文章编号:1000-5404(2012)12-1153-05

论著

人肺癌细胞系A549中肿瘤干细胞样细胞的分离及鉴定

闫秀萍,罗 虎,周向东 (400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 从人肺癌细胞系A549中分离并鉴定肺癌干细胞。**方法** 将A549细胞置于无血清条件培养基中培养,形成细胞球,采用平皿克隆形成实验、MTT细胞增殖实验、RT-PCR、Western blot、免疫荧光技术,检测并比较A549细胞和A549细胞球的增殖能力及干细胞相关标记的表达水平,鉴定细胞球的肿瘤干细胞特性。**结果** 利用无血清条件培养基从A549细胞中分离出肿瘤干细胞样细胞;相比A549细胞,细胞球呈悬浮生长,增殖能力和克隆形成数目(104±7)高于贴壁细胞[(37±3)($P<0.05$)],且干细胞相关标记Sox2(2.68±0.39)和Oct4(1.23±0.12)表达水平明显提高[贴壁细胞Sox2(0.05±0.02)、Oct4(0.10±0.02),$P<0.05$]。**结论** 运用无血清条件培养基可以从A549细胞系中有效富集肺癌干细胞样细胞。

[关键词] 肺癌;肿瘤干细胞;细胞球
[中图法分类号] R329-33;R329.2;R734.2 [文献标志码] A

Isolation and identification of lung cancer stem like cells from human lung cancer cell line A549

Yan Xiuping, Luo Hu, Zhou Xiangdong (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To isolate and identify the lung cancer stem like cells from the established human lung adenocarcinoma cell line A549. Methods The A549 cells were cultured in serum-free condition medium to form tumor spheres. Colony formation assay and MTT assay were used to observe the colony formation ability. RT-PCR, Western blot analysis, and immunofluorescent staining were performed to compare the expression levels of stem cell markers between A549 cells and A549 tumor sphere cells. Results The stem like cells were isolated from A549 cells in serum-free condition medium and formed typical neurospheres. The results showed that the proliferation and self-renewal capacity of the A549 sphere cells were stronger than A549 cells. A549 sphere cells expressed higher levels of stem cell markers Sox2 and Oct4 than A549 adhere cells (2.68±0.39 *vs* 0.05±0.02, 1.23±0.12 *vs* 0.10±0.02, $P<0.05$). Conclusion The serum-free condition culture effectively enrich cancer stem like cells from human lung adenocarcinoma cell line A549.

[**Key words**] lung cancer; cancer stem cells; tumor sphere

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program, 2010CB529402). Corresponding author: Zhou Xiangdong, E-mail: xiangdongzhou@126.com

近年来,肺癌发病率及病死率居高不下甚至呈持续上升趋势,加之其恶性程度高、预后差,已经成为各种癌症中导致死亡的首要病因,严重危害人类健康[1]。尽管目前肺癌综合治疗方面取得了一定进展,手术、化疗和放疗仍然是当前肺癌治疗的主要手段,但临床研究证实,多数患者确诊肺癌时已属中晚期而丧失手术机会,加之肺癌对放化疗的抵抗性,肺癌的5年生存率也未见明显提高[1]。

肿瘤干细胞理论的出现为肿瘤治疗带来新的希望。随着该理论的发展,越来越多的证据表明化疗耐药跟肿瘤干细胞有关,且在肿瘤的发生、维持及转移过程中发挥重要作用[2-4]。但肿瘤干细胞的分离、纯化及鉴定等研究仍是目前肿瘤干细胞研究的热点和难点。1997年Bonnet等[5]首次发现了白血病干细胞。

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2010CB529402)
[通信作者] 周向东,E-mail:xiangdongzhou@126.com

随着研究的深入,人们陆续在脑肿瘤、乳腺癌、前列腺癌、胶质母细胞瘤、结肠癌、肺癌等肿瘤中发现并成功分离出肿瘤干细胞[6-11]。

目前国内外有关肺癌干细胞的研究进展缓慢,原因之一就在于公认的、高特异性的肺癌干细胞分选标记尚未发现。本研究运用无血清条件培养基的悬浮培养方法分离并富集肺癌干细胞,并且进一步鉴定细胞球的肿瘤干细胞特性,为肺癌干细胞的分离、富集及进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

细胞株:人肺癌细胞株A549来自中国科学院上海生命科学院细胞库。

主要试剂:RPMI1640培养基(Gibco公司),胎牛血清(FBS,Gibco公司),DMEM/F12培养基(Gibco公司),重组人表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、重组人碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)均来自PeproTech公司,B27(Gibco公司),小鼠抗人Oct4单克隆抗体(Abcam公司),小鼠抗人Sox2单克隆抗体(Novus公司),Cy3标记的羊抗小鼠IgG(碧云天公司),Cy5标记的羊抗兔IgG(碧云天公司),PVDF膜(Millipore公司),羊抗兔IgG(碧云天公司),小鼠抗人GAPDH单克隆抗体(Invitrogen公司)。

1.2 细胞培养

A549细胞培养:培养基为含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,在37 ℃,5% CO_2培养箱内饱和湿度条件下培养。实验取对数生长期的细胞。

细胞球培养:培养基为DMEM/F12培养基,含有20 μl/ml B27,20 ng/ml EGF,20 ng/ml bFGF。将A549制成单细胞悬液以20 000个/孔的密度种植6孔板中,每孔2 ml培养液,每隔2~3 d半量换液。在37 ℃,5% CO_2条件下培养,显微镜下观察细胞成球情况和形态。实验取第3代细胞球。

1.3 细胞增殖实验和克隆形成实验

采用MTT法检测A549细胞及细胞球增殖能力。将A549细胞和A549细胞球制成单细胞悬液按1×10^4/孔的密度分别加入96孔板,每孔200 μl,对照组只加培养基。在37 ℃,5% CO_2条件下培养,每过24 h,拿出孔板检测,检测6 d,取每次检测的平均值。检测时,加180 μl基础培养基和MTT 20 μl(5 mg/ml),37 ℃,4 h,除去培养液,每孔加入150 μl DMSO,摇晃10 min。酶标仪测定光密度值[D(490)],以光密度值和时间为坐标绘制细胞生长曲线。

将A549细胞和A549细胞球制成单细胞悬液按200个/孔的密度分别接种于6孔板中,每孔加入2 ml含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基,定期换液,在37 ℃,5% CO_2条件下培养2周,将培养基吸弃,用PBS润洗后加入4%多聚甲醛固定,然后用结晶紫染色,观察克隆形成情况。

1.4 RT-PCR检测

收集A549细胞和细胞球进行总RNA提取,用试剂盒反转录为cDNA后进行RT-PCR,引物设计如下:Oct4上游:5′-GCAGCGACTATGCACAACGA-3′,下游:5′-CCAGAGTGGTGACGGAGACA-3′;Sox2上游:5′-CATCACCCACAGCAAATGACA-3′,下游:5′-CTCCTACCGTACCACTAGAACTT-3′;GAPDH上游:5′-AGCCACATCGCTCAGACA-3′,下游:5′-GCCCAATACGACCAAATCC-3′。引物合成由上海英骏生物技术有限公司合成。RNAiso(TaKaRa公司)逆转录试剂盒PCR扩增试剂盒RT-PCR试剂盒均为Fermentas公司。

1.5 免疫荧光检测

分别取A549细胞和细胞球种植于盖玻片上,在37 ℃,5% CO_2条件下培养,待爬片完成后,取出玻片用4%多聚甲醛固定,用PBS润洗后用0.3% Triton X-100透化处理,然后封闭后加入一抗(1∶400),4 ℃冰箱孵育过夜。第2天,取出玻片,PBS洗涤后加入二抗(1∶500),37 ℃避光孵育1 h,然后用PBS洗涤,用Hochest33258染色,PBS洗涤后抗荧光淬灭剂封片,共聚焦显微镜观察拍照。

1.6 Western blot

收集A549细胞和细胞球,用蛋白裂解液提取总蛋白,用BCA法测定总蛋白浓度,制备蛋白样品,进行SDS-PAGE电泳,浓缩胶80 V、30 min,分离胶120 V、120 min,电泳完成后转膜到PVDF膜,转膜结束后用含5%脱脂奶粉的TBST溶液室温封闭4 h。封闭完成后用TBST洗膜,加入一抗4 ℃冰箱孵育过夜,然后再次洗涤,室温孵育二抗2 h,洗涤,采用化学发光试剂盒(Pierce公司)按说明操作,用凝胶成像仪自动曝光记录成像。

1.7 统计学分析

结果以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 17.0统计软件进行独立样本的t检验。

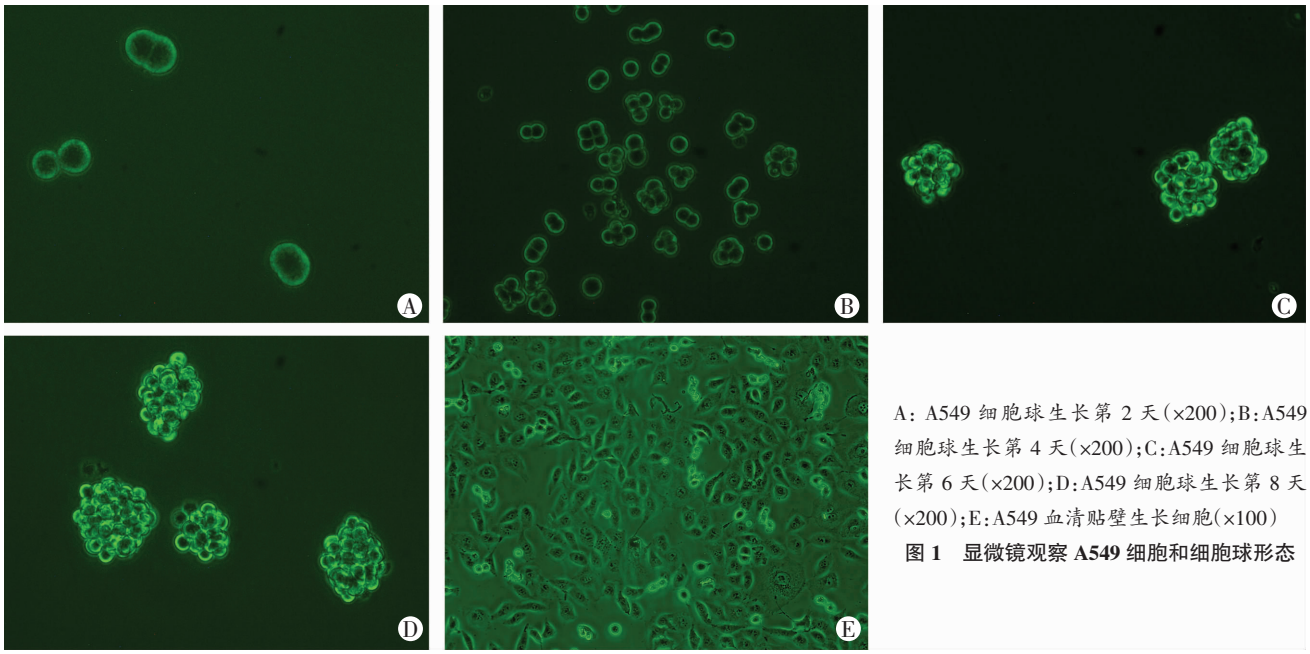
2 结果

2.1 A549细胞球培养结果

A549细胞株在有血清培养条件下,在培养皿底部贴壁生长,细胞呈短梭形,细胞生长迅速;而在无血清条件培养基条件下,细胞呈球形立体生长,细胞球呈圆形或者椭圆形,球内细胞结合紧密,球体饱满,折光性强,随着时间延长,细胞球可逐渐增大,形状趋于规则。见图1。

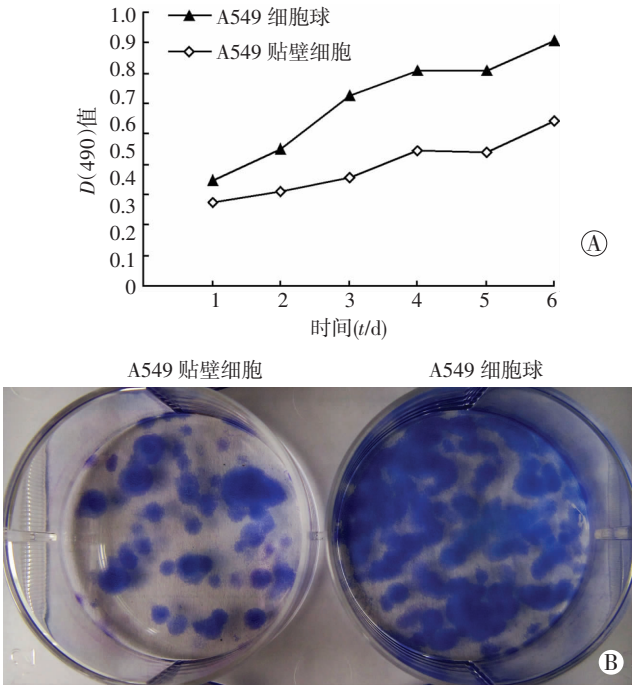
2.2 细胞增殖能力和克隆形成能力结果分析

用MTT比色法测定细胞增殖能力,并绘制细胞生长曲线,结果显示,细胞球的增殖能力显著高于普通贴壁细胞($P<0.05$)(图2A)。为检测细胞的体外克隆能力,将细胞和细胞球分别接种于平皿,进行平皿克隆实验,结果显示,细胞球的平皿克隆形成能力[克隆数(104±7)]显著高于贴壁细胞[克隆数(37±3),$P<0.05$,图2B]。上述结果说明细胞球比贴壁细胞体外增殖能力明显提高,具有更强的自我更新能力。



A: A549 细胞球生长第 2 天(×200);B:A549 细胞球生长第 4 天(×200);C:A549 细胞球生长第 6 天(×200);D:A549 细胞球生长第 8 天(×200);E:A549 血清贴壁生长细胞(×100)

图 1　显微镜观察 A549 细胞和细胞球形态



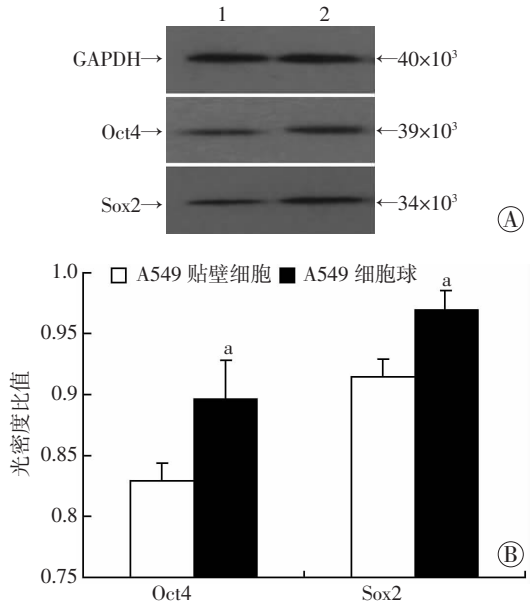
A:生长曲线比较;B:克隆能力比较

图 2　A549 细胞和细胞球增殖能力及平皿克隆能力比较

2.3　A549 细胞和细胞球干细胞相关标记表达分析

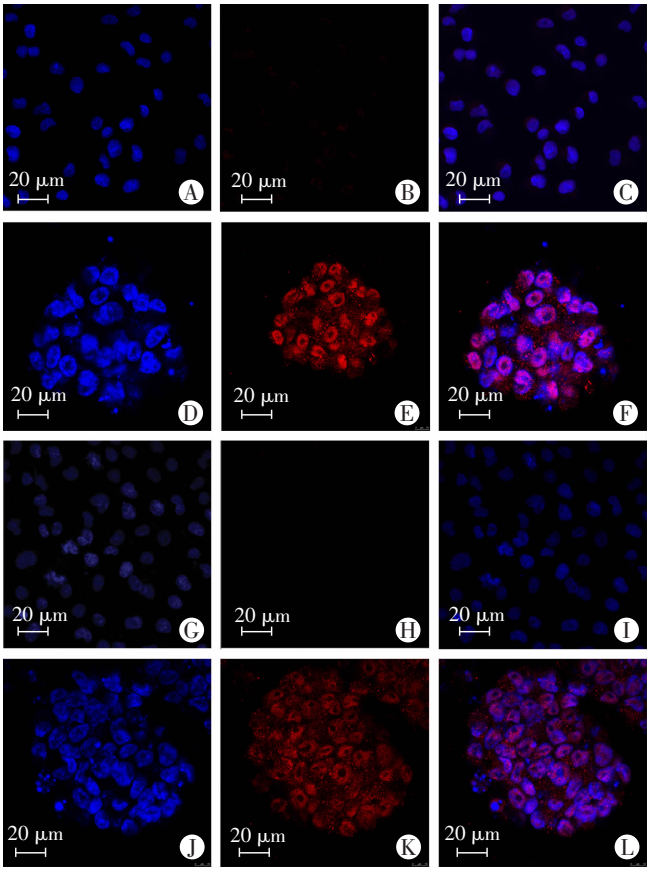
运用 RT-PCR 分别检测 A549 细胞和细胞球的肿瘤干细胞标记表达情况,结果提示细胞球的 Sox2 (2.68 ± 0.39) 和 Oct4 (1.23 ± 0.12) 的表达水平要高于贴壁细胞[分别为(0.05 ± 0.02)、(0.10 ± 0.02),$P<0.05$]。Western blot 检测在蛋白水平上也证实了这一点(图 3)。

免疫荧光检测结果显示,Sox2 和 Oct4 免疫荧光染色后激光共聚焦显微镜下观察呈红色,可以看到细胞球中的表达强度较高,普通贴壁细胞几乎看不到染色。提示细胞球中干性标记 Sox2 和 Oct4 表达多于贴壁细胞,细胞球更具有肿瘤干细胞特征。见图 4。



A:Western blot 检测结果　1:A549 贴壁细胞;2:A549 细胞球;B:半定量分析　a: $P<0.05$,与 A549 贴壁细胞比较

图 3　肿瘤干细胞相关分子 Sox2 及 Oct4 标记蛋白水平的表达



A～F:Sox2;G～L:Oct4;A、D、G、J:细胞核染色;B、E、H、K:肿瘤干细胞标记表达;C、F、I、L:叠加;A～C、G～I:A549贴壁细胞;D～F、J～L:A549细胞球

图4 肿瘤干细胞相关分子Sox2及Oct4免疫荧光测定结果

3 讨论

肿瘤干细胞理论从产生到证实伴随着各种各样的争议,但是随着各种肿瘤中分离和鉴定肿瘤干细胞的证据越来越多,这个理论正逐渐得到公认。肿瘤干细胞的深入研究,为人们认识肿瘤提供了新的视角,也为进一步挖掘潜在的肿瘤治疗靶点提供了新的方向。近年研究[3,12-15]显示:肿瘤干细胞的存在是导致肿瘤放化疗的失败的原因之一。肿瘤干细胞还和许多信号转导通路,如Wnt通路[16]、Akt通路[17]、PI3K通路有关[18]。上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition,EMT)细胞具有肿瘤干细胞特征,且肿瘤干细胞具有高侵袭性和高转移性,更易发生EMT[19-22]。以上研究表明,肿瘤干细胞已经涉及肿瘤研究的诸多方面。所以,有效分离和富集肿瘤干细胞就显得尤为重要。

目前肿瘤干细胞的筛选主要依靠各种表面分子标记进行分选。CD133是表达于多种肿瘤细胞表面的糖蛋白,近年来在肿瘤干细胞研究领域备受关注。利用其作为肿瘤干细胞标记已经从脑肿瘤[6]、结肠癌[10]、前列腺癌[23]、肝癌[24]等多种肿瘤中分离出肿瘤干细胞,但是仍存在争议,结肠癌转移过程中,$CD133^+$可以产生$CD133^-$细胞,且可以在NOD/SCID鼠中发生肿瘤[25]。同样,在肺癌干细胞中也存在类似问题,2008年Eramo等[11]提出CD133是肺癌干细胞的分选标记,随后就有人提出质疑,A549和H446细胞系中$CD133^+$及$CD133^-$细胞均含有肿瘤起始细胞[26]。可见,由于各种肿瘤干细胞存在异质性,在研究肺癌干细胞时,借鉴其他肿瘤干细胞的表面分子标记并不可靠。因此,在深入研究肺癌干细胞之前,寻找肺癌干细胞的特有分子标记来分离和富集干细胞显得尤为必要。

在本研究中,我们探索了一种有效分离肺癌干细胞的方法——无血清条件培养基悬浮球培养方法。这种无血清条件培养基添加有生长因子,在促进细胞的增殖的同时能够保持细胞未分化状态。在这种培养基中,只有肿瘤干细胞能够进行生长增殖,这是一个筛选分离的过程,从而更大限度的富集了肿瘤干细胞。这种培养方法最早用于培养神经干细胞,后来在胶质瘤干细胞、乳腺癌干细胞中得到证实和应用[27-28]。我们用MTT比色法绘出细胞生长曲线,结果提示细胞球的体外增殖能力显著强于普通A549贴壁细胞,平皿克隆形成实验结果也显示细胞球克隆形成能力强。以上结果说明,无血清培养得到细胞球增殖能力要强于贴壁细胞。为进一步验证细胞球的干细胞特性,我们选用干细胞转录因子Sox2和Oct4,这两个转录因子能够维持肺癌干细胞的特性,可以作为鉴定肺癌干细胞的分子标记[29-30]。我们分别运用RT-PCR、Western blot及免疫荧光技术检测了Sox2和Oct4在A549细胞及细胞球中的表达情况,结果证实细胞球中干性标记Sox2和Oct4表达显著强于普通A549细胞,说明细胞球更具有肿瘤干细胞特征,富含肺癌干细胞。以上结果提示,我们利用悬浮球培养方法可以成功分离和富集肺癌干细胞,这类细胞悬浮生长,具有更强的自我更新和增殖能力,且高表达肿瘤干细胞分子标记。

目前在众多分选肿瘤干细胞的方法中存在的共同问题是操作繁琐、技术难度大、花费昂贵。且在肺癌干细胞的研究中,先后报道的各种表面分子标记并不具有特异性。本研究探讨的无血清悬浮球培养法成本低、方便、快捷、高效,可暂时作为研究肺癌干细胞的工具,有利于进一步寻找肺癌干细胞筛选分子标记,有利

于肺癌干细胞分子调控、信号转导机制等基础研究工作顺利进行,进而为肿瘤发病机制及临床以肺癌干细胞为靶点的靶向治疗研究奠定基础。

参考文献:

[1] Siegel R, Ward E, Brawley O, *et al*. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4): 212 – 236.

[2] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, *et al*. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. Nature, 2001, 414(6859): 105 – 111.

[3] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 275 – 284.

[4] Wicha M S, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift [J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 1883 – 1890, 1895 – 1896.

[5] 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.

[6] Singh S K, Hawkins C, Clarke I D, *et al*. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. Nature, 2004, 432(7015): 396 – 401.

[7] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, *et al*. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983 – 3988.

[8] Collins A T, Berry P A, Hyde C, *et al*. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 10946 – 10951.

[9] Galli R, Binda E, Orfanelli U, *et al*. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 7011 – 7021.

[10] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, *et al*. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells[J]. Nature, 2007, 445(7123): 111 – 115.

[11] 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.

[12] Bao S, Wu Q, McLendon R E, *et al*. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response [J]. Nature, 2006, 444(7120): 756 – 760.

[13] Li H Z, Yi T B, Wu Z Y. Suspension culture combined with anticancer regimens for screening breast cancer stem cells[J]. Med Hypotheses, 2007, 68(5): 988 – 990.

[14] Huss W J, Gray D R, Greenberg N M, *et al*. Breast cancer resistance protein-mediated efflux of androgen in putative benign and malignant prostate stem cells[J]. Cancer Res, 2007, 65(15): 6640 – 6650.

[15] Zhang Q, Shi S, Yen Y, *et al*. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy[J]. Cancer Lett, 2010, 289(2): 151 – 160.

[16] Teng Y, Wang X, Wang Y, *et al*. Wnt/beta-catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 392(3): 373 – 379.

[17] Wang Y K, Zhu Y L, Qiu F M, *et al*. Activation of Akt and MAPK pathways enhances the tumorigenicity of CD133$^+$ primary colon cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(8): 1376 – 1380.

[18] Bleau A M, Hambardzumyan D, Ozawa T, *et al*. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(3): 226 – 235.

[19] Mani S A, Guo W, Liao M J, *et al*. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. Cell, 2008, 133(4): 704 – 715.

[20] Morel A P, Lievre M, Thomas C, *et al*. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition [J]. PLoS One, 2008, 3(8): e2888.

[21] Santisteban M, Reiman J M, Asiedu M K, *et al*. Immune-induced epithelial to mesenchymal transition *in vivo* generates breast cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2009, 69(7): 2887 – 2895.

[22] Yang L, Ping Y F, Yu X, *et al*. Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype[J]. Cancer Lett, 2011, 310(1): 46 – 52.

[23] 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.

[24] 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.

[25] Shmelkov S V, Butler J M, Hooper A T, *et al*. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133$^+$ and CD133$^-$ metastatic colon cancer cells initiate tumors[J]. J Clin Invest, 2008, 118(6): 2111 – 2120.

[26] Meng X, Li M, Wang X, *et al*. Both CD133$^+$ and CD133$^-$ subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells[J]. Cancer Sci, 2009, 100(6): 1040 – 1046.

[27] 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.

[28] Ponti D, Costa A, Zafaroni N, *et al*. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties [J]. Cancer Res, 2005, 65(13): 5506 – 5511.

[29] Chen Y C, Hsu H S, Chen Y W, *et al*. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells[J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2637.

[30] Xiang R, Liao D, Cheng T, *et al*. Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 104(9): 1410 – 1417.

(**收稿**:2012-03-25;**修回**:2012-04-29)

(编辑 汪勤俭)