

无血清分离人结直肠癌细胞的体外培养形态 及标志物表达特征

贾健锋* 贺长林

(都江堰市医疗中心腔镜外科,都江堰 611830)

摘要:目的 探讨人结直肠肿瘤干细胞在体外分化过程中细胞形态和干细胞相关标志物 CD133 的表达变化,为进一步研究结直肠肿瘤干细胞分化走向提供实验依据。**方法** 取来源于人结直肠癌的细胞系 HCT116,无血清培养分离出 CD133⁺ 细胞,加血清诱导分化,相差显微镜下观察其形态变化;在未分化状态下无血清培养第 7 天和 14 天与血清诱导分化后收集细胞,利用流式细胞仪检测干细胞标志物 CD133 的表达量,采用激光共聚焦检测 CD133 表面标记分子的表达。**结果** 1) 细胞形态:无血清培养分离的 CD133⁺ 细胞,在生长过程中聚集成规则的细胞球,血清诱导后即贴壁生长,贴壁形态与同来源细胞形态一致,且再次无血清悬浮培养后聚集成球稳定生长。2) 标志物变化:结直肠肿瘤干细胞未分化时 CD133 表面标记分子高表达,流式细胞仪检测未分化细胞 CD133 第 7 天表达率为 $(20.4 \pm 0.52)\%$,第 14 天表达率为 $(78.5 \pm 2.80)\%$,分化后表达率为 $(0.50 \pm 0.17)\%$ 。**结论** 细胞形态和标志物表达改变均表明高表达 CD133⁺ 的 HCT116 结直肠肿瘤干细胞可定向分化为同源的结直肠癌细胞,CD133⁺ 细胞经血清诱导后表达下调而使细胞失去干细胞特性。

关键词: 结直肠癌;肿瘤干细胞;干细胞标志物;无血清培养;CD133

中图分类号:R-331

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1006-6055.2014.06.011

Characteristics of Morphology and Stem Cell Related Markers of Colorectal Cancer Cells in Vitro in Serum-free Medium

JIA Jianfeng* HE Changlin

(Department of Laparoscopic Surgery, the Dujiangyan Medical Center, Dujiangyan 611830)

Abstract: **Objective** To pursue the changes of cell morphology, expression of stem cell related markers of colorectal cancer stem cells after differentiation in vitro. **Methods** Tumor stem cells of the line CD133⁺ were obtained from colorectal cancer cell line HCT116 cells were seeded in the serum free medium(SFM) supplemented with cell growth factors. Then cultured to differentiate in medium containing 10% fetal bovine serum. The morphology of the cells was observed under phase contrast microscope. Cells were collected respectively before differentiation and 7,14 days after the differentiation. The cell surface markers such as CD133 was investigated by flow cytometry. **Results** 1) HCT116 cells were formed cancer cell spheres in SFM, Sphere cells are able to produce a heterogeneous cell population that can produce spheres. Cancer cell spheres were induced to differentiate by serum supplemented medium, these differentiated cell were adherence growth and kept the same morphology with the parental cells. 2) These cancer cell spheres were founded expressing markers such as CD133 was higher than differentiated cells. The expression rates of CD133 was $(20.4 \pm 0.52)\%$ in the 7 days, $(78.5 \pm 2.80)\%$ in the 14 days, and $(0.50 \pm 0.17)\%$ of the differentiated cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The changes of morphology and cell marker expression in the high-expression CD133⁺ CRC cells were oriented differentiated into the same origin CRC cells, and the CD133⁺ cells were losing stem cell ability through serum-induced.

Key words: colorectal carcinoma cell lines; cancer stem/tumor-initiating cells; stem cell related marker; serum-free culture; CD133

1 引言

Reya 等^[1]报道的干细胞、肿瘤、肿瘤干细胞学说对肿瘤的起源引起了一场空前的热议,结直肠肿瘤干细胞的研究也随之成为重点课题。目前的争议

主要集中在用分离和鉴定胚胎干细胞的方法所获得的结直肠肿瘤干细胞是否就是肿瘤的起源细胞,尽管目前对体外干细胞标志物的检测及体内成瘤模型都证明存在干细胞样细胞亚群,这一细胞亚群具有更强的多向分化及致瘤潜能^[2]。但由于确切的结直肠肿瘤干细胞分化走向尚未阐明,肿瘤干细胞学说仍存在不少争议^[3]。本文报道了结直肠肿瘤干细胞体外分化过程中的形态和干细胞相关标志物的

2014-06-05 收稿,2014-07-06 接受

* 通讯作者, E-mail: jif1985@sina.cn

表达变化,旨在为进一步阐明结直肠肿瘤干细胞的分化走向和干细胞表达的变化分子机制打下基础。

2 材料与方法

2.1 实验材料

HCT116 细胞系购自中国科学院细胞库。完全培养基(SSM)为含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液(Gibco,美国)。细胞在 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内培养备用。

2.2 实验方法

1) 结直肠 CD133⁺ 肿瘤干细胞的无血清分离

无血清培养基(SFM)为 DMEM/F12 培养基中加入细胞生长因子:50 ng/ml EGF(peprotech,美国)、10 ng/ml Noggin(peprotech,美国)、50 ng/ml R-Spondin 1(R&D,美国)。制作 1% 琼脂糖(Agarose)附着面的 6 孔板备用。取 HCT116 结直肠癌细胞,制成单细胞悬液,用无血清的 DMEM/F12 培养基重悬,台盼蓝染色计数,以 10³/mL 密度接种至盛有 SFM 的上述 6 孔板中进行常规培养。HCT116 细胞无血清悬浮培养 1 天后即形成微小“肿瘤细胞球”,当肿瘤细胞球生长到 6~8 天时,离心收集肿瘤细胞球,重悬于细胞分散剂 Accutase 液中,孵箱中消化 5 min 后,轻轻吹打至肿瘤细胞球离散为单细胞,离心后按 1:2 比例接种至 SFM 中传代培养,观察细胞的自我更新情况。

2) CD133⁺ 细胞诱导分化和贴壁细胞的传代培养

待悬浮培养 2 周后收集形成的 CD133⁺ 细胞放入玻璃培养瓶中,加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液诱导分化,分别在不同时间点 24 h、48 h 及 72 h 置于显微镜下观察细胞形态及生长状态的变化,并观察传代后的细胞贴壁生长形态。

3) 肿瘤细胞球中 CD133 的细胞定位

取无血清悬浮培养 7 天形成的肿瘤细胞球置于 EP 管中,通过 4% 多聚甲醛固定后 PBS 洗涤,0.3% 过氧化氢灭酶后,用 5% BSA 封闭,加入鼠抗人单抗 CD133-PE(Miltenyi,德国),室温下避光孵育 20 min。PBS 清洗 3 次后转入激光共聚焦特殊的观察器皿中,同时设置不加一抗的空白对照,上机行断层扫描及三维重建,观察 CD133 干细胞标记分子的细胞定位。

4) 流式细胞检测无血清培养和诱导分化后的 CD133⁺ 细胞含量

HCT116 含血清培养细胞及无血清培养 7 天、14 天的肿瘤干细胞样细胞分别用 0.25% 胰酶和 Accutase 制备成细胞悬液,计数后调整细胞数量为 1 × 10⁶/组,每管中(按工作液 1:10 稀释)加入鼠抗人单抗 CD133-PE(Miltenyi,德国),对照管加入同体积的同型对照抗体,混匀,室温下避光孵育 20 min。PBS 清洗 2 次后,用含 1% 多聚甲醛的 PBS 固定重悬细胞,上流式细胞仪检测 CD133⁺ 细胞的含量,本实验重复 3 次。

5) 统计学处理

使用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验或方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HCT116 肿瘤干细胞的传代培养和诱导分化

无血清培养生长至第 7~9 天 CD133⁺ 细胞聚集成细胞球,后细胞球开始贴住琼脂糖而失去悬浮生长状态。此时球体大小稳定,加入细胞分散剂 Accutase 将肿瘤细胞球打散后,按 1:2 的比例传代,无血清培养后仍可形成与亲代肿瘤细胞球形态相同的 CD133⁺ 细胞球。将细胞球接种于 SSM 中血清诱导分化,24 h 后开始有 CD133⁺ 细胞球贴壁生长,形成细胞重叠生长的贴壁类圆形“细胞群”,其形态在高倍镜下观察与各结直肠癌细胞来源完全相同。血清诱导 72 h 后,肿瘤细胞球完全贴壁生长并增殖。加入 0.25% 胰酶 + EDTA 消化后可吹打成细胞悬液,可稳定地在 SSM 中传代培养,其生长特性和形态与结直肠癌系 HCT116 亲代细胞相同(见图 1)。

3.2 HCT116 肿瘤干细胞球中 CD133 的定位

采用激光共聚焦技术扫描 HCT116 肿瘤细胞球为 6 个层面,并将各层面进行三维重建,重建图中可见球中 CD133 定位于各个球层面的细胞膜(见图 2),并且球体的内外部均有 CD133 的表达,这表明无血清诱导可使 CD133⁺ 细胞稳定存活。

3.3 HCT116 诱导分化后细胞和肿瘤细胞球中干细胞标记分子 CD133 的检测

流式细胞检测结果显示,无血清培养第 7 天和第 14 天 HCT116 肿瘤细胞球中 CD133⁺ 细胞含量分别为 (20.4 ± 0.52)% 与 (78.5 ± 2.80)%,明显高于诱导分化后细胞的 (0.50 ± 0.17)%, $P < 0.01$ (见图 3)。这些表明无血清培养可使 CD133⁺ 细胞纯化,而采用血清诱导 CD133⁺ 的 HCT116 细胞分化后

CD133 表达下调,而失去干细胞特性。

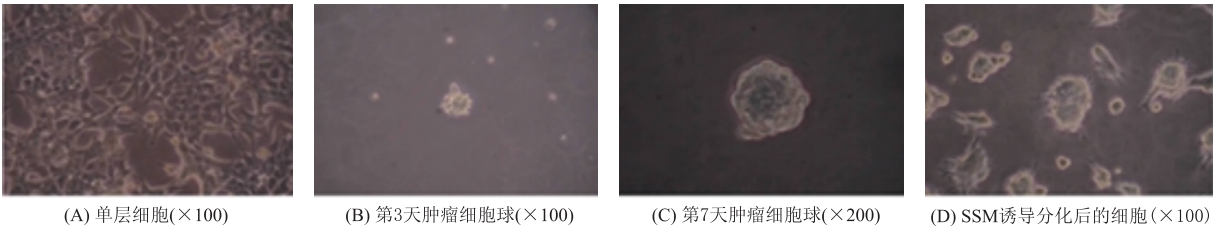
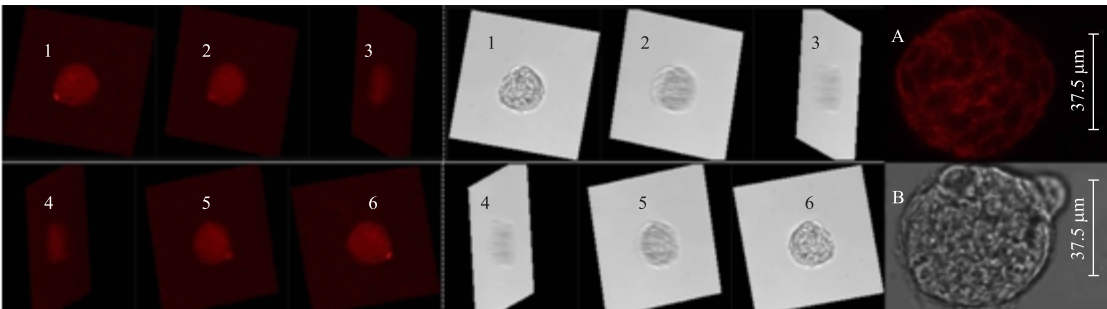


图 1 HCT116 肿瘤干细胞的悬浮培养及血清诱导分化情况

Figure 1 HCT116 cancer stem cells in SFM and differentiated cells induced by SSM



A.红色荧光 B.可见光 1-6: 不同检测视角 (×100)

图 2 干细胞标记分子 CD133 在 HCT116 肿瘤细胞球中三维重建后的定位

Figure 2 The location of cancer stem cell marker CD133 in HCT116 cancer cell spheres

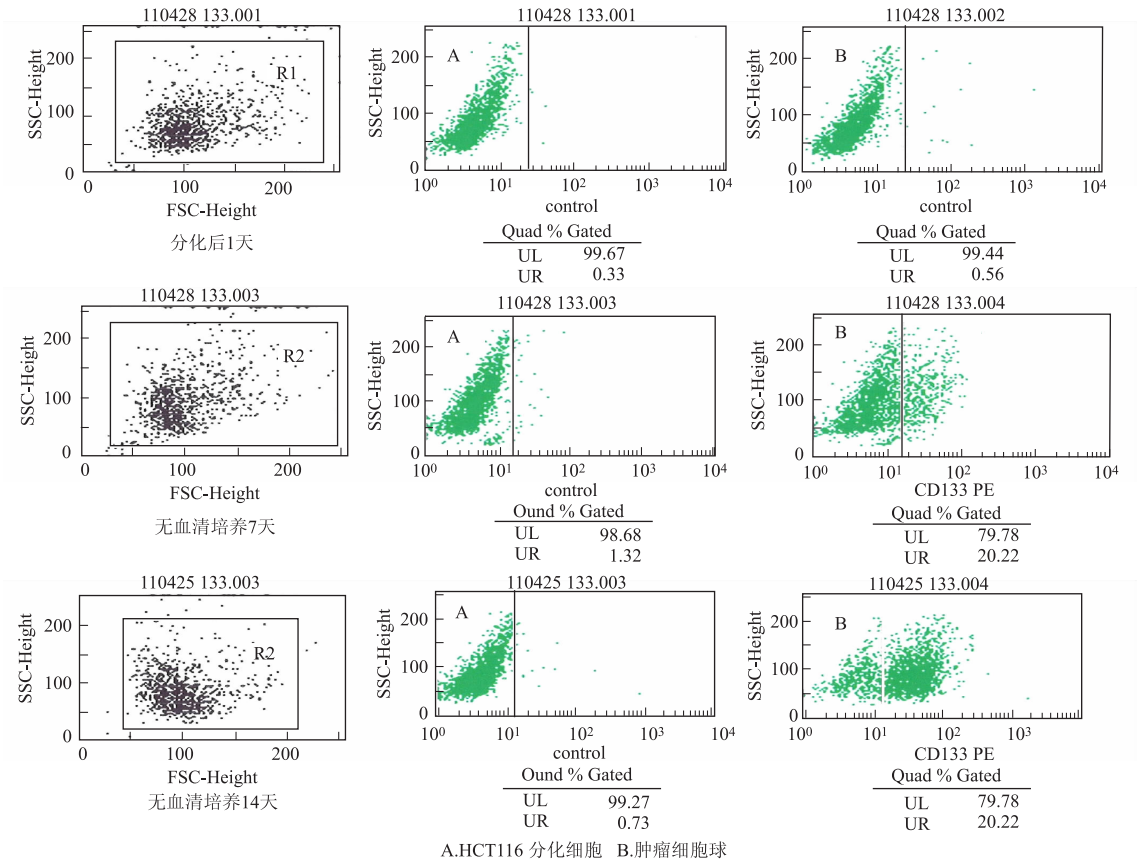


图 3 CD133 在 HCT116 细胞和肿瘤细胞球中检测的流式细胞图

Figure 3 Expression of CD133 in HCT116 differentiated cells and cancer spheres

4 讨论

肿瘤干细胞与正常干细胞在表型和功能上的相似性提示肿瘤干细胞可能来源于正常干细胞的转化^[4]。Lucia Ricci-Vitiani 等^[5]和 Cantherine A. O Biren 等^[6]在 2007 年分别用干细胞标记物 CD133 对结直肠癌进行研究,证明了结直肠癌中 CD133⁺细胞的存在,即在结肠癌中存在具有干细胞特性的细胞亚群。CD133 是一种细胞表面抗原,也称为 prominin-1,含有 5 个跨膜区域,在胞外有一个 N 端结构域,在胞外形成 2 个大环结构,细胞质内形成 2 个小环结构,C 末端结构域在细胞质内^[7]。CD133 已经被证实其作为一种干细胞标志物在人类白血病、脑肿瘤、肺癌、乳腺癌干细胞中表达,与肿瘤的演进和转移有关^[8-11]。本实验重点观察人结直肠癌 HCT116 细胞在无血清分离的体外分化过程中形态和干细胞相关标志物表达的变化,为进一步研究结直肠肿瘤干细胞分化走向提供实验依据。

通过无血清悬浮培养富集肿瘤干细胞 CD133⁺细胞,激光共聚焦扫描 HCT116 细胞球的各个层面并进行三维重建,发现 CD133 定位于球体中的细胞膜。流式细胞仪分别检测 HCT116 诱导分化后的细胞和未分化状态细胞中 CD133⁺细胞的含量,发现无血清培养的肿瘤细胞球中 CD133⁺细胞数量显著增多,这些结果表明 HCT116 细胞球中富含 CD133⁺细胞,该球体具有干细胞样的特性。加入小牛血清诱导该群 CD133⁺细胞后,细胞可定向分化为同源的结直肠癌细胞,其生长特性及形态一致,并可稳定地传代培养。

综上,结直肠肿瘤细胞系的表达谱可以确定肿瘤复发转移相关的不良预后,提示原发灶肿瘤细胞已具有肿瘤复发的基因表达程序,肿瘤复发转移的特性是肿瘤形成时已具有的遗传学改变,而非肿瘤演进的晚期事件。而且,不同类型肿瘤共同拥有这些转移相关不良预后基因,提示各种肿瘤可能存在肿瘤复发转移的共同基因程序^[14]。从肿瘤干细胞的理论分析,肿瘤干细胞的干细胞特性是肿瘤发生转移的前提条件,是各种肿瘤共有的基因程序。复发迁移性在肿瘤干细胞形成之时已具备,是肿瘤干细胞的遗传性特征^[15]。但本研究通过对高表达 CD133⁺的 HCT116 结直肠癌肿瘤干细胞形态和标志物表达的研究,表明高表达 CD133⁺的 HCT116 结直肠癌肿瘤干细胞可通过血清诱导定向分化为同源

的结直肠癌细胞,且 CD133⁺细胞可通过血清诱导分化而使干细胞特性降低,这将为肿瘤治疗方案的研究提供一条新的研究思路。

参考文献

- [1] REYA T, MORRISON S J, CLARKE M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414 (6859): 105-111.
- [2] VINAGOLU K R. *Cancer Stem Cells* [M]. New Jersey: WILEY Blackwell, 2014.
- [3] MURAKAMI H, MIZUTANI A, LING CHEN, et al. Cancer Stem Cells Derived from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells [J]. *Stem Cells and Cancer Stem cells*, 2014, 7 (11): 127-133.
- [4] DALERBA P, CHO R W, CLARKE M F, et al. Cancer stem cells: models and concepts [J]. *Annual Review of Medicine*. 2007, 11 (58): 267-284.
- [5] 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.
- [6] O'BRIEN C A, POLLETT A, GALLINGER S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445 (7 123): 106-110.
- [7] YIN A H, MIRAGLIA S, ZANJANI E D, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Blood*, 1997, 90 (12): 5 002-5 012.
- [8] ABDOLKHALEG D. Differential Sensitivity of Telomerase from Human Hematopoietic Stem Cells and Leukemic Cell Lines to Mild Hyperthermia [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2014, 12 (69): 681-691.
- [9] MAK B A, SCHNEGG C, LAI C Y, et al. CD133-Targeted Niche-Dependent Therapy in Cancer: A Multipronged Approach [J]. *The American Journal of PATHOLOGY*, 2014, 27 (184): 1-7.
- [10] SKIRECKI T, HOSER G, KAWIAK J, et al. Flow Cytometric Analysis of CD133-and EpCAM-Positive Cells in the Peripheral Blood of Patients with Lung Cancer [J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2014, 1 (62): 67-75.
- [11] LIU T J, SUN B C, ZHAO X L, et al. CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer [J]. *Oncogene*, 2013, 363 (32): 544-553.
- [12] MANI S A, GUO W, LIAO M J, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. *Cell*, 2008, 133 (4): 704-715.
- [13] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R, et al. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 157 (15): 178-196.
- [14] SCHRAMM H M. Should EMT of Cancer Cells Be Understood as Epithelial-Myeloid Transition [J]. *Journal of Cancer*, 2014, 79 (2): 125-132.
- [15] HAYASHIDA T, JINNO H, KITAGAWA Y, et al. Cooperation of Cancer Stem Cell Properties and Epithelial-Mesenchymal Transition in the Establishment of Breast Cancer Metastasis [J]. *Journal of Oncology*, 2011, 10 (1 155): 591-598.