论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1396-04

前胃泌素在人胃癌BGC-823细胞的悬浮肿瘤球中的表达

牛 茜,杨爱军,王晨昱,刘 伟,李 敏 (730000 兰州,兰州大学基础医学院病理学研究所,甘肃省新药临床前研究重点实验室)

【摘要】 **目的** 研究人胃癌BGC-823肿瘤细胞系中是否存在悬浮生长的肿瘤球,检测前胃泌素(progastrin,Pro-GRP)在肿瘤球中的表达。**方法** 取贴壁生长的BGC-823细胞,用有限稀释法和无血清培养法培养,并利用软琼脂克隆形成实验证实BGC-823中存在悬浮生长的具有干细胞特性的肿瘤球,流式细胞仪(FCM)检测该肿瘤球中ABCG2、CD44、CD166的表达。ELISA、细胞免疫荧光、FCM方法比较血清Pro-GRP分别在肿瘤球和贴壁细胞中的表达差异。**结果** 有限稀释法和无血清培养法均在BGC-823细胞系中培养出了悬浮生长的肿瘤球;克隆形成能力显示:肿瘤球为(37.63±5.99),贴壁细胞为(10.75±3.37),二者间有统计学差异($P<0.01$);FCM显示肿瘤球ABCG2的表达率(57.17±3.49)明显高于贴壁细胞(8.67±0.77)($P<0.01$);血清Pro-GRP在肿瘤球中的表达(73.37±9.42)明显高于贴壁细胞(5.11±1.03)($P<0.01$)。**结论** 人胃癌BGC-823细胞系中存在悬浮生长的肿瘤球,Pro-GRP的表达与肿瘤球有关。

【关键词】 胃癌细胞系BGC-823;肿瘤球;前胃泌素;FCM

【中图法分类号】 R73-354;R730.23;R735.2 【文献标志码】 A

Expression of progastrin in tumor spheres of human gastric BGC-823 cells

Niu Qian, Yang Aijun, Wang Chenyu, Liu Wei, Li Min (Institute of Pathology, Basic Medical College, Lanzhou University, Key Lab of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore whether there are suspension tumor spheres in human gastric BGC-823 cells, and investigate the expression of progastrin (Pro-GRP) in the tumor spheres. **Methods** Adherent cells were cultured by limit diluting and serum-free culture, then the existence of suspended cells that possessed the characteristic of stem cells was identified by colony formation capability assay. Flow cytometry was used to detect the expression of ABCG2 CD44 and CD166. The expression of Pro-GRP in the tumor spheres and the adherent cells was detected by ELISA, immunofluorescence and flow cytometry. **Results** The suspended tumor spheres were formed by limit diluting assay serum-free culture. The difference of colony formation was significant between suspended tumor spheres (37.63±5.99) and adherent cells (10.75±3.37) ($P<0.01$). The expression of ABCG2 in suspended tumor spheres was obviously higher than adherent cells (57.17±3.49 *vs* 8.67±0.77, $P<0.01$). The expression of Pro-GRP in suspended tumor spheres was markedly higher than adherent cells (73.37±9.42 *vs* 5.11±1.03, $P<0.01$). **Conclusion** Tumor spheres exist in human gastric BGC-823 cells, and Pro-GRP expression is related to tumor spheres.

【**Key words**】 gastric neoplasm cells; tumor spheres; progastrin; flow cytometry

Corresponding author: Li Min, E-mail: limin@lzu.edu.cn

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,严重威胁人类生命,在我国胃癌发病率一直高居不下,尤其在我省河西走廊一代更是居于首位。胃癌的发生很可能起源于正常胃干细胞,但一直缺乏客观可靠的直接证据。胃癌起源的最新研究认为胃癌源于骨髓细胞中的间充质干细胞[1]。Goodell等[2]首次于骨髓细胞中发现了一群染色很浅的细胞,称为侧群(side population,SP)细胞,体积较小。有研究证明SP细胞具有干细胞的自我更新和多向分化潜能,在一定程度上可以代表干细胞[3-5]。近些年,在实体肿瘤中也发现了SP细胞的存在[5-6]。

胃泌素是一种重要的胃肠激素[7],它对于食物的消化有着很重要的调节作用,并且可以促进胃肠道上皮细胞的再生。前胃泌素(Progastrin,Pro-GRP)是胃泌素释放肽(GRP)的前体结构。Pro-GRP在近几年被研究者发现可以作为一些肿瘤的标记物[8-10],在小细胞肺癌、结直肠癌[10]的患者血样中Pro-GRP异常增高,而在正常人抽样血样中,其含量很低,将患者的肿瘤组织切除后,其血中Pro-GRP的含量明显下降,这也

【通信作者】 李 敏,E-mail:limin@lzu.edu.cn

暗示肿瘤组织是 Pro-GRP 的来源。

近些年,有学者已经在结直肠癌中发现了血清前胃泌素对 $CD133^+$ 的干细胞的生长起到非常关键的作用[10],提示前胃泌素与干细胞之间存在着一定的关系。既然前胃泌素产生在胃部,本研究采用无血清和有血清分别培养胃癌 BGC-823 细胞,利用软琼脂克隆形成能力实验、ELISA、细胞免疫荧光染色、流式细胞仪比较肿瘤球和贴壁细胞中 Pro-GRP 的表达差异,结果显示在用无血清培养的肿瘤球中 Pro-GRP 的表达要明显高于有血清培养的贴壁细胞。由于近些年对肿瘤干细胞的表面分子标记物的争议一直存在,且对于胃癌干细胞尚无明确的标记物,所以本研究选取在胃癌中较为常用的人腺苷三磷酸结合盒转运体 G2(ABCG2)(SP 细胞的表面标记物)、CD44、CD166 三种标记物用于比较克隆球和贴壁细胞表达的不同,旨在观察前胃泌素与胃癌 BGC-823 细胞中干细胞的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞系 BGC-823 为本实验室保存。DMEM/F12 细胞培养液(Gibco 公司)、胎牛血清(杭州四季青公司)、B27、表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(Gibco 公司)、胰岛素(江苏万邦公司)、100 U/ml 青霉素、80 mg/ml 链霉素、L-谷氨酰胺(Sigma),胰蛋白酶(武汉博士德公司)。ABCG2 兔抗人多克隆抗体(mAb)、Pro-GRP 兔抗人 mAb(上海蓝基生物科技有限公司),FITC 标记山羊抗兔、DAPI/PI(武汉博士德公司)、Pro-GRP-ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)、FACS Aria 型流式细胞仪(BD 公司),倒置相差荧光显微镜(尼康公司)。

1.2 方法

人胃癌细胞株 BGC-823,用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 的青霉素和 80 mg/ml 链霉素的 DMEM/F12 培养液,在 37 ℃、含 5% CO_2、饱和湿度条件下培养,0.25 g/L 的胰蛋白酶消化、传代。实验选取对数生长期细胞。

1.2.1 无血清培养法培养 BGC-823 肿瘤细胞球 按照 bFGF 10 ng/ml、EGF 20 ng/ml、B27 10 μl/ml 和胰岛素 5 μg/ml 的剂量将各生长因子加入到经过过滤除菌的 DMEM/F12 培养液中。胰酶充分消化贴壁培养的 BGC-823 细胞成为单个散在的细胞,收集细胞,PBS 洗涤离心 2 次后,重置与上述无血清培养基中,配成细胞浓度为 1×10^3/ml 的细胞悬液。

1.2.2 有限稀释法 选取对数生长期的贴壁细胞,胰酶消化成单细胞悬液,收集后,台盼蓝染色做活细胞记数(活细胞比率 >95%),一部分细胞移入有血清培养基中混匀,另一部分细胞移入配好的无血清培养基中混匀,将 2 组细胞悬液分别加入到 96 孔板中,每孔 1 μl,平均每空 1 个细胞显微镜下确认只含有 1 个细胞的空,并作标记。在有血清培养的单细胞孔中添加 150 μl 的有血清培养基,在无血清培养的单细胞孔中添加 150 μl 的无血清培养基,观察其生长。1 周后换液,当单个细胞长成集落,覆盖到孔的 1/2 时,消化吸出移至 24 孔板扩大培养,依次逐级扩大培养。

1.2.3 软琼脂克隆形成能力实验 取对数生长期细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化并轻轻吹打,使之成为单细胞,做活细胞计数,用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液调整细胞密度至 1×10^6/L。然后根据实验要求作梯度稀释。用蒸馏水分别制备出 1.2% 和 0.7% 两个浓度的低熔点琼脂糖液,高压灭菌后,维持在 40 ℃中不会凝固。按 1∶1比例使 1.2% 的琼脂糖和 DMEM/F12 培养基(含有双抗和 20% 的胎牛血清)混合后,取 3 ml 混合液注入直径 6 cm 平皿中,冷却凝固,可作底层琼脂置 CO_2 温箱中备用。按 1∶1比例让 0.7% 的琼脂糖和 DMEM/F12 培养基(含有双抗和 20% 的胎牛血清)在无菌试管中相混以后,再向管中加入 0.2 ml 的细胞悬液,充分混匀,注入铺有 1.2% 琼脂糖底层平皿中,逐形成双琼脂层。待上层琼脂凝固后,置入 37 ℃,5% CO_2 温箱中培养 10 ~ 14 d,把平皿放置在倒置显微镜下,观察并计算克隆形成率。

1.2.4 ELISA 测定 Pro-GRP 胰酶分别充分消化贴壁细胞和悬浮细胞球成单个散在细胞,对二者分别进行细胞计数,调成 1×10^3/ml。将贴壁细胞重置于含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液中,悬浮细胞重置于上述无血清培养基中。24、48、72 h 时分别吸取上述 2 组细胞的细胞上清液,离心后用 ELISA 的试剂盒进行前胃泌素的测定,以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的光密度值[D(450)]。

1.2.5 细胞免疫荧光染色 贴壁细胞组将细胞悬液接种到放有盖玻片的 6 孔板上铺片,加入完全培养液,放置在 37 ℃、饱和湿度、含 5% CO_2 条件下培养,2 d 后观察确认细胞大部分已贴在盖玻片上,拿出细胞置室温,将其置于载玻片上。当悬浮细胞组出现明显的肿瘤球时,离心收集肿瘤球,做细胞涂片。分别对 2 种细胞用 PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛溶液固定,封闭,加入 Pro-GRP mAb(1∶150),4 ℃过夜,次日加 FITC 标记的山羊抗兔二抗(1∶150),37 ℃ 30 min,用 PI/DAPI 复染细胞核。

1.2.6 检测 ABCG2、CD44、CD166 和 Pro-GRP 将 1×10^6 个贴壁细胞和悬浮细胞分别于 4 ℃离心后弃上清液重悬于 100 μl 冰浴过的含 2 % FBS 的 PBS 中。分别加入 5 μl ABCG2、CD44、CD166、Pro-GRP 抗体,摇匀后冰浴 20 min,加入 1 ml 冰浴过的含 2% FBS 的 PBS,4 ℃离心弃上清,重复该步骤 1 次。重悬于 100 μl 冰浴过的含 2 % FBS 的 PBS 中。加入 5 μl FITC 标记二抗,摇匀后避光冰浴 20 min 。加入 1 ml 冰浴过的含 2% FBS 的 PBS,4℃离心弃上清,重悬于 400 μl 冰浴过的含 2% FBS 的 PBS 中经流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.3 统计软件,各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 悬浮细胞的培养

将处于对数生长期的贴壁细胞用胰酶消化,离心收集,加入到含各种生长因子的无血清培养基中。48 h 有少量细胞能够悬浮生长。5 d 时,形成大小不一的,细胞较密实,遮光性较强的肿瘤球,14 d 后,肿瘤球逐渐增大,细胞之间更加致密,遮光性更强(图 1)。



A:48 h;B:5 d;C:14 d

图1 无血清培养不同时间观察BGC-823肿瘤球的变化 (倒置相差显微镜 ×100)

2.2 有限稀释法分离细胞观察克隆形成能力

将稀释好的细胞悬液移入96孔板后,显微镜下选取只含有1个细胞的孔做标记,1周后,在有血清培养的50个单细胞空中,有44个孔的细胞死亡,6个孔的细胞成活形成了3~4个细胞,半量换液后培养至第2周后,其中有3个孔中的细胞增殖成边界规则,透光性强的肿瘤球(图2),其余3个孔的细胞增殖分化能力下降,没有形成肿瘤球。在有血清培养的50个单细胞孔中,培养出3株细胞亚群,百分比是6%。在无血清培养的50个孔中,培养出2株细胞亚群,百分比是4%。

为了比较贴壁细胞和肿瘤球细胞的克隆形成能力,分别将2组细胞置于含有200 μl无血清培养基的96孔板中,每组30个孔,每个孔1×10^2个细胞。3 d后半量换液,1周后观察并计数肿瘤球数。贴壁细胞形成(7.67±2.08)个肿瘤球,悬浮细胞形成(36.33±3.51)个肿瘤球,明显多于贴壁细胞组($P<0.05$)。

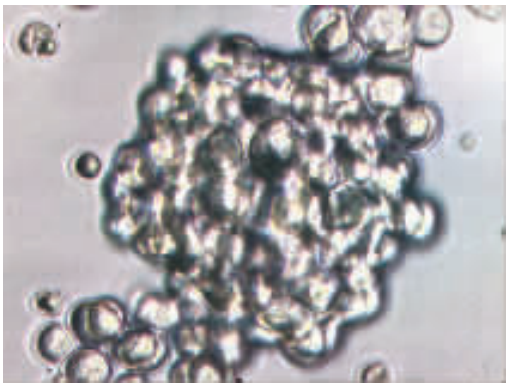


图2 BGC-823在限稀释法培养下形成的肿瘤球 (倒置相差显微镜 ×100)

2.3 软琼脂克隆形成能力实验

在制备好的双层软琼脂中分别培养贴壁细胞和悬浮肿瘤球细胞,每组同时做5个平行孔,取平均数静置培养14 d后,倒置显微镜观察形成的肿瘤球数目。贴壁细胞形成肿瘤数目(10.75±3.37),悬浮细胞形成(37.63±5.99),2组之间差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 流式细胞仪检测贴壁细胞和肿瘤球细胞ABCG2、CD44、CD166和Pro-GRP的表达

流式细胞仪检测结果显示,肿瘤球细胞中ABCG2、CD44的表达与贴壁细胞中ABCG2、CD44的表达差异有统计学意义($P<0.01$)。分别对2组细胞测定Pro-GRP的表达,肿瘤球细胞的表达率高于贴壁细胞($P<0.01$),表明Pro-GRP的表达与BGC-823细胞中悬浮肿瘤球有关,表1。

表1 贴壁细胞和肿瘤球细胞ABCG2、CD44、CD166、Pro-GRP的表达情况[$n=3$,($\bar{x}\pm s$)%]

组别	ABCG2	CD44	CD166	Pro-GRP
贴壁细胞	8.67±0.77	6.53±0.43	68.58±6.00	5.11±1.03
肿瘤球细胞	57.17±3.49[a]	68.35±5.19[a]	73.33±9.88	73.37±9.42[a]

a:$P<0.01$,与贴壁细胞比较

2.5 ELISA测定贴壁细胞和悬浮细胞中Pro-GRP的表达

收集24、48 h和72h贴壁细胞与肿瘤球细胞的细胞上清液,离心后用ELISA试剂盒测定2组细胞在不同时间Pro-GRP的表达结果显示:3个时间段肿瘤球细胞细胞均高于贴壁细胞,其中72 h两组间比较有统计学意义($P<0.01$),表2。

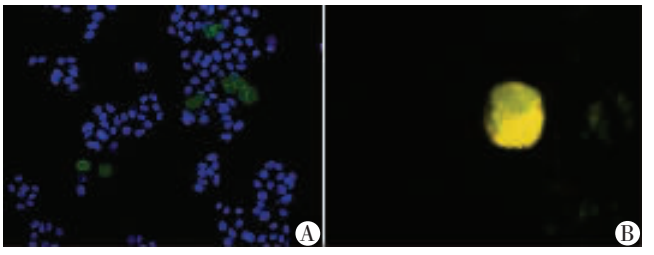
表2 不同时间ELISA测定2组细胞Pro-GRP的表达情况[$D(450)$,$n=3$,$\bar{x}\pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h
贴壁细胞	0.32±0.08	0.37±0.12	0.39±0.03
肿瘤球细胞	0.48±0.03	0.61±0.02	0.83±0.07[a]

a:$P<0.01$,与贴壁细胞比较

2.6 贴壁细胞与悬浮肿瘤球免疫荧光染色

Pro-GRP免疫荧光染色结果显示,贴壁细胞只有少量的细胞表达Pro-GRP,而在肿瘤球细胞消化后再次形成的肿瘤球中,大部分细胞表达Pro-GRP(图3)。



A:贴壁细胞;B:肿瘤球细胞

图3 Pro-GRP在贴壁细胞和肿瘤球细胞中的表达 (荧光显微镜 ×40)

3 讨论

在过去的十几年间,有学者认为肿瘤组织都来源于干细胞亚群。1994年,Lapidot等[11]报道的具有$CD34^+/CD38^-$表型的细胞具备同样的分化、增殖以及

自我更新能力,能够在免疫缺陷小鼠体内导致急性髓性白血病,这是人类恶性肿瘤干细胞的首次报道。1996 年 Goodell 等[2]首次用 Hoechst33342 染色在骨髓细胞中发现了一群染色很浅的细胞(SP 细胞),体积较小,表面具有干细胞通用标记物 Bcrp1/ABCG2[2],占整体细胞的很少一部分,其余绝大多数称为 non-SP 细胞。近些年,Patrawala[5]、Haraguchi 等[6]运用无血清法在实体肿瘤中发现了 SP 细胞。本实验选取胃癌细胞系 BGC-823,采用无血清培养法和有限稀释法培养出悬浮生长的肿瘤球。软琼脂克隆能力形成实验证实该肿瘤球具有较高的干细胞克隆增殖能力。FCM 检测该肿瘤球中 SP 细胞的特异性表面抗体 ABCG2(57.17 ± 3.49)及干细胞标记 CD44(68.35 ± 5.19)的表达,与贴壁细胞 ABCG2(8.67 ± 0.77)、CD44(6.53 ± 0.43)相比有差异,具有统计学意义($P < 0.05$)。CD166 的表达在 2 组细胞中没有统计学差异($P > 0.05$),以上的研究结果证实 BGC-823 中存在悬浮肿瘤球细胞,该肿瘤球具备干细胞的克隆特性。肿瘤球细胞 ABCG2 的高表达提示其很可能是 SP 细胞。

1905 年,人们首次证实对于胃酸分泌至关重要的激素,胃泌素,它可以促进胃酸的分泌,胃窦收缩和消化道黏膜生长等生理作用,近十几年,众多研究将胃泌素与肿瘤联系在了一起[7-10]。前胃泌素释放肽 Pro-GRP 可以促进胃肠道细胞的增生,抑制凋亡。在结肠癌和早期的结肠息肉患者血清中,发现了高含量的 Pro-GRP,而在正常健康人和手术切除肿瘤、息肉后的患者血清中,Pro-GRP 的含量很低[10],提示肿瘤可能是 Pro-GRP 升高的原因之一。同时,在 Pro-GRP 转基因小鼠中,发现血清前胃泌素的高表达导致小鼠的胃肠道癌症的发病率要明显高于野生型小鼠[11-13]。本实验中,ELISA 证实在 BGC-823 细胞系中有 Pro-GRP 的表达。Ciccotosto[14]和 Siddheshwar 等[9]分别于 1995 年和 2001 年证实在结肠癌中前胃泌素起到了促进增殖,抑制凋亡的作用。Ferrand 等[8]首次将前胃泌素对结肠癌 $CD133^+$ 细胞的作用以及信号通路给予了详尽的研究。本研究中将前胃泌素和悬浮肿瘤球结合在一起,FCM 显示 BGC-823 在无血清培养中形成的悬浮细胞肿瘤球中 Pro-GRP 的表达(73.37 ± 9.42),贴壁细胞为 5.11 ± 1.03($P < 0.01$);ELISA 测定 72h 结果显示悬浮肿瘤球 Pro-GRP(0.83 ± 0.07)明显高于贴壁细胞(0.39 ± 0.03);免疫荧光在贴壁细胞中发现只有少数细胞表达 Pro-GRP,而悬浮肿瘤球中大多数均表达。以上结果证实 Pro-GRP 在肿瘤球高表达,提示 Pro-GRP 可能与胃癌 BGC-823 中 SP 细胞有关,Pro-GRP 很可能是 BGC-823 中干细胞表达的一个特异蛋白标记物。但无血清培养的肿瘤球是否确实是 SP 细胞,还有待于利用流式分选进一步予以证实;SP 细胞是否确实是胃 BGC-823 的肿瘤干细胞[15]、Pro-GRP 是否在胃癌细胞系和胃癌组织中广泛表达,还有待于更加深入的研究与探讨。本研究尚处在初级阶段,Pro-GRP 对于肿瘤干细胞是否有促进其增殖、抑制凋亡、转移等作用以及胃泌素、Pro-GRP 对肿瘤的发生、发展过程中各自起到什么作用、通过什么信号通路发挥其作用等有待进一步研究。

参考文献:

[1] Cao H, Xu W, Qian H, *et al*. Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues[J]. Cancer Lett, 2009, 274(1):61-71.

[2] 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.

[3] Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R. *et al*. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(19):3701-3710.

[4] Burkert J, Otto W R, Wright N A. Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells[J]. J Pathol, 2008, 214(5):564-573.

[5] 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.

[6] 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.

[7] Dockray G, Dimaline R, Varro A. Gastrin:old hormone, new functions[J]. Pflugers Arch, 2005, 449(4):344-355.

[8] Ferrand A, Sandrin M S, Shulkes A, *et al*. Expression of gastrin precursors by CD133-positive colorectal cancer cells is crucial for tumour growth[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1793(3):477-488.

[9] Siddheshwar R K, Gray J C, Kelly S B. Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin or glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma[J]. Gut, 2001, 48(1):47-52.

[10] Smith A M, Watson S A. Review article:gastrin and colorectal cancer[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2000, 4(10):1231-1247.

[11] Lapidot T, Wang Jiancheng, Jens F, Rehfeld, *et al*. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice [J]. Nature, 1994, 67(3):645-648.

[12] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, *et al*. Characterization of CD133$^+$ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(4):820-824.

[13] Friis-Hansen L. Lessons from the gastrin knockout mice[J]. Regul Pept, 2007, 39(1/3):5-22.

[14] Ciccotosto G D, McLeish A, Hardy K J, *et al*. Expression, processing, and secretion of gastrin in patients with colorectal carcinoma[J]. Gastroenterology, 1995, 109(4):1142-1153.

[15] 卞修武. 对肿瘤研究前沿之肿瘤干细胞的几点认识[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(11):995-997.

(收稿:2011-01-03 修回:2011-02-19)

(编辑 王小宴)