基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0641-04

ABCG2 在 U251 细胞株及其干细胞中的表达及意义

赵洪新,程 远,陈 松
(重庆医科大学附属第二医院神经外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究 ATP 转运体成员 ABCG2 在 U251 细胞和 U251 干细胞中的表达,并分析其意义。方法:采用含 EGF、bFGF、LIF 及 B27 的无血清培养基培养 U251 细胞,形成 U251 干细胞球后采用单细胞克隆法继续在无血清培养基中培养。应用细胞免疫荧光染色法对肿瘤干细胞进行鉴定,应用激光共聚焦和 Western blot 法检测 ABCG2 在 U251 细胞及其干细胞中的表达情况。结果:在 U251 细胞株中成功分离出 U251 干细胞;免疫荧光染色显示 U251 干细胞表达 CD133;激光共聚焦显示两种细胞 ABCG2 均阳性表达,主要位于胞膜;Western blot 显示 ABCG2 在两种细胞均有表达,U251 干细胞中 ABCG2 表达明显高于 U251 细胞,二者差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:ABCG2 在 U251 细胞株及 U251 干细胞中均有表达,以 U251 干细胞中表达量更多。

【关键词】胶质瘤;胶质瘤干细胞;ABCG2
【中国图书分类法分类号】R739.41 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-10-23

Expression and significance of ABCG2 in U251cells and U251 stem cells

ZHAO Hong-xin, et al
(*Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and significance of ABCG2 (the G2 member of ATP- binding cassette family) in U251and its stem cell. *Methods*: The U251 were cultured in serum-free medium with EGF, bFGF, LIF and B27. The tumor spheres formed and cultured continuously in the serum-free medium through the monoclonal formation experiment. The immunofluorescence staining was employed to identify the U251 stem cell. The expression of ABCG2 was detected by confocal microscopy and Western blot. *Results*: The stem cells from malignant glioma cell line U251 have been successfully isolated. The cells expressed CD 133. The ABCG2 protein positive stain was located in the cell membrane in both U251 cells and its stem cell with confocal microscopy method. Western blotting show ABCG2 was expressed in U251 cells and in its stem cells. The expression level in the stem cells was significantly higher than U251 cells. *Conclusion*: ABCG2 is expressed in U251 cells and in U251 stem cells. The expression level in the latter was higher.

【Key words】Glioma; Glioma stem cell; ABCG2

随着肿瘤干细胞研究的深入,寻找肿瘤耐药的靶细胞和靶分子研究已越来越引起人们的重视。ABCG2 属于 ABC 转运蛋白家族,现已发现它不仅与肿瘤的耐药相关,还被认为它是一种潜在的干细胞分子标志。有学者直接用 ABCG2 作为干细胞或肿瘤干细胞的标志物来分离或鉴定干细胞或肿瘤干细胞[1,2]。但是有关 ABCG2 在胶质瘤及胶质瘤干细胞中的表达研究较少,本研究利用 Western blot 和激光共聚焦等方法,观察 ABCG2 在胶质瘤 U251 细胞株和 U251 干细胞中的表达情况,为胶质瘤的靶向治疗提供实验依据。

作者介绍:赵洪新(1983-),男,硕士,
研究方向:脑肿瘤的蛋白组学。
通讯作者:程 远,男,教授,E-mail:chengyuan023@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金面上项目资助(编号:30870723)。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

改良型 RPMI1640 培养基、胎牛血清、胰酶、青/链霉素均购自 HyClone 公司。人表皮细胞生长因子(Epidermal growth factor, EGF)、人碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)、白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)购自 Sigma 公司,B27 购自 Gibco 公司。小鼠抗人 CD133 单克隆抗体,山羊抗人 netin 单克隆抗体,小鼠抗人 ABCG2 单克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司。FITC 标记山羊抗小鼠 IgG,TRITC 标记兔抗山羊 IgG,TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG,辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自中杉金桥公司。SDS-PAGE

凝胶配制试剂盒、BeyoECL Plus、RIPA 裂解液(强)、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购自碧云天公司。小鼠抗人 β-actin,多聚赖氨酸购自博士德公司。

1.2 仪器

奥豪斯电子天平 SR6010,奥豪斯国际贸易上海有限公司。CO_2 恒温培养箱 ThermoForma3110,Thermo Forma 公司。高压蒸汽消毒器 YXQ·SG41·280,上海医用核子仪器厂。凝胶成像仪,Bio-Rad 公司。双稳定时电泳仪电源 DYY-6C 型、垂直电泳槽 DYCZ-400、电转槽 DYCZ-24D,北京六一仪器厂。激光共聚焦显微镜 TCS SP2(德国莱卡公司)。

1.3 U251 细胞系的培养与传代

人脑胶质瘤细胞株 U251 购自武汉大学典型培养物保藏中心。采用含 100 U/ml 青/链霉素、10%胎牛血清的 1640 培养液,在恒温培养箱内(条件:37℃,5%CO_2,饱和湿度)培养,隔天换液,待细胞长至 80%融合时,0.125%胰酶消化,1:2 传代于 50 ml 培养瓶中。

1.4 U251 干细胞的培养与传代

将 U251 细胞置于细胞培养箱中培养,待细胞处于对数生长期时用 0.125%胰酶消化,胎牛血清终止消化后吸管收集于离心管,800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 RPMI1640 无血清培养基(内含 EGF、bFGF 各 20 ng/ml,LIF10 ng/ml 以及 B27 20 μl/ml,反复吹打成单细胞悬液,计数后以 2×10^5 个/瓶接种于 50 ml 培养瓶中,置于恒温培养箱中培养。待悬浮生长的细胞球出现 5 d 后收集该细胞球,机械吹打并制成单细胞悬液,重悬于上述无血清培养基,按 1:2 的比例传代于 50 ml 培养瓶。

1.5 U251 干细胞单细胞克隆

将 U251 干细胞吹散,行活细胞染色后稀释为约 100 个/ml 的细胞悬液。吸 1 ml 该细胞悬液到 50 ml 细胞培养瓶中加入 47 ml 的无血清培养基,使总体积为 48 ml,细胞数约 100 个。于 24 孔板内每孔加入上述细胞悬液 0.5 ml 后置于细胞培养箱培养。镜下记录只有 1 个细胞存在的培养孔,观察克隆形成情况。数天后吸取 1 个培养孔内由 1 个细胞分裂增殖形成的细胞克隆到 25 ml 培养瓶中培养、扩增与传代。

1.6 U251 干细胞鉴定

将单细胞克隆方式扩增的第 3 代 U251 干细胞爬片。玻片预先经无菌多聚赖氨酸处理。1 d 后取出玻片,用中性树脂将玻片固定在载玻片上,用 0.01 mol/ml PBS 漂后,4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 反复冲洗,胎牛血清封闭 20 min,同时滴加稀释好的小鼠抗人 CD133 抗体和山羊抗人 netin 抗体,4℃孵育过夜,次日 PBS 充分冲洗后,滴加 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG,37℃孵育 30 min,PBS 冲洗、晾干后,再滴加 TRITC 标记兔抗山羊 IgG,37℃孵育 30 min,PBS 冲洗、晾干后封片,置激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.7 U251 细胞及 U251 干细胞 ABCG2 的荧光测定

取 U251 细胞及 U251 干细胞分别爬片,基本操作同 1.6,两种细胞均滴加稀释的小鼠抗人 ABCG2,并用 TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG 孵育,在激光共聚焦下观察并采集图像。

1.8 Western blot 分析 ABCG2 的表达

取 U251 细胞和 U251 干细胞分别加入 RIPA 裂解液,提取总蛋白质,BCA 法测定蛋白浓度,分装后 -80℃保存。配制浓度 6%、12%的分离胶和 5%的浓缩胶。蛋白上样,SDS-PAGE 电泳后,使用 PVDF 膜转膜。将 PVDF 膜浸置于含 5%脱脂奶粉的 PBST 液中封闭 2 h,封闭后孵育小鼠抗人 ABCG2,4℃过夜,次日用 PBST 溶液充分洗涤后,室温下辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 孵育 2 h,PBST 洗涤后,使用 ECL 发光试剂盒,在 Bio-Rad 凝胶成像仪下,对 PVDF 膜进行图像采集分析。取等量的蛋白样品,通过 western blot 测量 2 种细胞中 β-actin 的表达量,作为蛋白表达的内参。

1.9 数据统计分析

使用 Quantity one 软件分析蛋白条带光密度值,重复实验 5 次,用 SPSS13.0 对 2 种细胞 ABCG2 与 β-actin 光密度比值进行 t 检验,$P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 U251 干细胞球的形成

将吹散的 U251 细胞接种于无血清培养基中,24 h 后开始出现为数不多的悬浮小细胞团。48 h 后,悬浮的球状团数量明显增多,形态较为规则,接近球状,每个细胞团有数个到数十个细胞不等。U251 细胞株细胞在无血清的条件下生长会受抑制,随传代培养时间的延长和传代次数的增多而逐渐被清除,从而使干细胞得到纯化。而 U251 细胞在 10%血清培养基培养时则没有悬浮细胞团产生。将 U251 干细胞球接种于 10%血清培养基中,细胞球重新贴壁并逆转成 U251 细胞。

2.2 单细胞克隆脑 U251 干细胞与传代

在形成 U251 干细胞球后,用有限稀释法可以观察到吹散的单个细胞可以增殖形成细胞克隆,吹散的单个细胞会重复从单细胞生成细胞球的过程,该过程于单个 U251 细胞到生成 U251 干细胞球的过程相似。干细胞的增殖速度很快,在 48 h 内已由单细胞增殖形成由数十个细胞构成的细胞团。通过单细胞克隆方式扩增的干细胞球的形态和生长速度与原代基本一致。此后每 4~7 d 传代 1 次,连续传代 10 次的 U251 干细胞仍然保持着较为旺盛的生长态势。

2.3 U251 干细胞免疫荧光鉴定

对 U251 干细胞球行 CD133 和 nestin 免疫荧光染色,U251 干细胞呈现绿色和红色两种染色,表明该细胞 CD133 和 nestin 染色阳性(图 1)。CD133 被认为是最重要的干细胞标志物[3],Nestin 为神经干细胞或者前体细胞中表达[4],激光共聚焦软件将 2 种标志物叠加后成为黄色,图 1~3 清楚地显示该细胞球同时表达 2 种标志物,从而证明培养出的细胞球是 U251 干细胞。

2.4 U251 细胞及 U251 干细胞 ABCG2 蛋白的荧光测定

对 U251 细胞及其干细胞球行 ABCG2 免疫荧光染色,2



A. CD133 阳性表达,绿色　B. nestin 阳性表达,红色　C. 前两图的叠加图,两种颜色完全叠加后为黄色

图 1　U251 干细胞球(激光共聚焦显微镜 ×200)

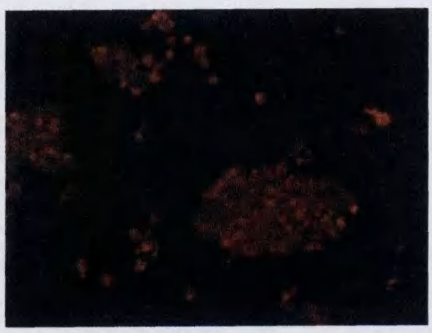


图 2　U251 干细胞球 ABCG2 阳性,红色(激光共聚焦成像 ×200)



图 3　U251 细胞 ABCG2 阳性,定位于胞膜上,红色(激光共聚焦成像 ×200)

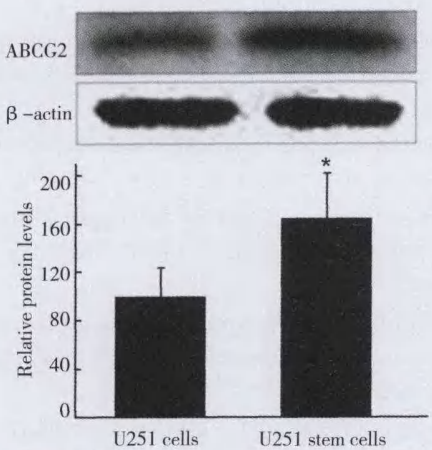


图 4　U251 和 U251 细胞 ABCG2 蛋白表达量

种细胞均被染成红色,表示细胞 ABCG2 均为阳性。因干细胞为团状,细胞相互罗列,ABCG2 定位不易辨别(图 2),而在 U251 细胞上可以清楚得看到定位于胞膜(图 3)。

2.5　Western blot 鉴定

结果显示 ABCG2 在 U251 细胞和 U251 干细胞中的表达差异有统计学意义,$P<0.05$。

3　讨　论

胶质瘤的耐药至今仍然是胶质瘤治疗中亟待解决的难题,现已发现在胶质瘤中存在着胶质瘤干细胞,它们是胶质瘤的始发细胞,有很强的耐药性[5]。肿瘤干细胞,虽然数量很少,但具有很强的耐药、抗辐射和抗凋亡性,而且这些细胞很大部分具有 ABCG2 蛋白高表达。因此,推测肿瘤的耐药性与 ABCG2 关系密切[6]。ABCG2 又名乳腺癌耐药蛋白(Breast cancer resistance protein,BCRP),属于 ABC 家族中 G 亚族,由 663 个氨基酸组成的跨膜转运蛋白,具有 ATP 依赖性药物外排功能[7,8],能无选择性地将有害物质转运出细胞,对正常的机体起生理性保护作用,但对肿瘤组织则表现为耐药。

本实验通过细胞免疫荧光染色和 Western Blot 等方法,发现 ABCG2 在 U251 细胞和 U251 干细胞中均有表达,且以胶质瘤干细胞中的表达量更高。有报道指出,随着胶质瘤分级的的增高,该蛋白的表达量亦随之增加,而在胶质瘤干细胞中,ABCG2 表达几乎达到 100%[9]。本试验结果与该报道吻合。由于 ABCG2 在两种细胞中的研究尚少,其具体功能尚不十分明确。

现有研究已证明,无论高度恶性的胶质瘤组织、胶质瘤细胞株,还是胶质瘤干细胞,都有很强的耐药性,并且这些细胞中均存在着 ABCG2 高表达,由于 ABCG2 作为强有力药物外排能力的转运蛋白,在胶质瘤的多药耐药(Multidrug resistance,MDR)中起到重要的作用,肿瘤干细胞学说认为肿瘤 MDR 来源于肿瘤干细胞,其耐药机理除了干细胞有较强的"自身更新"能力和处于静止期的特性外,最重要的是高表达 ABC 转运蛋白。实验已证明肿瘤干细胞表面存在多种 ABC 转运蛋白,包括 ABCB1 (MDR1)、ABCC1(MRP1)和 ABCG2 (BCRP)等,且体外实验证明用 ABC 蛋白抑制剂可以增加抗肿瘤药物的治疗疗效[10-12]。

随着研究的深入,人们还发现 ABCG2 参与侧群细胞(Side population cells,SP 细胞)表型形成。SP 细胞最初发现于

小鼠的造血干细胞，它们能将 DNA 荧光结合染料 Hoechst 33342 主动排出细胞外，从而出现 Hoechst 33342 拒染的情况。虽然它们只是骨髓细胞中的极少的一部分，却具有极强的造血活性[13]。后来又发现其存在于人和动物多种正常细胞和肿瘤中。骨髓细胞中 ABCG2 是决定其 SP 表型形成的因素，与造血细胞泵出 Hoechst 染料的特性有关，小鼠骨髓细胞 ABCG2 基因被敲除后，SP 表型几乎完全丢失，故 ABCG2 被认定为 SP 细胞的表型标记[6]。与此同时，肿瘤非 SP 细胞对常用的抗癌药物敏感性要大于 SP 细胞，提供了细胞的 SP 表型是导致其对药物敏感性的下降的直接证据。大量研究证实干细胞多数位于 SP 表型的细胞内，甚至有学者认为实体瘤中的 SP 细胞即为肿瘤干细胞，因此将 ABCG2 作为干细胞的表面标志物会更易于干细胞的分离和鉴定[14]。肿瘤干细胞假说认为恶性肿瘤难以根除的原因之一是肿瘤干细胞的多药耐药现象，而干细胞细胞 ABCG2 的表达是重要的一个原因[15]。

除此以外，ABCG2 蛋白表达可以提高细胞生存能力，在氧不足环境中通过抑制比咯紫质的生成而抑制缺氧对细胞的毒性作用。胶质瘤随着恶性级别的增高而增殖加速，随之而来的是缺血、缺氧引发的坏死增加。ABCG2 可以减少这些不利因素对细胞的毒性作用，同时有研究证明在脑肿瘤组织中，除了肿瘤实质，ABCG2 阳性细胞还沿血管分布，说明该蛋白有可能参与肿瘤组织中新生毛细血管的形成，同时使药物进入胶质瘤组织更少，更加重了耐药[16-19]。

综上所述，胶质瘤干细胞是胶质瘤增殖的始动细胞，它不仅决定了该细胞株的自我更新、不断增值，而且由于高表达特异性 ABCG2 等介导的膜泵耐药分子，使其对大多数化疗药物天然耐药，这可能是胶质瘤细胞多药耐药的原因所在。

参 考 文 献

[1] Mohan A, Kandalam M, Ramkulnar H L, et al. Stem cell markers: ABCG2 and MCM2 expression in retinoblastoma[J]. Br J Ophthalmol, 2006, 90(7): 889-893.

[2] 黄 强，董 军，朱玉德，等.人脑胶质瘤组织中分离与培养肿瘤干细胞[J].中华肿瘤杂志，2006，28(5)：331-333.

[3] 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): 7011-7012.

[4] Lendahl U, Zimmerman L B, Mckay R D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein[J]. Cell, 1990, 60(4): 585-595.

[5] Kang M K, Kang S K. Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma[J]. Stem Cell Dev, 2007, 16(5): 837-847.

[6] Zhou S, Schuetz J D, Bunting K D, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-populaton phenotype[J]. Nature Med, 2001, 7(9): 1028-1034.

[7] Hvorup R N, Birke A. Goetz. Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex btuCD-BtuF[J]. Science, 2007, 317: 1387-1390.

[8] Dawson R J, Locher K P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter[J]. Nature, 2006, 443: 180-185.

[9] Jin Y, Bin Z Q, Qiang H, et al. ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(10): 1369-1376.

[10] Lasky J L, Liau L M. Targeting stem cells in brain tumors[J]. Technol Cancer Res Treat, 2006, 5: 251-260.

[11] Merino G, Jonker J W. The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin[J]. Mol. Pharmacol, 2005, 67(5): 1758-1 764.

[12] Herget M, Oancea G, Schrodt S, et al. Mechanism of substrate sensing and signal transmission within an ABC transporter: Use of atrojan horse strategy[J]. Biol. Chem. 2007, 282: 3871-3880.

[13] 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.

[14] Challen G A, Little M H. A side order of stem cells: the SP phenotype [J]. Stem Cells, 2006, 24(1): 3-12.

[15] Linton K J, Higgins C F. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control[J]. Pflugers Arch, 2007, 453: 555-567.

[16] Partha K, Douglas D. The stem cell marker bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme[J]. J Biol Chem. 2004, 279: 24218-24225.

[17] Krishnamurthy P, Schuetz J D. Role of ABCG2/BCRP in biology [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006, 46 : 381- 410.

[18] 储 亮，黄 强，翟德忠，等.ABCG2 在胶质瘤组织中的表达及意义[J].癌症，2007，26(10)：1090-1094.

[19] Zhang W, Mojsilovic-Petrovic J, Andrade M F, et al. The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels[J]. FASEB J, 2003, 17(14): 2085-2087.

（责任编辑：冉明会）