DOI:10.16016/j.1000-5404.201510117

人肺癌 H1299 肿瘤干细胞样细胞的分离培养及鉴定

赵文思,罗 弋,黎博一,周寒静,张 涛 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 从人肺癌 H1299 细胞系中分离培养肺癌干细胞样细胞,并进一步鉴定其干细胞特性。**方法** 在低黏附条件下无血清诱导培养 H1299 细胞,富集 H1299 肿瘤细胞球,利用免疫荧光、流式细胞仪、PCR 及 Western blot 检测干性标志物 CD133 和 ABCG2 的表达,并观察克隆形成和体内致瘤能力的改变。**结果** 肺癌 H1299 细胞经无血清诱导培养可形成悬浮的细胞球。与普通贴壁 H1299 细胞相比,细胞球具有更强的增殖能力和致瘤性,且高表达干性基因 CD133 和 ABCG2,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 运用无血清悬浮细胞球培养方法富集的肺癌 H1299 细胞系肿瘤球高表达 CD133 和 ABCG2,具有干细胞特性。

[关键词] 肺肿瘤;H1299 细胞;肿瘤细胞球;CD133;ABCG2
[中图法分类号] R329-33; R730.23; R734.2 [文献标志码] A

Isolation and identification of cancer stem-like cells from lung cancer H1299 cells

Zhao Wensi, Luo Yi, Li Boyi, Zhou Hanjing, Zhang Tao (Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To isolate and culture cancer stem-like cells (CSCs) from human lung cancer cell line H1299, and then identify their stem cell characteristics. **Methods** H1299 cells were cultured in serum-free medium under non-adherent conditions to induce the formation of tumorspheres. Immunofluorescent assay, flow cytometery, PCR and Western blotting were performed to evaluate the expression of CSCs markers, CD133 and ABCG2. The clonality and tumorigenicity *in vivo* were also examined. **Results** The tumorspheres were formed by sphere-forming culturing. The data demonstrated that there were stronger capacities of proliferation and tumorigencity in the tumorspheres derived from H1299 cells than the adherent cells. And the expression levels of CD133 and ABCG2 were significantly higher in the tumorspheres ($P<0.05$). **Conclusion** The tumorspheres derived from H1299 cells by floating spheres culturing in serum-free condition are of high expression of CD133 and ABCG2, and possess stem cell characteristics.

[**Key words**] lung neoplasms; H1299 cells; tumorspheres; CD133; ABCG2

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81302018). Corresponding author: Zhang Tao, E-mail: tumorzzt@163.com

肺癌是威胁人类健康和生命的常见恶性肿瘤,因高发病率和死亡率已成为目前世界上肿瘤相关死亡的首要原因[1-2]。由于环境污染和烟草消费加剧,世界卫生组织预测在未来数年肺癌的死亡率还会继续增加,尤其是在亚洲地区。因此,积极预防肺癌的同时,深入探索肺癌复发和转移的确切机制显得尤为必要。

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81302018)
[通信作者] 张 涛,E-mail:tumorzzt@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151230.1141.021.html(2015-12-30)

研究表明:在肿瘤细胞中存在部分肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSCs)或肿瘤起始细胞(tumor-initiating cells,TICs),他们主导了肿瘤的发生、分化、转移和对常规放化疗的抵抗[3-4]。研究 CSCs 的特异性有利于进一步探索靶向性的肿瘤治疗策略,而有效地分离和鉴定 CSCs 是开展一系列后续研究的基础。无血清悬浮培养的肿瘤细胞球模型在 CSCs 研究中受到了越来越广泛的关注,并在乳腺癌、胶质瘤、卵巢癌等多种实体瘤中得到验证[5-7]。对于肺癌 CSCs,目前虽然还没有高度一致和公认的标志物,但其鉴定指标主要

还是 $CD133^+$ 和 $ABCG2^+$[8]。CD133 是一种转膜糖蛋白,在许多实体瘤中,其高表达往往提示恶性生物学行为和高复发风险[9-11]。ABCG2 又称乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein,BCRP),是一种 ATP 结合盒转运蛋白,能够介导肿瘤细胞对多种化疗药物的抵抗,对 SP 表型维持也发挥着重要作用[12]。本研究拟通过无血清悬浮细胞球的培养方法富集人肺癌 H1299 细胞系的肿瘤干细胞,探索两个潜在的 CSCs 标志物 CD133 和 ABCG2 在 H1299 肿瘤球的表达及其与干性特征之间的内在联系,为本课题组后续研究肺癌干细胞的特异性靶向治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌 H1299 细胞株由本实验室保存。RPMI1640 和 DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司,重组人表皮生长因子(EGF)和成纤维细胞生长因子(bFGF)购自 PeproTech 公司,B27 购自 Gibco 公司;APC 标记的 CD133 流式抗体(Miltenyi 公司),鼠抗人 CD133 单克隆抗体(Millipore 公司),兔抗人 CD133 多克隆抗体(博奥森公司),鼠抗人 ABCG2 单克隆抗体(Abcam 公司),FITC 标记的羊抗鼠 IgG(EarthOx 公司),Alexa Fluor® 568 标记的羊抗兔 IgG(Invitrogen 公司),β-actin 单克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔和羊抗鼠 IgG 均购自 Cell Signaling Technology 公司,超低吸附细胞培养瓶(Corning 公司);TRIzol 试剂为 Invitrogen 公司产品,逆转录试剂盒为大连宝生物(TaKaRa)公司产品,PCR 相关试剂为 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H1299 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内。取对数生长期细胞进行实验。H1299 细胞球培养及诱导分化:配置无血清培养基,DMEM/F12 培养基中添加 20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF 和 2% B27。H1299 细胞制成单细胞悬液,以 1 000/mL 的细胞数种植于超低吸附培养瓶,37 ℃ 5% CO_2 培养箱内培养,每隔 3 d 半量更换新鲜培养基,倒置显微镜观察球形成情况。细胞球增殖到足够大时,收集并机械分离成单细胞悬液进行传代培养,实验取第 3 代细胞球。为观察血清诱导球形成细胞的分化现象,分离的细胞球将进一步培养于含 10% FBS 而不添加上述生长因子的普通培养基中。

1.2.2 免疫荧光染色 H1299 细胞种植于盖玻片上,在孵箱内培养过夜完成爬片;H1299 细胞球直接取细胞悬液滴于载玻片上风干。4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 润洗后 0.1% Triton X-100 透膜 5 min,10% 山羊血清室温封闭 30 min,PBS 洗涤 2 遍后分别滴加一抗 CD133(1∶200)和 ABCG2(1∶200),4 ℃孵育过夜。次日,PBS 洗涤玻片后分别对应滴加 Alexa Fluor® 568 标记的羊抗兔或 FITC 标记的羊抗鼠二抗(1∶500),37 ℃避光孵育 30 min,PBS 洗涤,DAPI 染核 2 min,再次 PBS 洗涤后滴加抗荧光淬灭剂封片,倒置荧光显微镜观察拍照。

1.2.3 RT-PCR 和 q-PCR 取对数期 H1299 细胞和细胞球,TRIzol 法提细胞总 RNA,逆转录合成cDNA,RT-PCR 和 q-PCR 检测干性基因 CD133 和 ABCG2 的 mRNA 表达,GAPDH 为内参。引物序列,CD133 上游:5′-GAGTCGGAAACTGGCAGATAGCA-3′,下游:5′-ACGCCTTGTCCTTGGTAGTGTTG-3′;ABCG2 上游:5′-CACAAGGAAACACCAATGGCT-3′,下游:5′-ACAGCTCCTTCAGTAAATGCCTTC-3′;GAPDH 上游:5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′,下游:5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′,产物大小分别为 113、69、225 bp,所有引物均委托北京华大基因公司合成。PCR 条件:95 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 32 个循环;72 ℃ 3 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。q-PCR 条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min,共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的表达量。

1.2.4 流式细胞仪检测 分别收集 1×10^6 个 H1299 细胞和细胞球,PBS 洗涤 2 遍后加入 APC 标记的 CD133 及 FITC 标记的 ABCG2(1∶100)抗体,同时设立阴性对照和同型对照,混匀,4 ℃避光反应 15 min。PBS 再次洗涤后,细胞重悬于 1% 多聚甲醛溶液。流式细胞仪检测 CD133 和 ABCG2 的表达。

1.2.5 Western blot 检测 提取 H1299 细胞和细胞球总蛋白,BCA 法测蛋白浓度。制备蛋白样品,行 SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,TBST 洗膜 3 次后分别加入一抗 CD133(1∶1 000),ABCG2(1∶1 000)和 β-actin(1∶2 000),4 ℃孵育过夜。次日,洗膜,加入相应 HRP 标记二抗,室温孵育 2 h,洗涤,化学发光试剂盒(Bio-Rad)显影,凝胶成像仪曝光成像,以 β-actin 对目的蛋白进行标准化。

1.2.6 克隆形成实验 收集 H1299 细胞和细胞球,制成单细胞悬液,以 400/孔的细胞数接种于 6 孔板,每孔加入 2 mL 培养基于 37 ℃、5% CO_2 孵箱内培养,定期换液并观察克隆形成情况。2 周后,4% 多聚

甲醛固定,结晶紫染色,拍照并计数。

1.2.7 裸鼠成瘤实验 4~6 周龄(雌雄各 5 只)的 BALB/c 裸鼠购于重庆医科大学实验动物中心。将新鲜分离的 H1299 细胞和细胞球,以 1×10^6/100 μL PBS 密度分别接种至裸鼠背部左右两侧,观察 2 组移植瘤的生成及生长情况。处死裸鼠后,肿瘤标本进一步行 HE 染色鉴定。

1.3 统计学分析

实验均重复至少 3 次。Western blot 结果经 Image J 软件进行图片分析、灰度值计算。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料分析采用独立样本 t 检验,计数资料用 χ^2 检验,采用 SPSS 19.0 统计软件。

2 结果

2.1 H1299 肿瘤球的形成及血清诱导分化

与普通细胞贴壁生长方式不同,H1299 细胞在无血清培养基中呈悬浮生长,形成立体的细胞球。在培养第 3~4 天,球体开始成形,第 9~12 天球体完全形成,最终在第 18 天左右形成由大量细胞紧密结合而成的实体结构(图 1)。经过连续几代培养,细胞球的紧密程度和体积也不断增加。而撤去生长因子并经血清诱导培养 48 h 后,悬浮的细胞球又能够迅速恢复其分化能力并不断黏附到瓶壁形成贴壁细胞。

2.2 CD133 和 ABCG2 在 H1299 细胞球的 mRNA 表达

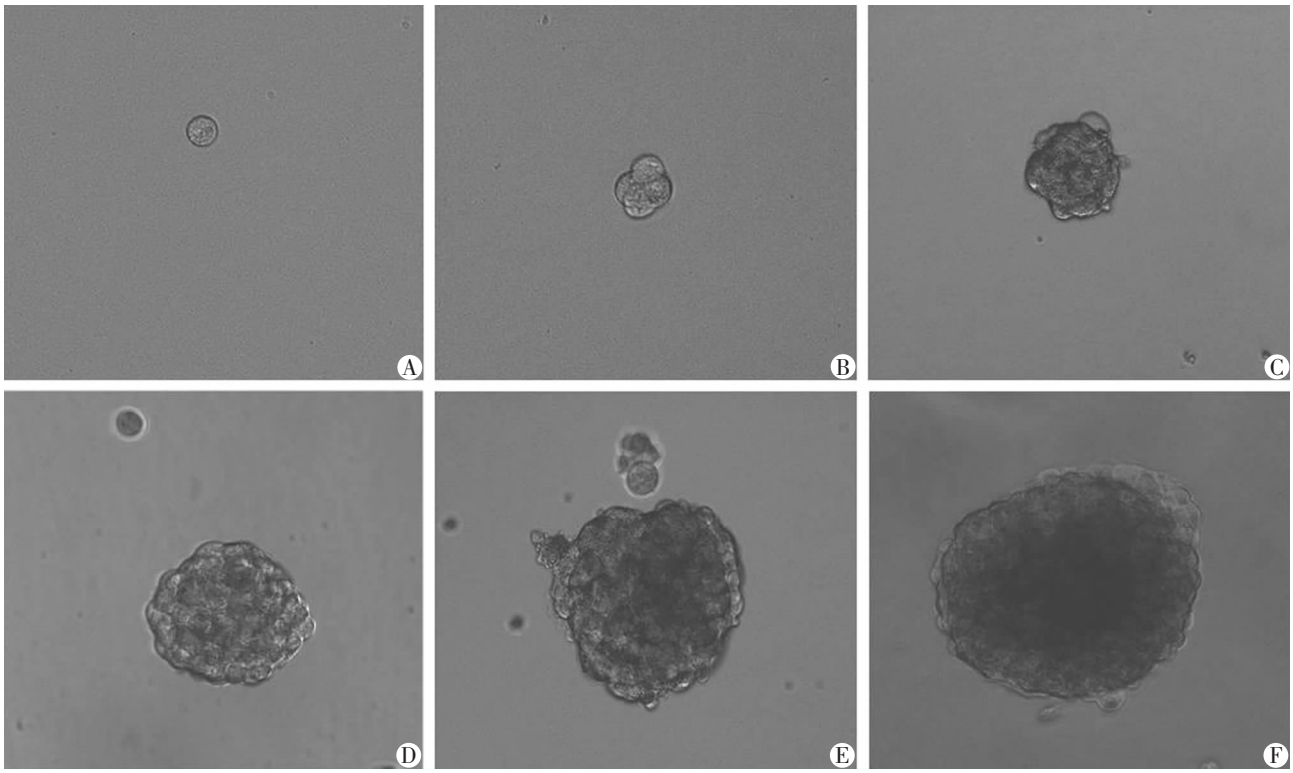
H1299 细胞球的 CD133 和 ABCG2 mRNA 表达均高于贴壁细胞($P<0.05$,图 2)。

2.3 CD133 和 ABCG2 在 H1299 细胞球的蛋白表达

H1299 细胞球组 CD133 和 ABCG2 的蛋白表达明显高于普通贴壁细胞组($P<0.01$,$P<0.05$,图 3)。

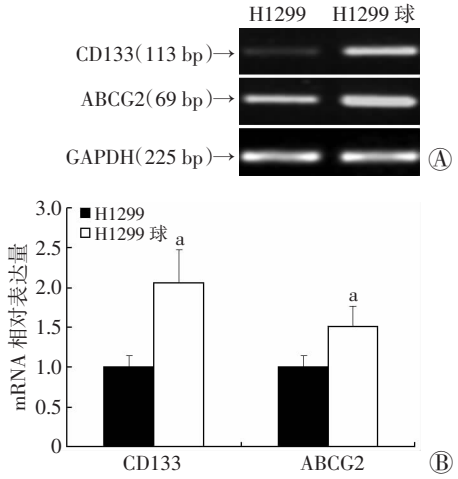
2.4 免疫荧光检测 CD133 和 ABCG2 在 H1299 细胞球的表达

CD133 和 ABCG2 抗原经免疫染色后在荧光显微镜下分别发红光和绿光,与普通贴壁细胞微弱的荧光相比,H1299 细胞球的荧光强度明显增强(图 4),表明细胞球具有更高的 CD133 和 ABCG2 表达量。



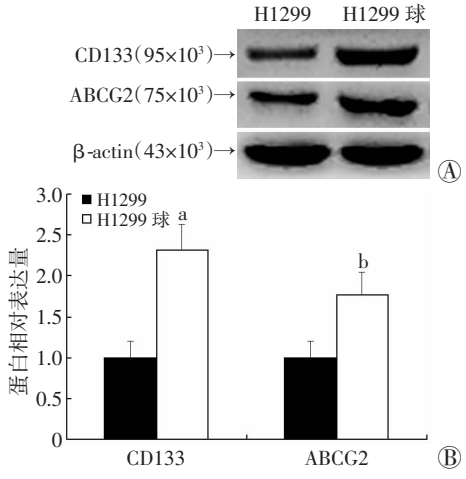
A~F:分别为 H1299 细胞球生长第 1、4、7、10、15、18 天

图 1 倒置显微镜观察 H1299 细胞球的生长 (×200)



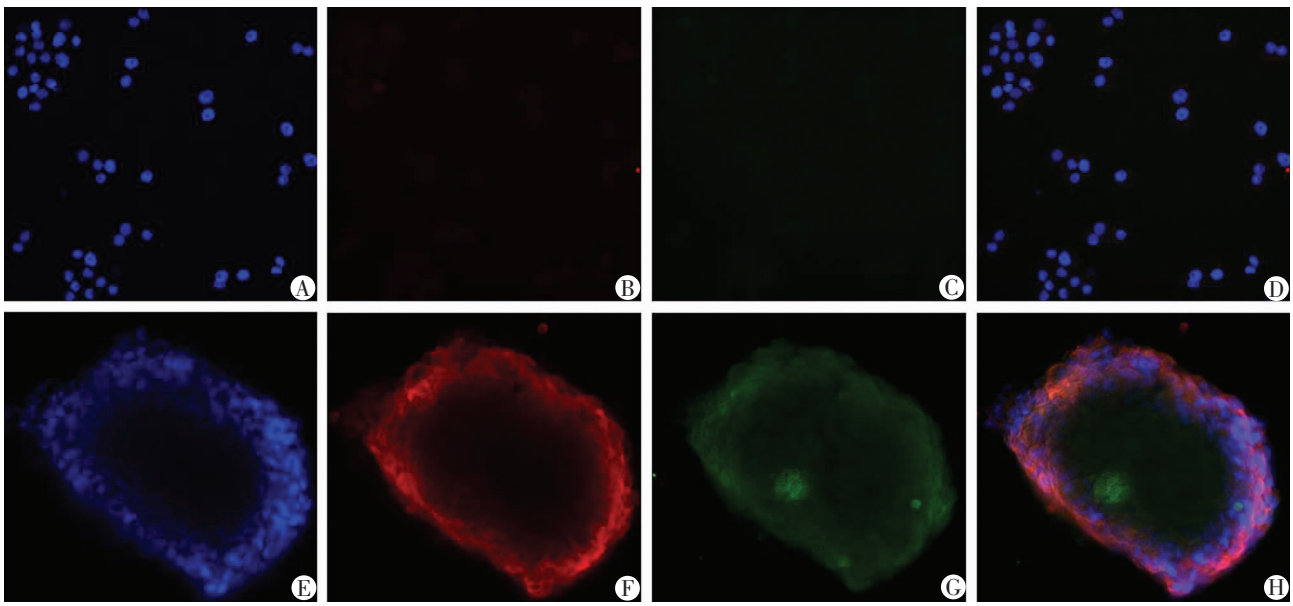
A:RT-PCR 检测;B:q-PCR 分析 a:$P<0.05$,与 H1299 细胞比较

图 2 H1299 细胞及细胞球中 CD133 和 ABCG2 的 mRNA 表达



A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 H1299 细胞比较

图 3 Western blot 检测 H1299 细胞及细胞球中 CD133 和 ABCG2 的蛋白表达



A~D:H1299 贴壁细胞;E~H:H1299 细胞球;A、E:DAPI 染核(蓝色);B、F:CD133(红色);C、G:ABCG2(绿色);D、H:图像融合

图 4 免疫荧光检测 H1299 细胞及细胞球中 CD133 和 ABCG2 的表达 (×400)

2.5 流式细胞仪鉴定 CD133 和 ABCG2 在 H1299 细胞球的表达

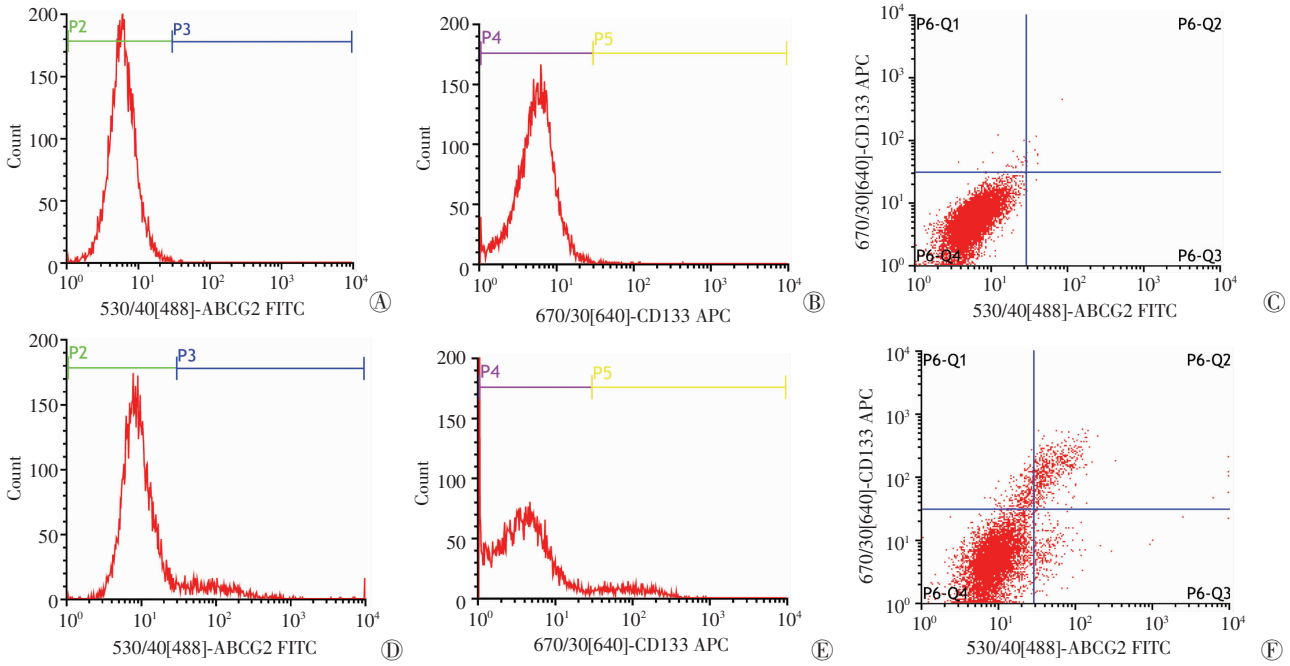
CD133 和 ABCG2 在 H1299 细胞球的表达高于普通贴壁细胞[CD133 阳性率:(11.92±3.34)% *vs* (0.46±0.29)%, $P<0.01$;ABCG2 阳性率:(10.67±3.57)% *vs* (1.78±1.27)%, $P<0.05$;双阳性率:(7.70±2.91)% *vs* (0.17±0.05)%, $P<0.05$;图 5],也证实了以上相关实验结果。

2.6 H1299 细胞球和贴壁细胞克隆形成能力检测

克隆形成实验结果(图 6)显示:H1299 细胞球形成的克隆集落数明显多于贴壁细胞[(278.3±37.4) *vs* (123±19.5), $P<0.05$],表明球形成细胞的体外增殖和自我更新能力更强,具有干细胞样特性。

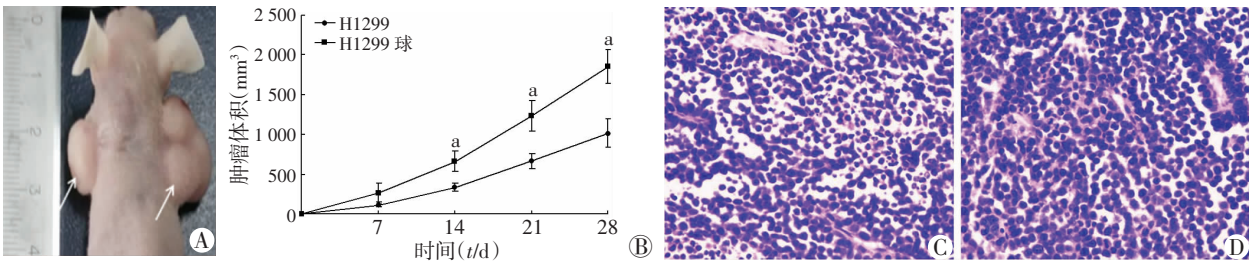
2.7 H1299 细胞球和贴壁细胞致瘤能力检测

通过比较 2 组细胞在裸鼠的成瘤率、潜伏期、生长速度以及肿瘤体积发现:细胞球组的成瘤率更高(5/5∶3/5),潜伏期更短,在注射肿瘤细胞后第 4 天就能形成肉眼可见包块,随后肿瘤生长速度加快,体积明显增大甚至有坏死形成;而普通贴壁细胞组在约 1 周后才出现瘤体,体积相对较小,生长速度也较缓慢(图 7A、B)。移植瘤进一步行 HE 染色,结果显示二者的组织学形态都呈腺癌,且细胞球组癌细胞集聚和有丝分裂较多(图 7C、D),表明 H1299 细胞球的成瘤能力更强。



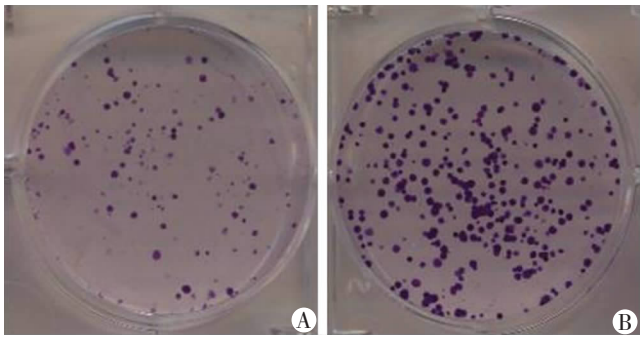
A～C:H1299 贴壁细胞; D～F:H1299 细胞球;A、D:ABCG2$^+$;B、E:CD133$^+$;C、F:双阳性

图 5　流式细胞仪检测 H1299 细胞及细胞球中 CD133 和 ABCG2 的表达



A:裸鼠移植瘤,左箭头代表 H1299 细胞成瘤,右箭头代表细胞球成瘤;B:肿瘤体积变化曲线　a:$P<0.05$,与 H1299 组比较;C、D:瘤体病理学观察(HE ×400)　C 图为 H1299 贴壁细胞成瘤,D 图为 H1299 细胞球成瘤

图 7　裸鼠成瘤实验



A: H1299 贴壁细胞;B: H1299 细胞球

图 6　克隆形成实验

3　讨论

肿瘤干细胞理论近年来广受关注,探索该理论能否应用于肺癌有望阐明导致肺癌复发转移的根本原因,并为临床肺癌特异性靶向治疗指明方向。鉴于高度特异性的肺癌 CSCs 分选标志物目前尚未明确,而肿瘤球模型却在越来越多实体瘤中成功运用,本课题组也采用成球法来富集肺癌 CSCs。与流式分选 CSCs 特异性标志物、SP 表型检测、乙醛脱氢酶(ALDH)活性检测等其他 CSCs 分离方法相比,悬浮细胞球培养法通过在无血清培养基中补充 EGF、bFGF 和 B27 等生长因子,能够在有效抑制细胞分化的同时使相对未分化的细胞存活并不断增殖,是一个不断筛选分离的过程,能简单、快速、经济、高效地富集到 CSCs[13]。考虑到无血清成球法可能存在的一些限制,如种植密度过高导致细胞球与细胞黏附难以区分,以及无法排除死亡细胞漂浮聚集的干扰,因此,我们反复优化实验条件,最终选择以 1 000/mL 的较低细胞种植密度种植细

胞,在不明显降低细胞球形成率的同时最大程度保证一个细胞球只来源于单个细胞。此外,真正的 CSC 能够形成二代、三代甚至以上的细胞球,为保证结果的可靠性,本研究所有实验均采用第三代细胞球进行。

干性基因的表达是鉴定 CSCs 的常用方法之一[4]。对于鉴定肺癌 CSCs,目前可重复性较高的基因主要是 ABCG2 和 CD133,他们对于 CSCs 干性的维持具有重要作用[14]。本实验在成功分离培养出肺癌 H1299 细胞球的基础上,以 CD133 和 ABCG2 为指标对其进行进一步的干性鉴定。PCR、Western blot 和流式检测结果均显示干性标志物 CD133 和 ABCG2 在 H1299 细胞球的表达明显高于贴壁细胞。免疫荧光染色结果也显示 H1299 细胞球高表达 CD133 和ABCG2,且二者均定位于胞膜及胞质,双染现象提示二者在 H1299 细胞球的共表达,可能是维持细胞球干性的一个主要亚群。

干性基因在细胞球中的表达上调与其强大的自我更新、增殖和分化能力紧密相关。克隆形成实验结果显示 H1299 细胞球的集落形成能力明显强于普通贴壁细胞,表明球来源细胞具有更强的体外增殖能力。然而,肿瘤球并不是一个完全由未分化细胞组成的同源结构,它含有更多的分化细胞。目前,还没有哪项研究能够精确地表明肿瘤球中多少细胞是真正的 CSCs,因此,检验 CSCs 存在的金标准还是接种少量细胞到免疫缺陷的小鼠体内观察其致瘤能力[15]。本实验分别接种 H1299 细胞和球来源细胞至裸鼠皮下比较二者的移植瘤形成情况,发现 H1299 细胞球组的成瘤能力明显比普通细胞组要强,成瘤率高,潜伏期短,瘤体生长快。上述各实验结果从不同角度提示:肺癌 H1299 肿瘤球相比于普通肿瘤细胞具有更强的体内外增殖能力,更具有干细胞特性。

本研究结果表明悬浮球培养是分离富集肺癌 CSCs 的有效途径,获得的 H1299 细胞球具有肿瘤干细胞的特征,在一定程度上代表了肺癌 CSCs。共表达 CD133 和 ABCG2 的基因组成可能是 H1299 细胞球具有干细胞特性的真正决定因素,这也为本课题组进一步研究以肺癌干细胞为靶点的与肿瘤发生、发展和耐药等有关的信号机制以及探索肺癌特异性靶向治疗新策略提供了理论依据。

参考文献:

[1] Dela-Cruz C S, Tanoue L T, Matthay R A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention[J]. Clin Chest Med, 2011, 32(4): 605-644. DOI:10.1016/j.ccm.2011.09.001

[2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29. DOI:10.3322/caac.21254

[3] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, *et al*. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111. DOI:10.1038/35102167

[4] Tirino V, Desiderio V, Paino F, *et al*. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization[J]. FASEB J, 2013, 27(1): 13-24. DOI:10.1096/fj.12-218222

[5] Piscitelli E, Cocola C, Thaden F R, *et al*. Culture and characterization of mammary cancer stem cells in mammospheres [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1235: 243-262. DOI:10.1007/978-1-4939-1785-3_18

[6] Yamamuro S, Okamoto Y, Sano E, *et al*. Characterization of glioma stem-like cells from human glioblastomas[J]. Int J Oncol, 2015, 47(1): 91-96. DOI: 10.3892/ijo.2015.2992

[7] House C D, Hernandez L, Annunziata C M. *In vitro* enrichment of ovarian cancer tumor-initiating cells[J]. J Vis Exp, 2015(96): e52446. DOI: 10.3791/52446

[8] Zakaria N, Yusoff N M, Zakaria Z, *et al*. Human non-small cell lung cancer expresses putative cancer stem cell markers and exhibits the transcriptomic profile of multipotent cells [J]. BMC Cancer, 2015, 15: 84. DOI:10.1186/s12885-015-1086-3

[9] Kashihara H, Shimada M, Kurita N, *et al*. CD133 expression is correlated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. Hepatogastroenterology, 2014, 61(134): 1563-1567.

[10] Nomura A, Banerjee S, Chugh R, *et al*. CD133 initiates tumors, induces epithelial-mesenchymal transition and increases metastasis in pancreatic cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(10): 8313-8322. DOI:10.18632/oncotarget.3228

[11] Yin S, Li J, Hu C, *et al*. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity[J]. Int J Cancer, 2007, 120(7): 1444-1450. DOI:10.1002/ijc.22476

[12] Nakanishi T, Ross D D. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression[J]. Chin J Cancer, 2012, 31(2): 73-99. DOI:10.5732/cjc.011.10320

[13] Weiswald L B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology[J]. Neoplasia, 2015, 17(1): 1-15. DOI:10.1016/j.neo.2014.12.004

[14] Alamgeer M, Peacock C D, Matsui W, *et al*. Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies[J]. Respirology, 2013, 18(5): 757-764. DOI: 10.1111/resp.12094

[15] Clarke M F, Dick J E, Dirks P B, *et al*. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(19): 9339-9344.

(**收稿**:2015-10-21;**修回**:2015-11-09)

(编辑 汪勤俭)