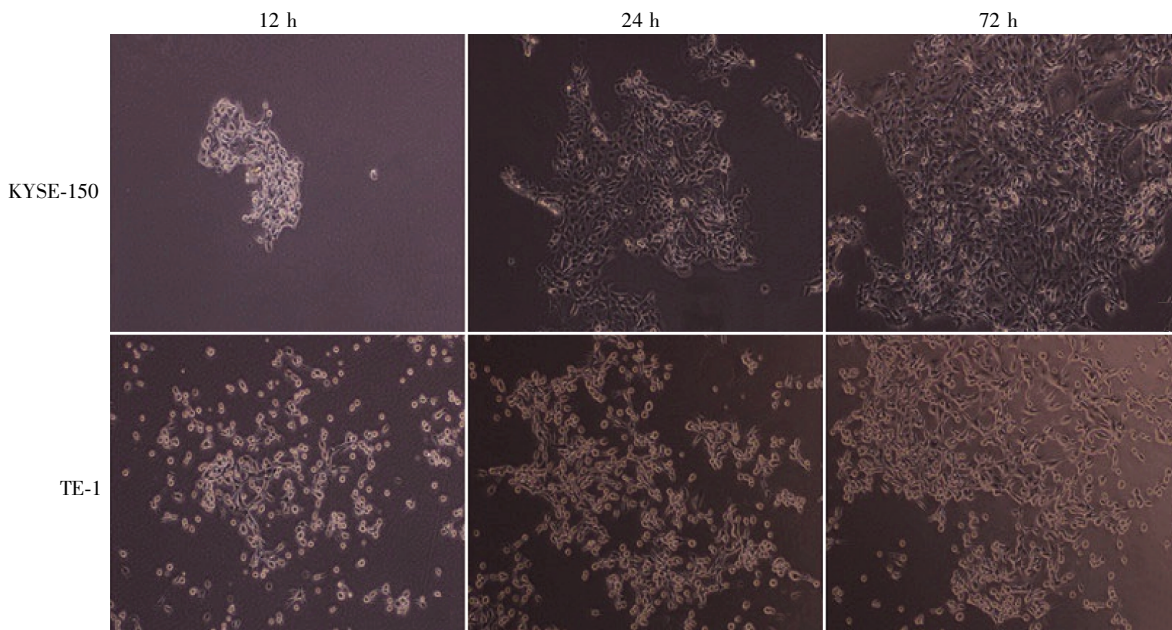


图2 细胞球在有血清培养基条件下的生长情况(×200)

Figure 2 Serum-containing medium culture of KYSE-150 and TE-1 cell spheres, and adherent growth gradually (×200)

通贴壁细胞($P < 0.05$, 图 3)。

2.4 亲本细胞和细胞球细胞的侵袭能力

通过 Transwell 侵袭实验发现, KYSE150 细胞球穿过微孔膜的细胞数 (103 ± 21) 个/视野, 多于

KYSE150 贴壁细胞的(38 ± 7)个/视野($t = 6.61, P < 0.01$), TE-1 细胞球穿过微孔膜的细胞数 (93 ± 13) 个/视野, 多于 TE-1 贴壁细胞的(42 ± 11)个/视野($t = 6.71, P < 0.01$, 图 4)。

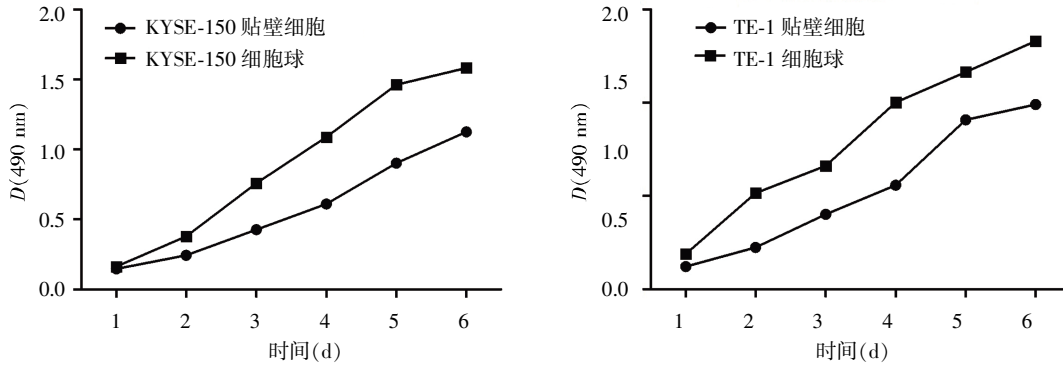
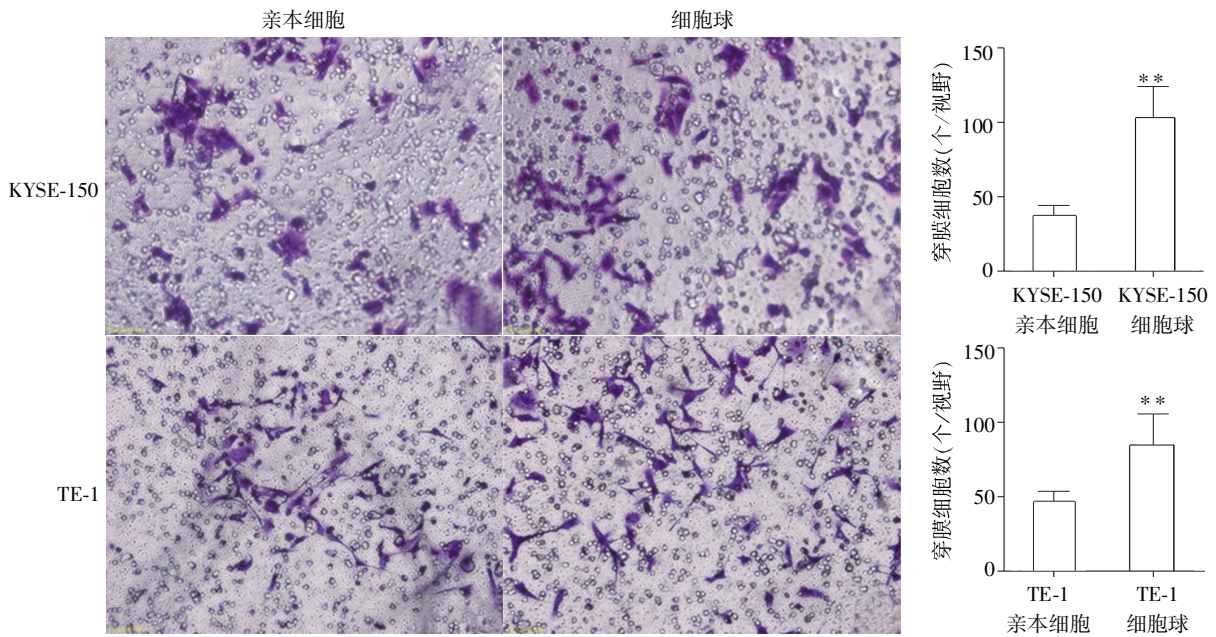


图 3 细胞球的生长情况

Figure 3 The growth curve of cell spheres and parent cells



与相应的亲本细胞比较, $**P < 0.01$ 。

图 4 Transwell 小室侵袭实验比较侵袭能力($\times 200$)

Figure 4 Transwell invasion assay was used to compare the invasive ability($\times 200$)

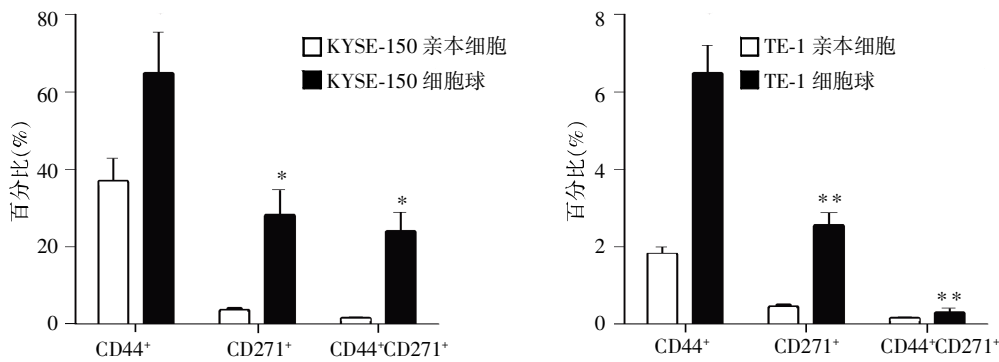
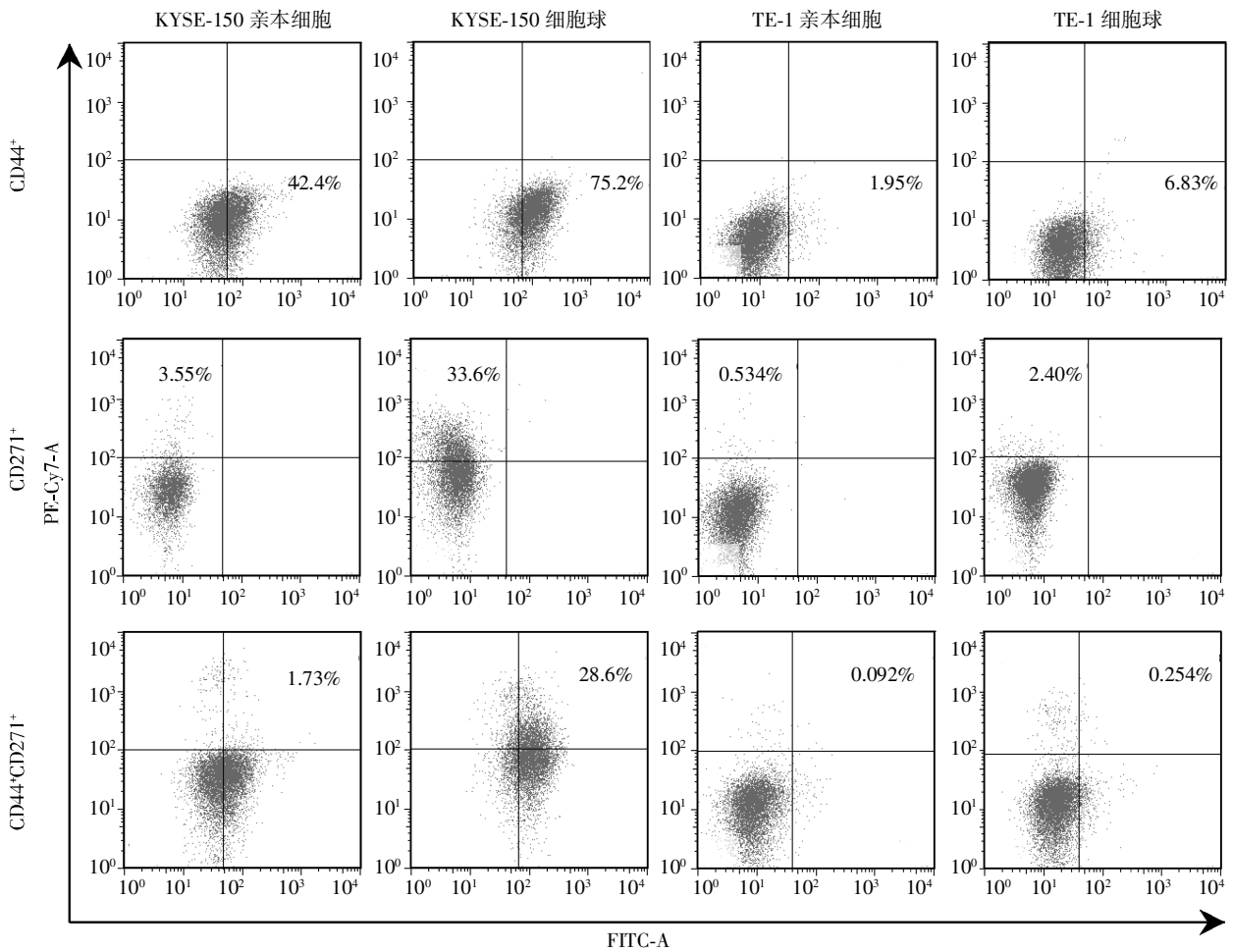
2.5 CD44、CD271 的表达

流式检测 KYSE-150、TE-1 细胞球和 KYSE-150、TE-1 亲本细胞中 CD44、CD271 的表达。KYSE-150 亲本细胞 CD44⁺细胞比例为 (37.04 ± 6.30)%、CD271⁺为 (3.69 ± 0.49)%、CD44⁺CD271⁺为 (1.64 ± 0.11)% ; KYSE-150 细胞球 CD44⁺细胞比例为 (64.92 ± 11.04)%、CD271⁺为 (28.27 ± 6.79)%、CD44⁺CD271⁺为 (24.07 ± 5.39)% ; TE-1 亲本细胞 CD44⁺细胞比例为 (1.87 ± 0.18)%、CD271⁺为 ($0.44 \pm$

0.10)%、CD44⁺CD271⁺为 (0.09 ± 0.02)%、TE-1 细胞球 CD44⁺细胞比例为 (6.41 ± 0.87)%、CD271⁺为 (2.58 ± 0.17)%、CD44⁺CD271⁺为 (0.27 ± 0.53)%(图 5)。细胞球中 CD44、CD271 的表达率均显著高于亲本细胞($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

食管癌的早期诊断率低, 耐药率高, 复发及转移率高, 临床治疗效果一直不理想, 这可能由于存在一



与相应的亲本细胞比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 流式细胞仪检测 CD44⁺、CD271⁺、CD44⁺CD271⁺细胞比例

Figure 5 Flow cytometry analysis of CD44⁺, CD271⁺, CD44⁺CD271⁺ expression

群为数极少的肿瘤干细胞所致。因此,研究食管肿瘤干细胞的特性将为食管癌的临床诊断和治疗提供新的思路和策略,而食管肿瘤干细胞的分离和鉴定就成为食管癌靶向治疗的重要途径。

肿瘤干细胞现主要有3种分离方法:侧群细胞(side population cells)即SP细胞分选法、表面标志分选法和悬浮细胞球的培养分选法。食管癌细胞无

特异的标志物给食管肿瘤干细胞的分离和鉴定带来了很大的困难,悬浮细胞球的培养其原理是利用CSCs能够在SFM中悬浮生长并形成干细胞球生长,而普通的肿瘤细胞则无法耐受这种无血清的培养条件,利用这种特性分离出肿瘤干细胞,这种方法最初应用于神经干细胞,后来也应用于脑胶质瘤干细胞、乳腺癌干细胞的培养^[11-12]。本研究通过SFM

培养法成功地从两种食管癌细胞株中获得可稳定传代的细胞球团,且与 SSM 培养的同系细胞有着显著差异。随着培养时间的增加,细胞球逐渐增大至直径 200~400 μm ,内部结合致密,边缘光滑,机械吹打分散或胰酶消化后在 SFM 中培养 3~4 d 能生长成原有大小的细胞球,而普通分化的细胞在此条件下无法形成细胞球并很快凋亡。MTT、Transwell 小室实验表明,悬浮培养分离的细胞球具有高增殖及侵袭能力。

目前通过细胞表面标志物来分选肿瘤干细胞是一种常用的研究方法。本研究选用 CD44 和 CD271 两种细胞表面分子来明确细胞球的分子表型。CD44 是一种跨膜糖蛋白,为细胞表面的黏附分子,也是乳腺癌干细胞的表型之一^[13]。Zhao 等^[14]研究认为,CD44 可作为富集食管鳞癌细胞中的肿瘤干细胞的标志,CD44⁺细胞具有致瘤、分化、耐药及自我更新等部分肿瘤干细胞的特性。CD271(P75NTR/NGFR)是神经营养因子的低亲和力受体,Okumura 等^[15]应用 CD271 对食管鳞状上皮细胞进行了分选,并证明其阳性细胞具有增殖、自我更新及多向分化能力。本实验通过流式检测获取的食管癌细胞球发现,食管癌细胞球 CD44⁺、CD271⁺细胞比例明显高于亲本细胞,表明 SFM 培养细胞球的方法能有效地富集食管癌细胞中具有干细胞特性的细胞亚群。

本研究探讨的无血清悬浮球培养法成本低,经济易行,SFM 悬浮培养可分离出富含食管癌干细胞的细胞球,相对于亲本细胞有更强的增殖和侵袭能力,并能在体外稳定传代、扩增,可暂时作为研究食管癌干细胞的工具,同时 KYSE-150、TE-1 细胞球被证实具有肿瘤干细胞特性,表达具有食管癌干细胞可能的表面标记分子 CD44、CD271,可以认为细胞球中富含肿瘤干细胞样细胞群。总之,本研究为食管癌干细胞体外深入研究提供了良好的细胞模型,有利于进一步寻找食管肿瘤干细胞的分子标记,进而为以食管肿瘤干细胞为治疗靶点的研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90
- [2] Driessens G, Beck B, Caauwe A, et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis [J]. Nature, 2012, 488(7412): 527-530
- [3] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111
- [4] Sachlos E, Risueno RM, Laronde S, et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells[J]. Cell, 2012, 149(6): 1284-1297
- [5] Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, et al. Lineage tracing reveals Lgr5⁺ stem cell activity in mouse intestinal adenomas[J]. Science, 2012, 337(6095): 730-735
- [6] Chen J, Li Y, Yu TS, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy [J]. Nature, 2012, 488(7412): 522-526
- [7] Sonderegger S, Pollheimer J, Knofler M. Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation--review[J]. Placenta, 2010, 31(10): 839-847
- [8] Stoica G, Lungu G, Martini-Stoica H, et al. Identification of cancer stem cells in dog glioblastoma [J]. Vet Pathol, 2009, 46(3): 391-406
- [9] 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
- [10] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. Nature, 2007, 445(7123): 106-110
- [11] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties[J]. Cancer Res, 2005, 65(13): 5506-5511
- [12] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821-5828
- [13] Snyder EL, Bailey D, Shipitsin M, et al. Identification of CD44v6 (+)/CD24- breast carcinoma cells in primary human tumors by quantum dot-conjugated antibodies[J]. Lab Invest, 2009, 89(8): 857-866
- [14] Zhao JS, Li WJ, Ge D, et al. Tumor initiating cells in esophageal squamous cell carcinomas express high levels of CD44[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21419
- [15] Okumura T, Shimada Y, Imamura M, et al. Neurotrophin receptor p75(NTR) characterizes human esophageal keratinocyte stem cells *in vitro* [J]. Oncogene, 2003, 22(26): 4017-4026

[收稿日期] 2013-06-06