黄梅等[6]研究显示:810 nm 单脉冲激光照射兔眼视网膜功率为 0.35 ~ 1.4 W,脉宽为 0.1 s 的单脉冲时,检眼镜未发现兔眼视网膜的损伤,光镜下受照区视感受器与色素上皮层有轻度水肿及少许渗出。本实验使用激光能量远小于该研究。有国外专利报道使用波长为 890 nm、照射功率 2 mW 组的半导体激光治疗弱视可以获得较高的疗效。国内报道[3,7],照射功率为 0.8 mV、照射距离 10 cm、照射时间为 3 min 的氦氖激光对儿童弱视有治疗作用。由于人眼和动物眼的差异,该实验结果能否直接应用于儿童弱视以及使用的效果和安全性有待于临床的进一步证实。

参考文献:

[1] 杨中伟, 孙佳英, 杨家太, 等. 低强度半导体激光治疗少年儿童弱视逐米观察法的疗效检验[J]. 中国激光医学杂志, 2003, 12(2): 126.
[2] 王双勇, 邱良秀. 半导体激光对豚鼠视网膜电图的影响[J]. 眼视光学杂志, 2008, 10(3): 194 - 197.
[3] 林再雄, 符曼雅, 唐平, 等. 氦氖激光联合弱视综合治疗仪治疗儿童弱视[J]. 中国斜视与小儿眼科杂志, 2007, 15(1): 22 - 25.
[4] 邱良秀, 张泺, 赵小杭, 等. 脉冲氦氖激光治疗弱视[J]. 实用眼科杂志, 1993, 11(1): 42 - 43.
[5] 石迎辉, 王丽娅. 弱激光治疗大龄儿童及成人弱视[J]. 医药论坛杂志, 2006, 27(6): 17 - 18.
[6] 黄梅, 吴楠, 刘翔, 等. 半导体激光对兔眼视网膜损伤及修复的观察[J]. 激光杂志, 2002, 23(3): 85 - 86.
[7] 项玉武. 低功率氦氖激光治疗小儿弱视[J]. 航空航天医药, 2004, 15(1): 26.

(**收稿**:2010-01-02;**修回**:2010-02-09)
(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2010)14-1565-03

短篇论著

人舌癌细胞株 Tca8113 中侧群细胞的分离及其 ABCG2 的表达

刘 凯,季 平,邓 诚,伍明毅 (400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院颌面外科)

[摘要] **目的** 通过流式细胞技术分选人舌癌细胞株 Tca8113 中的侧群细胞(SP 细胞)、非侧群细胞(MP 细胞),检查 ABCG2 蛋白在 SP 细胞、MP 细胞、T(Tca8113)细胞中的表达情况,并探讨其意义。**方法** 用流式细胞仪检测 SP 细胞、MP 细胞、未分选 Tca8113 细胞中的 ABCG2 表达情况。**结果** 人舌癌细胞株 Tca8113 中存在 SP 细胞,ABCG2 在 Tca8113 SP 细胞中较高表达(表达率 13.16%),在 MP 细胞中几乎不表达(表达率 1.07%)、在 Tca8113 细胞中少量表达(表达率 3.29%)。**结论** 人舌癌细胞株 Tca8113 中的 SP 细胞较高表达 ABCG2,通过 $ABCG2^+$ 分选侧群细胞,将有可能进一步分选纯化类肿瘤干细胞,为今后分离肿瘤干细胞提供有效手段。

[关键词] 舌肿瘤;SP 细胞;MP 细胞; 流式细胞术;肿瘤干细胞
[中图法分类号] R73-35;R730.23;R739.86 **[文献标志码]** A

随着肿瘤干细胞的研究不断深入,人们对肿瘤的发生、发展有了全新认识,肿瘤干细胞学说也逐渐被认同,然而肿瘤干细胞身份识别——肿瘤干细胞的分离与筛选是肿瘤干细胞研究的关键,同时亦是制约肿瘤干细胞研究的瓶颈[1]。目前,在头颈鳞癌中较为常见的舌癌肿瘤干细胞特异性表面标志物尚未确定。SP 细胞是在流式细胞检测时可外排 Hoechst33342 的细胞,主要表达 ABC 转运蛋白家族成员 ABCG2,已经在多种正常组织和癌细胞株被发现[2-5]。本实验作为探索发现头颈鳞癌 Tca8113 中肿瘤干细胞特异性表面标志物工程中的一个环节,拟证实外排泵蛋白 ABCG2 是否存在于 Tca8113 细胞的某一部分肿瘤细胞中。

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2005DB5241)
[通信作者] 季 平,电话:(023)89035838,E-mail:jiping@cta.cq.cn

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

人舌癌细胞株 Tca8113,细胞培养液 1640 和小牛血清由重庆医科大学基础研究所提供;鼠抗人 ABCG2 一抗购于 Abcam 公司;Hoechst33342 和碘化吡啶(PI) 购于 Sigma 公司;FITC 标记的羊抗鼠二抗(北京博奥森);ABCG2 转运蛋白阻滞剂维拉帕米(上海禾丰)。

1.2 仪器

FACSAria 流式细胞仪(BD 公司);超净工作台(Air TECH 苏净集团安泰公司制造)、TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机(湘仪离心机)、YCP-200CO2 细胞培养箱(上海易亮医疗器械有限公司)、倒置相差显微镜(Nicon ECLiPSE TE2000-u),37 ℃恒温水浴箱(DK-60,上海贺德实验设备厂),由重医实验室和四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室干细胞生物学研究室提供。

1.3　细胞培养及SP细胞的分选

将人舌癌细胞株Tca8113，培养在含15%小牛血清的1640培养液中，置于5% CO_2，37 ℃饱和温度的培养箱中培养，每日换液待细胞贴壁生长达70%～80%时传代培养。荧光激活流式分选SP细胞的具体步骤如下：①取25瓶已培养的细胞，细胞总量约为10^8。②以0.01% PBS冲洗，适量0.125%胰酶消化，中止消化后，HBSS洗涤，重悬细胞，密度为10^6/ml。③加入Hoechst33342（1 mg/ml）至终浓度为5 μg/ml，对照组同时加入维拉帕米至终浓度为50 μg/ml，37 ℃恒温水浴90 min。④ 90 min后，4 ℃低温离心500 r/min，10 min；收集沉淀，在4 ℃用含20 μg/ml碘化丙啶（PI）的HBSS平衡盐溶液平衡沉淀即为染色好的细胞（PI目的为标记死细胞）。⑤流式细胞仪检测分选，激发光波长为350 nm，上机分选，发光偏弱的即为SP细胞。去除PI阳性死细胞，收集分选出来的SP细胞、非SP细胞（MP细胞）。

1.4　流式细胞术检测ABCG2蛋白的表达

收集（1～3）×10^5数量级的SP细胞、MP细胞和T细胞，分别用200 μl PBS重悬细胞，加入20 μl鼠抗人ABCG2一抗（1∶100稀释），阴性对照组加入等体积PBS，37 ℃孵育30 min。离心半径3 cm、1 000 r/min离心5 min，弃上清，PBS洗2次，离心弃上清。分别加入200 μl PBS重悬细胞，加入20 μl FITC-羊抗鼠二抗（1∶50稀释），避光孵育30 min，离心半径3 cm、1 000 r/min，离心5 min，弃上清，PBS洗2次，离心弃上清，加固定液1%多聚甲醛200 μl，上机检测[6]。

1.5　统计学处理

采用SPSS 12.0统计软件，数据以$\bar{x} \pm s$表示，进行非参数Mann-Whitney检验。

2　结果

2.1　人舌癌细胞株Tca8113的培养情况

人舌癌细胞株Tca8113在含15%小牛血清的1640培养基中呈贴壁生长，生长活跃，2～3 d传代1次，倒置相差显微镜下见细胞呈圆形或椭圆形，胞核较大，细胞看似麦圈状，多个细胞常聚集在一起形成一个细胞团（图1）。

2.2　人舌癌细胞株Tca8113中SP细胞的分离

实验组中Hoechst33342染色后，人舌癌细胞株Tca8113中SP细胞的含量约为0.8%，在对照组中加入了ABCG2转运蛋白阻滞剂维拉帕米后，SP细胞的含量约为0.4%（图2）。

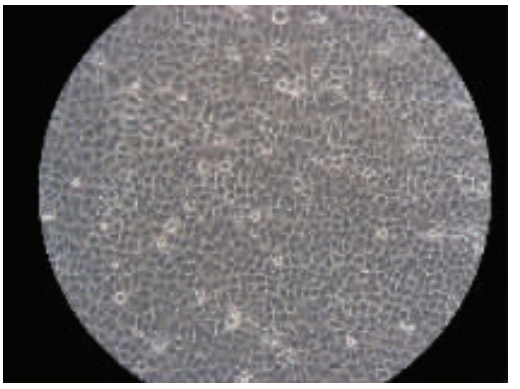
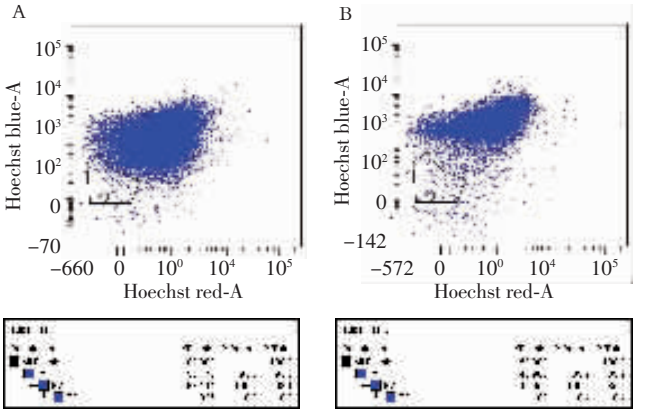


图1　倒置相差显微镜观察人舌癌细胞株Tca8113细胞形态　（×400）



A：Honechst33342染色分选SP细胞；B：Honechst33342染色后加入维拉帕米分选SP细胞

图2　流式细胞仪分选人舌癌细胞株Tca8113中SP细胞的含量

2.3　流式细胞仪检测ABCG2蛋白的表达

结果显示，SP细胞中ABCG2的表达率为13.16%；未分选细胞中ABCG2的表达率为3.29%；MP细胞中ABCG2的表达率为1.07%。与MP细胞相比，SP细胞富集了更多的ABCG2阳性细胞（$P<0.05$，图3）。

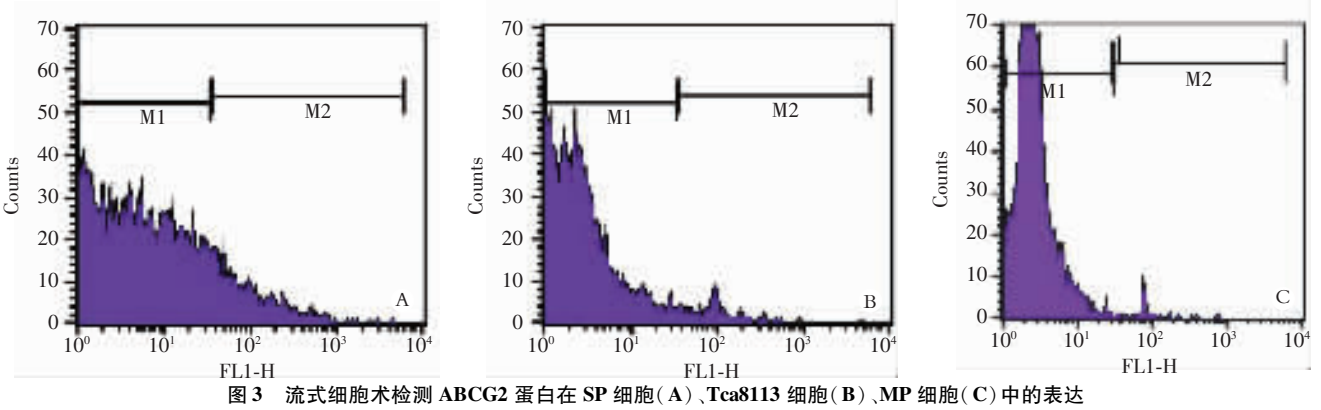


图3　流式细胞术检测ABCG2蛋白在SP细胞（A）、Tca8113细胞（B）、MP细胞（C）中的表达

3 讨论

本实验用流式细胞技术分选人舌癌细胞株 Tca8113 中的 SP 细胞并分别检侧 ABCG2 蛋白在 SP、MP 及未分选 Tca8113 细胞中的表达情况。结果表明，在人舌癌细胞株 Tca8113 分离的 SP 细胞中 ABCG2 的表达率为 13.16% 左右，而 MP 细胞几乎没有 ABCG2 的表达。与 MP 细胞相比，SP 细胞富集了更多的 ABCG2 阳性细胞，但并非所有的 SP 细胞均表达 ABCG2。本研究证实了人舌癌细胞株 Tca8113 中存在极少量的高表达目前已公认的干细胞的表面标志——ABCG2 蛋白[7]的 SP 细胞。SP 细胞是在流式细胞检测时可外排 Hoechst33342 的细胞，具有修复组织功能，自我更新和多向分化潜能，癌细胞株中的侧群细胞还具有强大的耐药能力和致瘤能力，是可能的癌干细胞[8,9]。尽管它们只占细胞总体的一小部分，但在一些研究中他们的特性却有重要作用。SP 细胞在肿瘤组织中高表达 ABC 转运体家族成员 ABCG2 后，会导致肿瘤细胞多药耐药[10]。

肿瘤干细胞具有自我更新和多向分化潜能，在启动肿瘤形成和生长中起决定性作用，是肿瘤生长、转移和复发的根源[11]，并且越来越多的研究证明 SP 表型已逐渐成为分选肿瘤干细胞的候选标志。人们发现 ABCG2 与 SP 表型的形成有关，ABCG2 是由 663 个氨基酸组成的跨膜转运蛋白，属于 ABC 家族中的 ABCG 亚家族的一员。ABCG2 作为一种转运蛋白，在维持细胞自身稳定及机体正常生理功能等方面起着重要作用。随着干细胞研究的不断深入，发现它直接参与了干细胞特性——SP 表型的形成，并且与肿瘤干细胞的多药抗药性及肿瘤的发生和治疗密切相关[5,12,13]。Zhou 等[14]在敲除 ABCG2 基因小鼠的研究中发现，骨髓细胞中 ABCG2 是唯一参与其 SP 表型形成的因素。研究发现 ABCG2 在多种干细胞中表达（但并非所有的干细胞都有此特性，这也为 SP 表型与干细胞的相关性研究带来更多问题和空间）。由 ABCG2 表达与 SP 表型的直接相关性可知细胞对药物敏感性的下降是 ABCG2 的表达造成的，ABCG2 分子能够被钙离子拮抗剂维拉帕米非特异性阻断，抑制染料外排，逆转耐药，使 SP 细胞减少。由此我们推测恶性肿瘤难以根除的原因之一是富集在肿瘤中 SP 细胞上的 ABCG2 蛋白将化疗药物泵出细胞外，降低细胞内药物浓度，从而导致 SP 细胞对化疗药物的敏感性降低，造成治疗效果不理想。

本研究以人舌癌细胞株 Tca8113 为研究对象，证实了舌癌中 SP 细胞的存在，并且分离出了这一小群细胞。随着分子生物学研究的拓展，SP 分选法将会在研究表面标记不清的肿瘤干细胞方面发挥更加重要的作用，为以后靶向肿瘤干细胞治疗提供新方法和思路，同时通过分选癌侧群细胞中的$ABCG2^+$细胞，将有可能进一步纯化类肿瘤干细胞，为今后分离肿瘤干细胞提供实验基础。

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] 焦锋，邱际华，张千兵，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2010，32(5)：499 - 501.
[3] Uezumi A, Ojima K, Fukada S, *et al*. Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341(3): 864 - 873.
[4] Zhang S, Uchida S, Inoue T, *et al*. Side population (SP) cells isolated from fetal rat calvaria are enriched for bone, cartilage, adipose tissue and neural progenitors[J]. Bone, 2006, 38(5): 662 - 670.
[5] Wang J, Guo L P, Chen L Z, *et al*. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line [J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3716 - 3724.
[6] 刘凯，季平，伍明毅. ABCG2 在人舌癌的表达及意义[J]. 重庆医学，2009，38(23)：2922 - 2923.
[7] Robey R W, To K K, Polgar O, *et al*. ABCG2: a perspective[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(1): 3 - 13.
[8] Lechner A, Leech C A, Abraham E J, *et al*. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293(2): 670 - 674.
[9] Zhang P, Zhang Y, Mao L, *et al*. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes[J]. Cancer Lett, 2009, 277(2): 227 - 234.
[10] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, *et al*. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system [J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 506 - 513.
[11] 卞修武. 对肿瘤研究前沿之肿瘤干细胞的几点认识[J]. 第三军医大学报，2008，30(11)：995 - 997.
[12] Hoshi N, Kusakabe T, Taylor B J, *et al*. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics[J]. Endocrinology, 2007, 148(9): 4251 - 4258.
[13] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, *et al*. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2 + and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic[J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6207 - 6219.
[14] 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.

（**收稿**：2010-01-28；**修回**：2010-03-12）
（编辑 王 红）