基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.003

无血清悬浮培养舌鳞癌Tca8113细胞系及肿瘤干细胞样亚群筛选

孙守娟，季　平，邹　波，邓　诚，杨　晶
（重庆医科大学附属口腔医院颌面外科，重庆　401147）

【摘　要】目的：比较有血清培养基（Serum-supplemented medium，SSM）培养的细胞中和无血清培养基（Serum-free medium，SFM）培养的肿瘤干细胞球体中肿瘤干细胞样亚群的比例，以期获得较好富集肿瘤干细胞的方法。方法：SFM 培养细胞，观察形成肿瘤干细胞球过程中的细胞形态；更换培养基为 SSM 诱导其分化；流式细胞仪检测 SSM 组细胞和 SFM 培养的肿瘤干细胞球分化前、后醛脱氢酶（Aldehyde dehydrogenase，ALDH）的表达。结果：Tca8113 细胞能在 SFM 中存活、增殖并形成肿瘤干细胞球；SFM 和 SSM 培养的细胞中 $ALDH^{high}$ 细胞比例分别为 0.297 0±0.009 0 和 0.010 7±0.002 5，差异有统计学意义（$P<0.05$）；诱导分化后细胞与 SSM 组细胞形态上无明显差异。结论：用 SFM 培养舌鳞癌 Tca8113 细胞可形成肿瘤干细胞球，而且这种细胞球富集了肿瘤干细胞。

【关键词】舌鳞癌 Tca8113；肿瘤干细胞球；醛脱氢酶；无血清培养基培养
【中国图书分类法分类号】R739.86　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-07-29

Serum-free suspension culture system and screening of stem like subpopulation in Tca8113 cell line of squamous cell carcinoma

SUN Shou-juan，JI Ping，ZOU Bo，DENG Cheng，YANG Jing
（*Department of Oral and Maxillofacial Surgery，the Affiliated Stomatology Hospital，Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To compare the proportion of stem like cells from serum-supplemented medium（SSM）culture with those from serum-free medium（SFM）culture in order to obtain better methods for enriching tumor stem cells. *Methods*：Tca8113 cells were cultivated in SFM. The cells were morphologically observed under optical microscope.To induce the differentiation of spherical cells，tumor spheres were cultivated in SSM. The expression of aldehyde dehydrogenase（ALDH）of undifferentiated spherical cells，post-differentiated spherical cells and SSM cells were detected by the fluorescence-activated cell sorting. *Results*：In SFM consisting of EGF，bFGF，and B27，a minority of Tca8113 cells could survive，proliferate，and form the suspended tumor spheres. The tumor spheres highly expressed ALDH（0.297 0±0.009 0:0.010 7±0.002 5）and also displayed differentiation-induced abilities. No significant difference in morphology was found between the post-diferentiated spheres cells and routine cultured Tca8113 cells. *Conclusion*：Tumor spheres with enriched cancer stem cells can be generated under serum-free culture condition with EGF，bFGF，and B27.

【Key words】tongue squamous cell carcinoma Tca8113；tumor spheres；aldehyde dehydrogenase；serum-free medium

头颈部鳞癌，包括口腔鳞癌，是全球第 6 种最常见的肿瘤，在发展中国家排第 3。尽管当前针对肿瘤的治疗方法有了很大改善，但是 5 年生存率仍然很低，约 50%。肿瘤干细胞理论认为，肿瘤细胞中存在一小群具有自我更新和分化能力的细胞，即肿瘤干细胞，这群细胞往往是肿瘤发生、发展、转移和复发的根源[1]。因此，肿瘤干细胞成为近几年的研究热点之一。但是，肿瘤干细胞在癌细胞或癌组织中的含量极小（占细胞总数的 0.01%~4%）[2]，不便于提取细胞的 RNA 和蛋白质，这就限制了对肿瘤干细胞的进一步研究。

本实验主要通过含生长因子的无血清培养基（Serum-free medium，SFM）培养舌鳞癌 Tca8113 细胞，分离和扩增出肿瘤干细胞球体；以在骨髓[3]和脐带血[4]干细胞中高表达同时在很多肿瘤（乳腺癌、肝癌、结肠癌、肺癌和头颈部鳞癌[5,6]）干细胞样亚群中的表达高于在非肿瘤干细胞样亚群中表达的醛脱氢酶（Aldehyde dehydrogenase，ALDH）为检测指标，利用流式细胞仪检测常规有血清培养的细胞和无血清培养的肿瘤干细胞球体细胞中 $ALDH^{high}$ 细胞的比例，从而探索能较好富集肿瘤干细胞的方法，为分选干细胞提供方便。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　细胞　人舌鳞癌 Tca8113 细胞系（重庆医科大学提供，原由上海交通大学医学院附属第九人民医院口外肿瘤实验

作者介绍：孙守娟（1983-），女，硕士，
研究方向：肿瘤的靶向治疗。
通信作者：季　平，男，教授，Email：jiping_62@hotmail.com。
基金项目：重庆市卫生局科研基金资助课题计划资助项目（编号：2008-2-231、2008-2-232）。

室惠赠）。

1.1.2 试剂与仪器 RPMI1640、小牛血清、0.25%胰酶消化液（杭州四季青生物工程材料有限公司）；ALDEFLUOR®试剂盒（Stem cell tecnologies）；表皮生长因子（Epidermal growth factor，EGF）和碱性成纤维细胞生长因子（Basic fibroblast growth factor，bFGF）（均购于 PeproTech）；B27（购于 Invitrogen）；有血清培养基（Serum-supplemented medium，SSM）为含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基，SFM 由 RPMI1640（1:1）、B27（1:50）、EGF（20 ng/ml）和 bFGF（20 ng/ml）组成。

BD FACSAria Ⅱ流式细胞分选仪（Becton dickinson），流式检测在西南医院癌症中心病理实验室完成，其它实验在重庆医科大学生命科学院-重庆市重点实验室完成。

1.2 方法

1.2.1 Tca8113 细胞的常规有血清培养 液氮冻存的 Tca8113 细胞在 37℃水浴中复苏后用 SSM，在 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养，待培养至对数期时用 0.25%胰酶消化，按 1:2 或 1:3 传代。

1.2.2 肿瘤干细胞球的培养 待 SSM 中培养的细胞生长到对数期时，用 PBS 液清洗 2~3 次后，每 50 cm^2 培养瓶中加入 4 ml SFM，平放于细胞培养箱中培养，每 2~3 d 换液 1 次，换液时吸出培养瓶中原先的液体至离心管中，把离心管放于培养箱静置 1 h，去掉离心管上部 2/3 的上清液，其余放回培养瓶，再添加 4 ml 新鲜的 SFM 继续培养。光学显微镜下观察 Tca8113 细胞在 SFM 中形成肿瘤干细胞球过程中的细胞形态。

1.2.3 肿瘤干细胞球的诱导分化实验 将在 SFM 中培养 20 d 后形成的肿瘤干细胞球重新置于 SSM 中，诱导其分化，倒置显微镜观察细胞形态变化。

1.2.4 流式细胞仪检测 应用流式细胞仪分别检测 SFM 培养的第 1、5、10、15、20、25、30 天的细胞中 $ALDH^{high}$ 细胞的比例，每次检测时分别选取 3 瓶中的部分细胞进行染色检测，检测后的细胞弃掉，不再回收，培养瓶中的剩余细胞继续培养；检测常规 SSM 培养的细胞中 $ALDH^{high}$ 细胞的比例；检测肿瘤干细胞球体有血清培养过程中 $ALDH^{high}$ 细胞的比例。

按照 ALDEFLUOR®试剂盒说明书，分别收集需要检测的细胞，用 0.25%胰酶消化，离心去上清，分别重悬于 ALDEFLUOR Assay Buffer 中，细胞计数，调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml 左右，从中取出 0.5 ml 作为流式空白对照，每组细胞都做如下操作：①准备 2 个 EP 管分别标记“test”和“control”，然后在“test”管中置入调整过的细胞悬液 1 ml。②加入 5 μl DEAB（DEAB 为 ALDEFLUOR 基质的抑制剂）试剂至“control”管中；加 5 μl 活化的 ALDEFLUOR 基质至“test”管，混合并立刻取出 0.5 ml 至 DEAB“control”管中。③在 37℃水浴箱中温育“test”管 和“control”管 30~60 min。④孵育之后，离心测试管和对照管：250 × g，5 min。去掉上清，0.5 ml ALDEFLUOR Assay Buffer（buffer 是专门设计用来防止醛脱氢酶荧光产物外排的）重悬细胞，盖上样品的盖子，立即放在冰上。⑤流式细胞仪检测 ALDH 的表达。

1.2.5 数据分析 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析，实验结果用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。采用方差分析进行多组间均数比较；*LSD-T* 检验进行多重比较，对 20 d 组与其余各组间差别进行对比分析，$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

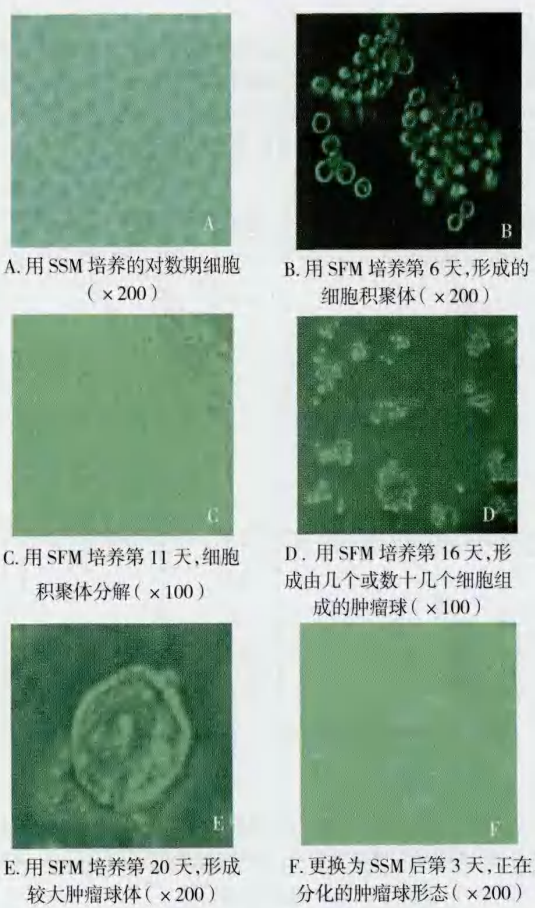
2 结 果

2.1 悬浮肿瘤干细胞球的形成过程

在常规培养至对数期的培养瓶中加入 SFM，刚开始的第 1~5 天，大部分细胞还是贴壁；第 6~10 天细胞逐渐脱离瓶底悬浮增生形成松散的“葡萄状”细胞聚集团块，此为细胞粘附聚集形成的细胞积聚体；第 11~16 天时，“葡萄状”状细胞团分解并调亡，但此时可见一小部分细胞持续扩增形成不太规则的细胞球，轻轻晃动培养瓶可见为数不多的细胞球沉于瓶底；第 17~21 天时可见细胞球体越来越大，一般由数十个至数百个细胞组成，密度均一，折光性良好，球内的细胞连接紧密，不能准确区分细胞间界限。一般新形成的细胞球体不规则，新生单个细胞常以“出芽”方式连接在球体上，随着培养时间的延长，细胞球体越来越规则，一般成卵圆形或圆形。细胞传代时用 0.05%胰酶和机械吹打法制成单细胞悬液，传代后的细胞一般在 2 周左右形成较规则的细胞球体，比之前形成细胞球体速度要快，见图 1B~E。

2.2 肿瘤干细胞胞球的分化过程

将在 SFM 中形成的干细胞球重新置于 SSM 中后，第 1~3 天可见细胞球内的细胞逐渐移出细胞球，形成“细胞岛”，摇晃培养瓶只见少数细胞贴壁，随着换夜和时间的延长，才慢慢形成贴壁生长的单层细胞，此过程大约 10 d 左右，见图1F。



A. 用 SSM 培养的对数期细胞（×200）　B. 用 SFM 培养第 6 天，形成的细胞积聚体（×200）

C. 用 SFM 培养第 11 天，细胞积聚体分解（×100）　D. 用 SFM 培养第 16 天，形成由几个或数十几个细胞组成的肿瘤球（×100）

E. 用 SFM 培养第 20 天，形成较大肿瘤球体（×200）　F. 更换为 SSM 后第 3 天，正在分化的肿瘤球形态（×200）

图 1 倒置显微镜下 Tca8113 细胞形态

2.3　流式细胞仪检测

2.3.1　肿瘤干细胞球培养过程中 ALDH 的表达情况　流式检测发现，$ALDH^{high}$ 细胞比例随着 SFM 培养时间的延长逐渐升高，SFM 培养 20 d 的细胞中 $ALDH^{high}$ 细胞所占比例最高，20 d 以后逐渐降低。在 SFM 培养的第 1、5、10、15、20、25、30 天（分别标记为 1、2、3、4、5、6、7 组）时细胞中 $ALDH^{high}$ 细胞的比例分别为 0.010 7 ± 0.002 5、0.025 0 ± 0.002 0、0.041 0 ± 0.002 0、0.095 0 ± 0.004 0、0.297 0 ± 0.009 0、0.282 7 ± 0.009 5、0.272 7 ± 0.005 5（见图 2），n=3，经方差分析得 F=1 577.34，P<0.000 1。

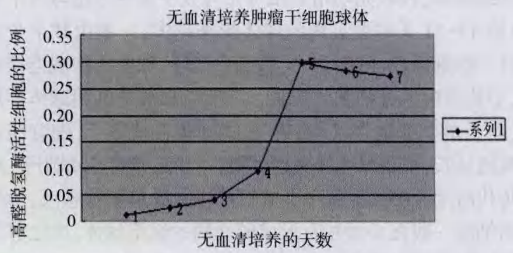
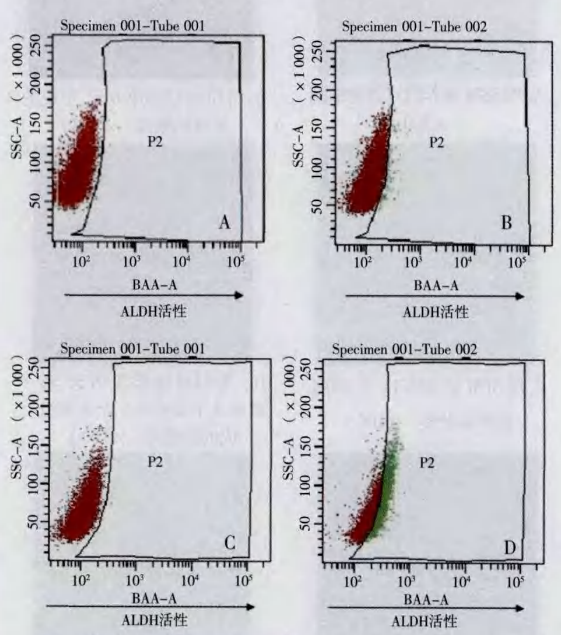


图 2　肿瘤干细胞球培养过程中 $ALDH^{high}$ 细胞比例的变化

LSD-T 检验结果：第 20 天组与其余各组之间比较后分别均具有统计学意义，提示，SFM 培养 20 d 时是分选肿瘤干细胞亚群的最佳时机。

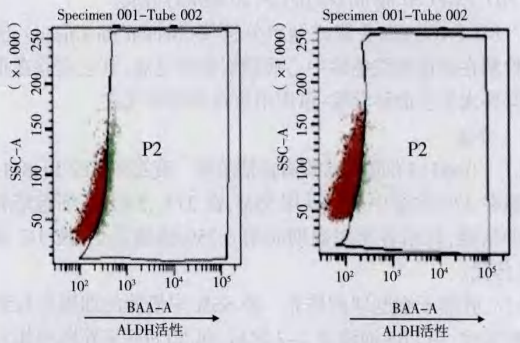
2.3.2　常规有血清培养的细胞和肿瘤干细胞球中 ALDH 的表达情况　流式细胞术分析显示 SSM 培养的细胞和 SFM 培养 20 d 后形成的肿瘤干细胞球中 $ALDH^{high}$ 细胞比例分别为 0.010 7 ± 0.002 5 和 0.297 0 ± 0.009 0，肿瘤干细胞球体细胞 $ALDH^{high}$ 的比例高于 SSM 组培养的细胞，差异有统计学意义（P<0.05），说明无血清悬浮培养形成的肿瘤干细胞球体，可以富集得到大量 $ALDH^{high}$ Tca8113 细胞，见图 2。



A、B. SSM 培养的细胞中 $ALDH^{high}$ 细胞比例为 1.3%；C、D. SFM 悬浮培养 20 d 时肿瘤干细胞球中 $ALDH^{high}$ 细胞比例为 30.6%。A、C. 有醛脱氢酶活性抑制剂 DEAB；B、D. 无 DEAB

图 3　Tca8113 细胞中 ALDH 活性分析典型流式细胞检测结果

2.3.3　肿瘤干细胞球体有血清培养过程中 ALDH 的表达情况　流式细胞术分析显示 SFM 培养 20 d 后形成的肿瘤干细胞球（$ALDH^{high}$ 细胞比例为 0.297 0 ± 0.009 0）中重新加入 SSM 的第 3 天和第 7 天 $ALDH^{high}$ 细胞比例分别为：0.098 0 ± 0.003 0 和 0.040 0 ± 0.005 0，由此推测肿瘤干细胞球体细胞中的 $ALDH^{high}$ 细胞可能分化为 $ALDH^{high}$ 细胞和 $ALDH^{low}$ 细胞。



A. SSM 培养第 3 天的细胞中 $ALDH^{high}$ 细胞比例为 9.5%；B. SSM 培养第 7 天时肿瘤干细胞球中 $ALDH^{high}$ 细胞比例为 4.1%

图 4　Tca8113 细胞中 ALDH 活性分析典型流式细胞检测结果

3　讨　论

目前分选头颈部肿瘤干细胞的方法主要有：①功能学分选：肿瘤干细胞具有对 DNA 荧光染料 Hoechst33342 或诺丹明拒染的特性，利用该特性联合荧光激活细胞分选仪（FACS）分选细胞，被分选出的细胞称为侧群（SP）细胞。②干细胞标志物筛选方法：如 CD44、CD133 等。③ALDEFLUOR分析法：ALDEFLUOR 试剂系统是一种非免疫方面的鉴定方法，它是基于高表达于骨髓造血系统、外周血、神经系统[7]中的干细胞和祖细胞的 ALDH 活性来进行功能上的分选。其原理是细胞中大量表达的 ALDH 酶，可将 ALDH 底物-BAAA（Bodipy™-aminoacetaldehyde）水解为可发荧光的 BAA（Bodipy™-aminoacetate），因此使得高水平表达 ALDH 的细胞呈现明亮的荧光（$ALDH^{high}$），从而用一个普通的流式分选仪就可检测、计数和分选。但是上述这几种方法最大的技术瓶颈是肿瘤干细胞只占肿瘤细胞的很少一部分，如 Zhang 等[8]在口腔鳞癌中分离出 SP 细胞：肿瘤实体中 SP 细胞占细胞总数的 0.1%~6.9%，舌癌 9 种细胞系中 SP 细胞占细胞总数的 0.2%~9.8%，特别是在 Tca8113 细胞系中 SP 所占未分离细胞的比例更低为 0.2%。Prince 等[9]从头颈部鳞状细胞癌中分离出CD44$^+$肿瘤干细胞，占未分离细胞的 10%以下。Clay 等[10]从 6 例头颈部鳞癌组织中分离出 $ALDH^{high}$，其占细胞总数的 1%~7.8%。但是要想进一步研究肿瘤干细胞相关基因、蛋白和生物学特性就必须纯化足量的细胞，其分离干细胞的工作量之大，限制了对肿瘤干细胞的进一步研究。

有文献报道含生长因子的无血清培养基可以维持肿瘤

干细胞的未分化状态和促进肿瘤干细胞增殖[11,12]。这可能与细胞的失巢凋亡(Anoikis)有关，失巢凋亡是细胞程序性死亡的一种，是由于与细胞外基质和其他细胞脱离接触而诱发的。然而部分肿瘤细胞具有失巢凋亡抗性，即肿瘤细胞从原发组织脱落，游走、迁移到远端组织，并种植生长，这往往引起肿瘤的远端转移和复发[13,14]。肿瘤细胞无血清悬浮培养，作为失巢凋亡抗性研究的体外模型[15]，使得细胞之间不能相互接触，细胞也不能与培养瓶底接触，所以只有能克服失巢凋亡的干细胞才能存活下来，

因此，选择含适合生长因子的 SFM，生成富集肿瘤干细胞的肿瘤干细胞球，再进一步通过免疫法或功能法纯化肿瘤干细胞是一种行之有效的方法。

本实验主要进行了以下研究：①SFM 中最初时只添加 EGF、bFGF 生长因子，结果只能形成肿瘤细胞积聚体，大约 1 周后细胞全部分解死亡，未能形成肿瘤干细胞球体。后来根据相关文献报导增加了 B27，随着培养时间的延长，可以形成肿瘤干细胞球体。关于球体形成的条件目前尚不十分清楚，在 pince 头颈部鳞癌[9]的研究中通常应用 EGF、bFGF 诱导球体形成。一些报道中还添加了 B27、胰岛素、N1 等。②随着 SFM 培养时间的延长，微球体体积逐渐增大；更换为 SSM 培养基时，细胞从微球体中移出，10 d 后与正常 Tca8113 细胞相比，细胞形态上无明显差异；流式细胞仪检测肿瘤干细胞球 SSM 培养过程中 $ALDH^{high}$ 细胞比例结果显示，随着时间的延长比例越来越小，由此推测 $ALDH^{high}$ 细胞可能分化为 $ALDH^{high}$ 细胞和 $ALDH^{low}$ 细胞。这几点即部分证明了肿瘤微球体具有自我更新和分化能力。依据肿瘤干细胞理论(肿瘤细胞中具有自我更新和分化能力的细胞称为肿瘤干细胞)，所以肿瘤微球体被称为肿瘤干细胞球亦算是名副其实。③用流式细胞仪检测肿瘤细胞球体形成过程中 $ALDH^{high}$ 细胞的比例，数据显示 SFM 培养的前 20 d，$ALDH^{high}$ 细胞比例随着 SFM 培养天数的延长逐渐升高；到第 20 天时 $ALDH^{high}$ 细胞比例最高为 0.297 0 ± 0.009 0；20 d 以后逐渐降低，这可能与肿瘤干细胞球体体积过大，使得球体中央细胞缺少营养供应，导致中央细胞死亡有关。由此推测用 SFM 培养 20 d 时，此刻即是细胞传代也是 $ALDH^{high}$ 细胞分选的最佳时间。④常规 SSM 培养的细胞中 $ALDH^{high}$ 细胞的比例为 0.010 7 ± 0.002 5，与其在头颈部鳞癌中的比例相一致[5]。⑤流式细胞术分析显示 SSM 培养的细胞和 SFM 培养 20 d 后形成的肿瘤干细胞球中 $ALDH^{high}$ 细胞比例分别为 0.010 7 ± 0.002 5 和 0.297 0 ± 0.009 0，由此显示出无血清培养可以大大富集 $ALDH^{high}$ 细胞。推测无血清培养的优势可能与肿瘤干细胞样细胞具有失巢凋亡抗性有关。

总之，在优化培养条件后成功富集得到舌鳞癌Tca8113细胞系微球体，并能在体外稳定传代，大量扩增。同时微球体被证实具有肿瘤干细胞特性，高表达干细胞表面标记分子 ALDH，可以认为微球体富含舌鳞癌干细胞，为分选干细胞提供方便。

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] Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2004, 51(1): 1-28.

[3] Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, et al. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity[J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1142-1151.

[4] Hess D A, Meyerrose T E, Wirthlin L, et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity[J]. Blood, 2004, 104(6): 1648-1655.

[5] Chen Y C, Chen Y W, Hsu H S, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(3): 307-313.

[6] Clay M R, Tabor M, Owen J H, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase[J]. Head Neck, 2010, 32(9): 1195-1201.

[7] Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 975-985.

[8] Zhang P, Zhang Y, Mao L, et al. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes[J]. Cancer Letters, 2009, 227(2): 227-234.

[9] Prince M E, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(3): 973-978.

[10] Clay M R, Tabor M, Owen J H, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase[J]. Head Neck, 2010, 32(9): 1195-1201.

[11] Lee J, Kotliarova S, KotliarovY, et al. Tumor stemcells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines[J]. Cancer Cell, 2006, 9(5): 391-403.

[12] 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.

[13] Zhu Z, Sanchez-Sweatman O, Huang X, et al. Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1707-1716.

[14] Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, et al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB[J]. Nature, 2004, 430(7003): 1034-1039.

[15] Rhim J S. Cell aggregation assay: a rapid means of evaluating and selecting in vitro transformed cells[J]. Cancer Detect Prey, 1983, 6(3): 381-388.

（责任编辑：冉明会）