

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.32.008

人宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中 SP 细胞水平和生物学特性的比较研究*

董超¹, 金从国², 吴星烧³, 杨毅³, 高碧燕^{4△}(昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院:1. 肿瘤内二科;2. 肿瘤研究所;
3. 放射治疗研究中心;4. 妇瘤科, 昆明 650118)

摘要:目的 比较宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中多种恶性肿瘤的侧群(SP)细胞的含量和生物学特性。方法 采用 Altra 流式细胞仪分选出宫颈癌组织原代培养 6 代细胞和 HeLa 细胞株中 SP 细胞,检测两种细胞的表面标记和细胞周期增殖状况。结果 宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中 SP 细胞水平分别为(1.62±0.48)%和(2.70±0.59)%,HeLa 细胞株中 SP 的水平明显高于宫颈癌组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。宫颈癌组织和 HeLa 细胞株 SP 细胞的生物学标记(ABCG2、CD133、CD43、P63、Ki-67、MDR)表达率分别为:ABCG2(78.59±5.42)% vs. (80.17±3.60)%,CD133(51.55±6.29)% vs. (52.87±4.96)%,CD43(69.73±5.70)% vs. (70.68±5.44)%,P63(47.56±6.92)% vs. (48.06±5.28)%,Ki-67(14.69±1.69)% vs. (15.33±1.38)%,MDR(58.36±11.12)% vs. (58.24±5.32)%,表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。各细胞周期时相分布分别为: G_0/G_1 期(94.70±1.76)% vs. (95.10±1.59)%,S 期(3.25±0.99)% vs. (2.92±0.84)%, G_2/M 期(2.05±1.10)% vs. (1.98±0.95)%,凋亡率(4.06±0.64)% vs. (3.92±0.59)%,坏死率(1.00±0.38)% vs. (1.12±0.31)%,表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。宫颈癌组织和 HeLa 细胞株两组 SP 细胞在生物学标记和细胞周期增殖状况的表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中都存在 SP 细胞且含量不同,他们均具有肿瘤干细胞的生物学特性。

关键词:宫颈肿瘤;肿瘤干细胞;侧群细胞;生物学特性

中图分类号:R737.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)32-4297-04

Comparison and analysis of side population cells in biological characteristics between human cervical cancer and HeLa cells*

Dong Chao¹, Jin Congguo², Wu Xingrao³, Yang Yi³, Gao Biyan^{4△}(1. Department of the Second Medical Oncology; 2. Tumor Institute; 3. Department of radiotherapy;
4. Department of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical
University/Yunnan Tumor Hospital, Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: Objective To compare the proportion and biological characteristics of side population cells between human cervical cancer and HeLa cells. Methods Altra flow cytometry was used to isolate SP cells from human cervical cancer and HeLa cells, the cells markers and cell cycles were measured. Results The proportions of SP cells in human cervical cancer and HeLa cells were (1.62±0.48)% and (2.70±0.59)%, the percentage of SP in HeLa cells were significantly higher than in human cervical cancer ($P<0.05$). The proportions of ABCG2, CD133, CD43, P63, Ki-67, MDR were (78.59±5.42)% vs. (80.17±3.60)%, (51.55±6.29)% vs. (52.87±4.96)%, (69.73±5.70)% vs. (70.68±5.44)%, (47.56±6.92)% vs. (48.06±5.28)%, (14.69±1.69)% vs. (15.33±1.38)%, (58.36±11.12)% vs. (58.24±5.32)% in human cervical cancer and HeLa cells, respectively ($P>0.05$). The proportions of G_0/G_1 , S, G_2/M were (94.70±1.76)% vs. (95.10±1.59)%, (3.25±0.99)% vs. (2.92±0.84)%, (2.05±1.10)% vs. (1.98±0.95)%, respectively. The proportions of apoptosis and necrosis were (4.06±0.64)% vs. (3.92±0.59)%, (1.00±0.38)% vs. (1.12±0.31)%. There were no significant differences in biological characteristics, cell cycle or cell apoptosis of the two SP cells between human cervical cancer and HeLa cells ($P>0.05$). Conclusion Side population cells express in human cervical cancer and HeLa cells, and percentages of the two SP cells are different. The two SP cells have the characteristics of cancer stem cells. So it can be viewed as the pointcut to research the cervical cancer stem cell and supply scientific basis to identify the cervical cancer stem cell.

Key words: uterine cervical neoplasms; neoplastic stem cell; side population cells; biological characteristics

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率均居女性恶性肿瘤第 2 位,容易复发与转移,单纯的手术切除或手术加放化疗并不能从根本上解决宫颈癌复发和转移。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)是一类存量较少,同时具有肿瘤细胞和干细胞特征的干细胞样癌细胞亚群,在肿瘤生长、

复发和转移中均起关键作用。研究表明,多种恶性肿瘤的侧群(side population, SP)细胞富集于 CSC,可以作为干细胞研究的重要资源^[1]。本研究采用 Altra 流式细胞仪分选出人宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中 SP 细胞,比较两组 SP 细胞的生物学标记和细胞周期增殖凋亡的状况,探讨以侧群细胞作为宫颈癌干

* 基金项目:云南省卫生厅科学研究基金项目(2010NS084)。作者简介:董超(1979—),主治医师,硕士,主要从事肿瘤内科临床工作。

△ 通讯作者, Tel: 13118716333; E-mail: biyan_gao@126.com。

细胞研究切入点的可行性和科学依据,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 (1)标本来源:选取 2010 年 6 月至 2012 年 6 月在本院妇科经宫颈活体确诊的宫颈癌标本 60 例(均经患者或委托人知情同意),病理类型均为鳞癌,其中年龄 33~73 岁,平均 50.4 岁。宫颈癌分期和病理分级采用国际妇产科联盟的标准(FIGO,2009 年),其中 I B 期 7 例,II A 期 8 例,II B 期 29 例,III B 期 16 例,临床及病理资料完整。Hela 细胞株来自上海细胞库。(2)实验试剂:DMEM/F 121:1 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司,0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液、青霉素混合液购自 Solarbio 公司,碘化丙啶(PI)、维拉帕米(verapamil hydrochloride)、Hoechst 33342、二甲亚砜(DMSO)、四甲基嘧啶蓝(MTT)和胶原酶 I 购自 Sigma-Aldrich 公司,磷酸盐缓冲液(PBS)购自贝博生物公司。ABCG2-PE、CD133-PE、CD43-PE、P63-PE、Ki67-PE、MDR-PE 抗体均购自 Beckman Coulter 公司。

1.2 方法

1.2.1 人宫颈癌细胞原代培养及细胞传代 在新鲜肿瘤组织边缘无坏死、钙化及电凝部位无菌取材,将组织置入含青霉素(100 000 U/L)、链霉素(100 000 mg/L)的无血清 RPMI-1640 培养基内,并于 1 h 内处理,组织块置于培养皿中,加入 RPMI-1640 液,再用 RPMI-1640 液漂洗 2 次后剪成约 1 mm×1 mm×1 mm,加入 0.25%胰蛋白酶消化液置于 37℃ 消化 20~30 min,细胞悬液纱布过滤后 1 000 r/min,5 min 离心,弃上清液,稀释成 10⁵ 个/mL 浓度,用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液稀释,置于 37℃,5% CO₂ 饱和湿度的恒温箱中培养,每 2~3 天换液并传代 1 次,以 0.02%乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)和 0.25%胰蛋白酶的 1:1 混合液消化,经 6 次传代选用对数生长期细胞为实验对象。

1.2.2 宫颈癌 Hela 细胞株的培养和传代 含 10% FBS,100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液为完全培养基,在 37℃,5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。显微镜下观察到细胞贴壁生长,用无菌 0.9%生理盐水清洗 2 次,加入含血清的 RPMI-1640 培养液培养。显微镜下观察到细胞贴壁长满,倒除培养液,用无菌 0.9%生理盐水清洗 2 次,以 0.02% EDTA-2Na 和 0.25%胰蛋白酶的 1:1 混合液 2 mL 消化。显微镜下观察到贴壁细胞已完全消化下,加入含 10% 血清的 RPMI-1640 培养液 2 mL 终止消化,轻轻吹打成单细胞悬液,移一半细胞悬液至新培养瓶中,在 37℃,5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。

1.2.3 细胞染色 选用对数生长期细胞,PBS 洗 1 次,加入 EDTA-2Na 和胰蛋白酶混合消化液 2 mL,镜下观察细胞变圆,加入含血清培养基中止消化,脱壁形成细胞悬液,移入无菌离心管,以 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液稀释成以 10⁶ 个/mL 浓度的细胞悬液。细胞分为 2 组,各 1 mL,一组加入 5 μL Hoechst33342;二组加入 5 μL Hoechst33342 及 200 μL 维拉帕米。将 2 组细胞置于 37℃ 恒温水浴振荡 120 min,每 15 分钟手动振荡 1 次。2 h 后取出,加入冰 PBS 终止反应,以 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。再加入冰 PBS 液,尖吸管吹打,混匀。2 组分别加入 PI 至终浓度 2 μg/mL,立即用流式细胞仪分析。

1.2.4 Altra 流式细胞仪分析 SP 亚群 待分选细胞用 5~10 μg/mL 的 Hoechst33342 标记,置于 37℃ 中摇床振荡 90~120 min,用流式细胞仪进行分析和分组,Hoechst33342 的激发光为 407 nm 紫光,450/40 带通收集蓝光,695/40 带通收集红光。PI 的激发光为 488 nm 蓝光,用 575/26 带通收集红光。收集分选出的 SP 细胞悬液,离心半径 6 cm,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,各加至 1 mL,制成单细胞悬液,各设实验管和对照管,每管细胞数 1×10⁶ 个,实验管中加入 ABCG2-PE、CD133-PE、CD43-PE、P63-PE、Ki67-PE、MDR-PE 各 20 μL,对照管中不加,混匀,室温下避光静置 2 h,用流式细胞仪检测各个管中抗体阳性表达率。

1.2.5 流式细胞仪 TUNEL 法检测 SP 细胞的细胞周期时相分布和细胞凋亡 分别收集宫颈癌组织原代培养 6 代细胞和 Hela 细胞株中 8×10⁶ 个 SP 细胞,加入 500 μL 预冷 70%的乙醇重悬,冰上固定 30 min 后离心细胞。同一样品分为 2 管,分别加入 TDT 反应液及阴性对照液各 30 μL,放置在 37℃ 下,孵育 1 h;加入 1 mL 含 0.2% BSA 的 PBS 洗涤,700 r/min 室温离心 3 min;去上清液,加入 10 mg/mL RANse 20 μL,0.1% Triton 200 μL,放置在 37℃ 下,孵育 15 min;加入 100 μg/mL 的 PI 染液 1 mL,避光放置 15~30 min。流式细胞仪进行细胞周期分析和凋亡检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,成组资料采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌组织和 Hela 细胞株中 SP 含量的测定 采用 Altra 流式细胞仪分选出宫颈癌组织原代培养 6 代细胞和 Hela 细胞株中 SP 细胞的水平分别为(1.62±0.48)%和(2.70±0.59)%,差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 1、2、表 1。

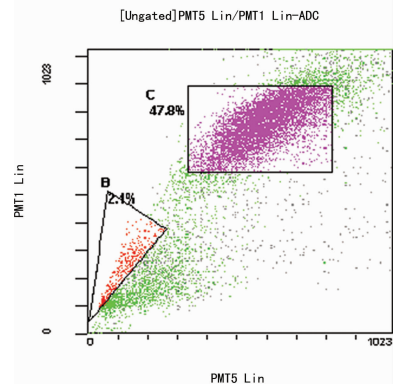


图 1 宫颈癌组织 SP 细胞水平

表 1 宫颈癌组织和 Hela 细胞株中 SP 细胞含量及其生物学特性比较($\bar{x} \pm s, \%$)

项目	宫颈癌组织 (n=60)	Hela 细胞株 (n=30)	<i>t</i>	<i>P</i>
SP 细胞含量	1.62±0.48	2.70±0.59	9.316	0.000
ABCG2	78.59±5.42	80.17±3.60	1.443	0.152
CD133	51.55±6.29	52.87±4.96	1.005	0.318
CD43	69.73±5.70	70.68±5.44	0.756	0.452

续表 1 宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中 SP 细胞含量及其生物学特性比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

项目	宫颈癌组织 (n=60)	HeLa 细胞株 (n=30)	t	P
P63	47.56 ± 6.92	48.06 ± 5.28	0.348	0.729
Ki-67	14.69 ± 1.69	15.33 ± 1.38	1.810	0.074
MDR	58.36 ± 11.12	58.24 ± 5.32	0.057	0.955

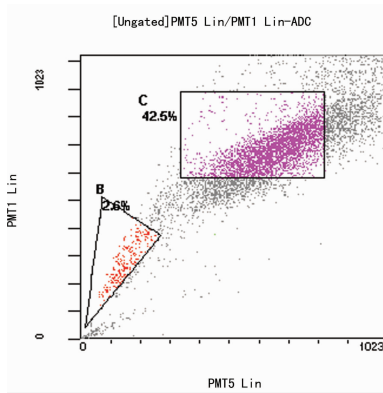


图 2 HeLa 细胞株 SP 细胞水平

2.2 宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中 SP 细胞的生物学特性比较 SP 细胞的各项生物学标记 (ABCG2、CD133、CD43、P63、Ki-67、MDR) 在宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中的表达无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.3 宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中 SP 细胞的细胞周期和细胞凋亡比较 SP 细胞在宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中各细胞周期时相分布 (G_0/G_1 、S、 G_2/M 期) 和细胞凋亡坏死的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2, 图 3~6。

表 2 宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中 SP 的细胞周期和细胞凋亡比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

生物学特性	宫颈癌组织 (n=60)	HeLa 细胞株 (n=30)	t	P
G_0/G_1	94.70 ± 1.76	95.10 ± 1.59	1.046	0.299
S	3.25 ± 0.99	2.92 ± 0.84	1.540	0.127
G_2/M	2.05 ± 1.10	1.98 ± 0.95	0.312	0.756
凋亡	4.06 ± 0.64	3.92 ± 0.59	0.967	0.336
坏死	1.00 ± 0.38	1.12 ± 0.31	1.504	0.136

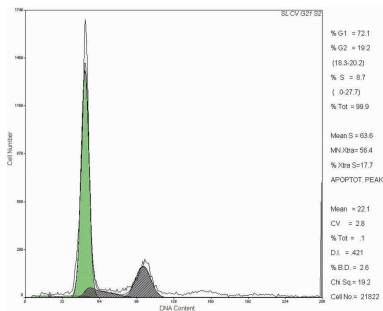


图 3 宫颈癌组织 SP 细胞周期

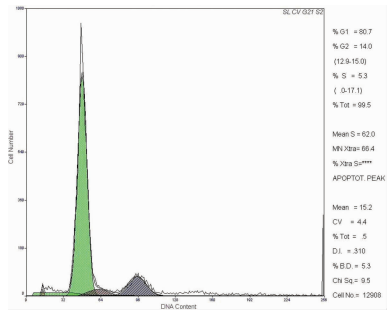


图 4 HeLa 细胞株中 SP 的细胞周期

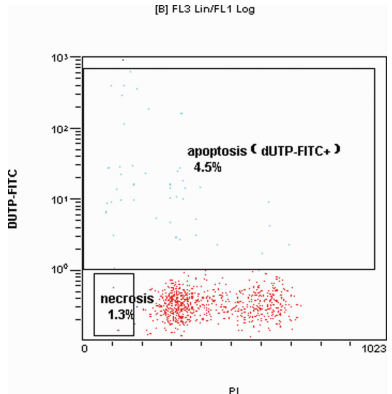


图 5 宫颈癌组织 SP 细胞凋亡坏死

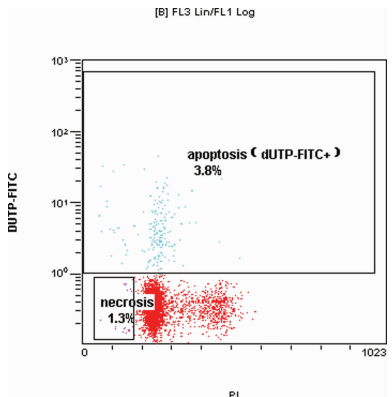


图 6 HeLa 细胞株中 SP 的细胞凋亡坏死

3 讨论

目前,对 CSC 的研究仍处于探索阶段,对大多数肿瘤而言,迄今仍未建立较特异的分选鉴定方法,从形态学上很难区分 CSC 与肿瘤细胞间的差异,只能用功能学方法即从自我更新能力和分化潜力来鉴定 CSC。分离 CSC 主要有:SP 细胞分选、无血清培养富集干细胞和通过 CSC 表面特异性标志筛选 3 种方法^[2]。SP 法是利用 SP 细胞外排染料 Hoechst33342 的特征,采用流式细胞技术将染色阴性和弱阳性的细胞分选出来,分离正常干细胞和 CSC。目前,尚未发现 CSC 特异性标志与正常组织干细胞之间有何区分,公认的是根据共有的生物学特性进行鉴定,如自我更新能力、表达干细胞标志、耐药基因表达和免疫缺陷鼠体内成瘤等^[3]。CSC 理论认为并非所有肿瘤均具有无限增殖和自我更新的能力,肿瘤细胞中存在一些数量很少但具有类似于干细胞功能的细胞,他们具备上述 CSC 特性,无论经过手术还是放疗和化疗等各种治疗的癌症患者,理论上只要还存在 CSC 就可能出现肿瘤的复发和转移^[4]。

本实验采用 Altra 流式细胞仪成功分选出 60 例不同分期

的宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中的 SP 细胞。宫颈癌组织进行原代培养 6 代细胞分选出 SP 细胞的水平为 $(1.62 \pm 0.48)\%$, 较国内学者的结果略低^[5]; HeLa 细胞株中的 SP 细胞水平为 $(2.70 \pm 0.59)\%$, 较其他学者的结果略高^[6]; 与同实验中 SP 细胞比较, 人宫颈癌组织 SP 水平明显低于 HeLa 细胞株, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。多项研究表明, 实体瘤中 SP 细胞具有 CSC 特性, 即表达干细胞相关表面标志, 具有自我更新、致瘤能力强和高表达转运蛋白 ABCG2 等, ABCG2 是 ATP 结合盒药物转运子家族成员之一的基因, 是通过水解 ATP 供能将化疗药物泵出胞外, 导致细胞耐药, 这也是肿瘤耐药、复发的重要原因之一^[7-8]。在宫颈癌组织和 HeLa 细胞株 SP 细胞 ABCG2 呈高水平表达 $(78.59 \pm 5.42)\%$ 和 $(80.17 \pm 3.60)\%$, 提示 ABCG2 可能是参与维持肿瘤多药耐药性的一个重要生物标志^[9-10]。Ki-67 抗原为人增殖期细胞特异性核蛋白, 在不同病理分级的侵袭性鳞癌中均有表达, 而且表达水平与肿瘤细胞增生密切相关, 与宫颈癌分期成正相关^[11]。宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中 SP 细胞的 Ki-67 的表达率分别为 $(14.69 \pm 1.69)\%$ 和 $(15.33 \pm 1.38)\%$, 明显低于其他生物学标记物的表达, 提示两种组织来源的 SP 细胞具有 CSC 的相对静止、低增殖和低凋亡的特征。研究显示, P63 基因对于正常上皮的发育和维持其功能起关键作用, 在调节干细胞的一致性上有重要的作用, 并在皮肤、肺、宫颈和其他部位的鳞状上皮的分化过程中担当操纵子, P63 优先表达于宫颈储备细胞的胞核中, 随肿瘤恶性度而升高, 可能是宫颈癌干细胞的标记物^[12]。本实验中宫颈癌和 HeLa 细胞株中 SP 细胞中 P63 的表达率分别为 $(47.56 \pm 6.92)\%$ 和 $(48.06 \pm 5.28)\%$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SP 细胞在宫颈癌组织和 HeLa 细胞株处于 G_0/G_1 期比例最多, 高达 $(94.70 \pm 1.76)\%$ 和 $(95.10 \pm 1.59)\%$, 提示 SP 细胞主要处于静止期, 而凋亡和坏死比例较低。在宫颈癌组织和 HeLa 细胞株的凋亡表达率为 $(4.06 \pm 0.64)\%$ 和 $(3.92 \pm 0.59)\%$; 坏死表达率为 $(1.00 \pm 0.38)\%$ 和 $(1.12 \pm 0.31)\%$ 。进一步证实 SP 细胞具有 CSC 的相对静止、低增殖和低凋亡的特征。SP 细胞具有 CSC 的特性, 可用于鉴定 CSC^[13-14]。本研究立足于 CSC 学说, 应用流式细胞技术对宫颈癌组织和 HeLa 细胞株进行 SP 细胞的分离、生物学标记、细胞周期、细胞凋亡和坏死的检测, 确定了宫颈癌组织和 HeLa 细胞株的 SP 细胞均具有 CSC 特性。

综上所述, 本研究认为人宫颈癌组织和 HeLa 细胞株中的 SP 亚群细胞富集于宫颈癌干细胞, 通过流式细胞仪分选 SP 细胞亚群是分离宫颈癌干细胞的一种有效方法, 无论人宫颈癌组织还是 HeLa 细胞株中的 SP 细胞均可作为宫颈癌干细胞筛选和研究的切入点, 这也为进一步研究宫颈癌干细胞的特异性标记奠定了实验基础^[5, 15]。本研究选用宫颈癌原代培养细胞作为研究对象, 为研究宫颈癌化疗、放疗、分子靶向等个体化治疗策略提供一定理论基础和科学依据。

参考文献:

[1] Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and Expan-

sion of the tumorigenic lung cancer stem cell population [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3): 504-514.

- [2] Lobo NA, Shimono Y, Qian D et al. The biology of cancer stem cells[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 675-699.
- [3] Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality[J]. *Nat Med*, 2009, 15(9): 1010-1012.
- [4] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells cancer and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111.
- [5] 宋菁华, 王克芳, 李斌, 等. 人宫颈癌侧群细胞的分选及其生物学特性的研究[J]. *首都医科大学学报*, 2012, 33(1): 5-10.
- [6] Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. [J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(4): 414-415.
- [7] Karla PK, Earla R, Boddu SH, et al. Molecular expression and functional evidence of a drug efflux pump (BCRP) in human corneal epithelial cells[J]. *Curr Eye Res*, 2009, 34(1): 1-9.
- [8] Gao JX. Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(1): 67-96.
- [9] Nicolazzo JA, Katneni K. Drug transport across the blood brain barrier and the impact of breast cancer resistance protein (ABCG2)[J]. *Curr Top Med Chem*, 2009, 9(2): 130-147.
- [10] Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(8): 872-877.
- [11] Amaro-Filho SM, Golub JE, Nuovo GJ, et al. A comparative analysis of clinical and molecular factors with the stage of cervical cancer in a Brazilian cohort [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57810.
- [12] Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, et al. Cytokeratin 17 and P63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(2B): 771-775.
- [13] Fong D, Yeh A, Naftalovich R, et al. Curcumin inhibits the side population (SP) phenotype of rat C6 glioma cell line: towards targeting of cancer stem cells with phytochemicals[J]. *Cancer Lett*, 2010, 293(1): 65-72.
- [14] Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers [J]. *Cancer Lett*, 2008, 268(1): 1-9.
- [15] 万丽娟, 吴楠. 宫颈癌干细胞表面标志物的研究进展[J]. *现代妇产科进展*, 2011, 20(12): 990-992.

(收稿日期: 2014-07-10 修回日期: 2014-08-22)