

· 论 著 ·

肾癌干细胞的培养鉴定及其凋亡的实验研究*

田福起, 孙浩[△], 潘鹏, 郭涛, 何鸿保, 姚宏伟

(江苏大学附属医院泌尿外科, 镇江 212001)

摘要:目的 探讨肾癌干细胞在肾癌的发生发展中的作用。方法 收集肾癌细胞检测其 CD133 表达情况, 并研究其凋亡特性; 然后将其悬浮于含有表皮生长因子(EGF)和成纤维生长因子(bFGF)的无血清培养基中培养 7d, 收集干细胞球, 同时收集利用含 10% 胎牛血清培养基培养的肾癌细胞作阴性对照, 分别检测其 CD133 表达情况, 并研究其凋亡特性。**结果** 悬浮培养 2d 后出现肾癌干细胞球, 培养 7d 后干细胞球明显增多, 收集干细胞球, 用流式细胞仪检测发现表达 CD133⁺ 细胞约占 (8.25 ± 1.43)%, 阴性对照中 CD133⁺ 细胞只占 (1.22 ± 0.34)%, 并且较前者具有较高的凋亡率。**结论** 利用无血清体外培养并收集悬浮生长的肾癌细胞的方法可以从肾癌细胞中获取肾癌干细胞; 肾癌干细胞较一般瘤组织有较低的凋亡率, 维持着肿瘤的无限增殖。

关键词: 肿瘤干细胞; 肾癌; 细胞培养; CD133; 凋亡

中图分类号: R737.11; R730.231

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)03-0259-03

Isolation and identification of RCSC and study of its apoptosis property*

TIAN Fu-qi, SUN Hao[△], PAN Peng, et al.

(Department of Urology Surgery, Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

Abstract: Objective To enrich renal cell carcinoma (RCC) stem cells from RCC cells line in serum free medium (SFM) with the method of suspension culture and to study its apoptosis. **Methods** RCC cells were collected and dissociated into single ones whose expression of CD133 and apoptotic rate were first detected, then they were seeded in SFM containing EGF and bFGF. Seven days later the expression of CD133 and apoptotic rate in cells from SFM were detected by flow cytometry and normal RCC cells were set as negative control. **Results** RCC stem cells spheres were appeared after RCC cells were cultured tow days in SFM; Seven days later, more spheres came out. Then collected and detected them by flow cytometry and found that about (1.22 ± 0.34)% cells were CD133⁺ cells in normal OS-RC-2 cell line, while CD133⁺ cells reached to (8.25 ± 1.43)% after cultivating in SFM for 7 days and had low apoptotic rate. **Conclusion** RCC stem cells can be enriched from RCC cells by SFM, and they have lower apoptotic rate than normal RCC cells and are keeping their unlimited proliferating.

Key words: tumor stem cell; renal cell carcinoma (RCC); cell culture; CD133; apoptosis

肾癌是泌尿系统常见恶性肿瘤, 发病具有隐匿性, 一旦出现症状往往为晚期, 并且是对放、化疗均不敏感的实体瘤^[1]。目前对于肾癌的病因、病理机制尚不清楚。近年来肿瘤干细胞(tumor stem cell, TSC)理论的发展为肾癌的治疗提供了新的思路。肿瘤干细胞是存在于肿瘤中的一小部分具有干细胞性质的细胞群体, 其具有自我更新能力, 是形成不同分化程度的肿瘤细胞和肿瘤不断扩大的源泉。本实验通过研究其凋亡来探讨肾癌干细胞在肾癌的发生、发展中的作用。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 仪器为 CO₂ 培养箱(上海力康)、流式细胞分析仪(BD 公司)、超净工作台(苏州安泰)、Anke TDL-5-A 离心机(上海安亭)、TL-16R 台式高速冷冻离心机(上海离心机机械研究所)等; 试剂为肾癌细胞株 OS-RC-2(上海中科院细胞库)、DMEM 高糖培养液(GBICO)、F12 培养液(GBICO)、胎牛血清(杭州四季青)、成纤维生长因子(bFGF, Prospec)、表皮生长因子(EGF, Prospec)、抗-CD133-PE(eBioscience)、ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT I (美国 BD 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 肾癌干细胞球培养 取对数生长期的肾癌细胞 OS-

RC-2, 用 0.25% 胰酶将其消化成单细胞; 收集细胞, 1 500r/min 离心 5min; 弃去上清液, PBS 漂洗 1 次, 取部分细胞检测 CD133 表达情况, 并研究其凋亡特性; 另一部分悬浮于预先配好的 DMEM/F12 无血清培养基(含 EGF 20μg/L, bFGF 20μg/L); 细胞计数, 并调整细胞浓度为每毫升 2 × 10⁵ 个活细胞, 接种于底面积 75cm² 培养瓶, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱进行悬浮培养, 隔日换液; 同时以含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液培养细胞作为阴性对照。定期于倒置显微镜下观察生长情况。

1.2.1 CD133 表达的检测 收集无血清培养 7d 的肾癌细胞, 1 500r/min 离心 5min, 弃去上清液, 用 0.25% 胰酶将其消化成单细胞; 加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液终止消化, 1 500r/min 离心 5min 收集细胞; 弃去上清液, PBS 漂洗 3 次; 按试剂盒说明书操作, 加入 PE 标记的 anti-CD133 20μL, 室温避光孵育 20min 后 PBS 漂洗 1 次, 用抗鼠 IgG1 作同型对照进行流式细胞分析。同时收集作为阴性对照的细胞进行流式细胞分析。

1.2.3 肾癌干细胞凋亡的检测 收集无血清培养 7d 的肾癌细胞及常规有血清培养的肾癌细胞(对照组), 将其悬浮于不含 EGF 和 FGF 无血清培养基作用 24h 后分别检测其凋亡率。用

* 基金项目: 镇江市科技局资助项目(SH2007024)。△ 通讯作者: E-mail: fuqilele@163.com。

Annexin V/PI 双标记法检测细胞凋亡,按试剂盒说明书操作,收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,并调整细胞浓度为每毫升 10^6 个活细胞,取 $100\mu\text{L}$ 加入 5mL 流式管中,然后加入 $5\mu\text{L}$ Annexin V-FITC 混匀后加入 $5\mu\text{L}$ PI 混匀。避光、室温孵育 15min ,加入 $400\mu\text{L}$ 缓冲液,以流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

1.3 统计学方法 本资料属于计量资料,CD133 表达情况及凋亡率以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS13.0 统计软件进行 F 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾癌干细胞球生长过程观察 肾癌细胞接种于无血清培养基后可见细胞呈圆形悬浮于培养液中,均匀散布; 10h 后大部分细胞沉于瓶底,并有部分贴壁生长,呈梭形或多角形,仍有少量细胞悬浮; 2d 后可见细胞球生成,每个细胞球大约有 $3\sim 8$ 个细胞,呈圆形,规则,无突起,折光性较强; 7d 后细胞球明显增多,体积增大,致密,为规则的圆形或卵圆形。对照组细胞则贴壁生长,呈梭形或多角形,均匀散布于瓶底,没有细胞球生成(插页 I 彩图 1,2)。

2.2 肾癌干细胞球 CD133 表达情况 通过流式细胞分析可见悬浮培养的肾癌干细胞球中 CD133 高表达,CD133⁺ 细胞为 $(8.25 \pm 1.43)\%$,而无血清培养前及作为阴性对照的肾癌细胞 CD133 表达较低,分别为 $(1.18 \pm 0.39)\%$ 、 $(1.22 \pm 0.34)\%$ (图 1,2),3 者差异有统计学意义($F = 213.64, P < 0.05$);无血清培养前与阴性对照组肾癌细胞比较差异无统计学意义,但两者与悬浮培养的肾癌细胞的差异均有统计学意义。

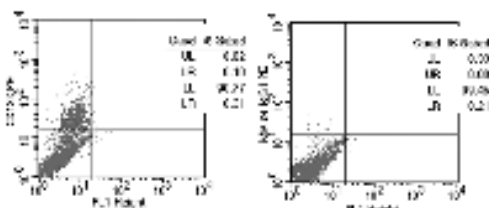


图 1 肾癌干细胞球 CD133 表达情况

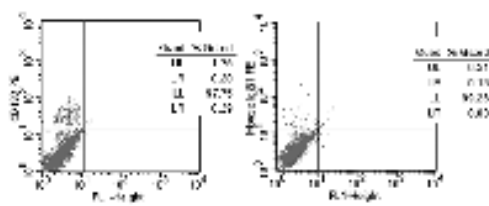


图 2 肾癌细胞 CD133 表达情况

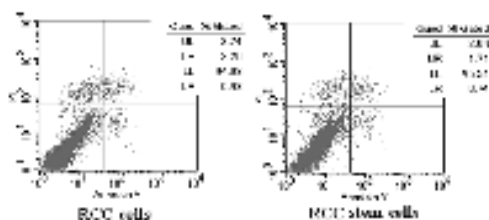


图 3 肾癌细胞及其干细胞凋亡率

2.3 肾癌干细胞凋亡的检测 通过流式细胞仪分析可见作为阴性对照的肾癌细胞凋亡率为 $(0.98 \pm 0.23)\%$,无血清培养前肾癌细胞凋亡率为 $(0.94 \pm 0.19)\%$,而培养的干细胞球凋亡率为 $(0.73 \pm 0.25)\%$ (图 3),3 者差异有统计学意义($F = 3.55, P < 0.05$);无血清培养前与阴性对照组肾癌细胞比较差异无统计学意义,但两者与悬浮培养的肾癌细胞的差异均有统计学意义。

3 讨论

肾恶性肿瘤的发病率在全身恶性肿瘤中占 3% 左右,临床表现具有多样性和隐匿性,一旦出现症状往往为晚期,并且具有多药耐药性(multidrug resistance, MDR),对化疗不敏感,长期以来所用的化疗药都具有剂量依赖性,细胞毒性作用大,效果不理想^[2]。传统肿瘤理论认为任何单个肿瘤细胞转移或残留均可能导致肿瘤的转移及复发。依照肿瘤干细胞学说,肿瘤中绝大多数细胞只具备有限增殖能力、不能自我更新,这部分肿瘤细胞不会导致肿瘤的转移、复发。本实验试图通过无血清培养的方法得到肾癌干细胞,并研究其性状,从而研究肾癌的病因及机制,为治疗提供新的思路。

细胞体外培养技术尤其是干细胞培养技术的发展对肿瘤干细胞的培养分离具有十分重要的意义。2002 年 Ignatova 等首次尝试应用培养神经干细胞的方法培养胶质瘤细胞时发现只有少数肿瘤细胞能够存活,并形成类似神经球的单克隆细胞团。2003 年 Singh 等^[3]用无血清悬浮培养的方法进一步对脑肿瘤细胞进行培养,成功分离、鉴定出了脑肿瘤干细胞,随后无血清悬浮培养方法在肿瘤干细胞的培养及分离中得到推广。其与传统培养方法相比,去除了血清,加入了终浓度都为 $20\mu\text{g/L}$ EGF 和 bFGF,这样排除了生物血清成分的干扰,更易于胚胎干细胞的建系^[4-7]。而加入的 EGF 和 bFGF 被证实具有促进细胞增殖、抑制其分化的作用,并且这一作用在一定浓度范围内随浓度的增加而增强,但当浓度大于 $20\mu\text{g/L}$ 时浓度依赖作用不明显。现已知 EGF 和 bFGF 受体都属于酪氨酸蛋白激酶信号传导通路,EGF 在干细胞增殖的后期阶段发挥促有丝分裂作用,而 bFGF 不仅在干细胞增殖早期发挥促有丝分裂作用,还能增强干细胞对 EGF 的敏感性^[8]。其具体作用机制尚有待进一步研究。

随着肿瘤干细胞理论的发展,肿瘤干细胞的鉴定技术也日趋完善,目前鉴定干细胞应用最多的方法为细胞表面标记技术。本实验应用该技术选择 CD133 作为表面标记对其进行鉴定。CD133 是一种跨膜蛋白,属于 Prominin 家族成员,分子量为 120×10^3 ,1997 年 Miraglia 等将其作为新的造血干细胞表面抗原提出。近年来发现 CD133 作为肿瘤干细胞特征性表面标志物之一,已成为肺癌、乳腺癌、脑胶质瘤、前列腺癌、肝癌、结肠癌、喉癌等实体瘤中肿瘤干细胞典型的分子标记^[9]。作者也曾在探讨肾癌干细胞表面标志时发现肾癌干细胞高表达 CD133,而 CD34 几乎不表达,诸多研究表明 CD133 可以作为筛选肾癌干细胞的独立因素^[10-11]。

本实验对肾癌细胞经过一段时间的悬浮培养发现,有细胞球生成,并呈悬浮生长,这些细胞球理论上是由肾癌干细胞单克隆增殖形成的肾癌干细胞球^[12-14],由于其分泌黏附因子而不易分离而形成团状。流式细胞分析这些细胞团发现其高表达干细胞表面标志 CD133,而阴性对照中 CD133 表达量很低。这一结论进一步证实了肿瘤干细胞理论,肿瘤中存在少量干细胞特性的肿瘤细胞,维持着肿瘤的发生、发展。常规培养肿瘤细胞时由于血清成分的复杂性,使肿瘤干细胞趋向于分化状态,导致这些干细胞特性的肿瘤细胞减少。当这种促分化条件去除,其干细胞特性便显现出来。同时再次证明无血清悬浮培养可以获得富含干细胞特性的肿瘤细胞,可以作为初次筛选肿瘤干细胞的方法。

细胞的凋亡又称程序性死亡,是在基因调控之下所产生的自然死亡现象,这一机制和干细胞共同维持着组织器官细胞数量的相对恒定,从而维持其功能。当凋亡机制受到病理损害时

将会导致肿瘤的发生。从理论上讲肿瘤中具有永生特性的肿瘤干细胞自身不会或很少凋亡。那么肿瘤干细胞是否具有这一特性,本实验将肾癌干细胞球及肾癌细胞分别在贫瘠化的无血清培养基中作用 24h 后,发现肾癌干细胞球更耐受这种贫瘠化的“土壤”,有着较低的凋亡率。这一结果提示肿瘤干细胞具有永生化的特性,与一般肿瘤细胞相比生存能力更强。2007 年 Ali 等^[15] 研究 9L 细胞干细胞球生存素、MRP-3 mRNA 表达量较 9L 单层培养细胞表达量升高,提示凋亡率下降。

肾癌干细胞的成功培养及鉴定具有重要意义,从新的角度解释了肾癌的发生、发展及其耐受放、化疗的特性,为肾癌的基础研究提供了新的思路。通过研究其凋亡特性,明确了肾癌干细胞在肾癌发生、发展中的作用,为今后肾癌的治疗提供了明确的靶向。

参考文献:

- [1] 周天贵,周承贵,陈先国,等. 肾癌组织中 MMP-7 表达和 MVD 测定及其临床意义[J]. 山东医药,2009,48(40):22.
- [2] Godley P, Kim SW. Renal cell carcinoma[J]. Curr Opin Oncol,2002,14:280.
- [3] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003,63(18):5821.
- [4] Cheng MX, Xiu LG, Yu XL. A new method to culture primary neural stem cells of embryonic rats[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008,12(16):3189.
- [5] Shalaw FG, Slimani S, Kolopp-Sarda MN, et al. Effect of cyclic stretching and foetal bovine serum (FBS) on proliferation and extra cellular matrix synthesis of fibroblast [J]. Biomed Mater Eng,2006,16(Suppl 4):S137.
- [6] Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, et al. Long-term culture of mouse male germ line stem cells under serum- or feeder-free condition[J]. Bio Reprod,2005,72(4):985.
- [7] Hong-mei P, Gui-an C. Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines[J]. Hunman Reprod,2006,21:217.
- [8] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司,2004:109.
- [9] 安江洪,钱莘,敖绪军,等. CD133 在人 NSCLC 组织和细胞系中表达的初步研究[J]. 重庆医学,2008,37(9):932.
- [10] Benedetta B, Bruno S, Grange C, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney [J]. Am J Pathol,2005,166(2):545.
- [11] 翟羽佳,常文军,侯建国,等. 肾透明细胞癌 CD133 的表达及其体外对干扰素和 5-氟尿嘧啶处理效果的影响[J]. 第二军医大学学报,2009,30(3):252.
- [12] Stupp R, Hegi ME. Targeting brain-tumor stem cells[J]. Nat Biotechnol,2007,25(2):193.
- [13] Singh SK, Dirks PB. Brain tumor stem cells: identification and concepts[J]. Neurosurg Clin N Am,2007,18(1):31.
- [14] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells[J]. Cancer Cell,2007,11(1):69.
- [15] Ali JG, Dwain I, Gentao L, et al. Spheres isolated from 9L gliosarcoma rat cell line possess chemoresistant and aggressive cancer stem-like cells[J]. Stem Cells,2007,432:281.

(收稿日期:2009-07-30 修回日期:2009-08-16)

(上接第 258 页)

- cancer[J]. Int J Colorectal Dis,2005,20(2):89.
- [5] Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, et al. Proliferative activity of intratumoral fibroblasts is closely correlated with lymph node and distant organ metastases of invasive ductal carcinoma of breast[J]. Am J Pathol,2000,156(5):1701.
- [6] 郑华,申俊,高庆红,等. 口腔鳞状细胞癌间质成纤维细胞 α -SMA 的表达及意义[J]. 国际口腔医学杂志,2007,34(3):157.
- [7] Garin-chesa P, Old LJ, Retting WJ. Cell surface glycoprotech of reactive stromal fibroblasts as potential antibody target in human epithelial cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1990,87(18):7235.
- [8] Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, et al. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin [J]. Cancer Res, 1993, 53(14):3327.
- [9] Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, et al. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994,91(12):5657.
- [10] 高力,张曦,陈幸华. 肝细胞生长因子与恶性血液病的相关研究进展[J]. 重庆医学,2006,35(8):746.
- [11] Kermorgant S, Paricio T, Dessirier V, et al. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease over production. Evidence for P13 kinase and PKC involvement[J]. Carcinogenesis, 2001,22(7):1035.
- [12] Dong G, Chen Z, Li ZY, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor induced activation of MEK and P13K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res,2001,61(15):5911.

(收稿日期:2009-07-05 修回日期:2009-08-07)