基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.017

结直肠肿瘤细胞球的干细胞相关特性研究

贾健锋，程　勇，郑梦颖，饶明月
（重庆医科大学附属第一医院胃肠外科，重庆　400016）

【摘　要】目的：无血清悬浮培养生成 5 种人结直肠肿瘤细胞球，体外稳定传代培养，研究其在体外增殖、分化及转移等生物学特性。方法：人结直肠癌细胞 SW480、SW620、LOVO、HT29 和 HCT116 在添加了细胞生长因子的无血清培养基(Serum-free medium，SFM)中悬浮培养，稳定传代并诱导分化。选择其中 HCT116 细胞系用流式细胞技术检测单层细胞及其肿瘤细胞球干细胞标记分子 $CD133^+$的表达。Transwell 小室实验、免疫荧光及 RT-PCR 分别检测 HCT116 单层细胞及其肿瘤细胞球的体外转移能力，以及间质化标记分子 N-cadherin 及 Vimentin 的表达。结果：5 种人结直肠癌细胞系均在 SFM 中形成能稳定传代培养的肿瘤细胞球，其在含血清培养基(Serum supplemented medium，SSM)中重新贴壁生长并各自恢复亲代细胞的生物学特性。与 HCT116 单层细胞相比，HCT116 肿瘤细胞球中 $CD133^+$细胞比例显著增多，并具有更强的转移能力，以及高表达间质化标记分子 N-cadherin 及 Vimentin。结论：通过无血清培养可以生成人结直肠肿瘤细胞球，这些球体中富含肿瘤干细胞样特性的细胞。

【关键词】结直肠肿瘤；肿瘤干细胞；上皮-间质化；无血清培养；CD133
【中国图书分类法分类号】R735.3+5；R735.3+7　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-07-17

Biological characteristics of human colorectal cancer spheres cultured in serum-free medium

JIA Jian-feng, CHENG Yong, ZHENG Meng-ying, RAO Ming-yue
(*Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To generate cancer spheres from five different colorectal cancer cell lines in serum-free medium (SFM), stably subculture them in vitro, and study their biological characteristics of proliferation, differentiation and metastasis. *Methods*: Human colorectal cells SW480, SW620, LOVO, HT29 and HCT116 were cultured in SFM with supplemented cell growth factors; stable subculture was induced to differentiate in serum supplemented medium (SSM). The expression of $CD133^+$ in HCT116 monolayer cells and spheres were investigated by flow cytometry. Cell metastasis assay, immunofluorescence and RT-PCR were applied to examine cell metastasis ability in vitro and the expression of mesenchymal markers N-cadherin and Vimentin of both HCT116 monolayer cells and spheres. *Results*: Cancer spheres could be generated from five colorectal cancer cell lines in SFM. These spheres were stably subcultured and induced to differentiate by serum supplemented medium, and these differentiated cells were in adherent growth and kept the same morphology with the parental cells. HCT116 spheres, compared with parental cells, had higher $CD133^+$, N-cadherin and Vimentin expressions as well as metastasis ability. *Conclusion*: Colorectal cancer spheres can be generated in SFM culture, and these cancer spheres are rich in cancer stem-like cells.

【Key words】 colorectal cancer; cancer stem cell; epithelial-mesenchymal transition; serum-free culture; CD133

肿瘤干细胞学说认为肿瘤组织中同样存在一小部分干细胞，这小部分亚群细胞才是肿瘤复发转移的根源[1-3]。结直肠癌的发病率逐年上升，严重威胁着人类的身体健康，2007年 Ricci-Vitiani 研究[4]发现结直肠癌中也存在 TSCs(Tumor stem cells，TSCs)，故富集结直肠 TSCs 并研究其生物学特性，对结直肠癌的诊断、治疗具有重要意义。为此，本研究通过无血清培养 5 种人结直肠癌细胞富集 TSCs，并将其稳定传代和诱导分化，研究结直肠 TSCs 的自我更新和分化能力；以及对其中 HCT116 单层细胞与肿瘤细胞球的干细胞和间质化标记分子进行差异研究，以期为体外进一步探明人结直肠癌复发和转移的分子机制奠定基础。

作者介绍：贾健锋(1985-)，男，硕士，
研究方向：胃肠道肿瘤临床及基础研究，
通信作者：程　勇，男，教授，Email：chengyongcq@yahoo.com.cn。
基金项目：重庆市自然科学基金资助项目(编号：2008BB5230)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SW480、SW620、LOVO、HT29 和 HCT116 细胞系购自中国科学院细胞库。完全培养基(SSM)为含 10%小牛血清的 DMEM 培养液(Gibco,美国)。细胞在 37℃、5%CO_2 恒温培养箱内培养备用。

1.2 实验方法

1.2.1 结直肠癌细胞系的无血清培养 无血清培养基为 DMEM/F12 培养基中加入细胞生长因子：50ng/ml EGF(peprotech,美国)、10ng/ml Noggin(peprotech,美国)、50ng/ml R-Spondin 1(R&D,美国)。1%琼脂糖(Agarose)附着面的制备：称取琼脂糖粉末 0.5 g,溶于装有 50 ml 三蒸水的玻璃瓶中高压灭菌,待冷却至 50℃用移液器迅速将 1 ml/孔琼脂糖移入 6 孔板中,晃动孔板使琼脂均匀铺满孔底后备用。取对数生长期的上述结直肠癌细胞,0.25%胰酶消化后吹打成单细胞悬液,用无血清的 DMEM/F12 培养基重悬,台盼蓝染色计数,以 10^3 个/ml 密度接种至盛有 SFM 上述 6 孔板中进行常规培养。每天置于显微镜下观察细胞球的形成情况,隔天半量换液。

1.2.2 结直肠肿瘤细胞球传代和诱导分化 当肿瘤细胞球生长到 6~8 d 时,离心收集肿瘤细胞球,重悬于细胞离散剂 Accutase 液中,孵箱中消化 5 min 后,轻轻吹打至肿瘤细胞球离散为单细胞,离心后按 1:2 比例接种至 SFM 中传代培养,观察细胞的自我更新情况。待 2 周后收集形成的各种细胞球放入玻璃培养瓶中,加入含 10%小牛血清的 DMEM 培养液诱导分化,分别在不同时间点 24、48 h 及 72 h 置于显微镜下观察细胞形态及生长状态的变化。

1.2.3 流式细胞检测肿瘤细胞球中 $CD133^+$细胞含量 HCT116 单层细胞及肿瘤细胞球分别用 0.25%胰酶和 Accutase 制备成细胞悬液,计数后调整细胞数量为 1×10^6 个/组,每管中按(工作液 1:11 稀释)加入鼠抗人单抗 CD133-PE(Miltenyi,德国),对照管加入同体积的同型对照抗体,混匀,室温下避光孵育 20 min。PBS 清洗 2 次后,用含 1%多聚甲醛的 PBS 固定重悬细胞,上流式细胞仪检测 $CD133^+$细胞的含量。

1.2.4 免疫荧光检测肿瘤细胞球内 N-cadherin 及 Vimentin 表达 将 SFM 中培养形成的各结直肠肿瘤细胞球用 PBS 洗涤离心,制成细胞球悬液,涂于防脱玻片上晾干,4%多聚甲醛在室温下固定后 PBS 洗涤,接着用 0.3%过氧化氢灭酶后 PBS 洗涤,再用 0.2%TritonX-100 破膜后 PBS 洗涤,然后 5% BSA 封闭,加入兔抗人 N-cadherin 单克隆抗体(1:50,Santa Cruz,美国)或鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体(1:50,Santa Cruz,美国),4℃过夜,洗涤后加 FITC 或 TRITC 标记的相应二抗,室温暗处孵育,加 4,6 二脒基-2-苯吲哚盐酸(4,6-diamidino-2-phenylindole hydrochloride,DAP I,Sigma,美国)复染 5 min,洗涤后倒置显微镜观察。同时设不加一抗的空白对照。

1.2.5 RT-PCR 实验检测肿瘤细胞球中 N-cadherin 及 Vimentin 表达 取 HCT116 细胞和肿瘤细胞球,Trizol(TaKaRa 公司)裂解细胞,提取总 RNA,紫外分光光度计定量。按逆转录试剂盒(TaKaRa 公司)说明书进行反应,得到的 cDNA-20℃保存。取 1 μl cDNA,分别加入 N-cadherin 和 Vimentin 的上下游引物各 1 μl、2×Taq PCR MasterMix 12.5 μl 和去离子水 9.5 μl,反应体系为 25 μl。引物及反应条件见表 1。反应结束后将 3 μl PCR 产物加样至 2%琼脂糖凝胶样品孔中,在 1× TBE 电泳缓冲液中鉴定 PCR 产物,BioRad 凝胶成像系统照相并记录,Quantity One 软件分析实验结果。

1.2.6 Transwell 小室实验检测肿瘤细胞球体外转移能力 HCT116 单层细胞及肿瘤细胞球分别用 0.25%胰酶和 Accutase 制备成细胞悬液,计数后调整细胞数量为 1×10^4 个/ml。将孔径 8 μl 的 Transwell 小室(Millipore,美国)放入 24 孔板中,下室加入 600 μl 含 10%FBS 的 DMEM 培养基,上室加入 400 μl 细胞悬液, 同时加入 0.1%BSA 维持细胞悬液的渗透压。每组细胞设 2 个复孔培养 12 h 后(等同于重复 3 次实验),取出小室并用棉签将上室细胞擦掉,PBS 清洗小室,4%多聚甲醛常温下固定 20 min,PBS 洗净后瑞氏染液染色 10 min,洗净晾干后用眼科镊将滤膜揭下,细胞面朝下,中性树胶封片。显微镜下分别计数中间和四周 5 个视野区的穿膜细胞数,取平均数表示每组细胞的迁移能力。

1.2.7 统计学处理 使用 SPSS17.0 软件对数据进行分析。数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,实验组与对照组之间采用独立样本 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

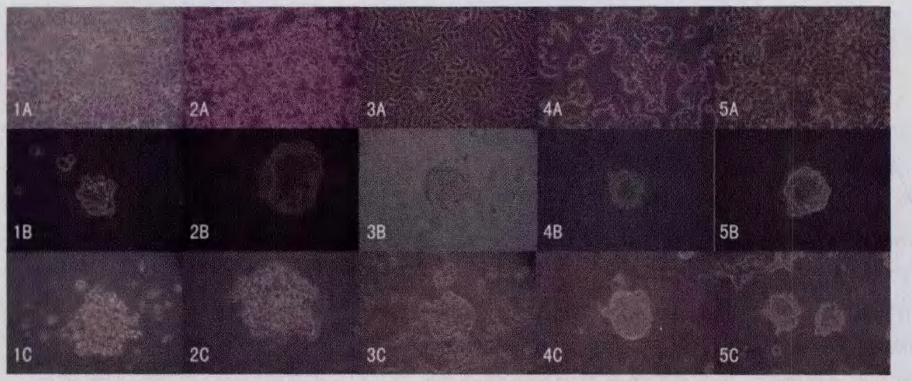
2 结 果

2.1 结直肠肿瘤细胞球的形成、传代和诱导分化。

5 种结肠癌细胞以 10^3 个/ml 的密度接种于 SFM 中,起初各细胞都单个悬浮生长,自第 1 天后 HT29 和 HCT116 行成微小“肿瘤细胞球”,第 2~7 天这些细胞球不断长大,并且形状变成规则的圆球体。SW480 和 SW620 在第 1~2 天开始出芽增殖,到第 3 天形成细胞球,此后不断长大至第 7 天。LOVO 形成细胞球最为缓慢,第 1~4 天出芽增殖缓慢,第 5 天基本形成微小的细胞球,此后迅速长大到第 7 天后球体不再长大、

表 1 PCR 引物序列

名称	引物序列	产物大小	温度
N-cadherin	上游引物 5’-GCTGATGTTTGTGGTATGGATG-3’	430 bp	60℃
	下游引物 5’-CTGCTCACCACCACTACTTGAG-3’		
V imentin	上游引物 5’-GAAGAGAACTTTGCCGTTGAAG-3’	122 bp	59.5℃
	下游引物 5’-TTGAGCAGGTCTTGGTATTCAC-3’		
GADPH	上游引物 5’-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3’	259 bp	58℃
	下游引物 5’-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3’		



1. SW480　2. SW620　3. LOVO　4. HT29　5. HCT116

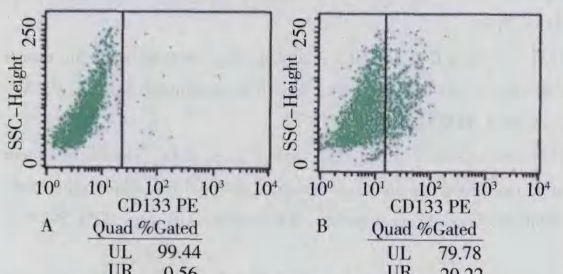
A. 常规含血清培养 5 种结直肠癌细胞系（×100）；B. 无血清培养第 7 天形成的 5 种肿瘤细胞球（×100）C. 用血清诱导肿瘤细胞球的分化情况（×100）

图 1　5 种结直肠肿瘤细胞球及血清诱导分化情况

形状规则。生长至第 7~9 天各肿瘤细胞球折光度变差，各肿瘤细胞球开始贴住琼脂糖生长，失去悬浮生长状态。此时球体大小稳定，加入细胞离散剂 Accutase 将肿瘤细胞球打散后，按 1:2 的比例传代，无血清培养数天后仍可以形成与亲代肿瘤细胞球形态相同的细胞球。将 5 种肿瘤细胞球接种于 SSM 中诱导分化，24 h 后开始有肿瘤细胞球贴壁生长，形成细胞重叠生长的贴壁圆形“细胞群”，其形态在高倍镜下观察与各结直肠癌细胞来源完全相同。血清诱导 72 h 后，肿瘤细胞球完全贴壁生长并增殖。加入 0.25%胰酶+EDTA 消化后可以吹打成细胞悬液，可稳定的在 SSM 中传代培养。并且这些子代细胞接种于 SFM 后，可以重新形成肿瘤细胞球，其生长特性和形态与各自来源的 5 种结直肠癌亲代细胞相同（见图 1）。

2.2　HCT116 单层细胞和肿瘤细胞球中表面标记分子 CD133 的检测

流式细胞检测结果显示，HCT116 肿瘤细胞球中 $CD133^+$ 细胞含量为（20.40 ± 0.52）%，明显高于单层细胞的（0.50 ± 0.17）%，t'=8.217；P<0.01（见图 2）。这表明采用无血清培养方法可以富集到大量 $CD133^+$ 的 HCT116 细胞。

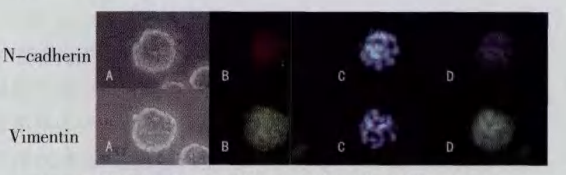


A. HCT116 单层细胞；B. HCT116 肿瘤细胞球

图 2　CD133 在 HCT116 单层细胞和肿瘤细胞球的流式检测

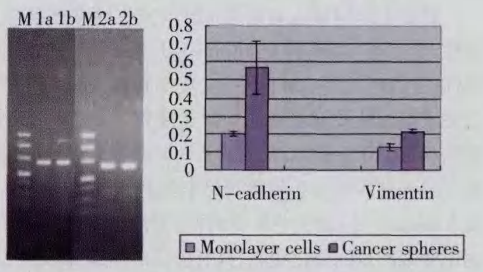
2.3　HCT116 单层细胞和肿瘤细胞球中 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白及 mRNA 的表达

通过免疫荧光检测到在 HCT116 肿瘤细胞球中 N-cadherin 和 Vimentin 表达胞浆中，其荧光强度明显增强。相比较于单层细胞，RT-PCR 检测到这两种转移相关标记分子的 mRNA 水平上调（$t_{N\text{-cadherin}}$=4.385，$t_{Vimentin}$=6.572；P<0.05）（见图3、图 4）。



A. 可见光下细胞球的形态；B. 红色/绿色荧光下 N-cadherin 和 Vimentin 各自在细胞球中的表达；C. DAPI 染核；D. 合并（×100）

图 3　HCT116 细胞球中间质化标志物的表

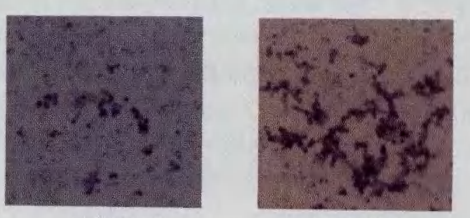


M. Marker DL 500；1. N-cadherin；2. Vimentin；a. 单层细胞；b. 肿瘤细胞球 PCR 数据图（P<0.05）

图 4　HCT116 单层细胞及肿瘤细胞球中间质化标志 mRNA 的表达

2.4　HCT116 单层细胞和肿瘤细胞球的转移能力

通过 Transwell 实验检测到 HCT116 肿瘤细胞球细胞穿过孔膜细胞数为 104.67 ± 14.64，显著高于单纯细胞 28.67 ± 6.50（t'=8.342；P<0.05），表明肿瘤细胞球细胞具有更强的转移能力。



A. 单层细胞　B. 肿瘤细胞球

图 5　HCT116 单层细胞与肿瘤球细胞的转移能力（×100）

3 讨 论

干/祖细胞可以在无血清环境中悬浮生长，而分化细胞则会死亡[5]。目前无血清培养方法已经成功应用于乳腺癌[6]、神经胶质瘤[7]、前列腺癌[8]及结直肠癌[9]等干细胞的分离培养。本研究通过模拟低粘附环境的无血清培养，成功从人结直肠癌细胞系中获得了稳定传代的肿瘤细胞球。其在添加了细胞生长因子的无血清环境中自我更新，表现出较强的增殖能力；细胞球可以通过细胞离散剂 Accutase 打散后稳定传代，并在无血清培养基中重新形成细胞球。将细胞球接种于 SSM 中诱导分化，可重新贴壁生长增殖，其形态与单层细胞保持一致，这些表明肿瘤细胞球处于未分化状态，具有可塑性，可在外界刺激因素下定向分化为成熟细胞。

CD133 曾命名为 AC133，最初在造血干/祖细胞中发现，后来研究认为 CD133 也是非造血系统干细胞的标记分子。其作为一种干细胞表面标记分子已经被证实在神经胶质瘤[10]、前列腺癌[11]等干细胞中表达，与肿瘤的发生和转移具有密切联系。Ricci-Vitiani[4]和 O'Brien[12]在 2007 年分别发表对结直肠癌起始细胞的研究，均认为结直肠肿瘤干细胞起始于 $CD133^+$细胞，因此本研究通过流式细胞检测 HCT116 单层细胞和肿瘤细胞球中 $CD133^+$细胞的含量，发现肿瘤细胞球中 $CD133^+$细胞数量显著增多，这表明结直肠肿瘤细胞球中富含有 $CD133^+$细胞。

肿瘤干细胞被认为是恶性肿瘤发生转移的根源，其转移特性与上皮-间质转化（Epithelial-mesenchymal transition，EMT）密切相关[13]。EMT 是指上皮细胞在特定的因素作用下，失去细胞极性及细胞间的紧密连接和粘附连接，而获得了浸润性和游走迁移能力，变成具备间质细胞形态和特性的细胞，这一过程在肿瘤发生侵袭转移中具有重要作用。N-cadherin 及 Vimentin 是 EMT 中重要的蛋白分子，其在细胞中的高表达说明细胞呈间质化状态，具有极强的侵袭转移能力[14]。本研究通过免疫荧光技术检测到间质化标记分子 N-cadherin 及 Vimentin 表达于球体细胞的胞浆中，同时采用 RT-PCR 检测其 mRNA，发现相比较于单层细胞，细胞球中 N-cadherin 及 Vimentin mRNA 水平表达上调，并通过 Transwell 小室实验检测到 HCT116 肿瘤细胞球具有更强的转移能力。这些结果同时证明了肿瘤细胞球转移性增高存在的可能分子机制，及该球体中含有肿瘤干细胞样特性的细胞，其具有很强的转移能力。

综上所述，本研究应用无血清悬浮培养人结直肠癌细胞系成功生成了肿瘤细胞球，并证实该细胞球具有自我更新及诱导分化的潜能。通过对 HCT116 单层细胞和肿瘤细胞球的比较，发现球体中 $CD133^+$细胞数量明显增多，并高表达间质化标记分子 N-cadherin 及 Vimentin，以及具有更强的转移能力，这些结果表明肿瘤细胞球中富含肿瘤干细胞样特性的细胞。目前有学者认为[15]肿瘤细胞球是肿瘤生长体外模型，通过对结直肠肿瘤细胞球生物学特性的研究，将可能从全新的角度阐明结直肠癌复发转移的可能机制。

参 考 文 献

[1] Ricce-vitiani L, Fabrizi E, Palio Elisabetta, et al. Colon cancer stem cells[J]. J Mol Mod, 2009, 87(11): 1097-1104.

[2] Ischenko I, Seeliger H, Schaffer M, et al. Cancer stem cells: How can we target them[J]. Current Medicinal Chemistry, 2008, 5(14): 3171-3184.

[3] Dalerba P, Cho R W, Clarke M F, et al. Cancer stem cells: models and concepts[J]. Annu Rev Med, 2007, 58: 267-284

[4] Ricce-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.

[5] Vermeulen L, Sprick M R, Kemper K, et al. Cancer stem cells-old concepts, new insights[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(6): 947-958.

[6] Al-hajjm, Wichams, Benito-Hernandeza, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(11): 3983-3988.

[7] Singh S K, Terasaki M, Clarke I D, et al. Identification of a cancer stem cell *in human brain tumors*[J]. *Cancer* Res, 2003, *63*(21): 5281-5228.

[8] Collins A T, Habib P A, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(11): 10946-10951.

[9] Kawamoto, Hironobul, Yuasa, et al. Characteristics of CD133+ human colon cancer SW620 cells[J]. Cell Transplantation, 2010, 19(6-7): 857-864.

[10] Pallini R, Ricci-Vitiani L, Montano N, et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis [J]. Cancer, 2011, 117(1): 162-174.

[11] Miki J, Furusato B, LI H, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens[J]. Cancer Res, 2007, 67(51) 3153-3156.

[12] O'Brien C A, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell *capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*[J]. Nature, 2007, 445(7123): 106-110.

[13] Hayashida T, Jinno H, Kitagawa Y, et al. Cooperation of cancer stem cell properties and epithelial-mesenchymal transition in the establishment of breast cancer metastasis[J]. Journal of Oncology, 2011, 591427, 7.

[14] 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.

[15] Weiswald L B, Richon S, et al. Newly characterized ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness[J]. British Journal of Cancer, 2009, 101(43): 473-482.

（责任编辑：冉明会）