文章编号:1000-5404(2010)04-0315-04

论著

CXCR4阳性Lewis肺癌细胞的高致瘤性和高转移潜能

辇伟奇[1],敖绪军[2],陈芳琳[1],陈正堂[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所[1];245041 安徽 黄山,解放军第532医院普通外科[2])

[摘要] **目的** 从小鼠肺腺癌细胞株(lewis lung carcinoma, LLC)中分离并鉴定具有高转移潜能的肿瘤干细胞样细胞亚群。**方法** 流式分析Sca1、CXCR4双阳性细胞比例,激光共聚焦检测小鼠肺癌组织中双阳性细胞表达情况;以CXCR4作为磁珠分选细胞的表面标志,检测分选前后细胞活性,观察分析CXCR4阳性亚群的恶性生物学行为。**结果** LLC细胞中Sca-1、CXCR4双阳性细胞比例为0.1%,CXCR4阳性细胞为0.18%,小鼠肺癌组织存在荧光双染色细胞;分选前细胞活性为(95.58±0.87)%,分选后活力为(94.96±0.76)%($P>0.05$);CXCR4阳性亚群在无血清中呈球状生长,CXCR阴性亚群1×10^5即不可成瘤,CXCR4阳性亚群在7×10^3仍可成瘤;CXCR4阴性和阳性亚群分别以5×10^5、2×10^4密度各接种3只小鼠,前者无转移,而后者2只发生肺转移,1只发生耳转移。**结论** Lewis肺癌细胞中的CXCR4阳性亚群具有一定的自我更新和转移能力,具备癌转移性干细胞某些特性。

[关键词] 细胞系,肿瘤;癌,非小细胞肺;肿瘤干细胞;小鼠,近交C578L;癌,Lewis肺;受体,CXCR4
[中图法分类号] R73-37;R730.23;R734.2 **[文献标志码]** A

Highly tumorigenic and metastatic potential of CXCR4 positive cells from Lewis lung carcinoma cell line

Nian Weiqi[1], Ao Xujun[2], Chen Fanglin[1], Chen Zhengtang[1] ([1]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of General Surgery, No. 532 Hospital of PLA, Huangshan, Anhui Province, 245041, China)

[Abstract] **Objective** To isolate and identify the subgroups of tumor stem-like cells with a highly metastatic potential from Lewis lung cancer (LLC) cell line. **Methods** The ratio of Sca-1 and CXCR4 cells with dual-color immunofluorescent staining in LLC was determined by flow cytometry, and their expression in lung tissue of mice was detected by laser confocal microscopy. $CXCR4^+$ cells were used as a magnetic head in isolation of surface markers on the cells as well as in detection of cell activity before and after isolation. Biological behaviors of subgroups of positive CXCR4 cells were observed and analyzed. **Results** The ratio of Sca-1 and $CXCR4^+$ cells in LLC was 0.1%, and the rate of positive $CXCR4^+$ cells in LLC was 0.18%. Dual-color immunofluorescence-stained cells were observed in mouse lung tissues. The cell activity was (95.58±0.87)% and (94.96±0.76)% respectively, before and after isolation ($P>0.05$). Tumor formation was found in subgroups of positive CXCR4 cells (7×10^3). Negative and positive CXCR cells were inoculated into 3 mice respectively at the concentration of 5×10^5 and 2×10^4 cells. No metastasis occurred in the former group. However, lung metastasis was found in 2 mice and ear metastasis was observed in 1mouse of the latter group. **Conclusion** Subgroups of positive CXCR4 cells in LLC are characterized by certain properties of cancer metastatic stem cells and have the ability to renew themselves and metabolize.

[Key words] cell line, tumor; carcinoma, non-small-cell lung; neoplastic stem cells; mice, inbred C578L; carcinoma, Lewis lung; receptors, CXCR4

Supported by the National High Technology Research & Development Program (863 Program, 2007AA02Z129), the National Natural Science Foundation of China(30901790) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5117). Corresponding author: Chen Zhengtang, E-mail: chenzhengtamg@mail.tmmu.com.cn

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2007AA02Z129);国家自然科学基金(30901790);重庆市自然科学基金(CSTC200BB5117)
[通信作者] 陈正堂,E-mail: chenzhengtang@mail.tmmu.com.cn

癌干细胞(cancer stem cells,CSCs)理论的建立,使肿瘤转移机制研究有了一个新的重要研究方向,因为癌干细胞具备的自我更新和多向分化等特性使其更有可能被选择为转移优势克隆。Hermann 等[1]在胰腺癌干细胞中发现了更具转移潜能的 $CXCR4^+$ 亚群,并认为其存在是胰腺癌发生转移的根本原因之一。我们先前应用磁珠分选方法分离和培养了 $Sca\text{-}1^+$ Lewis 肺腺癌细胞(lewis lung cancer cells,LLC),证实了其具备肿瘤干细胞的某些特性[2],本研究拟在此基础上进一步寻找并验证其中高转移亚群的存在。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基、优等胎牛血清(美国 Hyclone 公司);小鼠 Easy Sep 磁珠分选系统(加拿大 Stem Cell 公司);PE 标记大鼠抗小鼠 CXCR4 单克隆抗体,FITC 标记兔抗小鼠 Sca-1 单克隆,PE、FITC 标记的 IgG 同型对照(美国 eBioscience 公司);兔抗小鼠 CXCR4 多克隆抗体,大鼠抗小鼠 Sca-1 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体,TRITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(武汉博士德公司);小鼠 Lewis 肺癌细胞株由四川大学细胞中心提供;健康 C57BL/6J 小鼠 45 只,4~6 周,雌性,由第三军医大学实验动物中心提供;激光扫描共聚焦显微镜(Leica TCS SP5)由第三军医大学基础医学部中心实验室提供;流式细胞仪(美国 BD 公司),由第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所提供。

1.2 Lewis 肺癌细胞培养

以 LLC 为研究对象,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。

1.3 流式细胞仪检测 Sca-1、CXCR4 抗原表达

取对数生长期的 LLC 细胞,将细胞浓度调整为 1×10^6 个/ml,分别加入 FITC 标记的 Sca-1 1 μl 和 PE 标记的 CXCR4 抗体 5 μl,免疫荧光染色 20 min,PBS 洗涤 2 次,1% 多聚甲醛液固定,流式细胞仪检测,样品各分析 30 000 个以上细胞。

1.4 激光共聚焦显微镜观察小鼠肺癌组织中双阳性细

取对数生长期的 LLC 细胞,制成单细胞悬液,将细胞浓度调整为 5×10^6 个/ml,细胞悬液以 0.2 ml/只接种于 C57BL/6 小鼠右腋皮下,3 周后,将皮下肿瘤组织取出,制成冰冻切片;切片用冰丙酮固定 10 min,PBS 漂洗,5 min×3 次;加入 Sca-1 抗体(1∶100)CXCR4(1∶100),对照组加入 PBS,37 ℃孵育 1 h,4 ℃过夜;第 2 天,加入相应荧光二抗 IgG(1∶100),37 ℃孵育 1 h,PBS 漂洗,山羊血清封闭 5 min×3 次;1 μg/ml DAPI 复染,室温孵育 10 min,5 min×3 次;再用蒸馏水洗 1 min,除去盐结晶;50% 缓冲甘油封片,共聚焦显微镜下观察。

1.5 磁珠分选 $CXCR4^+$ 细胞及分选前后活性检测

将 LLC 细胞制成单细胞悬液,调成 1×10^8 个/ ml,悬于 100 μl 的 DMEM 培养液中;加入 PE 标记的 CXCR4 抗体 20 μl,避光,室温孵育 15 min;加入 EasySep PE selection cocktail 混合液 7 μl,充分混匀,避光,室温孵育 15 min;加入磁珠纳米颗粒 5 μl,充分混匀,室温孵育 10 min;加入含 2% FBS 和 1 mmol/L EDTA 的 PBS 至 2.5 ml,混匀细胞后将试管插入磁极中,静置 5 min;倒掉上清部分,保持磁极与试管倒置状态 2~3 s,然后使试管口恢复向上的位置;重复漂洗 4 次,用无血清的 DMEM 重悬细胞。纯化前后分别取 5 μl 细胞悬液与 5 μl 0.4% 台盼蓝溶液混合后,滴入细胞计数板置于显微镜下观察。不着色、发亮的为活细胞,着色、胞体膨大者为死细胞,计数细胞总数及活性细胞百分比。

1.6 $CXCR4^+$ LLC 的条件培养

将分选的 $CXCR4^+$ LLC 细胞悬浮培养于含有 20 ng/ml EGF、10 ng/ml bFGF、5 mmol/L HEPES、0.5% BSA 的 50 ml 培养瓶中,培养条件为 37 ℃,5% CO_2;每 2~3 天添加新鲜的培养基,倒置显微镜下观察细胞生长状态。

1.7 体内成瘤实验

将分选的 $CXCR4^+$ 细胞、$CXCR4^-$ 细胞按照表 1 密度梯度分别接种于 C57BL/6J 小鼠右腋窝皮下,接种后每 2 天观察 1 次,统计不同亚群种植后的成瘤时间。

1.8 体内转移能力观察

参照成瘤实验结果,$CXCR4^+$ 亚群以 2×10^4/只接种,$CXCR4^-$ 亚群以 5×10^5/只接种,每组各接种 3 只;8 周后处死观察相关器官转移情况;将转移组织固定、包埋,切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜观察形态学改变。

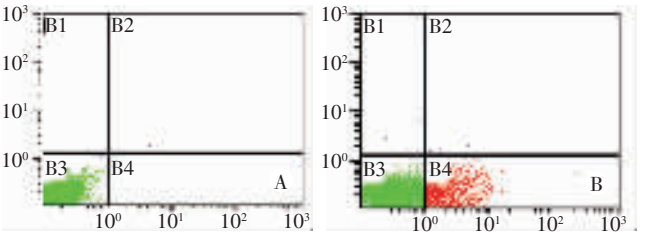
1.9 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,分选前后细胞活性以及 $CXCR4^-$ 亚群、$CXCR4^+$ 亚群成瘤时间的比较均采用 t 检验,所有实验数据采用统计学软件 SPSS 13.0 处理。

2 结果

2.1 双阳性细胞比例测定

流式检测发现 LLC 细胞株中双阳性细胞(B2)比例为 0.1%,CXCR4 阳性细胞(B1+B2)为 0.18%,Sca-1 阳性细胞(B4+B2)为 23.1%,见图 1。



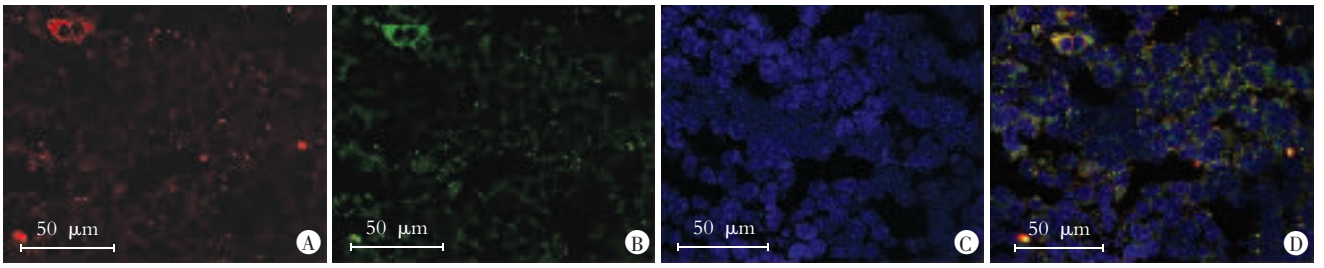
B1:PE 单色荧光区域;B2:PE、FITC 双色荧光区域;B3:双阴性区域;B4:FITC 单色荧光区域

A:同型对照; B:不同亚群比例测定

图 1 流式检测 Lewis 肺癌细胞株 Sca-1、CXCR4 抗原表达情况

2.2 小鼠肺癌组织中双阳性细胞检测

在 Lewis 肺癌肿瘤组织中,可以看到部分细胞呈 Sca-1、CXCR4 染色双阳性,双阳性细胞分散分布于肿瘤组织中,见图 2。



A：CXCR4 荧光染色；B：Sca-1 荧光染色；C：DAPI 复染细胞核；D：荧光叠加

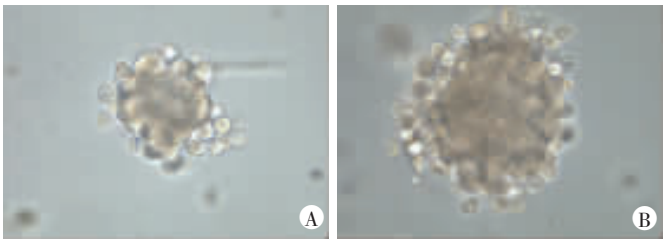
图2 小鼠肺癌组织中的荧光双染色细胞观察

2.3 分选前后细胞活性比较

分选前细胞活力为(95.58 ± 0.87)%，分选后活力为(94.96 ± 0.76)%（$P > 0.05$），显示应用磁珠分选基本不影响细胞活力。

2.4 CXCR4$^+$LLC 的条件培养

分选后的 CXCR4$^+$LLC 细胞培养于条件培养基内呈球型悬浮生长，类似于“胶质瘤细胞球”。培养 1 ~ 2 d 后，可见由少量细胞组成的小细胞球悬浮在培养基内，3 d 后细胞开始增生，细胞集落增大，但可见少部分细胞呈贴壁生长，6 d 形成较大细胞球，见图 3。



A：生长第 3 天；B：生长第 6 天

图3 倒置显微镜观察 CXCR4$^+$亚群无血清培养生长情况（×400）

2.5 成瘤实验

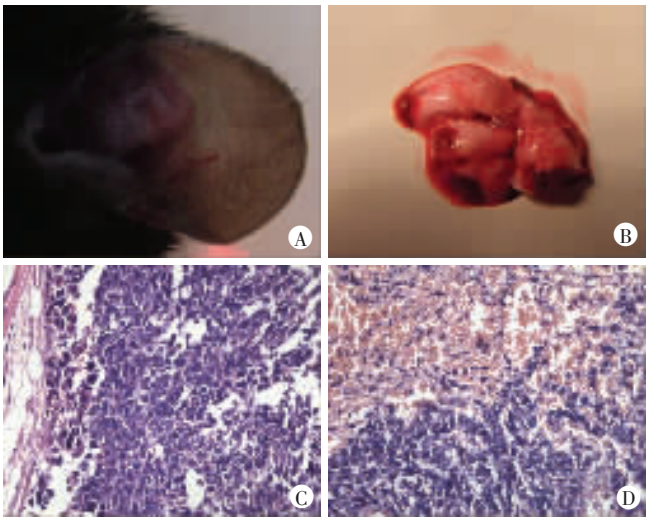
差异梯度密度接种时，CXCR4$^-$亚群成瘤时间为(11.8 ± 1.75) d，CXCR4$^+$亚群成瘤时间为(12.26 ± 1.98) d（$P > 0.05$），表明两亚群种植后成瘤时间并无显著差别；CXCR4$^-$亚群在1×10^5/只不能成瘤，而 CXCR4$^+$亚群在 7×10^3/只仍可成瘤，见表 1。

表1 亚群间成瘤能力比较（成瘤小鼠数/种植小鼠数）

CXCR4	种植细胞数目								
	2×10^6	1×10^6	5×10^5	2×10^5	1×10^5	5×10^4	2×10^4	1×10^4	7×10^3
CXCR4$^-$	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3	0/0	0/0	0/0
CXCR4$^+$	0/0	0/0	0/0	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	1/3

2.6 不同亚群体内转移能力比较

CXCR4$^-$组未发现转移，CXCR4$^+$组均发生转移，其中 2 只发生肺转移，1 只发生耳转移；CXCR4$^+$组转移率显著高于 CXCR4$^-$组；HE 染色显示转移组织中癌细胞浸润生长，见图 4。



A：耳转移大体标本；B：肺转移大体标本；C：耳转移组织（HE ×400）；D：肺转移结节（HE ×400）

图4 转移器官大体标本及病理学变化

3 讨论

肺癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤，其中以非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）最常见，约占总数的 80%，50% 以上的 NSCLC 发现时已局部播散或远处转移。越来越多的研究者认为，NSCLC 发生转移是早期事件，相继在Ⅰ ~ Ⅱ期患者淋巴结、骨髓和外周血中发现了微转移灶和播散的癌细胞（disseminated tumor cell，DTC）[3,4]，更进一步研究证实癌细胞转移能力可能是在 NSCLC 发生起始阶段通过基因表型改变后获得的[5]。

NSCLC 干细胞（或干细胞样细胞）现已以不同方法分离并经体外实验证实具有自我更新能力和高致瘤性[6,7]，这为深入研究 NSCLC 转移机制提供了新的方向。肿瘤干细胞虽然在肿瘤组织仅占极少的比例，但在肿瘤复发转移中发挥着重要作用。Hermann 等[1]发现 CD133$^+$ CXCR4$^+$胰腺癌细胞亚群与 CD133$^+$

CXCR4⁻胰腺癌细胞亚群相比虽有着类似的自我更新能力,但却有着更强的迁徙和转移能力,2周后即可发生肝转移。Dalerba等[8]将之命名为转移性癌干细胞(metastatic cancer stem cells,mCSCs),认为它是肿瘤转移发生的根源之一。

本研究发现具备某些肿瘤干细胞特性的Sca-1⁺LLC中也存在着极少量的CXCR4⁺亚群,双阳性细胞比例为0.1%,并通过激光共聚焦证实小鼠种植瘤组织内确有双染细胞存在。但目前在无菌条件下分离如此微量的双阳性细胞,且需保持细胞良好活性,在方法学上尚有一定困难。鉴于CXCR4⁺ LLC比例为0.18%,近似可视为双阳性细胞,因此,我们以CXCR4为标记进行磁珠分选,分选前后细胞活性并无显著差别,确保了研究对象的高纯度和良好活性。

本研究证实CXCR4⁺ LLC在无血清条件培养基中呈"球状生长",具有较强成瘤性和转移潜能。需要指出的是,CXCR4⁺ LLC成瘤能力高于之前报道的Sca-1⁺ LLC[2]。我们推测,这与CXCR4受体功能有关,作为趋化因子受体的CXCR4不仅与其配体SDF-1α介导了肿瘤细胞趋化和侵袭[9,10],同时它也是许多成体干细胞的重要标志物[11,12]。因此,我们下一步将努力实现无菌条件下Sca-1、CXCR4双阳性细胞的高效分选,为深入研究NSCLC转移干细胞特性奠定基础,进而为NSCLC抗转移治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] Hermann P C, Huber S L, Herrler T, *et al*. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(3): 313-323.

[2] 敖绪军, 钱莘, 安江宏, 等. Sca-1 + Lewis肺癌细胞成瘤实验的研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(20): 2044-2045, 2048.

[3] Nosotti M, Tosi A, Palleschi A, *et al*. Immunocytochemical detection of occult tumor cells in the bone marrow: prognostic impact on early stages of lung cancer[J]. Eur Surg Res, 2008, 41(3): 267-271.

[4] Sher Y P, Shih J Y, Yang P C, *et al*. Prognosis of non-small cell lung cancer patients by detecting circulating cancer cells in the peripheral blood with multiple marker genes[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(1): 173-179.

[5] Brock M V, Hooker C M, Ota-Machida E, *et al*. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 358(11): 1118-1128.

[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] Ho M M, Ng A V, 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.

[8] Dalerba P, Clarke M F. Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(3): 241-242.

[9] 邱际华, 刘求真, 陈丽, 等. CXCR4/SDF-1对鼻咽癌细胞增殖与迁移能力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 598-600.

[10] 赵林涛, 卞修武, 姜建勇, 等. 下调CXCR4表达对胶质瘤干细胞侵袭能力和VEGF分泌量的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(11): 1049-1052.

[11] Ratajczak M Z, Zuba-Surma E, Kucia M, *et al*. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis[J]. Leukemia, 2006, 20(11): 1915-1924.

[12] Ehtesham M, Mapara K Y, Stevenson C B, *et al*. CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells[J]. Cancer Lett, 2009, 274(2): 305-312.

(**收稿**:2009-08-21;**修回**:2009-09-20)

(编辑 栾 嘉)

医学论文对研究对象写作的基本要求

医学论文中描述研究对象(人或实验动物)的选择、基本情况以及研究所采用的方法和观察指标,常用的标题有"材料与方法"、"对象与方法"和"资料与方法"等。临床试验研究应说明试验程序是否经所在单位或地区伦理学相关机构的批准,研究对象或其亲属是否知情并签署知情同意书。观察对象为患者时,须注明病例和对照者来源、纳入标准及一般情况等,必要时还应说明排除标准。临床随机对照研究须交待干预方法的设计(随机方法)和所采用的盲法。研究对象为实验动物时,须注明动物的名称、种系、等级、数量、来源、性别、年(月)龄、体质量、饲养条件、健康状况及实验动物合格证号等。

本刊编辑部