

人结直肠癌细胞系的成球培养方法及转移侵袭能力研究

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 探索人结直肠癌细胞系形成肿瘤细胞球的培养方法及球体内间质化标志物的表达检测。方法 结直肠癌细胞系 SW480、SW620、LOVO、HT29 及 HCT116 在添加了不同细胞生长因子的无血清培养基(SFM)中悬浮培养,传代更新,诱导分化。免疫荧光技术和 RT-PCR 分别检测细胞球中间质化标志物 N-cadherin 及 Vimentin 的表达情况。结果 5 种细胞系均能在特制的 SFM 中形成细胞球,并稳定的传代增殖。在用血清诱导分化后,又重新贴壁生长,且与亲代细胞保持一致的细胞形态。细胞球中间质化标志物 N-cadherin、Vimentin 表达均上调。结论 结直肠癌细胞系在低黏附及添加了细胞生长因子 R-Spondin 1、Noggin 的无血清环境中更容易形成悬浮生长的肿瘤细胞球,细胞球细胞比亲代细胞更具有转移侵袭能力。

关键词:结直肠癌;亲代细胞;肿瘤细胞球;无血清培养;上皮-间质转化

中图分类号:R-331 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1006-6055.2013.06.018

Study of Cultivation and Metastasis-related Characteristics of Tumor Spheres Generated from Human Colorectal Cancer Cell Lines in Serum-free Medium

JIA Jianfeng HE Changlin*

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

Abstract: **Objective** To study on the best cultivation method for cell spheres from colorectal cancer cell lines and examine the mesenchymal markers expression in those cell spheres. **Methods** Colorectal cancer cell lines SW480, SW620, LOVO, HT29 and HCT116 cells were seeded in the serum free medium(SFM) supplemented with cell growth factors, the cancer cell spheres were subculture and induced to differentiate by serum supplemented medium, the expression of mesenchymal markers were investigated by immunofluorescence and RT-PCR. **Results** Cancer cell spheres could be generated from five colorectal cancer cell lines in SFM. These spheres were stable subculture and self-renewal, and were induced to differentiate by serum supplemented medium, these differentiated cell were adherence growth and kept the same morphology with the parental cells. These cancer cell spheres were founded expressing mesenchymal markers such as N-cadherin and Vimentin was higher than monolayer cells. **Conclusion** Tumor spheres can be generated and maintained from colorectal cancer cell lines in SFM, and The metastasis ability of cell sphere was higher than monolayer cells.

Key words: colorectal cancer; monolayer cells; cancer cell spheres; serum-free medium; epithelial-mesenchymal transition

1 引言

肿瘤是导致人类死亡的主要原因之一。尽管手术加化学治疗、放射治疗等技术不断改进,但仍时常发生不可预测的恶性肿瘤细胞远处转移,这给肿瘤的根治带来了障碍。近年来,有研究指出无血清悬浮培养法可以使结直肠癌细胞形成悬浮生长的肿瘤细胞球,并认为这些细胞球具有比亲代细胞更强的耐药及转移等能力,其可能与结直肠癌的复发转移密切相关。为此,本研究通过对 5 种结直肠癌细胞系无血清悬浮培养,旨在探索出一种形成结直肠癌细胞球最佳的培养方法,从而为体外研究结直肠癌细胞球提供良好的模型。并通过对细胞球中间质化标志物的检测,以期探索肿瘤易发生侵袭转移的可能机制提供一条新思路。

2 材料与方法

2.1 实验材料

SW480、SW620、LOVO、HT29 和 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) 结直肠癌细胞的无血清培养。

无血清培养基为:(1) DMEM/F12 培养基。(2) DMEM/F12 培养基中加入细胞生长因子:20 μg/L EGF(peprotech,美国)、10 μg/L bFGF(peprotech,美国)。(3) DMEM/F12 培养基中加入细胞生长因子:50 ng/ml EGF、10 ng/ml Noggin(peprotech,美国)、50 ng/ml R-Spondin 1(R&D,美国)。10 g/L 琼脂糖(Agarose)附着面的制备:称取琼脂糖粉末 0.5 g,溶于装有 50 ml 三蒸水的玻璃瓶中高压灭菌,待冷却至 50℃用移液器迅速将 1 mL/孔琼脂糖移入 6 孔板中,晃动孔板使琼脂均匀铺满孔底后备用。取对数生长期的上述结直肠癌细胞,0.25% 胰酶消化后吹打成单细胞悬液,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 3 种不同 SFM 上述 6 孔板中进行常规培养,并以未铺琼脂的培养孔做为对照。每天置于显微镜下观察细胞球的形成情况,隔天半量换液。

2) 结直肠癌细胞球的自我更新和传代。

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分散为单细胞,离心后按 1:2~3 比例接种至 SFM 中传代培养,观察细胞的自我更新情况。

3) 结直肠癌细胞球的诱导分化。

待 2 周后收集形成的各种细胞球放入玻璃培养瓶中,加

* E-mail:jjf1985@sina.cn

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。

4)结直肠癌细胞球间质化标志物的免疫荧光和 mRNA 检测。

将 SFM 中培养形成的各结肠癌细胞球 0.01% PBS 洗涤离心,制成细胞球悬液,涂于防脱玻片上晾干,4% 多聚甲醛固定在室温下固定,0.01% PBS 洗涤,0.3% 过氧化氢灭酶,0.01% PBS 洗涤,0.2% TritonX-100 破膜 0.01% PBS 洗涤,0.01% PBS 洗涤,5% BSA 封闭,加入兔抗人 N-cadherin 单克隆抗体(1:50,Santa Cruz,美国)或鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体(1:50,Santa Cruz,美国),4℃ 过夜,洗涤后加 FITC 或 TRITC 标记的相应二抗,室温暗处孵育,加 4,6 二脒基-2 一苯吡啶盐酸(4,6-diamidino-2-phenylindole hydrochloride,DAPI,Sigma,美国)复染 5 min,洗涤后倒置显微镜观察。

取亲代细胞和肿瘤细胞球,Trizol(TaKaRa 公司)裂解细胞,提取总 RNA,紫外分光光度计定量。按逆转录试剂盒(TaKaRa 公司)说明书进行反应,得到的 cDNA -20℃ 保存。取 1μl cDNA,分别加入 N-cadherin 和 Vimentin 的上下游引物各 1 μl,2×Taq PCR MasterMix 12.5 μl 和去离子水 9.5 μl,反应体系为 25 μ。引物及反应条件见表 1。反应结束后将 3μl PCR 产物及内参 GADPH 加样至 2% 琼脂糖凝胶样品孔中,在 1×TBE 电泳缓冲液中鉴定 PCR 产物,BioRad 凝胶成

像系统照相并记录,Quantity One 软件分析实验结果。

3 结果

3.1 结直肠癌肿瘤细胞球的形成过程

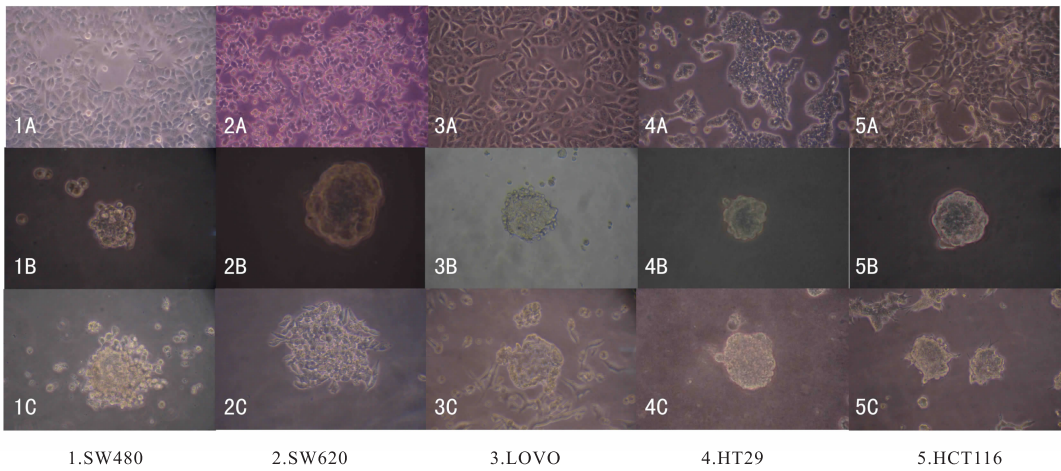
5 种结肠癌细胞以 10³/mL 的密度接种于 3 种不同的 SFM 中:1)未加细胞因子的 DMEM/F12 培养基中没有肿瘤细胞球产生。2)DMEM/F12 培养基中加入 20 μg/L EGF、10 μg/L bFGF 的培养中,只有 HT29 细胞形成了细胞团块聚集,但没有形成规则的肿瘤细胞球。3)DMEM/F12 培养基中加入 50 ng/ml EGF、10 ng/ml Noggin 及 50 ng/ml R-Spondin 1。在铺有琼脂的低黏附环境下,起初各细胞都单个悬浮生长,自第 1 天后 HT29 和 HCT116 行成微小“肿瘤细胞球”,第 2-7 天这些细胞球不断长大,并且形状变成规则的圆球体。SW480 和 SW620 在第 1~2 天开始出芽增殖,到第 3 天形成细胞球,此后不断长大到第 7 天形成规则大小几乎固定的圆球体。LOVO 形成细胞球最为缓慢,第 1~4 天出芽增殖缓慢,第 5 天基本形成微小的细胞球,到第 7 天后球体也不再长大、形状规则。

而在未铺琼脂的 6 孔板中,HCT116 及 HT29 起初贴壁生长,3~4 天后有细胞球从贴壁细胞中游出,生成至稳定时,细胞球体积较小,而 SW480、SW620 及 LOVO 贴壁生长后逐渐死亡,没有细胞球形成。见图 1(a)、(b)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	引物序列	产物大小	温度
N-cadherin	上游引物 5'-GCTGATGTTTGTGGTATGGATG-3'	430bp	60℃
	下游引物 5'-CTGCTCACCACCACTACTTGAG-3'		
V imentin	上游引物 5'-GAAGAGAACTTTGCCGTTGAAG-3'	122bp	59.5℃
	下游引物 5'-TTGAGCAGGTCTTGGTATTAC-3'		
GADPH	上游引物 5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3'	259bp	58℃
	下游引物 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'		



(a) 亲代细胞系 (×100) (b) 肿瘤细胞球培养至第7天 (×200) (c) 血清诱导细胞球第3天的生长情况

图 1 结直肠肿瘤细胞球的形成与血清诱导

Figure 1 Colorectal tumor spheres generated in SFM and induced by SSM

3.2 结直肠肿瘤细胞球的自我更新和传代

增殖形成规则的肿瘤细胞球,生长至第 7~9 天各肿瘤细胞球折光度变差,细胞球开始贴住琼脂糖开始生长,失去悬浮球体的形态。此时球体大小稳定,加入细胞离散剂 Accutase 将肿瘤细胞球打散后,按 1:2~3 的比例传代,无血清培养数天后仍可以形成与亲代肿瘤细胞球形态相同的细胞球。

3.3 结直肠肿瘤细胞球的诱导分化情况

将 5 种肿瘤细胞球接种于 SSM 中诱导分化,24 h 后开始有肿瘤细胞球贴壁生长,形成细胞重叠叠生长的贴壁圆形“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 消化后可以吹打成细胞悬液,可稳定的在 SSM 中传代培养。并且诱导分化后的细胞接种于 SFM 后,可以重新形成肿瘤细胞球,其生长特性和形态与各自来源的 5 种结直肠癌亲代细胞相同,这表明本研究采用的培养方法的确使 5 种结直肠癌细胞都形成了肿瘤细胞球。(见图 1(c))

3.4 结直肠肿瘤细胞球体内间质化标志物的表达

用免疫荧光技术检测 5 种肿瘤细胞球中间质化标志物,发现在倒置荧光显微镜下观察所有的肿瘤细胞球都有 N-cadherin(绿色荧光)和 Vimentin(红色荧光)的表达。相比较于单纯细胞,RT-PCR 检测得到在 mRNA 水平 N-cadherin 和 Vimentin 表达上调($P<0.05$),这些说明细胞球发生了 EMT (见图 2、图 3)。

4 讨论

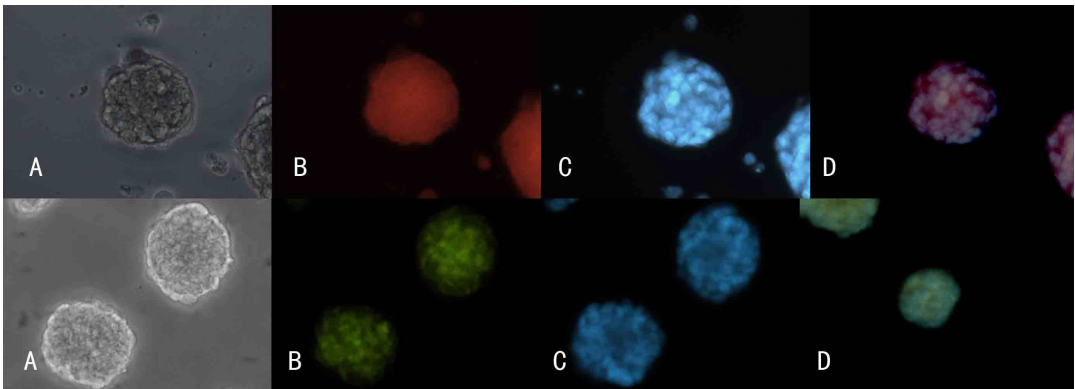
无血清悬浮培养法最早被应用于干细胞培养,干/祖细胞可以在无血清培养下悬浮生长,而分化细胞则会死亡^[3]。由于肿瘤干细胞学说^[4]的提出,无血清悬浮培养方法被引入到肿瘤领域的研究,目前包括乳腺癌^[5]、神经胶质瘤^[6]、前列腺癌^[7]及结直肠癌^[8]等中都通过无血清悬浮培养得到了肿瘤细胞球。但是,各肿瘤细胞系中无血清培养基成分配制和培养方法并不相同^[9,10],并且例如在结直肠癌细胞系中,有的学者^[11]认为只有 HT29 能形成肿瘤细胞球,而 SW480、

SW620 及 HCT15 却不能。因此,本研究旨在通过对结直肠癌细胞系无血清培养方案的探索,以得到稳定形成结直肠癌肿瘤细胞球的方法,并使其不断自我更新和传代,在数量上大量扩增,为进一步研究肿瘤细胞球的生物学特性奠定基础。

无血清悬浮培养的根本目的是使肿瘤细胞球稳定增殖传代,并使其保持干性,阻止其分化^[12]。本研究采用的无血清培养基包括基础培养基 DMEM/F12,及细胞生长因子 R-Spondin 1、Noggin 和 EGF。R-Spondin 1 也被称作 Cristin 3 是一种 27 kDa 的分泌蛋白,通过激活 Wnt/ β -catenin 调控细胞增殖。Noggin 是一种 46kDa 二硫化物同型二聚体,其主要通过结合于 TGF- β 家族而抑制它们与信号分子的结合,发挥与 EGF 相同的抑制细胞分化作用。采用这种无血清培养基对常见的 5 种结直肠癌细胞系 SW480、SW620、LOVO、HT29 和 HCT116 进行无血清悬浮培养,均得到了结合紧密的肿瘤细胞球,并且可以稳定传代培养。但由于各个细胞株生物学特性不同,其在形成细胞球过程中,肿瘤细胞球生成的时间、数目及大小均存在差异。

SFM 不宜配制过久,否则会不利于肿瘤细胞球的形成和生长,其原因可能是由于 PH 值的改变及细胞因子的失活。普通培养瓶中的生长的肿瘤细胞球有的形状极不规则,并且在 7~8 天后,如不及时传代很容易贴壁分化。但在铺有 1% Agarose 培养板中生长,由于 1% Agarose 可以模拟低黏附着底面,其中生长的肿瘤细胞球比在普通培养瓶中生长的形状更规则,发生贴壁的现象时间延迟。当在铺有 1% Agarose 的孔板中培养到 10~12 天,肿瘤细胞球体积不会再增大,细胞球的光泽度会明显下降,故此时细胞球仍需用 Accutase 传代培养。

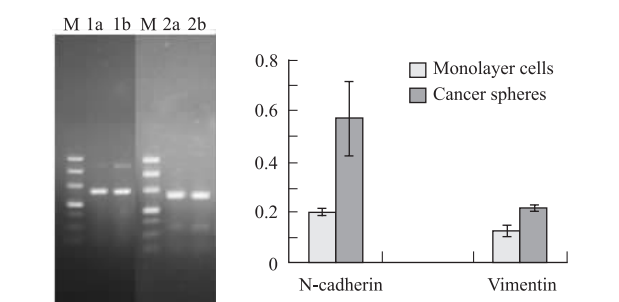
上皮-间质转化(Epithelial-Mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞在特定的因素作用下,失去细胞极性 & 细胞间的紧密连接和黏附连接,而获得了浸润性和游走迁移能力,变成具备间质细胞形态和特性的细胞,这一过程在肿瘤发生侵袭转移中具有重要作用。N-cadherin 及 Vimentin 是 EMT 中重要的蛋白分子,间质化标志物高表达说明细胞呈间质化状态,具有极强的侵袭转移能力^[13]。肿瘤细胞球是由一



A. 可见光下肿瘤细胞球形态 B.红色/绿色荧光下肿瘤细胞球中Vimentin和N-cadherin的表达
C.蓝色荧光激发下肿瘤细胞球胞核DAPI染色 D.荧光合并后的肿瘤细胞球图像

图2 间质化标志物 N-cadherin 和 Vimentin 的表达

Figure 2 The expression of Epithelial-mesenchymal maker N-cadherin and Vimentin in the cell spheres



(* P < 0. 05) M. (Marker DL 500) ; 1. N-cadherin ; 2. Vimentin ; a. 亲代细胞 ; b. 肿瘤细胞球

图 3 单层细胞及肿瘤细胞球中 N-cadherin 和 Vimentin mRNA 表达情况

Figure 3 N-cadherin and Vimentin mRNA expression of monolayer cells and cancer spheres

群干细胞和祖细胞“异质性细胞团块”，其应该不表达或低表达分化细胞的标志物^[10]，我们通过对结直肠癌肿瘤细胞球中 N - cadherin 及 Vimentin 的表达情况研究发现^[12]，发现结直肠癌肿瘤细胞球中高表达这两个间质化标志物，这说明细胞球可能通过上皮 - 间质转化而获得更强的转移能力。

综上所述，本研究采用添加细胞生长因子 R-Spondin 1、Noggin 和 EGF 的无血清培养基和 1% Agarose 铺盖的培养底面，并且利用细胞离散剂 Accutase 代替胰酶传代，成功得到可以稳定传代培养的 5 种结直肠癌肿瘤细胞球，从而为体外研究结直肠癌肿瘤细胞球提供良好的模型。上皮 - 间质转化是肿瘤细胞发生侵袭转移的重要机制，而本研究检测到结直肠癌肿瘤细胞球中间质化标记物高表达，这将为探索肿瘤易发生侵袭转移的可能机制提供一条新思路。

参考文献

[1] 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.

[2] RICCI-VITIANI L, LOMBARDI D G, PILOZZI E, et al. Identification

and expansion of human colon-cancer-initiating cells. [J] Nature, 2007, 445 (7 123) : 111-115.

[3] LINHENG L, WILLIAM B N. Normal Stem Cells and Cancer Stem Cells; The Niche Matters[J]. Cancer, 2006, 66 (9) : 553-557.

[4] REYA T, MORRISON S J, CLARKE M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414 (6 859) : 105-111.

[5] MARCATO P, DEAN C A, PAN D, et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis [J]. STEM CELLS, 2011, 29 (1) : 32-35.

[6] PALLINI R, RICCI-ITIANI L, MONTANO N, et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis[J]. Cancer, 2011, 117 (1) : 162-174.

[7] COLLINS A T, BERRY PA, HYDE C, et al Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. Cancer, 2005, 65 (23) : 10 946-10 951.

[8] KAWAMOTO, HIRONOBUI, YUASA, TAKESHI, et al. Characteristics of CD133 + human colon cancer SW620 cells[J]. Cell Transplantation, 2010, 19 (6-7) : 857-864.

[9] WEISWALD L B, RICHON S, et al. Newly characterized ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness[J]. British Journal of Cancer, 2009, 101 (3) : 473-482.

[10] DALERBA P, CHO R W, CLARKE M F, et al. Cancer stem cells: models and concepts [J]. Annual Review of Medicine, 2007, 58 : 267-284.

[11] HWANG W L, CHIOU S H, TSAI M L, et al. Isolation and characterization of cancer stem-like cells from colorectal carcinoma[J]. Cancer, 2008, 32 (9) : 67-85.

[12] YOSBIDA S, SBIMMURA S, SBIMAZAKI J, et al. Serum-Free Spheroid Cultrure of Mouse Corneal Keratocytes [J]. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2005, 46 (5) : 1 653-1 661.

[13] 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.