

· 论 著 ·

A549 肺腺癌始动细胞的富集和鉴定*

林 盛, 张振华, 饶明月, 吴敬波[△]

(泸州医学院附属医院肿瘤科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 利用紫杉醇联合无血清培养完成对 A549 肺腺癌始动细胞的富集并鉴定富集亚群的干细胞特性。方法 对数生长期的 A549 细胞经胰酶消化, 干细胞培养基重悬, 得到成球状生长的细胞; 传至第 2 代时加入紫杉醇作用 48 h, 离心去除死细胞和紫杉醇, 换新鲜干细胞培养基培养, 至存活细胞恢复克隆生长后鉴定其干细胞相关特性。结果 紫杉醇联合无血清培养方式成功从 A549 细胞中富集得到肿瘤干细胞, 该群细胞高表达分化抗原簇蛋白 133/人上皮细胞黏附分子(CD133/CD326), 具有多向分化潜能、高表达干细胞相关基因及更强的致瘤能力, 具备干细胞相关特性。结论 紫杉醇联合无血清培养富集得到高表达 CD133/CD326 分子的细胞亚群, 该亚群具备干细胞相关特性, 可用于后续肺腺癌干细胞生物学特性的研究。

关键词:肿瘤干细胞; A549; 紫杉醇

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.34.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)34-4108-04

Enrichment and identification of lung adenocarcinoma initiating cells from A549*

Lin Sheng, Zhang Zhenhua, Rao Mingyue, Wu Jingbo[△]

(Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To obtain the lung adenocarcinoma initiating cells from the A549 cell line based on paclitaxel treatment combination with serum-free cultivation and to validate spared cells can represent tumor initiating cells (TICs). **Methods** After dissociated by trypsin, about 10^6 /mL cells were suspended in serum-free medium supplemented with 0.4% bovine serum albumin (BSA), insulin, basic fibroblast growth factor (bFGF), human recombinant epidermal growth factor (EGF) and obtained spheroid cells. At the second passage, paclitaxel was added at a concentration of 100 nmol/L for 48 h and then replaced with completely fresh medium once or twice per week until new spheroids emerged. **Results** The subpopulation of cells that survived serum-free cultivation and paclitaxel treatment could highly express the cluster of differentiation 133/cluster of differentiation (CD133/CD326) molecular markers and have features of stemness including differentiation, high expression of cancer stem cells (CSCs)-associated genes and stronger capability of tumorigenesis. **Conclusion** The survived subpopulation that highly express the CD133/CD326 molecular markers presenting the characteristics of stemness in vitro and in vivo, and could be used in future researches of biological functions.

Key words: neoplastic stem cells; A549; paclitaxel

非小细胞肺癌(non-small-cell lung carcinoma, NSCLC)是重要的恶性肿瘤致死原因。近年以来,随着诊断水平的提高和综合治疗模式(新辅助化疗,高精度放疗以及分子靶向治疗)的改进,使肺癌患者有所受益,但总 5 年生存率改善并不明显。大量的研究证实在肿瘤组织中存在极少数的肿瘤始动细胞或肿瘤干细胞:具备始动肿瘤发生、维持自我更新、治疗抗拒、更强的侵袭和致瘤能力,是肿瘤复发和转移的根源。从肿瘤干细胞层面进行研究将有利于阐明肺癌的发生、发展机制,发现新的临床诊疗靶点以提高疗效。本研究采用紫杉醇联合无血清逆向诱导的方法从 A549 细胞株中富集肺腺癌始动细胞,进行相关干细胞特性的验证,为后期肿瘤干细胞生物学特性的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 细胞来源: A549 人肺腺癌细胞株, 购自美国 ATCC 中心; 动物来源: 雄性健康裸鼠 6 只, 4 周龄, 泸州医学院附属医院中心实验室代购于中国医学科学院, 无特定病

原体级(SPF)。

1.1.2 主要试剂和仪器 重组人碱性成纤维细胞生长因子、重组人表皮生长因子购自 Pepro Tech 公司, 重组人胰岛素、牛血清白蛋白购自 Sigma 公司, 鼠抗人藻红蛋白标记的分化抗原簇蛋白 133/1(CD133/1-PE) 流式抗体、鼠抗人异硫氰酸荧光素标记的人上皮细胞粘附分子(CD326-FITC) 流式抗体, 鼠源同型藻红蛋白标记的免疫球蛋白 1(IgG1-PE)、鼠源同型异硫氰酸荧光素标记的免疫球蛋白 1(IgG1-FITC) 购自 Miltenyi Biotec 公司, 紫杉醇注射液购自山西普德药业有限公司, 兔抗人 CD133 购自 Abcam 公司, 山羊抗人 CD326 购自 Santa Cruz 公司, FITC-山羊抗兔 IgG 购自 Beyotime 公司, CY3-驴抗山羊 IgG 购自 Biologend 公司, 二脒基苯基吡啶(DAPI) 工作液购自 Beyotime 公司, 山羊抗兔 IgG 及兔抗 CK8/18 工作液购自中衫金桥生物技术有限公司, 二氨基联苯胺(DAB) 显色试剂盒及免疫组织化学试剂盒购自 DAKO 公司, 抗荧光淬灭封片液购自 Beyotime 公司。倒置相差显微镜、流式细胞仪及激光共聚焦均由泸州医学院中心实验室提供。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81201682)。 作者简介: 林盛(1977~), 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤干细胞及综合治疗研究。

[△] 通讯作者, Tel: 13980257136; E-mail: wjb6147@163.com。

1.2 方法

1.2.1 A549 细胞的逆向诱导 取对数生长期 A549 细胞,胰酶消化后离心,用干细胞培养基重悬,第 2 天即可见成球状生长的细胞出现;成球细胞达到传代量(细胞密集,成球多、成球大、致密,机械吹散成小细胞团后第 2 天即恢复状态)后,加入等量的干细胞培养基,吸管反复轻柔吹散成球细胞后,吸取半量细胞悬液至新培养瓶,完成传代。

1.2.2 紫杉醇对诱导细胞的富集 成球细胞传至第 2 代,细胞达到传代量后将细胞尽量机械吹散至单个细胞;按 1×10^6 /mL A549 细胞对应紫杉醇浓度 $0.1 \mu\text{mol/L}$,作用 48 h 后离心换用新鲜干细胞培养基;换用培养基后第 2 天可见大量成球细胞死亡,仅少数由 2~3 个聚成的细胞克隆存在;据成球细胞的多少及大小使用低速离心 $600 \sim 800 \text{ r/min}$,将存活的细胞克隆选出,去除死细胞碎片,换新鲜培养基继续培养,隔天观察细胞状态,每周对细胞进行换液(1~2 次),直细胞恢复加药前的生长状态。

1.2.2 流式细胞术检测 CD133/CD326 待检细胞(A549 细胞消化离心,悬浮细胞收集离心)用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗涤 2 次;设置同型和待检组,按照使用说明分别加入相应的 CD133/CD326 流式抗体及同型(浓度按 1:11 稀释)孵育 30 min;PBS 洗涤 3 次后样本避光送检。

1.2.3 免疫荧光检测成球细胞 CD133/CD326 吸取紫杉醇处理后第 4 代成球细胞悬液至载玻片,涂片离心机, 800 r/min ,离心 5 min 后浸入 4% 多聚甲醛固定 20 min;0.1% 的聚乙二醇辛基苯基醚(triton)作用 3 min 后 PBS 洗涤;滴加 5% 的牛血清清蛋白(bovine serum albumin,BSA)作用 10 min 后用吸水纸吸净。滴加 1:300 的兔抗人 CD133 和山羊抗人 CD326 一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育过夜。次日,将玻片常温放置 30 min,PBS 洗涤 3 次,滴加 1:400 的羊抗兔-FITC-CD133、驴抗

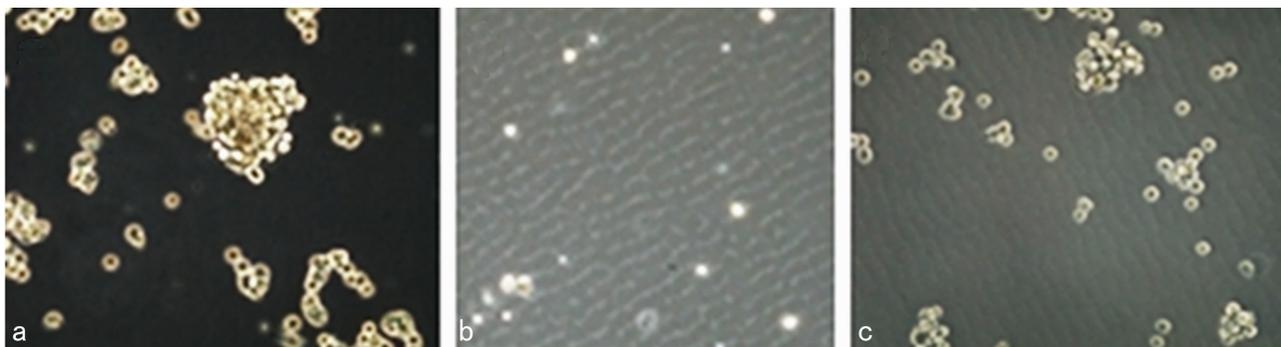
山羊-CY3-CD326 荧光二抗,避光孵育 30 min 后 PBS 洗涤 3 次;滴加 DAPI 工作液,复染细胞核 4 min,PBS 洗涤 3 次,抗荧光淬灭封片剂后送检。

1.2.4 成球细胞分化实验 将生长状态良好的成球细胞吸入 6 孔板中,平板离心, $1\ 500 \text{ r/min}$,离心 5 min,弃掉干细胞培养基。重新加入含 10% 标准胎牛血清的完全培养基,每孔 4 mL,常规培养,每天观察细胞形态变化情况,第 6 天取出盖玻片,4% 多聚甲醛固定 30 min;PBS 洗涤后将其置入 0.3% 的过氧化氢溶液处理 20 min;PBS 漂洗,血清封闭处理 30 min,滴加 CK8/CK18 单克隆抗体,孵育过夜;PBS 漂洗后滴加二抗(山羊抗兔) $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min;PBS 漂洗,加入链霉和素-生物素-酶复合物(streptavidin-biotin complex,SABC)后 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min;PBS 漂洗,DAB 显色,苏木素复染细胞核,经分化,蓝化后,梯度乙醇脱水处理,透明后中性树脂胶封片送检。

1.2.5 裸鼠成瘤实验 将生长良好的 4 周龄雄性裸鼠 9 只,分为 3 个实验组,每组 3 只;收集生长状态良好、能进行传代的 A549 细胞及成球细胞, $1\ 500 \text{ r/min}$ 离心 5 min;去掉上清液,按不同细胞加入相应的培养基各 1 mL,充分吹散细胞,计数后调整细胞浓度;CD133⁺/CD326⁺ 细胞的浓度分别为 1×10^4 、 1×10^5 和 5×10^3 /mL 对应普通 A549 细胞 1×10^4 、 1×10^5 和 1×10^6 /mL;CD133⁺/CD326⁺ 细胞注射在裸鼠的左前腋下,A549 细胞注射在裸鼠的右前腋下;观察成瘤情况,在瘤体最大径线达到 2 cm 后处死所有老鼠,剥离肿瘤进行病理学检查。

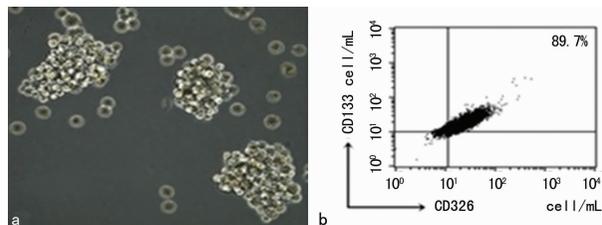
2 结 果

2.1 逆向诱导联合紫杉醇的富集结果 普通 A549 细胞胰酶消化后用干细胞培养基诱导成球状生长,传代培养至第 2 代,加入紫杉醇处理 48 h 后换新鲜干细胞培养基,可见大部分成球细胞裂解,仅有极少数的细胞克隆存活;经过约 2 周时间,残存的细胞能重新恢复克隆生长,见图 1。



a: A549 细胞诱导第 2 代;b:紫杉醇处理后第 4 天,细胞大部分死亡;c:紫杉醇处理后第 14 天。

图 1 紫杉醇联合干细胞培养基逆向诱导对 A549 始动细胞的富集(×200)



a:富集细胞第 4 代(×200);b:第 4 代富集细胞的 CD133/CD326 双阳性率。

图 2 富集细胞第 4 代生长状态及 CD133/CD326 流式测定

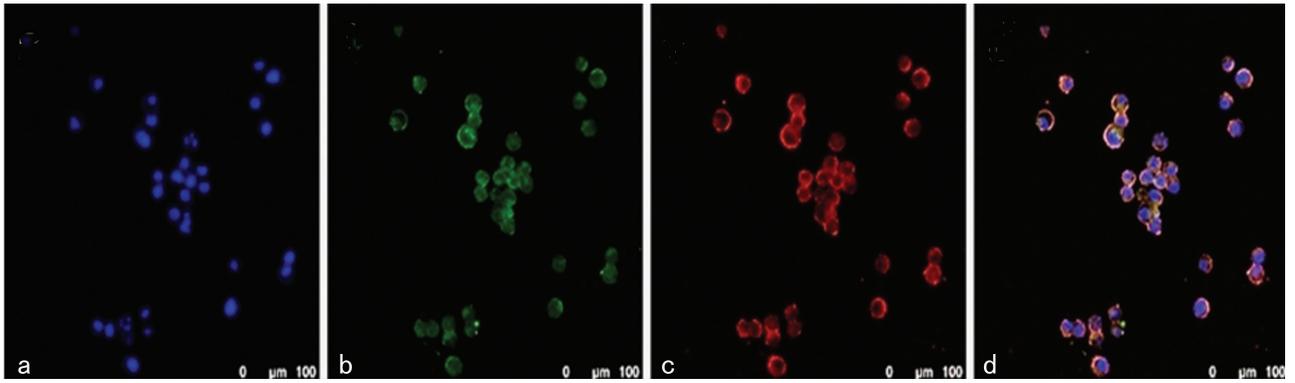
2.2 富集细胞的 CD133/CD326 流式检测结果 紫杉醇处理后的细胞恢复正常克隆生长状态后,能在体外连续的传代培养;细胞球数目明显增多,体积变大,细胞质折光度佳。第 4 代细胞 CD133/CD326 双阳性率在 80%~90%,见图 2。

2.3 富集细胞的免疫荧光检测结果 紫杉醇处理后第 4 代成球细胞在共聚焦显微镜下可以看到绝大多数均表达 CD133(绿色荧光)和 CD326(红色荧光),荧光主要分布在细胞膜上,部分位于细胞质,见图 3。

2.4 成球细胞的分化和分化抗原 CK8/CK18 的表达 成球

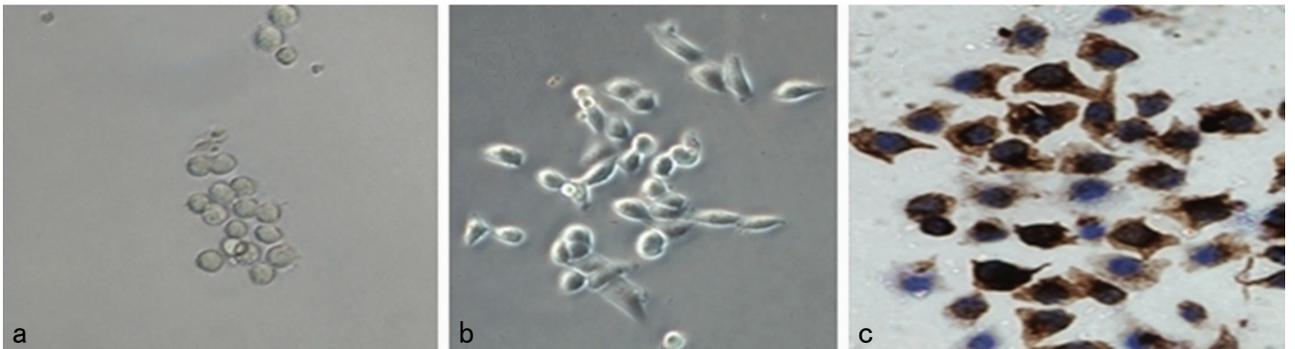
细胞在分化培养基条件下,1 d 即可贴壁生长,细胞形态由圆形逐渐变扁圆形,在第 6 天就和普通 A549 细胞的形态基本相似;对第 6 天的细胞进行免疫组织化学检测发现细胞均表达分化抗原 CK8 或 CK18,证实 $CD133^+/CD326^+$ 细胞亚群具备分化功能,见图 4。

2.5 裸鼠成瘤实验 $CD133^+/CD326^+$ 细胞注射在裸鼠的左前肢腋下,A549 细胞注射在小鼠的右前肢腋下,两种细胞悬液浓度均为 1×10^4 /mL,结果显示 10^4 级的 $CD133^+/CD326^+$ 细胞即能成瘤,而 10^5 级的 A549 细胞不能成瘤,证实富集细胞具备更强的致瘤能力,见图 5。



a:DAPI 染色显示细胞核呈现蓝色;b:CD133 的表达(绿色荧光);c:CD326 的表达(红色荧光);d:CD133/CD326 的共表达(显示为橙色荧光)。

图 3 第 4 代成球细胞的免疫荧光共聚焦检测($\times 400$)



a:成球细胞 24 h 的生长状态;b:成球细胞分化第 6 天;c:分化第 6 天细胞 CK8/CK18 分化抗原的表达。

图 4 成球细胞的分化及分化抗原的免疫组织化学检测($\times 200$)



a: $CD133^+/CD326^+$ 细胞成瘤(左前腋下);b:剥离的移植瘤;c:移植瘤组织病理检测(HE 染色 $\times 200$)。

图 5 裸鼠成瘤及病理检测

3 讨 论

癌干细胞存在于大多数实体肿瘤中,并能为某些分子所标记:乳腺癌以 $CD44^+/CD24^-$ 作为干细胞分子标记^[1],黑色素瘤以 $CD133^+$ 或者 $CD20^+$ 作为干细胞分子标记^[2],其他诸如胶质瘤、前列腺癌^[3]、卵巢癌^[4]、肝癌^[5]、胰腺癌^[6] 以及结肠癌^[7] 等均以 $CD133^+$ 作为干细胞的分子标记。但就肺癌干细胞而言,对其确切的分子表面标记存有争议。Tirino 等^[8] 通过体外和体内相关实验也证实在肺癌组织中 $CD34^+/CD326^+$ 或者

$CD133^+/CD326^+$ 细胞亚群具备干细胞特性,但在肺癌细胞 A549/CALU1/LC12/LC31/LC52 中,仅 $CD133^+/CD326^+$ 细胞亚群才具备干细胞特性。Meng 等^[9] 通过磁性活细胞分选,得到 $CD133^+$ 和 $CD133^-$ 细胞亚群,经体内和体外实验证实 $CD133^+$ 和 $CD133^-$ 细胞亚群中含有等量的干细胞样细胞,说明至少在肺癌细胞株 A549 和 H446 中, $CD133$ 不能单独作为干细胞的分子标记物;临床研究认为 $CD133$ 的表达与肺癌的预后也无明确的相关性^[10]。因此,本实验选择药物筛选联合

无血清培养逆向诱导富集 A549 始动细胞。

实验通过检测流式细胞表达率证实富集得到的细胞亚群表达 CD133/CD326 表面分子;为了更直观地观察体外传代培养后细胞球 CD133/CD326 分子的表达情况,本实验用 FITC 标记的绿色荧光和 CY3 标记的红色荧光抗体对 CD133 和 CD326 进行共聚焦检测,结果显示第 4 代的始动细胞绝大多数表达 CD133/CD326 分子,证实紫杉醇联合证实紫杉醇联合干细胞培养基逆向诱导可有效富集 CD133/CD326 细胞亚群。多向分化潜能和更强的成瘤能力是肿瘤干细胞所具备的重要特性,在分化实验中,CD133⁺/CD326⁺ 细胞在第 2 天即可以贴壁生长,其后逐渐成扁平不规则状生长,第 6 天外形和普通 A549 细胞相类似,免疫组织化学结果证实分化细胞均表达 CK8/CK18 细胞角化蛋抗原,说明其有向普通肿瘤细胞分化的潜能。成瘤实验中 10⁴ 级 CD133⁺/CD326⁺ 细胞即能形成移植瘤,而 10 倍量的普通 A549 细胞不能成瘤,说明富集细胞亚群较普通的 A549 细胞具备更强的自我更新增殖能力。

总之,实验证实了以 CD133/CD326 标记的富集细胞亚群具备干细胞的相关特性包括连续的传代成球能力、向普通肿瘤细胞分化的潜能、较普通细胞具备更强的成瘤能力,能够用于肺腺癌始动细胞后期生物学特性的研究。

参考文献:

- [1] Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, et al. The CD44⁺/CD24⁻ phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients[J]. *Medical oncology*, 2011, 28(3): 745-752.
- [2] Zabierowski SE, Herlyn M. Melanoma stem cells; the dark seed of melanoma[J]. *JCO*, 2008, 26(6): 2890-2894.
- [3] Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells[J].

Eur J Cancer, 2006, 42(14): 1213-1218.

- [4] Zhang S, Balch C, Chan MW, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4): 4311-4320.
- [5] Ma S, Tang KH, Chan YP, et al. miR-130b Promotes CD133⁺ liver tumor initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein1[J]. *Stem Cell*, 2010, 7(13): 694-707.
- [6] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(6): 313-323.
- [7] Bellizzi A, Sebastian S, Ceglia P, et al. Co-expression of CD133⁺/CD44⁺ in human colon cancer and liver metastasis[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 228(2): 408-415.
- [8] Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour initiating cells in non-small-cell lung cancer[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009, 36(3): 446-453.
- [9] Meng X, Li M, Wang X, et al. Both CD133⁺ and CD133⁻ sub populations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(12): 1040-1046.
- [10] Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, et al. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(4): 950-958.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-11)

(上接第 4107 页)

receptor coexpression in breast tumor tissue samples using flow cytometry-possibilities and limitations[J]. *Cytometry A*, 2010, 77(4): 387-398.

- [11] Griffero F, Daga A, Marubbi D, et al. Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors[J]. *J Biol Chem*, 2009, 84(11): 7138-7148.
- [12] Vollmann-Zwerenz A, Diermeier-Daucher S, Wege AK, et al. Multichromatic phenotyping of HER receptor coexpression in breast tumor tissue samples using flow cytometry-possibilities and limitations[J]. *Cytometry A*, 2010, 77(4): 387-398.

- [13] Lobo NA, Shimono Y, Qian D, et al. The biology of cancer stem cells[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007(23): 675-699.

- [14] Argyriou AA, Antonacopoulou A, Iconomou G, et al. Treatment options for malignant gliomas, emphasizing towards new molecularly targeted therapies[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009, 69(3): 199-210.
- [15] Viana-Pereira M, Lopes JM, Little S, et al. Analysis of EGFR Overexpression, EGFR Gene Amplification and the EGFRvIII Mutation in Portuguese High-grade[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(2): 913-920.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-10)