论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1440-05

结直肠癌细胞系肿瘤干细胞相关亚群初步研究

胡 祥,程 勇,王吉明,刘 彬
(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:检测不同结直肠癌细胞系中存在肿瘤干细胞样亚群,探讨初步富集肿瘤干细胞相关亚群的方法。方法:采用流式细胞术检测结直肠癌细胞系 LOVO、SW480、HCT116 中的侧群细胞(Side population,SP)细胞,添加生长因子的无血清培养基(Serum-free medium,SFM)培养 SW480 初步分离,富集肿瘤干细胞样亚群,有限稀释实验,诱导分化,传代更新,含血清/无血清培养基交替培养证实肿瘤干细胞相关亚群的存在。结果:LOVO、SW480、HCT116 细胞系中含 SP 细胞分别为 1.0%,1.2%和 1.3%;SW480 细胞中约含有 0.54%~0.62%的细胞能够在无血清培养基中能够存活、增殖,形成悬浮的肿瘤细胞球;在 SFM 中加入血清可促使肿瘤干细胞相关细胞分化;肿瘤干细胞相关细胞可以连续传代,并可交替培养于含 10%小牛血清培养基(Serum-supplied medium,SSM)和 SFM 中。结论:结直肠癌细胞系 LOVO、SW480、HCT116 中含 SP 细胞,SW480 中的肿瘤干细胞相关亚群可以无血清培养基富集。

【关键词】结直肠癌;细胞系;肿瘤干细胞
【中图分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-17

Preliminary study on cancer stem-like cells (side population) in human colorectal cancer cell lines

HU Xiang, et al
(*Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the content of cancer stem-like cells in different human colorectal cancer cell lines and explore the methods for enriching cancer stem-like cells in SW480. *Methods*: The percentage of side population cells(SP)in human colorectal cancer cell lines LOVO, SW480, HCT116 were detected by flow cytometry. SW480 cell line was cultivated in serum-free medium(SFM) supplemented with growth factors and cancer stem-like cells reforming into floatingspheres were isolated. The isolated cancer stem-like cells were identified by limiting-dilution assay, differentiation assay, self-renewal assay, alternative cultivation assay. *Results*: The percentage of SP cells was 1.0% in LOVO, 1.2% in SW480 and 1.3% in HCT116. In the absence of serum, a minority(0.54%~0.62%) of cancer stem-like cells in SW480 cells survived, proliferated and assembled into the suspended tumor cell spheres. SW480 cancer stem-like cells possessed proliferative, self-renewal and differentiation potential, which were responsible for the floating tumor clone. Serum addition into SFM resulted in the proliferation of cancer stem-like cells; after several generations and alternated cultivation in SSM and SFM, cancer stem-like cells maintained their characters. *Conclusion*: LOVO, SW480 and HCT116 cell lines contain a tiny minority of SP cells with stem cell properties. The cancer stem-like cells in SW480 line can be maintained in SFM using a floating culture method.

【Key words】 Colorectal cancer; Cell line; Cancer stem cell

2001 年 Reya 和 Morrison 等通过对造血干细胞与血液系统肿瘤研究的回顾性分析,提出完整的肿瘤干细胞学说[1],到目前包括血液系统[2,3],实体瘤中的乳腺癌[4]、中枢神经胶质瘤[5,6]、前列腺癌[7]及结肠癌[8]等肿瘤干细胞的分离成功,肿瘤干细胞学说得到不断证实、完善。当前认为肿瘤干细胞是肿瘤发生、发展、转移、复发的根源。结直肠癌发病率日益增高,即使手术根治切除,其复发率仍有 40%~50%,对结直肠癌肿瘤干细胞的研究将对结直肠癌的治疗更具特意靶向意义,我们采用流式细胞术检测 LOVO、SW480、HCT116 中的侧群细胞(Side-population,SP),通过无血清培养基培养SW480 细胞系,克隆分离肿瘤细胞侧群,并从形态学、分化、自我更新、交替培养等方面进行鉴定。

作者介绍:胡 祥(1983-),男,硕士,
研究方向:胃肠道肿瘤的基础临床研究。
通讯作者:程 勇,男,副教授,E-mail:chengyongcq@yahoo.com.cn。
课题基金:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC,2008BB5230)。

1 材料与方法

1.1 细胞系，试剂和仪器

LOVO、SW480、HCT116 细胞系（重庆医科大学基研所细胞库），RPMI1640 培养基（GIBICO）；特级新生小牛血清（FBS）（杭州四季青）；EDTA、胰蛋白酶粉（北京鼎国）；Hoechst33342、PI（南京凯基生物）；维拉帕米（Bioma1）；无血清培养基（Serum-free medium，SFM）为不含牛血清的 RPMI1640 培养基，并添加重组表皮生长因子 EGF（20 μg/L，PeproTech）、碱性成纤维生长因子 bFGF（10 μg/L，PeproTech）10^5 U/L 青霉素 G 和 100 mg/L 链霉素（华北制药）。流式细胞仪（美国 BD 公司），超净工作台（AIR TECH）、CO_2 恒温细胞培养箱（thermo 公司），离心机（SIGMA 公司），倒置显微镜（Olympus 公司），37℃恒温水浴箱（Polysciences 公司）。

1.2 细胞系培养

LOVO、SW480、HCT116 细胞系以含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基（SSM）置于 37℃、5% CO_2 培养箱内培养。用含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的消化液消化传代细胞。选用对数生长期细胞实验。

1.3 SP 细胞比例检测

3 种细胞系分别取对数生长期细胞，制成单细胞悬液，调整细胞密度为 10^6 个 /ml，各设实验管和对照管。实验管加入 Hoechst33342（终浓度为 5 μg/m1），对照管同时再加入维拉帕米（终浓度为 50 μg/m1），37℃水浴 90 min，每 20 min 振荡混匀 1 次，最后低温离心机离心 5 min 弃上清，用 4℃ PBS 洗 2 遍。重悬于 4℃含 1% 胎牛血清的 PBS 液中。FACS 流式细胞仪紫色激光（407 nm）检测 3 种结直肠癌细胞系中 SP 细胞比例。

1.4 肿瘤干细胞相关亚群的分离培养，传代

选择 SW480 对数生长期的细胞，用 PBS 液清洗，胰蛋白酶消化，重悬于 SFM，台盼兰染色并计数，以 5×10^6 个细胞接种于 100 ml 培养瓶中，继续在 37℃，5% CO_2 培养箱中培养。待增殖形成细胞球 3~4 d 后，将其收集于离心管中，自然沉降 20 min 弃去半量陈旧上清，加入等量新鲜 SFM 并机械吹打成单细胞悬液，重悬于 SFM，按 1∶2 的比例传代于培养瓶中。

1.5 肿瘤干细胞相关亚群交替在 SSM 和 SFM 培养基中培养

按照 1.4 的方法，待 SW480 细胞系在 SFM 中形成细胞球 2 d 后，收集并重悬于 SSM 液中，待其呈单层细胞生长后，再收集并重悬于 SFM 液中，呈细胞球样悬浮生长，如此反复 3 次。

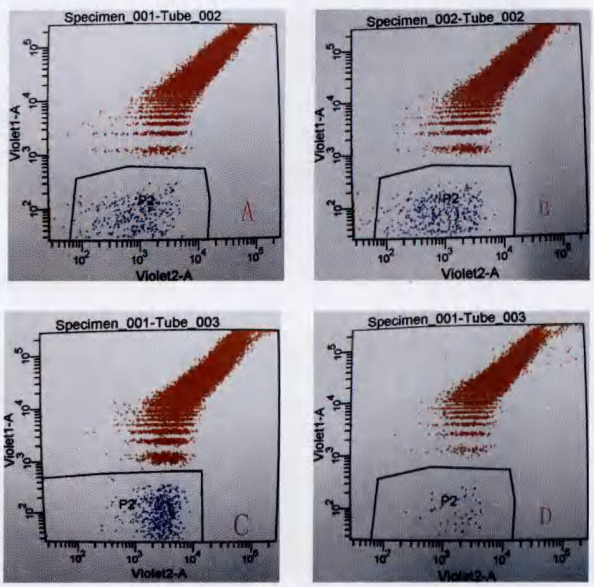
1.6 有限稀释法

有限稀释采用 Bellows 等[9]，Tropepe 等[10]的方法，将贴壁生长于 SSM 中的 SW480 细胞经胰酶消化，吹打成单细胞悬液，计数后重悬于 SFM，按每孔 200 μl 培养液分别接种 320、160、80、40、20、和 10 个细胞于 96 孔板，以每个浓度未形成肿瘤球的孔的百分比为应变量，以每孔中接种的细胞数为自变量，作直线回归分析，回归方程中与以应变 37% 相对应的自变量值就是要形成 1 个肿瘤球所需的接种细胞量，因为每个肿瘤细胞球均有 1 个肿瘤干细胞形成，所以根据这 1 细胞量求出肿瘤干细胞在细胞系中的比例。此试验重复 5 次。

2 结 果

2.1 不同细胞系中 SP 细胞检测

SP 细胞亚群即位于 Hoechst33342 红光 / 蓝光双参数图左下角荧光阴性或弱阳性区域。LOVO、SW480、HCT116 细胞系中 SP 细胞的比例分别为 1.0%，1.2% 和 1.3%，经维拉帕米阻断后明显减少（图 1）。



A. LOVO 中 SP 细胞含 1.0%；B. SW480 中 SP 细胞占 1.2%；C. HCT116 中 SP 细胞占 1.3%；D. 对照组（维拉帕米）HCT116 中 SP 细胞占 0.1%

图 1 不同细胞系中 SP 细胞的含量

2.2 肿瘤细胞球的形成

SW480 在 SFM 中培养 24~48 h 后可产生少量体积较小松散的悬浮肿瘤球（图 2A），72 h 后肿瘤球体积增大，随着时间的延长，在 1 周左右所形成的肿瘤球数量增多，形态大小各异，较前致密（图 2B），3 周左右均形成致密的形态一致的肿瘤球（图 2C），而且经过传代后肿瘤球的总数量大量扩增。而用 SSM 培养的 SW480 时，接种后数小时开始解聚细胞球，没有悬浮细胞团产生（图 2D）。

2.3 肿瘤干细胞相关细胞的自我更新与分化

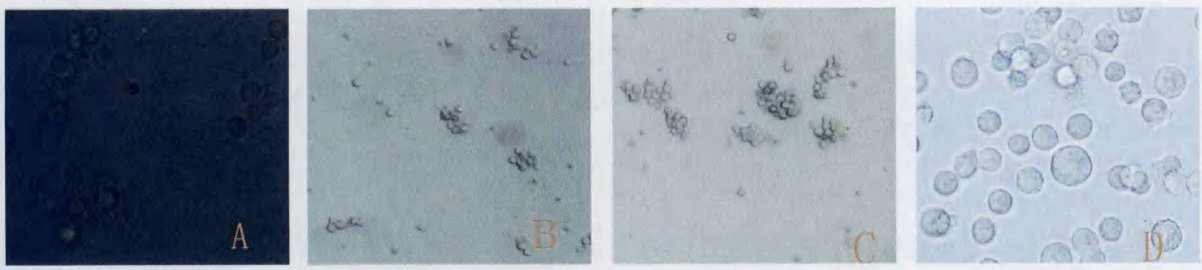
SW480 细胞在 SFM 培养形成肿瘤球后，经机械吹打后培养于 SFM 中，1~2 周后仍可形成肿瘤细胞球和一些单细胞，其形态与原代相同（图3A），而单细胞则不具有这种功能，只能形成单细胞（图 3B）；血清促使 SP 细胞分化，当形成肿瘤球后（图 3C），在 SFM 中逐渐滴加 FBS，并隔日补充，24 h 肿瘤球开始变小，单细胞增多，7 d 左右时肿瘤球消失，均为单细胞，且多为粘附生长（图 3D）。

2.4 肿瘤干细胞相关细胞在 SSM 和 SFM 两种培养基中交替转化

肿瘤球接种于 SSM 中，12 h 内细胞贴壁，细胞平贴培养板底（图 4A）并逐渐形成单细胞层，显微镜下与传统培养形成的单细胞层无明显差异（图 4B）；消化单层细胞，重新培养于 SFM 中，仍可形成细胞球，其形态与原代相同（图 4C）。

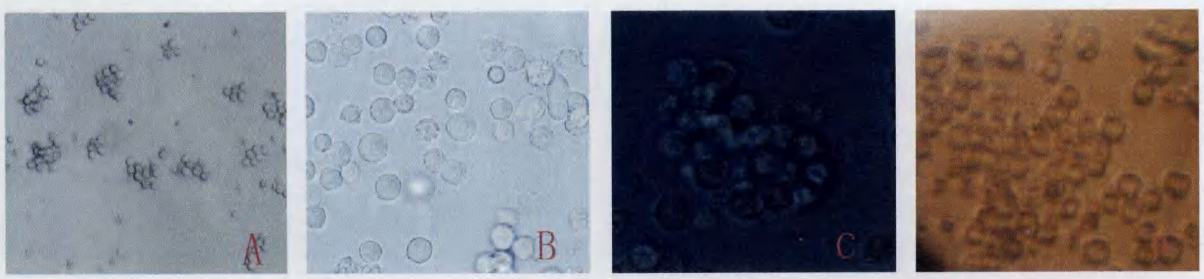
2.5 SW480 细胞中含有 0.54%~0.62%的具有形成肿瘤球能力的肿瘤干细胞

采用 Bellows 等、Tropepe 等的方法，经有限稀释、单克隆形成试验和直线回归分析，在用 SFM 培养 SW480 时，要形成 1 个肿瘤细胞球所需的细胞数为 172.26 ± 11.50，这证明了 SW480 中有 0.580% ± 0.035%能够形成肿瘤细胞球的肿瘤干细胞，而其他大多数细胞不具备这种能力（图 5、表 1）。



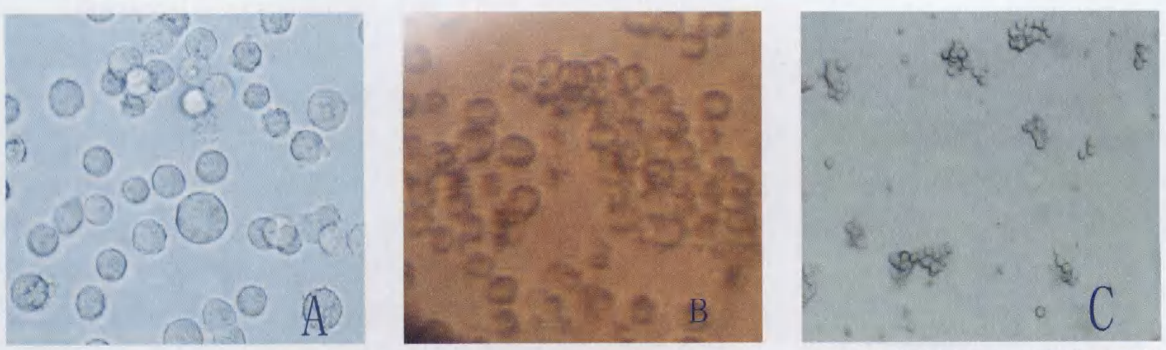
A SFM 中培养 24~48 h（200×） B SFM 中培养 1 周（100×） C SFM 中培养 3 周（200×） D SSM 中培养 6 h（100×）

图 2 SW480 中肿瘤细胞球的形成过程



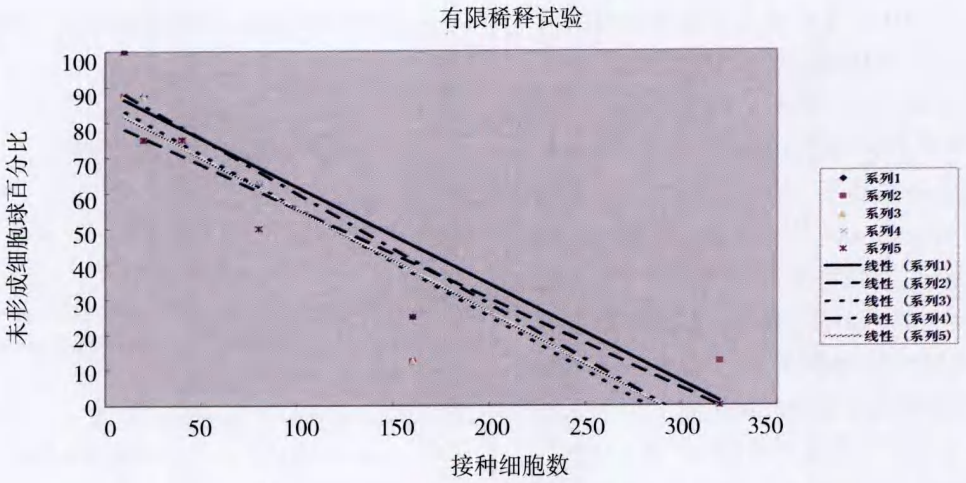
A. SP 细胞（100×）； B. 单细胞（200×） C. 4 h 内（400×） D. 7 d（200×）

图 3 SW480 中 SP 细胞的自我更新及在加有血清的 SFM 中的分化过程



A. 肿瘤球接种于 SSM 中，12 h 内（×200） B. 48 h 后（×200） C. 消化单层 SW480 细胞，重新培养于 SFM 中，仍可形成肿瘤细胞球（×100）

图 4 SW480 在 SSM 和 SFM 两种培养基中交替转化



注：以每孔中接种的细胞数为自变量，以每个浓度未形成肿瘤球的孔的百分比为应变量，作回归直线，以应变量 37%相对应的自变量的值就是要形成一个肿瘤球所需的细胞数

图 5　有限稀释试验单克隆试验的直线回归分析

表 1　SW480 中肿瘤干细胞的比例

试验次数	R^2	形成一个肿瘤球时 每孔所需的细胞数	肿瘤球的比例(%)
1	0.873 8	190.31	0.53
2	0.811 2	173.04	0.58
3	0.883 4	160.70	0.62
4	0.930 2	173.23	0.58
5	0.893 1	164.04	0.61
$\bar{x} \pm s$		172.26 ± 11.50	0.58 ± 0.035

注：每次试验的回归直线见图 5，R^2 为直线回归的决定系数

3　讨　论

肿瘤干细胞学说的提出为肿瘤生物学，肿瘤的诊断、治疗及预后都提供了新的思路，预示着基于肿瘤细胞随机化理论的传统肿瘤研究将转变到以针对为数极少的一亚群肿瘤干细胞上来。肿瘤的靶向治疗无疑会成为未来肿瘤治疗的发展方向，肿瘤干细胞将成为未来肿瘤研究的众矢之的，而肿瘤干细胞的表型、富集、分离即为进一步研究奠定基础。结直肠癌的高发病率，高复发率，5 年短生存率既生活质量极度恶化等特点吸引了数研究者的目光，其肿瘤细胞体外培养基础研究中，LOVO、SW480、HCT116 细胞系研究得最为广泛透彻，加之国内王锡山等[11]也间接证明了 LOVO 细胞系中 SP 亚群的存在，故我们借此对三种细胞系的肿瘤干细胞相关亚群进行初步探讨。

荧光染料 Hoechst33342 能与核 DNA 结合，在 424~444 nm 之间可以检测到发光值。在利用 Hoechst 染料进行造血干细胞的流式分析时，常会发现一群分布特殊的细胞，经过紫外激发后用双波长（450 nm 和 675 nm 以上波长）监测，在流式二维分析点阵图上，可以观察到这群细胞发出微弱的蓝色和红色荧光，呈彗星状分布在主群的一侧，因此被称 SP 细胞[12]。ABC 转运蛋白相关基因 ABCG2 高表达被认为是肿瘤干细胞的一主要特征，ABCG2 可高效外排 DNA 荧光染料Hoechst33342，从而能通过流式分选分析系统分选出 SP 细胞。决定所分选的细胞系中是否含有 SP 细胞，在于是否有对染料 Hoechst 33342 拒染或淡染的细胞亚群且可被维拉帕米所阻断。在国内，我们首次真正意义上检测到 LOVO、SW480、HCT116 细胞系中 SP 细胞及其含量，并把 SW480 细胞系培养于无血清细胞培养基中，分离呈悬浮肿瘤球生长的SP 细胞，利用有限稀释试验计算出肿瘤干细胞细胞大约占 0.580% ± 0.035%，并进一步通过自我更新、分化能力、交替生长来鉴定了其具有干细胞特性。为了有效的分离肿瘤干细胞，通过经验[13,14]，我们在无血清培养基中加入 EGF、bFGF，

可以有效的从 SW480 中培养分离呈悬浮细胞球样生长的细胞，这部分肿瘤细胞球我们称之为肿瘤干细胞相关细胞（富集肿瘤干细胞），剩余的大多数肿瘤细胞即肿瘤组成细胞（Bulks cancer cells）呈现粘附状态，增殖能力有限和不具有分化的能力。本实验 SW480 中的 SP 细胞具有以下特征：呈悬浮样生长，并能形成克隆性的细胞球－肿瘤干细胞样细胞球，并能连续传代；随着时间的延长，其肿瘤细胞球的数量增加，体积增大，体现出 SP 细胞的快速增殖性；SP 形成的肿瘤细胞球制备成单细胞后仍可以形成肿瘤细胞球，其他不具有这样的能力；SW480 细胞能够在传统的含血清培养基中长期培养，也能在无血清培养基中长期增殖、传代；并且观察到随着培养基和培养方式的更换，能在悬浮的肿瘤细胞球和贴壁的单细胞层之间转换。但同时我们也发现，在肿瘤干细胞球经多次传代增殖过程中，到一定阶段，细胞球数目并不继续持续增加，且单个细胞开始增多，表现出细胞分化的特点，这与相关报道不符[11]可能与培养液中白血病抑制因子缺乏而肿瘤干细胞富集过多有关，我们将继续探索能富集，稳定持续培养肿瘤干细胞的方法，尝试肿瘤干细胞系的建立。

本次试验，我们从常用的几种结直肠癌肿瘤细胞系中通过紫色激发光的流式设备检测到边缘细胞的存在，其数量差异不显著，结合本试验采用的三种肿瘤细胞系皆有高侵袭，高转移，高度恶性的生物学特性，我们大胆猜测这是否验证了与细胞系中肿瘤干细胞存在有关，但本实验中的流式散点图中 SP 亚群偏宽，究其原因，SP 分离的最优化的条件是用 35 nm 左右的紫外光激发，我们根据自身条件，利用 407 nm 的紫光作为激发光源，这是与紫外光波长最接近的可见光。Telford 等[15]曾用小鼠骨髓细胞比较了 370 nm 紫外光和 408 nm 紫光在 SP 分选中的异同，发现紫光也可以分离出 SP 亚群，缺点是紫光激发出的发射光效率低，强度弱于紫外光，点阵图中的 SP 峰较钝，SP 比例相对较高，特异性较紫外光差。但是对于不具备紫外光分选的条件下，也可以作为一种研究干细胞的手段，结直肠癌细胞系中真正肿瘤干细胞的含量，我们将继续探求。我们首次在国内检测出 LOVO、SW480、HCT116 细胞系中 SP 细胞及其含量，并通过形态、分化、自我更新、交替培养和 Hoechst 染色试验说明了 SW480 细胞系中含有少量能够在无血清培养基中存活、增殖，自我更新并呈悬浮细胞球生长的干细胞样细胞。我们应该进一步纯化 SP 细胞，以便更好的研究肿瘤干细胞的特性。

参 考 文 献

[1] Reya T,Morrison R J,Clarke M F,et al. Stem cell,cancer,and cancer stem cells[J]. Nature,2001,414(6859):105-111.

[2] Bonnet D,Dick J E.Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originate from a primitive hematopoietic cell[J]. Nature Medicine,1997,3(7):730-737.

[3] Lapidot T,Sirard C,Vormoor J,et al. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice[J]. Nature,1994,367(6464):645-648.

[4] Al-Hajj M,Wicha M S,Adalbeno B H,et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cell [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(7):3983-3988.

[5] Singh S K,Clarke I D,Terasaki M,et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Research,2003,63(18):5821-5828.

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

[7] 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.

[8] 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.

[9] Bellows C G,Aubin J E.Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro[J]. Dev Biol,1989,133(1):8-13.

[10] Tropepe V,Sibilia M,Ciruna B G,et al. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon[J]. Dev Biol,1999,(208):166-188.

[11] 王锡山，刘彦龙，杨艳梅.大肠癌细胞系 Lovo 中亚群（SP）细胞的分离培养和鉴定[J]. 世界华人消化杂志，2007,15(9):953-959.

[12] Goodell M A,Rosenzwhg M,Kim H,et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species[J]. Nat Med,1997,3(12):1337-1345.

[13] Reynolds B A,Weiss S.Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell[J]. Dev Biol,1996,175:1-13.

[14] Reynolds B A,Tetzlaff W,Weiss S.A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes[J]. J Neurosci,1992,12:4565-4574.

[15] Telford W G.Analysis of UV-excited fluorochromes by flow cytometry using near-ultraviolet laser diodes[J]. Cytometry A,2004,61(1):9-17.

（责任编辑：冉明会）