

甲状腺未分化癌耐药和转移中肿瘤干细胞和上皮细胞间质的转化作用

郑 帅,王晓东,崔 岱,许馨予,杨 涛,郑旭琴*

(南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:** 探讨甲状腺未分化癌耐药和转移中肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)和上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的作用。**方法:** 以甲状腺未分化癌细胞株 SW1736 为研究对象,采用流式荧光激活分选技术从 SW1736 细胞株中分选出具有干细胞特性的侧群(side population, SP)细胞。用阿霉素诱导非侧群(non-SP)细胞耐药。在 SP、non-SP 及 non-SP 耐药细胞中,采用体外克隆形成试验检测克隆形成能力;四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测阿霉素对增殖的影响;real-time PCR 比较干细胞标志 nestin、ABCG2、肿瘤耐药基因 MDR1、EMT 标记物 E-cadherin、 β -catenin、vimentin、slug、N-cadherin 表达情况。**结果:** SW1736 细胞中存在 0.8%左右的 SP 细胞,SP 细胞克隆形成率明显高于 non-SP 细胞。non-SP 耐药细胞的半数抑制浓度明显高于 non-SP 细胞,且 non-SP 耐药细胞流式分选不能获得 SP 细胞,只能得到 non-SP 细胞。real-time PCR 结果显示,SP 较 non-SP 细胞高表达 nestin、ABCG2、MDR1、N-cadherin、 β -catenin、vimentin 及 slug;non-SP 耐药细胞较 non-SP 细胞 MDR1、slug 表达上调;均未检出 E-cadherin。**结论:** 阿霉素诱导耐药不能将非肿瘤干细胞(non-SP 细胞)转化为获得性肿瘤干细胞(SP 细胞),但可导致 EMT 的异常激活。SP 细胞可能是肿瘤耐药、复发、转移的根源。

[关键词] 甲状腺;肿瘤干细胞;侧群细胞;上皮细胞间质转化;耐药

[中图分类号] R736.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)12-1627-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20141201

The role of cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition in drug resistance and metastasis of anaplastic thyroid carcinoma

Zheng Shuai, Wang Xiaodong, Cui Dai, Xu Xinyu, Yang Tao, Zheng Xuqin*

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the role of cancer stem cells (CSCs) and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in drug resistance and metastasis of anaplastic thyroid carcinoma. **Methods:** Human anaplastic thyroid cancer cell line, SW1736, was sorted for side population (SP) cells which had stem cell characteristics by Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS). Non-SP cells were treated with doxorubicin to establish drug resistant cell modes. Among SP, non-SP and non-SP drug resistant cells, the clonal formation assay was performed to evaluate the self-renewal potential; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cell proliferation assay was adopted to examine effects of doxorubicin on the proliferation; Genes expression of stem cell markers-nestin and ATP-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2), the gene related to cancer resistance and relapse-multidrug resistance gene (MDR1) and some EMT associated genes-E-cadherin, β -catenin, vimentin, Slug and N-cadherin, were compared by performing real-time PCR. **Results:** SW1736 line cells contain 0.8% side population cells. Clonal formation assay revealed that SP cells displayed markedly higher clonogenic potential than non-SP cells. MTT cell proliferation assay showed that the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of non-SP drug resistant cells was obviously higher than that of non-SP cells. SP cells displayed higher genes expression of nestin, ABCG2, MDR1, slug, β -catenin, vimentin and N-cadherin, compared with non-SP cells. The gene expressions of slug and MDR1 were higher in non-SP drug resistant cells than those of non-SP cells. E-cadherin was not detected in all cell types. **Conclusion:** Doxorubicin can't make the transition of non-CSCs (namely non-SP) to acquired CSCs (namely SP), but can induce the aberrant activation of EMT. SP cells may have significant impact on tumor drug resistance, recurrence and metastasis.

[Key words] thyroid; cancer stem cells; side population; epithelial-mesenchymal transition; drug resistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(12): 1627-1631, 1637]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81102032)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zqx5126@163.com

临床上常使用阿霉素单独或联合顺铂、长春新碱等治疗甲状腺未分化癌,但效果不佳。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)在化疗药物耐药中发挥重要作用^[1],其高表达 ABC 转运体是肿瘤耐药的重要机制之一^[2]。耐药肿瘤细胞表现出与亲本细胞不同的侵袭、转移能力。有研究发现阿霉素耐药的乳腺癌细胞系耐药株中丧失 E-cadherin 表达^[3],另有研究发现耐药株中一些转移相关黏附因子和基质金属蛋白酶类表达与亲本细胞相比存在差异^[4],均提示 MCF-7/ADR 细胞在获得耐药性的同时,发生了上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),促进了其侵袭、转移能力的提高。Brabletz 等^[5]提出了“迁移的肿瘤干细胞”假说,认为 CSCs 不仅在肿瘤的发生发展中具有决定性作用,在肿瘤的转移方面也扮演了重要角色,导致 EMT 的异常激活。

CSCs、耐药与 EMT 三者之间的联系尚不明确。本研究以甲状腺未分化癌细胞株为研究对象,采用流式荧光激活分选(fluorescent activated cell sorting, FACS)从中分选出侧群(side population, SP)细胞和非侧群(non-SP)细胞,利用阿霉素诱导 non-SP 细胞耐药,比较三者肿瘤干细胞特征、EMT 特征及对化疗药物的耐药性。探究药物是否能诱导 EMT 将非肿瘤干细胞转化为获得性肿瘤干细胞,从而解释甲状腺未分化癌耐药的机制,为根治甲状腺未分化癌提供可能新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

人甲状腺未分化癌细胞株 SW1736 由德国柏林洪堡大学夏洛特医学院 Derwahl 教授惠赠。

DMEM 培养基和胎牛血清(Gibco 公司,美国);阿霉素、Hoechst 荧光染料、ABCG2 拮抗剂维拉帕米、四甲基偶氮唑蓝(MTT)及吉姆萨染液(Sigma 公司,美国);TRIzol 核酸提取液(Invitrogen 公司,美国);逆转录及 real-time PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本);双波长流式细胞仪(BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SW1736 细胞株贴壁生长在含 10%胎牛血清 DMEM 的培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 双波长流式细胞仪分选 SW1736 细胞中的 SP 细胞和 non-SP 细胞

取对数生长期的 SW1736 细胞制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,37℃水浴箱中预

热 10 min 后,分为实验组和对照组,两组均加入 Hoechst33342 染料(浓度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$),其中对照组加入 ABCG2 转运体拮抗剂维拉帕米(终浓度 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$),置于 37℃恒温水浴中避光孵育 120 min。孵育完成后将细胞重悬于 4℃ HBSS 溶液(含 2%胎牛血清及 10 mmol/L HEPES)中,30 μm 尼龙膜过滤制备单细胞悬液,加入碘化丙啶(PI)至终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。流式检测以 350 nm 激发光源、610 nm 双色短通反射滤镜、450 nm 和 675 nm 边缘长通滤片分别检测散射光蓝光及红光部分,分选出 SW1736 细胞中的 SP 细胞和 non-SP 细胞。

1.2.3 SW1736 流式分选后的 non-SP 细胞诱导耐药

DMEM 培养基中加入阿霉素逐步诱导 non-SP 细胞耐药,阿霉素浓度从 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 起始,逐渐增至 0.02、0.03、0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$,最终浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$,培养 15 d,细胞状态良好,为 non-SP 耐药细胞。

1.2.4 体外增殖试验

收集对数期的 non-SP 和 non-SP 耐药细胞,每孔加入 200 μl 细胞悬液, 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板。37℃、5% CO₂ 孵育 24 h 后,予无血清培养液单独培养或加入不同浓度阿霉素继续培养 24 或 48 h。每孔加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml),继续培养 4 h。弃上清,每孔加入 150 μl DMSO,置于摇床上低速振荡 10 min。应用酶联免疫检测仪,492 nm 处测量各孔吸光度值。每组设 6 个复孔,重复 3 次。

1.2.5 平板克隆形成试验

将分选的 SP 与 non-SP 细胞悬液以每皿 200 个细胞的密度均匀接种于直径 60 mm 的培养皿中。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,分别于培养的第 3 天和第 7 天加甲醛固定,姬姆萨染料染色后显微镜下计数 >50 个细胞的克隆数。克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 实时荧光定量 real-time PCR

提取甲状腺未分化癌细胞的 RNA,使用 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit 将 RNA 逆转录成 cDNA。real-time PCR 反应条件:预变性 94℃ 5 min,变性 94℃ 30 s,退火 30 s,延伸 72℃ 30 s,共 25~30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。各引物序列如下: β -actin(产物 280 bp)上游 5'-CCCAGGACCAGGGC GTGAT -3',下游 5'-TCAAA-CATGATCTGGGTCAT-3';ABCG2(234 bp)上游 5'-TG TAGCAACACTTCTCAT GACC-3',下游 5'-TG-TAGCAACACTTCTCATGACC-3';MDR1(253 bp)上游 5'-GCCTGGCAGCTGGAAGACAAATAC-3',下游

5' -ATGGCCAAATCACAAGGGTTAGC-3' ;Nestin (177 bp) 上游 5'- AGCAGCACTCTTAACTTACG -3',下游 5'- CTGACTTAGCCTATGAGATGG -3';N-cadherin (199 bp)上游 5'- CGAGCCGCCTGCGCT-GCCAC-3', 下游 5'-CGCTGCTCTCCGCTCCCCGC-3';Vimentin(179 bp)上游 5-CCGAAAACACCCTG-CAATCTTTC-3', 下游 5'-CACATCGATTTGGACAT-GCTGT-3'; β -catenin (100 bp) 上游 5'- AAAATG-GCAGTGCCTTACG-3', 下游 5'- TTTGAAG-GCAGTCTGTGTA-3';Slug (182 bp) 上游 5'- ACAGCGAACTGGACACACATAC -3', 下游 5'- GTATCCGGAAAGAGGAGAGAGG-3';E-cadherin(151 bp)上游 5'- TTGAAAGAGAAACAGGATGGCTG-3', 下游 5'- TCATTCTGATCGGTTACCGTGAT-3'。采用相对定量方法($2^{-\Delta\Delta CT}$)进行分析,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

应用 SPSS17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组比较采用多因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 或 Dunnett T3 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。半数抑制浓度(IC_{50})使用 GraphPad Prism 5 软件作图得出。

2 结果

2.1 SW1736 细胞中 SP 和 non-SP 细胞克隆形成能力的比较

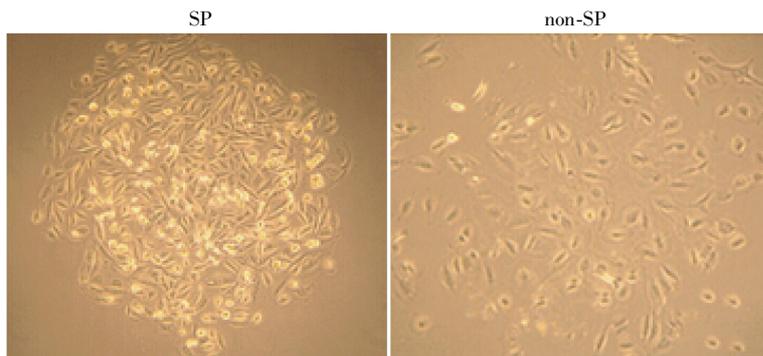


图 2 SP、non-SP 细胞及总 SW1736 细胞的克隆形成率($\times 200$)
Figure 2 Clonal assay of SP, non-SP and SW1736 cells($\times 200$)

2.2 non-SP 耐药细胞的更新能力及阿霉素对其增殖能力的影响

阿霉素逐步诱导 non-SP 细胞耐药, 从起始浓度 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 直至终浓度 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 培养 15 d, 细胞状态良好。继续提高阿霉素浓度后, non-SP 细胞无法存活, 故将阿霉素耐药 15 d 后终浓度为 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 的 non-SP 细胞定为 non-SP 耐药细胞。

non-SP 耐药细胞, 再次进行 SP 的 FACS 分选,

甲状腺未分化癌细胞株 SW1736 中存在少量的 SP 细胞, 比例为 0.8%。在加入 ABC 转运蛋白阻滞剂维拉帕米后, SP 细胞比例下降为 0(图 1)。分选后 SP 细胞呈克隆样生长, 而 non-SP 细胞无法形成克隆结构, 大部分呈分散状生长(图 2)。分选后培养 5 d, SP 细胞的克隆形成率 (CFE) 为 $(17.40 \pm 4.60)\%$, non-SP 细胞的 CFE 为 $(0.97 \pm 0.49)\%$, 两组具有统计学差异($P < 0.05$)。分选后培养 10 d, SP 细胞的 CFE 为 $(24.50 \pm 5.50)\%$, non-SP 细胞的 CFE 为 $(1.37 \pm 0.45)\%$, 两组亦具有统计学差异($P < 0.05$)。提示 SP 细胞克隆形成能力明显强于 non-SP 细胞。

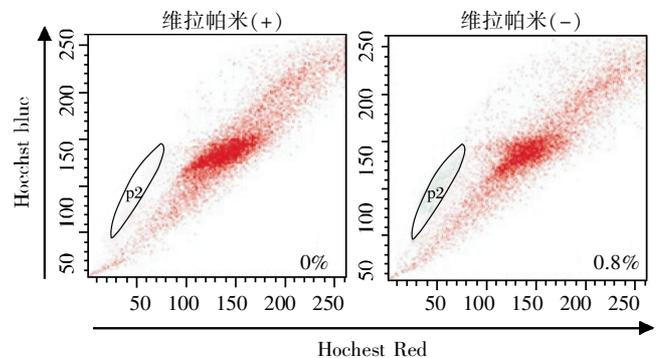
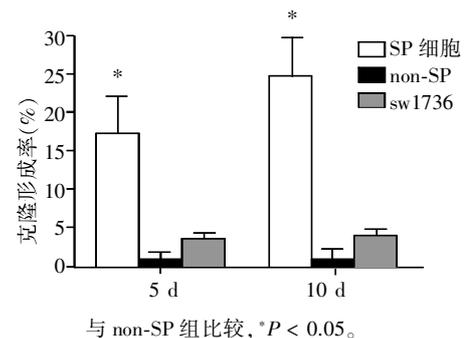


图 1 甲状腺未分化癌细胞株 SW1736 中 SP 细胞的流式分选
Figure 1 SP cells sorting by flow cytometry in anaplastic thyroid cancer cell line SW1736



结果显示 non-SP 耐药细胞不能获得 SP 细胞, 只能获得 non-SP 细胞(图 3)。

MTT 法结果显示, 不论是 non-SP 还是 non-SP 耐药细胞, 培养 72 h 较 48 h 细胞活性下降。non-SP 耐药细胞对阿霉素的耐药性明显强于 non-SP 细胞(图 4)。培养 48 h 后, non-SP 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.50 $\mu\text{g/ml}$, non-SP 耐药细胞为 0.88 $\mu\text{g/ml}$ 。培养 72 h 后, non-SP 细胞的 IC_{50} 为 0.08 $\mu\text{g/ml}$,

non-SP 耐药细胞为 0.38 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.3 SP、non-SP 和 non-SP 耐药细胞中干细胞、肿瘤耐药和 EMT 相关基因的表达

Nestin、ABCG2 是干细胞相关基因,MDR1 为肿瘤耐药基因。SP 细胞与 non-SP 细胞相比,高表达

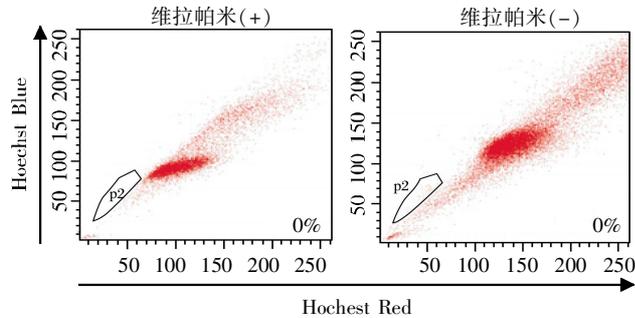


图3 non-SP 耐药细胞中 SP 细胞的流式分选

Figure 3 SP cells sorting by flow cytometry in non-SP drug resistant cells

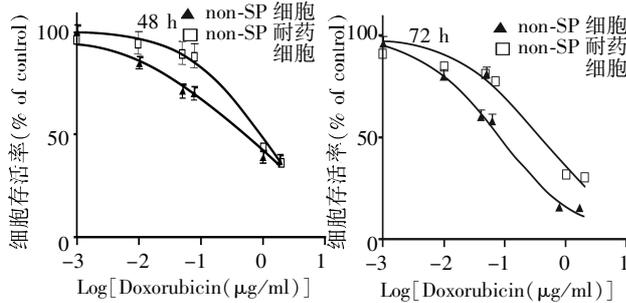
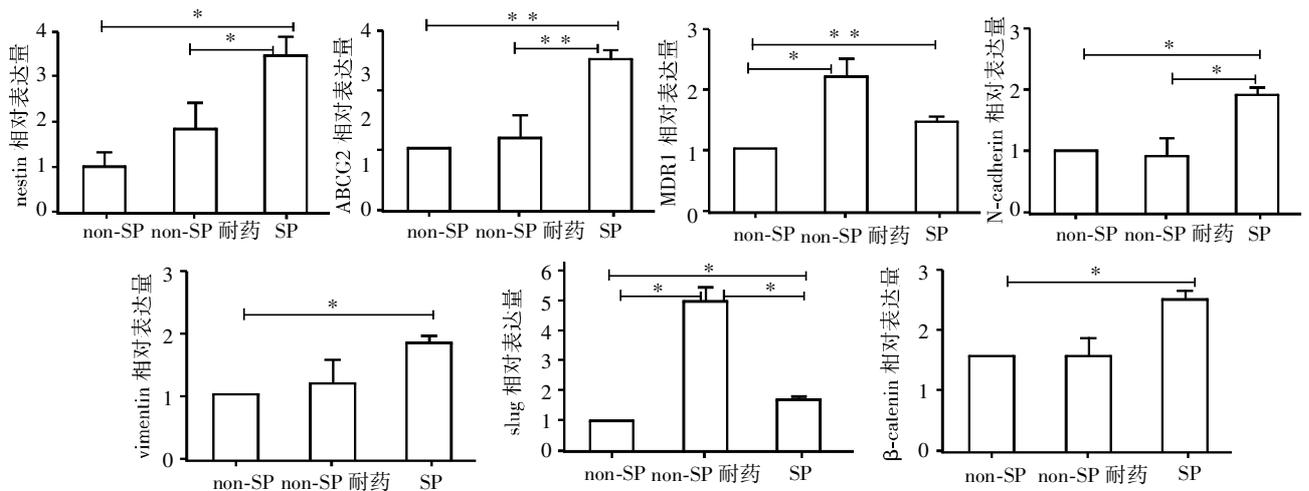


图4 阿霉素对 non-SP 和 non-SP 耐药细胞存活率的影响

Figure 4 The effects of doxorubicin on non-SP and non-SP drug resistant cells viability



SP 与 non-SP 细胞相比, nestin、ABCG2、MDR1、slug、 β -catenin、vimentin 及 N-cadherin 表达上调; non-SP 耐药与 non-SP 细胞相比, MDR1、slug 表达上调; non-SP 耐药与 SP 细胞相比, slug 表达增高, ABCG2、nestin、N-cadherin 表达下降, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 real-time PCR 分析 non-SP、non-SP 耐药、SP 细胞中 nestin、ABCG2、MDR1 和 EMT 相关基因(β -catenin、vimentin、slug、N-cadherin)的表达量

Figure 5 Real-time PCR analysis of mRNA expression of nestin, ABCG2, MDR1 and EMT related gene(β -catenin, vimentin, slug, N-cadherin)

nestin($P < 0.05$)、ABCG2 及 MDR1($P < 0.01$)。SP 细胞与 non-SP 耐药细胞相比, ABCG2($P < 0.01$)、nestin($P < 0.05$)表达亦增高, MDR1 无差异。Non-SP 耐药细胞较 non-SP 细胞 MDR1 表达升高($P < 0.05$), ABCG2、nestin 的表达无统计学差异。

β -catenin、vimentin、slug、N-cadherin、E-cadherin 为 EMT 相关基因。SP 与 non-SP 细胞相比, 高表达 β -catenin、vimentin、slug 及 N-cadherin($P < 0.05$)。Non-SP 耐药细胞较 non-SP 细胞高表达 slug($P < 0.05$), β -catenin、vimentin 之间的差别无统计学意义。Non-SP 耐药细胞与 SP 细胞相比, slug 表达增高, N-cadherin 表达下降($P < 0.05$)。 β -catenin、vimentin 的表达, non-SP 耐药高于 non-SP 细胞、SP 高于 non-SP 耐药细胞, 但均无统计学意义。E-cadherin 基因在 4 种细胞中均未检出(图 5)。

3 讨论

耐药和转移是肿瘤患者治疗失败的主要原因, 肿瘤干细胞和上皮细胞间质转化被认为起重要作用。目前研究发现这两种表型之间可能存在功能上的联系。

早在 2001 年, 研究人员提出肿瘤干细胞理论, 该理论指出肿瘤细胞中存在一小部分具有自我更新和多向分化潜能的 CSCs。其具有选择性致癌能力, 表达特异性表面标志物^[1]。Nestin 早在 1990 年就被认为是中枢神经系统发育中的干细胞^[6], 随后

在恶性胶质瘤^[7]、前列腺癌^[8]等中作为 CSCs 的标志物。Liu 等^[9]对于甲状腺未分化癌肿瘤组织标本进行组织免疫组化鉴定,肿瘤组织标本都表达 nestin,而瘤旁正常的甲状腺组织 nestin 都为阴性, nestin 可能是甲状腺未分化癌肿瘤干细胞的标记物。ABCG2 是 ABC 转运体家族的成员,广泛存在于各种干细胞上,其特异性表达决定了 SP 细胞的 Hoechst 阴性染色表型。本研究显示,在甲状腺未分化癌细胞株 SW1736 分选出的 SP 细胞较 non-SP 细胞高表达 nestin、ABCG2,提示在甲状腺未分化癌细胞株中存在有干细胞潜能的 SP 细胞。

研究证明 ABC 转运体的高表达可促使肿瘤细胞将化疗药物泵出胞外,导致肿瘤耐药^[2]。ABCG2 和 MDR1 同属于 ABC 转运家族,在乳腺癌^[10]和肝癌^[11]等的阿霉素耐药中发挥重要作用。在甲状腺未分化癌 HTh74 细胞株中,高表达 ABCG2 和 MDR1 是 SP 细胞及 HTh74 耐药株对阿霉素耐药的主要原因之一^[12-13]。本研究发现从 SW1736 细胞分选的 SP 细胞较 non-SP 细胞高表达 ABCG2 及 MDR1,可能就是甲状腺未分化癌对放、化疗不敏感及易复发的重要原因之一。因此,化疗药物联合抑制 ABC 转运蛋白活性药物在甲状腺未分化癌的治疗中有潜在的临床应用价值。

同时,本研究结果表明 non-SP 耐药细胞流式分选不能获得 SP 细胞,只能获得 non-SP 细胞。本课题组先前的实验结果显示,将 SW1736 细胞以阿霉素浓度 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 短期耐药 3 d,流式分选 SP 细胞的比例为 3.1%^[12],较 SW1736 细胞未耐药时的 0.8%SP 细胞比例明显升高。以上结果表明阿霉素不能诱导 non-SP 细胞(即非 CSCs)转化为 SP 细胞(即 CSCs),耐药引起的 SP 比例升高可能是由于 SP 细胞本身增殖引起的。

EMT 的发生以上皮细胞极性的丧失和间质特性(成纤维细胞样的外形、间质标记基因的表达出现)的获得、细胞间黏附能力丧失和迁移及运动能力获得为主要特征,与肿瘤细胞侵袭和远处转移有密切关系。目前体内和体外实验证据都表明,EMT 在乳腺癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌等多种癌症的原发性浸润和继发性转移中起着举足轻重的作用^[14-17]。E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、 β -catenin 和 Slug 均为 EMT 相关标志。本研究中 real-time PCR 结果显示 E-cadherin 在 SW1736 细胞分选的 SP、non-SP 及 non-SP 耐药细胞中均未表达,SP 细胞较 non-SP 细胞高表达 N-cadherin、Vi-

mentin、 β -catenin 和 Slug,证实了在甲状腺未分化癌细胞株 SW1736 中具有干细胞特性的 SP 细胞发生了 EMT,为 SP 细胞的强侵袭转移能力提供了一定的理论依据。同时研究发现,阿霉素诱导的 non-SP 耐药细胞也发生了 EMT,non-SP 耐药细胞与 non-SP 细胞相比高表达 Slug。进而提示甲状腺未分化癌细胞的体外侵袭能力可能与 SP 细胞发生了 EMT 相关,而在化疗药物的诱导下非肿瘤干细胞 non-SP 也可能通过发生 EMT 而具有了高侵袭能力,其中关系尚有待进一步研究。

综上所述,本研究采用了 FACS 分选方法从甲状腺未分化癌细胞株中成功分选出 SP 细胞,该群细胞增殖能力强,高表达干细胞标志、肿瘤耐药基因及 EMT 相关基因。并第一次在甲状腺肿瘤细胞株中,用分离出的 non-SP 细胞诱导耐药,发现阿霉素不能将非 CSCs 即 non-SP 细胞转化为 CSCs 即 SP 细胞,但可导致 EMT 的异常激活。耐药引起的 SP 比例升高可能是由于 SP 细胞本身增殖引起的。SP 细胞可能是肿瘤耐药、复发、转移的根源。肿瘤根治需要同时针对 CSCs 和 EMT 信号通路。

[参考文献]

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111
- [2] Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2009, 14(1): 3-9
- [3] Lu L, Zhou D, Jiang X, et al. Loss of E-cadherin in multidrug resistant breast cancer cell line MCF-7/Adr: possible implication in the enhanced invasive ability [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012, 16(9): 1271-1279
- [4] Li QQ, Wang WJ, Xu JD, et al. Up-regulation of CD147 and matrix metalloproteinase-2, -9 induced by P-glycoprotein substrates in multidrug resistant breast cancer cells[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(11): 1767-1774
- [5] Bra bletz T, Jung A, Spaderna S, et al. Opinion: migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(9): 744-749
- [6] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. *Cell*, 1990, 60(4): 585-595
- [7] Ma YH, Mentlein R, Knerlich F, et al. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades [J]. *J Neurooncol*, 2008, 86(1): 31-45