论著

文章编号:1000-5404(2011)04-0356-04

人卵巢癌细胞系A2780中肿瘤干细胞的分离及鉴定

谢 伟[1],龙海霞[1],张 恒[1],向 橦[1],朱 波[1],谢荣凯[2] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:全军肿瘤诊治研究所[1];妇产科[2])

【摘要】 **目的** 从人卵巢癌细胞系A2780中分离并鉴定卵巢癌干细胞。**方法** 将A2780细胞置于含人重组表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、人重组碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、牛血清白蛋白和人胰岛素的无血清培养基中培养,采用连续传代诱导培养肿瘤干细胞,对每代分离出来的肿瘤干细胞进行流式检测,并对第4代肿瘤干细胞进行免疫荧光检测和逆向分化实验。**结果** 从A2780细胞中成功分离出肿瘤干细胞,在上述无血清培养基中呈悬浮生长,具有很强的自我更新能力,流式检测显示随着传代诱导,CD133阳性率依次升高,免疫荧光进一步证实了CD133是卵巢癌干细胞的表面标记物,诱导分化实验说明其可逆向分化成为A2780肿瘤细胞。**结论** 体外培养的卵巢癌细胞株A2780中存在卵巢癌干细胞,并能将其分离培养和诱导分化。

【关键词】 卵巢肿瘤;肿瘤细胞,培养的;肿瘤干细胞;分离;鉴定
【中图法分类号】 R329.2;R73-354;R737.31 【文献标志码】 A

Isolation and identification of ovarian cancer stem cells from ovarian cancer cell line A2780

Xie Wei[1], Long Haixia[1], Zhang Heng[1], Xiang Tong[1], Zhu Bo[1], Xie Rongkai[2] ([1]Institute of Cancer, [2]Department of Gynaecology and Obstetrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To isolate and identify ovarian cancer stem cells from ovarian cancer cell line A2780. **Methods** The A2780 cells were cultured in serum-free medium with EGF, bFGF, insulin and BSA to induce tumor stem cells by continuous passage. Flow cytometry was applied to identify the cancer stem cells in every passage. Immunofluorescence staining and reverse differentiation experiments were conducted on the fourth passage of cancer stem cells. **Results** The ovarian cancer stem cells were successfully isolated from ovarian cancer cell line A2780. They formed typical neurospheres in serum-free medium, and had strong self-renew capacity. The results of flow cytometry illustrated that CD133 positive rate was increased with the passages of cancer stem cells. Immunofluorescence staining further confirmed that $CD133^+$ cells were the surface marker of ovarian cancer stem cells, and they could differentiate into ovarian cancer cells in reverse differentiation experiments. **Conclusion** There were ovarian cancer stem cells in ovarian cancer cell line A2780, which can be isolated, cultured and differentiated.

【**Key words**】 ovarian neoplasms; tumor cells, cultured; neoplastic stem cells; isolation; identification

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30901592). Corresponding author: Xie Rongkai, E-mail: xrkai@163.com

肿瘤干细胞是肿瘤组织中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的细胞,具有连续增殖和向不同表型分化的能力。在肿瘤组织中,肿瘤干细胞能够分化为新的肿瘤细胞,其不对称的分裂导致了肿瘤组织的异质性[1]。它对化疗药物及放射治疗有很强的抵抗性,已成为肿瘤治疗的瓶颈。越来越多的研究表明,肿瘤干细胞可能作为肿瘤临床治疗的一个新的靶点[2]。然而,并不是所有的肿瘤干细胞都有明显的标记物,并且肿瘤组织中仅含有极少量的肿瘤干细胞(0.2%~1.0%)[3]。因此,分离及鉴定肿瘤干细胞已成为肿瘤基础研究中的一个重要课题。

卵巢癌是女性常见的生殖系统恶性肿瘤,其早期常无明显症状,超过三分之二的病例在发生转移时症状才显现[4],严重威胁着女性的生命健康。目前,临床上治疗卵巢癌的常规方法是手术及化疗,但治疗后容易复发及扩散,严重影响患者长期生存。近年来,肿

【基金项目】 国家自然科学基金(30901592)
【通信作者】 谢荣凯,E-mail:xrkai@163.com

瘤干细胞理论的兴起，给卵巢癌临床治疗提供了一个新的方向。

肿瘤干细胞分离通常采用细胞表面标记物分离法和生物学特征分离法。在卵巢癌中，Zhang 等[5]采用 CD44 和 CD117 作为标记，从卵巢癌原位瘤中分离出卵巢癌干细胞，并经小鼠体内实验研究发现其具有致瘤性和连续增殖的能力等肿瘤干细胞的特性。CD133 是经典的肿瘤干细胞标记分子，乳腺癌、脑胶质瘤、肝癌、结肠癌、前列腺癌等多种实体瘤中存在的 $CD133^+$ 肿瘤细胞群具有干细胞特性。Ferrandina 等[6]研究发现，原发性卵巢癌中 $CD133^+$ 细胞和 $CD133^-$ 的细胞亚群相比具有更强的克隆能力和增殖能力。体外扩增的 $CD133^+$ 卵巢癌细胞具有类似神经干细胞球的生长特性、多向分化及自我更新能力。本研究采用含有数种细胞因子的无血清培养基成功诱导了卵巢癌干细胞，为后续肿瘤干细胞生物特性的研究及肿瘤干细胞靶向药物的筛选奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

细胞株：卵巢癌细胞株 A2780 购自美国典型培养物收藏中心(ATCC)，细胞在 37 ℃，5% CO_2 培养箱内饱和湿度条件下培养，培养液为 DMEM(HyClone 公司)，并加入 10% 标准胎牛血清(FBS，TBD 公司)，

主要试剂：人重组表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF，PeproTech 公司)，人重组碱性成纤维生长因子(FGF-basic，PeproTech 公司)，人重组胰岛素(Sigma 公司)，牛血清白蛋白(BSA，Sigma 公司)，APC 标记的鼠抗人 CD133 流式抗体购自美天旎公司，APC 标记的鼠来源 IgG 同型对照抗体(美国 ADL 公司)，纯化的兔抗人 CD133 抗体购自 Abcam 公司，FITC 结合的羊抗兔二抗购自 eBioscience 公司。

1.2 细胞培养

肿瘤细胞的培养：A2780 细胞株的培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，在 37 ℃，5% CO_2 的条件下培养。每 2～3 天换液 1 次。实验取对数生长期的细胞。

肿瘤干细胞的无血清培养：取对数生长期的 A2780 肿瘤细胞，去除旧培养基，用 0.25% 的胰酶消化，加入 DMEM/F12 + 10% 胎牛血清终止消化后，转入离心管，以 800 r/min 离心 5 min，弃上清。随后加入无血清培养液(含有 EGF、bFGF、BSA 和人胰岛素的 DMEM/F12 培养基)，使用吸管机械吹打后，用 40 μm 筛网过滤，计数后以 20 000/孔的细胞密度种植于 6 孔板中，每孔 4 ml。在 37 ℃，5% CO_2 的条件下培养，并随时观察细胞的生长情况。

1.3 流式细胞检测

待培养基中细胞开始有细胞悬浮起来时，用吸管吹打悬浮成团的细胞后，然后转入新的培养孔进行无血清培养及传代。由于肿瘤干细胞球体积过大后难以吹散，所以传代间期应控制在 5～7 d。将不同代数的干细胞采用低速离心机以 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞后，干细胞浓度调整至 1×10^7/ml，取 100 μl 细胞液，分别加入 1 μg 荧光素标记的鼠抗人 CD133 抗体，对照组加入同型鼠 IgG 抗体，室温放置 30 min 后，用 PBS 离心洗涤 2 次，重悬细胞于 200 μl PBS 中，上机检测 CD133 的阳性率。

1.4 免疫荧光检测

取第 4 代对数期卵巢癌干细胞，以 800 r/min 离心 5 min 进行甩片离心，将干细胞甩片至玻片上，随后将玻片置于冰冻的 4% 多聚甲醛中，固定 20 min，用 PBS 小心漂洗 3 次，采用 5% BSA 封闭 20 min，甩干玻片。以 1∶300 的比例加入兔抗人 CD133 一抗，4 ℃冰箱孵育过夜。次日，取出 4 ℃孵育的玻片，室温静置 10 min，PBS 洗涤 3 次，以 1∶500 的比例滴加 FITC 标记的羊抗兔二抗，37 ℃孵育 30 min。荧光素标记的二抗在 37 ℃ 下避光孵育 30 min，随后 PBS 洗涤 3 次后，滴加即用型的 DAPI 染色 3 min，PBS 洗涤 3 次，采用抗荧光淬灭的封片剂封片，在激光共聚焦显微镜下观察、照相。

1.5 肿瘤干细胞的诱导分化

单细胞悬液传代 4 次后，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，用含有 10% FBS 的 DMEM 培养液重悬，接种于 6 孔板中。37 ℃，5% CO_2 的条件下培养，培养 7 d 后，采用相差显微镜观察细胞形态变化。

2 结果

2.1 无血清诱导培养

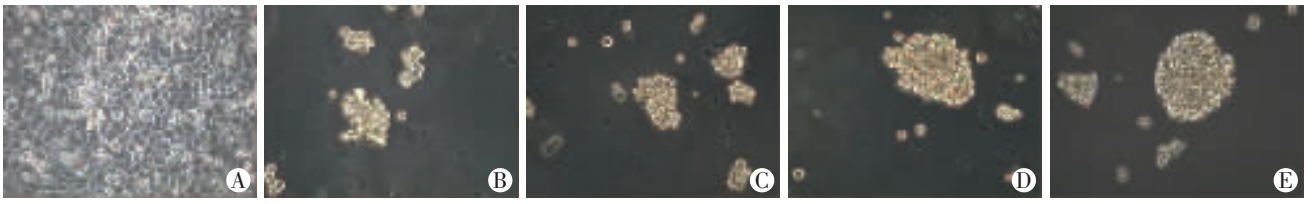
A2780 细胞株接种于含有血清的 DMEM 培养基中，24 h 即可见贴壁，3～5 d 细胞融合度≥80%。接种于无血清培养基内，绝大部分细胞贴壁分化，仅少部分细胞呈悬浮状态，24～48 h 后，培养基中开始出现悬浮生长的细胞球，此时的细胞球较小，细胞显圆形，大小一致，折光性强，立体饱满(图 1)。此后每次传代，悬浮于培养基中的细胞球逐渐增多，体积逐渐增大，形态更加规则。每次传代前，晃动 6 孔板，可见悬浮于培养基中的肿瘤干细胞，传代后 24～48 h 后，就可见次代肿瘤干细胞球的形成，并且数量逐渐增多、体积增大，形状规则。经过 7 次传代，干细胞仍保持良好的克隆形成能力，形态和初代干细胞球相似，充分显示其自我更新的能力(图 1)。

2.2 流式细胞仪分析

流式检测结果显示，与同型对照相比，$CD133^+$ 细胞在 A2780 干细胞各代中含量变化很大，原代 CD133 干细胞阳性率仅为 1.16%，而第 1、3、5 代和 7 代 CD133 干细胞阳性率分别为 7.31%、20.20%、44.33% 和 92.69%，阳性率呈明显上升趋势。这就充分说明，连续无血清传代培养能够提高 A2780 干细胞的诱导率，并且 CD133 是其特异性标志物。

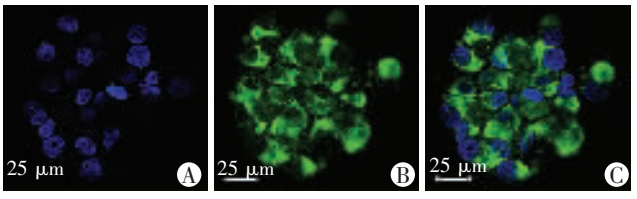
2.3 免疫荧光检测

A2780 干细胞 CD133 免疫荧光染色后，在激光共聚焦显微镜下可以观察到(图 2)，其细胞质和细胞膜因结合 FITC 标记二抗而显绿色荧光，为 CD133 阳性；细胞核因 DAPI 染色而显蓝色。这就进一步证明了我们采用无血清培养基诱导出了卵巢癌干细胞。



A:贴壁细胞(×200);B:第1代(×400);C:第3代(×400);D:第5代(×400);E:第7代(×400)

图1 肿瘤干细胞球相差显微镜观察

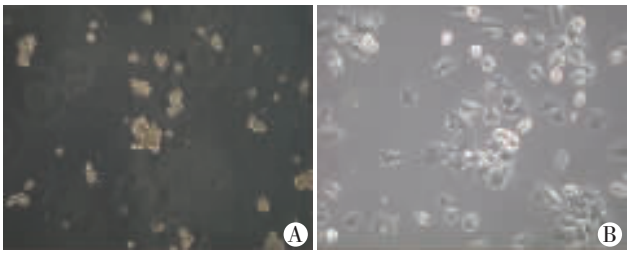


A:DAPI;B:CD133;C:A、B图叠加

图2 CD133阳性卵巢癌干细胞荧光显微镜观察

2.4 干细胞诱导分化情况

第7代卵巢癌干细胞接种于含血清的培养基4 h后,发现开始有干细胞球贴壁,并有细胞从干细胞球中迁移出来;24 h后,干细胞球体变扁,形状不规则,迁移出来的细胞增多;4~6 d时,贴壁细胞数量明显增加,铺满培养瓶壁,与原A2780细胞株贴壁情况相似,这就说明A2780干细胞具有逆向分化的能力(图3)。



A:分化前;B:分化后

图3 相差显微镜观察卵巢癌干细胞分化改变 (×200)

3 讨论

研究发现肿瘤组织中存在明显的异质性,这就意味着多数恶性肿瘤组织是由具有不同增殖潜能和移植后生存潜能的细胞群组成[7]。从细胞的形态上来看,这些肿瘤可能是由一小群肿瘤干细胞增殖而来,从而产生不同表型和增殖潜能的肿瘤细胞[8]。在20世纪70年代研究者就提出肿瘤是一种干细胞疾病,但由于当时没在肿瘤中分离出相应的干细胞,所以该研究一直处于停滞阶段[9]。1997年,Bonnet等[10]以$CD34^+CD38^-$为肿瘤干细胞标记,首次从急性白血病病人体内分离出肿瘤干细胞,虽然此类细胞仅占肿瘤细胞的5%,但却具有极强的自我更新和增殖潜能的干细胞特性。

目前国内外报道已利用多种方法从卵巢癌组织中成功分离出肿瘤干细胞[11-12]。然而,肿瘤组织来源困难,分离培养时技术繁琐、成本高,限制了对卵巢癌干细胞生物学特性的研究。A2780是较为常用的卵巢癌细胞株,如能成功分离培养卵巢癌干细胞,将为后续卵巢癌干细胞生物学特性的研究和靶向药物的筛选提供价廉、方便的途径。本研究采用无血清悬浮培养的方法证实了卵巢癌细胞株A2780中存在一小群具有自我更新及连续增殖潜能的细胞,这一小群细胞经过多次传代筛选,可在无血清条件下悬浮生成成肿瘤干细胞球。无血清悬浮培养的方法最初应用于神经干细胞的分离,后来在胶质瘤干细胞的分离中得到了证实[13],即用CD133作为干细胞的表面标记物,筛选出的$CD133^+$胶质瘤干细胞群在无血清的条件下可以悬浮成细胞球并能连续增殖,而$CD133^-$细胞群贴壁,不能增殖及形成细胞球。这说明只有干细胞可以在无血清的条件下存活,所以用这种培养方法可以用来筛选干细胞群。

为了证实肿瘤干细胞球具有自我更新及连续增殖特性,我们将A2780干细胞球连续传了7代,发现细胞球的形成具有增加的趋势。这就进一步说明了干细胞的存在以及肿瘤干细胞的很强的单克隆能力。为了证实A2780干细胞的可逆性分化,我们将成球的干细胞接种到有血清的DMEM培养基中,数小时后发现其开始贴壁,数天后贴壁细胞明显增加,贴壁的细胞形态和A2790细胞株形态相似,这就证明了在无血清培养条件下,肿瘤细胞可以保持未分化的状态。

近年来,也有报道利用磁珠分选法和流式分选法,根据肿瘤干细胞表面标记物进行分离肿瘤干细胞,如$CD44^+/CD24^-$用来分离乳腺癌干细胞,$CD34^+/CD38^-$用来分离急性白血病干细胞[14]。在本研究中,我们采用无血清悬浮传代培养的方法进行分离卵巢癌干细胞,就是根据肿瘤干细胞在无血清条件下会保持未分化的状态。随后,我们分别采用流式细胞术和免疫荧光检测了干细胞的标记物CD133的阳性表达率。本研究对传代的7代卵巢癌干细胞分别进行了流式检测,从结果可以看出,CD133阳性率随着传代的次数逐渐升高,这就说明了A2780干细胞显CD133阳性,从侧面也证明了A2780干细胞的很强的自我更新能力。在免疫荧光检测中,我们发现CD133抗原主要表达于卵巢癌干细胞胞浆和胞膜上。

肿瘤干细胞已成为肿瘤领域研究的热点,尽管这项研究还不太成熟,还没形成系统的理论,但肿瘤干细胞的成功分离及鉴定对肿瘤学基础和临床研究具有重要的意义。本研究采用无血清诱导培养的方法,以 CD133 阳性抗原作为干细胞标记物,从 A2780 细胞株中分离鉴定肿瘤干细胞,为后续肿瘤干细胞生物特性的研究及肿瘤干细胞靶向药物的筛选奠定了基础。

参考文献:

[1] Bapat S A. Evolution of cancer stem cells[J]. Semin Cancer. Biol, 2007, 17(3): 204 - 213.
[2] Zhao R C, Zhu Y S, Shi Y. New hope for cancer treatment: exploring the distinction between normal adult stem cells and cancer stem cells [J]. Pharmacol Ther, 2008, 119(1): 74 - 82.
[3] Wicha M S, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea: a paradigm shift[J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 1883 - 1890.
[4] Liu L, Zhang X, Du C, *et al*. MEK1-independent activation of MAPK and MEK1-dependent activation of p70 S6 kinase by stem cell factor (SCF) in ovarian cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 382(2): 385 - 389.
[5] Zhang S, Balch C, Chan M W, *et al*. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors[J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4311 - 4320.
[6] Ferrandina G, Bonanno G, Pierelli L, *et al*. Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2008, 18(3): 506 - 514.
[7] Dick J E. Breast cancer stem cells revealed[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3547 - 3549.
[8] Brazelton T R, Rossi F M, Keshet G I, *et al*. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice[J]. Science, 2000, 290(5497): 1775 - 1779.
[9] Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2004, 51(1): 1 - 28.
[10] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. Nat Med, 1997, 3(7): 730 - 737.
[11] Alvero A B, Chen R, H H, *et al*. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravel the mechanisms for repair and chemoresistance[J]. Cell Cycle, 2009, 8(1): 158 - 166.
[12] Bapat S A, Mali A M, Koppikar C B, *et al*. Stem and progenitor - like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3025 - 3029.
[13] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, *et al*. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821 - 5828.
[14] 朱言亮, 陈龙邦, 王靖华, 等. 肺腺癌细胞株 SPC-A1 中侧群细胞的分离与肿瘤干细胞样特征的鉴定[J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11(5): 681 - 685.

(收稿:2010-10-13 修回:2010-11-10)
(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2011)04-0359-01

个案与短篇

高原习服适应中白细胞线粒体 DNA 拷贝数的变化规律

罗勇军,刘福玉,陈 丽,高钰琪 (400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系高原疾病学教研室,高原医学教育部重点实验室,全军高原生理与高原病研究重点实验室)

【关键词】 线粒体 DNA;拷贝数;高原;习服
【中图法分类号】 R329.28 【文献标志码】 B

线粒体是机体能量工厂,是组织、细胞氧利用的关键场所。90% ~95% 机体耗能通过线粒体的氧化磷酸化作用获得[1]。线粒体在细胞、组织和机体的低氧习服适应过程中发挥着重要的作用[1-2]。线粒体 DNA(mtDNA)与线粒体的功能密切相关,mtDNA 的数量及序列变化可能导致线粒体的功能改变[2-3]。因而本研究观察移居高原 1 年的受试者及高原肺水肿患者白细胞 mtDNA 的拷贝数变化,探讨高原习服适应中 mtDNA 的拷贝数变化规律。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及设备

人血液基因组 DNA 提取试剂盒(OMEGA 公司,美国),定量 PCR 试剂盒(大连宝生物公司);实时荧光定量 PCR 仪(Opticn monitor 1,美国)。

1.2 分组及标本采集

随机选取已经获得高原适应的世居藏族(n = 20),完全高原习服的移居汉族(n = 20),以及未到过高原的平原汉族(n = 19)健康青年男性作为受试者,年龄(19 ± 3)岁、职业均为劳动强度相当的军人。按照中华医学会高原肺水肿的诊断标准,选取年龄相匹配的高原肺水肿患者 20 例[3]。分别在平原和高原采集上述标本空腹静脉血 2 ml(EDTA 抗凝),-20 ℃保存。世居藏族受试者 3 代均为藏族,其本人在西藏高原地区(3 658 m)出生、成长。移居汉族受试者本人在平原出生,从平原移居到 3 700 m 高原时间 1 年,在高原期间未发生急性高原病。上述的样本收集过程中遵循《赫尔辛基宣言》,本研究得到了收集对象的知情同意。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取与定量 采用 OMEGA 公司的全血基因组

(下转 375 页)

【基金项目】 国家自然基金面上项目(30900715);国家科技支撑计划(2009BAI85B01)
【通信作者】 高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail:gaoy66@yahoo.com