文章编号:1000-5404(2010)05-0499-03

技术方法

鼻咽癌细胞株侧群细胞染色条件的优化及其表面标记物的测定

焦 锋,邱际华,张千兵,姚开泰,刘求真 (510515 广州,南方医科大学肿瘤研究所)

[摘要] **目的** 探讨鼻咽癌细胞株侧群细胞所需荧光染料 Hoechst33342 最佳的孵育时间和浓度;研究细胞密度对侧群细胞比例的影响;测定其表面标记物 CD133 和 ABCG2 蛋白的表达。**方法** 荧光染料 Hoechst33342 孵育细胞,选择不同的时间(30、60、90、120、150、180 min)及不同的浓度(3、4、5、6、7、8 mg/L),用流式细胞仪检测,倒置荧光显微镜观察选择合适的孵育时间和浓度。选取不同生长密度(70%、100%)的细胞,流式细胞仪检测侧群细胞比例的变化。荧光抗体 CD133 和 ABCG2 共孵育 Hoechst33342, 流式细胞仪测定细胞表面标记物 CD133 和 ABCG2 蛋白的表达。**结果** Hoechst33342 孵育时间为 70 min,侧群细胞染色效果较佳。不同的鼻咽癌细胞株,合适孵育终浓度不同, 如 CNE2 为 6 mg/L,而 CNE1 为 2 mg/L。另外,侧群细胞的比例呈生长密度依赖性。CD133 蛋白总含量恒定在 0.1% ~0.2%,侧群细胞和主群细胞表达量没有显著差异,CD133 并不富集于侧群细胞中。而侧群细胞 ABCG2 蛋白较主群细胞优势表达,比例达 80% 以上。**结论** 鼻咽癌细胞株侧群细胞最佳的荧光染料染色时间为 70 min,不同细胞株孵育终浓度不同。侧群细胞的比例呈密度依赖,与 ABCG2 密切相关。

[关键词] 侧群细胞;主群细胞;肿瘤干细胞;流式细胞术;Hoechst33342;鼻咽肿瘤
[中图法分类号] R730.43;R739.63 **[文献标志码]** B

侧群(side population,SP)细胞是一类富集的干细胞,主要表达 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)家族成员 ATP-binding cassette superfamily G member2/breast cancer resistance protein 1 (ABCG2/Bcrp1),现已经在多种正常组织和癌细胞株被发现。侧群细胞具有自我更新,多向分化潜能和修复组织的功能,肿瘤细胞株中的侧群细胞还具有强大的致瘤能力和耐药能力, 可能是肿瘤复发和耐药的根源。本实验主要研究获得鼻咽癌细胞株 SP 细胞染色条件的优化,细胞密度对 SP 细胞比例的影响,并测定其表面标记物 ABCG2、CD133 蛋白的表达,初步探讨三者之间的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

鼻咽癌细胞株 CNE2、CNE1、5-8F、6-10B、HONE1、SUNE1 等由本实验室保存,HK-1 由香港中文大学医学院陶谦教授惠赠,RPMI1640 培养液(HyClone 公司),2.5 g/L 胰酶、胎牛血清(杭州四季青公司),Hoechst33342、维拉帕米(Verapamil,Sigma 公司),PE-CD133 抗体(Miltenyi Biotech 公司),PE-ABCG2 抗体(eBioscience 公司)等。

1.2 仪器

FACSAria 流式细胞仪(BD 公司),倒置荧光显微镜、倒置生物显微镜(Nikon 公司),低温高速离心机、CO_2 恒温细胞培养箱(Harris 公司),台式低速离心机、恒温循环水浴箱(Pharamcia 公司),超净工作台(苏州净化公司)等。

1.3 细胞培养

鼻咽癌细胞株,用含 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,在 37 ℃、50 ml/L 饱和湿度条件下培养, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代,实验选用对数生长期细胞。

1.4 细胞计数和染色

1.4.1 细胞计数 倒置生物显微镜下观察细胞生长状态良好,吸去培养基,D-Hanks 洗 2 遍,加入 2.5 g/L 胰蛋白酶,37 ℃恒温孵箱孵育 2 ~3 min,待大量细胞变圆,加入完全培养基,吸管吹吸数次,移入 10 ml 锥形离心管中,细胞计数板计数,低速离心机 300 r/min 离心 5 min,用 20 ml/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬细胞,调整细胞数为(0.5 ~1.0) $\times 10^6$/ml。

1.4.2 荧光染料 Hoechst33342 染色

1.4.2.1 不同的孵育时间 加入 Hoechst33342 至终浓度 5 mg/L, 37 ℃恒温水浴箱避光水浴 30、60、90、120、150、180 min,每隔 10 min 混匀 1 次。4 ℃低温高速离心机 3 000 r/min 离心 2 min。弃上清,D-Hanks 洗 2 次,重悬于预冷的 20 ml/L 胎牛血清的 D-Hanks 液中。对照组提前加入 Verapamil 至终浓度 50 μmol/L 37 ℃孵箱孵育 30 min,期间每隔 10 min 混匀 1 次,后共孵育 Hoechst33342。流式细胞仪分析,倒置荧光显微镜下观察细胞染色效果,选择合适的孵育时间。

1.4.2.2 不同的孵育终浓度 重复上述步骤 1,选择合适的孵育时间孵育, 调整 Hoechst33342 到不同的终浓度(3、4、5、6、7、8 mg/L),流式细胞仪分析选择合适的孵育终浓度。

1.4.3 细胞荧光抗体 PE-CD133 或 PE-ABCG2 与 Hoechst33342 共染色 Hoechst33342 染完色后,4 ℃低温高速离心机3 000 r/min 离心 2 min,超净台下弃上清,D-Hanks 洗 2 次,离心弃上清加约 100 μl,20 ml/L 胎牛血清 D-Hanks 液,加入 PE-CD133 或 PE-ABCG2 约 1 μl,与 4 ℃冰箱中避光孵育 30 min,期间每隔 10 min 混匀 1 次,后 4 ℃低温高速离心机 3 000 r/min 离心 2 min,去上清,D-Hanks 洗 2 次后,调整细胞数为 5×10^6/ml 重悬于 500 ml, 20 ml/L 胎牛血清 D-Hanks 液,待上流式细胞仪检测。

1.5 流式细胞仪检测

Hoechst33342 的激发光为 375 nm 紫外光,450/40 带通收集红光,675 长通收集红光,PE 的激发光为 488 nm 蓝光,用

[基金项目] 广东省科技计划项目(2007B031515006)
[通信作者] 刘求真,电话:(020)62789410,E-mail:liuqiuzhen@126.com

575/26带通收集红光。应用流式细胞仪,圈出SP和非SP门、PE阳性门,分析各自所占比例。

1.6 倒置荧光显微镜观察

Hoechst33342染料的激发光为紫外光。镜下观察大部分细胞(MP细胞)胞核被染色呈现较强蓝色荧光,小部分细胞(SP细胞)胞核蓝光较弱,应为拒染或淡染的细胞。

2 结果

2.1 荧光染料Hoechst33342孵育时间对鼻咽癌细胞株侧群细胞检测的影响

荧光染料孵育不同的时间均可以出现侧群细胞。流式细胞仪分析,孵育30 min,虽可见侧群细胞,但是未与主群细胞完全分离开,可能是孵育时间不充足。60 min时,侧群细胞比例比较稳定,与主群细胞完全分离开,增加孵育时间,其侧群细胞变化并不明显。倒置荧光显微镜镜下观察,孵育30 min大部分细胞染色较淡,示染色效果不完全。孵育60 min,染色趋于稳定,可见少数淡染或拒染的细胞。增加染色时间,镜下观察未见明显的改变(图1)。与流式细胞仪分析结果一致。Hoechst 33342荧光染料,虽然是低毒性,但长时间的孵育必然会影响细胞活力状态,对以后分选不利,同时为了确保完全的孵育效果,我们选择孵育时间为70 min。

2.2 不同终浓度荧光染料Hoechst33342对鼻咽癌细胞株侧群细胞检测的影响

荧光染料孵育不同的终浓度,均可以出现侧群细胞。但终浓度不同,侧群细胞图形不同,比例不等。浓度过低,侧群细胞比例过高,且未与主群细胞分离开,示染色不完全。浓度过高,侧群细胞比例过低,且会对细胞产生毒性,不利于以后分选。我们选择6 mg/L作为CNE2细胞株的合适的孵育终浓度。加入维拉帕米后,其侧群细胞比例明显减少,从1.3%降为0.1%。5-8F、6-10B、SUNE1细胞株合适的荧光染料终浓度为3 mg/L,HK1、HONE1为5 mg/L,HNE1为4 mg/L,CNE1为2 mg/L。

2.3 不同细胞接种密度影响SP细胞的比例

不同的细胞密度或者细胞融合度会影响侧群细胞的比例。在一定的程度上,细胞的接种密度降低,其侧群细胞的比例也会相应的随之降低。相对于长满瓶底为100%的细胞,长满仅为70%的细胞,提示其SP细胞的比例从1.3%降为0.6%。提示其都可以被维拉帕米所抑制。

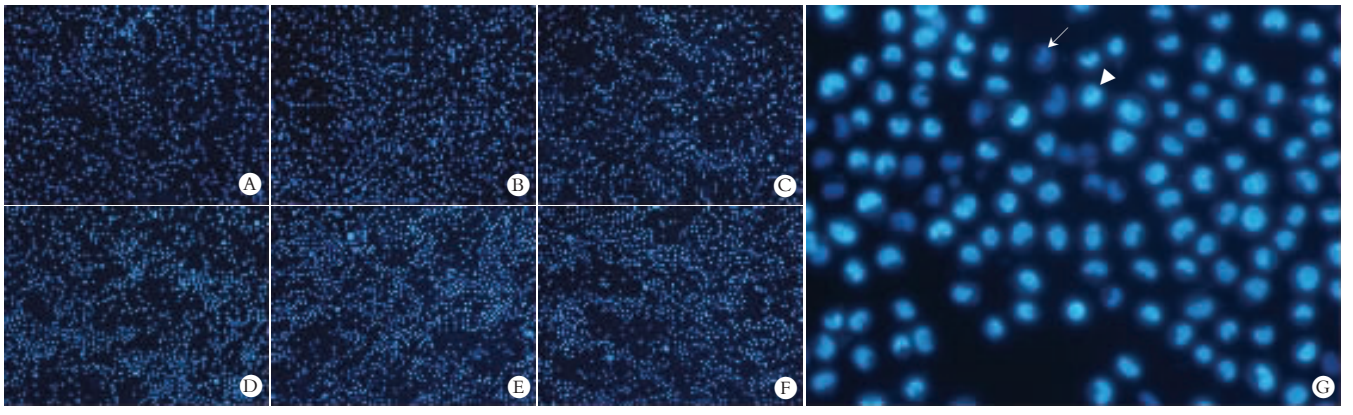
2.4 鼻咽癌细胞株表面标记物ABCG2和CD133蛋白的表达

ABCG2总蛋白的表达为16.1%。其中SP细胞高表达ABCG2,表达量占85.5%,而MP细胞表达仅为9.2%。ABCG2蛋白的表达富集与SP细胞中。CD133总蛋白表达在0.2%左右,SP细胞未见表达,MP细胞表达为0.2%。CD133蛋白的表达并未在SP细胞中富集。

3 讨论

肿瘤干细胞学说[1]认为肿瘤组织中存在极少量肿瘤细胞,具有自我更新能力和分化潜能,是肿瘤增殖生长、转移和复发的根源,肿瘤干细胞现已成为肿瘤研究的热点。目前,主要依据肿瘤细胞表面膜蛋白,黏附分子及受体的差异,通过一些假想的干细胞表面标记[2]分离和鉴定肿瘤干细胞。但是由于大部分的肿瘤尚缺乏特异性的表面标记,因此肿瘤干细胞的分离纯化一直是长久以来亟待解决的难题之一。

而SP细胞作为一种不通过寻找特异性的表面标记,利用荧光染料外排的特性来富集肿瘤干细胞,作为研究肿瘤干细胞的方法是一种理想的途径。Goodell等[3]使用Hoechst染料进行造血干/祖细胞的FACS分析时,常发现一群分布特殊的细胞,经过紫外激发后(用双波长450、675 nm以上监测)可以观察到这群细胞发出微弱的蓝色和红色荧光,在流式二维分析点阵图上,呈彗星分布在主群一侧,因此称为SP细胞。决定检测的细胞中是否含有SP细胞,在于是否存在有对染料Hoechst33342拒染或淡染的细胞亚群,且同时可被维拉帕米(主要阻断ABC转运蛋白家族成员MDR1/PRP活性,抑制荧光染料外排)所阻断。研究表明,细胞染色偏低的原因主要是细胞膜上的ABC转运蛋白家族成员ABCG-2/BCRP-1,能将Hoechst33342泵出胞外,通过转基因技术增加ABCG-2/BCRP-1的表达可以使SP细胞数量增加,故ABCG-2/BCRP-1是造成SP细胞表型的关键[4,5]。鼻咽癌细胞株ABCG2



A~F:×100;G:×200;A:30 min;B:60 min;C:90 min;D:120 min;E:150 min;F:180 min;G:60 min ↑:SP;▲:MP

图1 倒置荧光显微镜下观察Hoechst33342荧光染料孵育不同时间后的SP细胞

蛋白的表达与文献报道相一致,侧群细胞较主群细胞高表达ABCG2,可以达到80%以上,ABCG2阳性细胞中包含了大部分的SP细胞,也包含少部分的非SP细胞,说明鼻咽癌细胞株SP细胞中除了表达ABCG2以外,可能还表达其他的膜转运蛋白。

影响SP细胞的因素有很多。如需要紫外光激发且配备相应的滤片,Telford等[6]曾用小鼠骨髓细胞比较了370、407 nm紫光在SP细胞分选中的异同,发现紫光也可以分离出SP细胞亚群,缺点是紫光激发出的发射光效率低,强度弱于紫外光,点阵图的SP细胞峰较钝,SP细胞比例相对较高,特异性较紫外光差。此外,样本染色,Hoechst33342染料合适的终浓度及孵育时间,水浴箱温度的恒定,流式仪器的操作等都会影响SP细胞的检测和鉴定。Lichtenauer等[7]在研究肾上腺皮质癌细胞株NCIh295R SP细胞时考虑了荧光染料孵育时间的影响,他们通过流式细胞仪和激光共聚焦显微镜共同分析荧光染料分别孵育0、20、90、120、180 min,发现90 min效果最优化,延长或者缩短孵育时间都会影响SP细胞的获得。Srivastava等[8]在研究成神经管细胞瘤细胞株时,分析了荧光染料33342的浓度梯度对SP细胞的影响,发现5 mg/L可能更合适。而Shi等[9]在研究肝细胞癌时,则采用浓度为20 mg/L。Loebinger等[10]研究鳞状上皮细胞癌SP细胞时考虑了孵育时间,细胞密度以及细胞的周期对SP细胞的影响,他们分析得出30 min的孵育时间,鳞状上皮细胞癌SP细胞已经稳定,增加孵育时间不会影响SP细胞的获得,另外他们发现增加细胞密度或者减少增殖期的细胞都将会增加SP细胞的比例接近10倍。本实验通过荧光染料Hoechst33342孵育不同的终浓度和时间,探讨鼻咽癌细胞株侧群细胞染色条件的优化。荧光染料孵育60 min,SP细胞已经稳定。延长时间,SP细胞没有变化,由于长时间的荧光染料的孵育会影响细胞的存活,同时为了保证更好SP细胞孵育的效果,孵育时间70 min可能更为合适。同时,不同的细胞株,染料的合适的孵育终浓度不同,荧光染料浓度过低,SP细胞和MP细胞没有完全分离开,SP细胞染色不完全,浓度过高,SP细胞比例过低,且会对细胞产生毒性,不利于分选以及分选后培养。此外,细胞的生长密度会影响鼻咽癌SP细胞的比例,呈密度依赖性,细胞密度比例低的细胞,其SP细胞的比例也明显降低。以CNE-2细胞株为例,未长满瓶底(约为70%)相对于长满瓶底(设为100%),其SP细胞的比例从1.3%降为0.6%。

表面黏附分子CD133又称AC133,也被称为prominin-1,是一种具有5个跨膜区域的糖蛋白,它有一个显著特点就是其表达随着细胞的分化迅速下调,使它成为一个独特的分离和鉴定干细胞和祖细胞的分子标志。CD133是传统的造血干细胞、血液肿瘤和内皮祖细胞的标志物,在一些实体瘤中也作为肿瘤干细胞的标记物[11]。尽管其生物学功能还不清楚,但作为干细胞的标记物也得到越来越多的证据支持。在鼻咽癌细胞株中,CD133是否可以作为肿瘤干细胞特异性的表面标记物?侧群细胞与CD133的关系如何?尚不清楚。本研究中鼻咽癌细胞株CD133阳性细胞的比例恒定在0.1%~0.2%,但CD133阳性细胞并未富集在侧群细胞中,提示SP细胞和CD133阳性细胞可能是2个不同的细胞亚群,下一步需进行体内外相关实验深入探讨两者之间关系。

目前鼻咽癌干细胞尚缺乏特异性的表面标记物,SP细胞的研究可以为后续进一步研究鼻咽癌干细胞打下一定基础。可以以鼻咽癌SP细胞为研究模型,探讨其自我更新、信号传导通路及肿瘤耐药等方面的机制,进一步寻求肿瘤干细胞特异性的表面标记物,为破译鼻咽癌发生的分子病因以及防治提供新的分子靶点。

参考文献:

[1] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, *et al*. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
[2] Li F, Tiede B, Massague J, *et al*. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis[J]. Cell Res, 2007, 17(1): 3-14.
[3] Goodell M A, Brose K, Paradis G, *et al*. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo* [J]. J Exp Med, 1996, 183(4): 1797-1806.
[4] Challen G A, Little M H. A side order of stem cells: the SP phenotype [J]. Stem Cells, 2006, 24(1): 3-12.
[5] Zhou S, Schuetz J D, Bunting K D, *et al*. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype[J]. Nat Med, 2001, 7(9): 1028-1034.
[6] Telford W G. Analysis of UV-excited fluorochromes by flow cytometry using near-ultraviolet laser diodes[J]. Cytometry A, 2004, 61(1): 9-17.
[7] Lichtenauer U D, Shapiro I, Geiger K, *et al*. Side population does not define stem cell-like cancer cells in the adrenocortical carcinoma cell line NCI h295R[J]. Endocrinology, 2008, 149(3): 1314-1322.
[8] Srivastava V K, Nalbantoglu J. Flow cytometric characterization of the DAOY medulloblastoma cell line for the cancer stem-like phenotype [J]. Cytometry A, 2008, 73(10): 940-948.
[9] Shi G M, Xu Y, Fan J, *et al*. Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(11): 1155-1163.
[10] Loebinger M R, Giangreco A, Groot K R, *et al*. Squamous cell cancers contain a side population of stem-like cells that are made chemosensitive by ABC transporter blockade[J]. Br J Cancer, 2008, 98(2): 380-387.
[11] Mizrak D, Brittan M, Alison M R. CD133: molecule of the moment [J]. J Pathol, 2008, 214(1): 3-9.

(**收稿**:2009-09-07;**修回**:2009-11-02)
(编辑 栾 嘉)