

卵巢癌干细胞的分离、鉴定及初步生物学功能研究^{*}

刘春生¹, 浦 春¹, 曹明刚², 张 鹏¹ (1. 皖南医学院弋矶山医院检验科, 安徽芜湖 241001; 2. 安徽中医药高等专科学校, 安徽芜湖 241003)

【摘要】 目的 从人卵巢上皮细胞癌建系的 SKOV3 细胞中分离出 CD133CD117 表型卵巢癌干细胞, 探讨其相关生物学特性。**方法** 利用免疫磁珠技术分选出 CD133CD117 癌细胞, 继而进行平皿、软琼脂克隆形成试验, 无血清培养试验和致瘤试验探讨其初步功能; 采用反转录聚合酶链反应检测癌细胞 Wnt-2 基因表达水平。**结果** 表型 CD133CD117 癌细胞在平皿、软琼脂和无血清培养基中克隆形成能力明显强于 CD133⁻CD117⁻ 癌细胞; 同时表现出较强致瘤性; Wnt-2 基因在不同表型癌细胞中存在差异表达。**结论** 卵巢癌细胞中存在干细胞样癌细胞, 利用磁珠分选得到的 CD133CD117 癌细胞具有干细胞的相关特性, 为卵巢癌干细胞生物学特性的研究及靶向治疗提供依据。

【关键词】 卵巢癌干细胞; 免疫磁珠分选; Wnt-2 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)02-0166-03

Study on separation, identification and preliminary biological function of ovarian cancer stem cells^{*} LIU Chun-sheng¹, PU Chun¹, CAO Ming-gang², ZHANG Peng¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Yijishan Hospital, Wannan Medical University, Wuhu, Anhui 241001, China; 2. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Wuhu, Anhui 241003, China)

【Abstract】 Objective To isolate the CD133CD117 phenotype ovarian cancer stem cells from the SKOV3 cell line of human ovarian carcinoma, and to investigate its related biological function. **Methods** The CD133CD117 cancer cells were sorted through MACS technology, then the plates, soft agar colony formation assays, serum-free culture and tumorigenicity test were carried out to investigate its preliminary function; RT-PCR was used to detect cancer cell Wnt-2 gene expression. **Results** The cloning formation capability of CD133CD117 cancer cells in petri dishes, soft agar and serum-free medium was stronger than that in CD133⁻CD117⁻ cancer cells; meanwhile showing stronger tumorigenicity; the expression levels of Wnt-2 gene were different among different phenotypes of cancer cells. **Conclusion** Stem cell-like cancer cells exist in ovarian cancer cells, sorted CD133CD117 cancer cells from ovarian cancer cells by MACS have the properties of stem cells, which provides the scientific basis for the study of biological characteristics and targeted therapy of ovarian cancer stem cells.

【Key words】 ovarian cancer stem cells; magnetic activated cell sorting; Wnt-2

卵巢癌在妇科生殖系统恶性肿瘤中发病率、复发率高, 5 年生存率仅 15%~25%, 其病死率在妇科恶性肿瘤中占据首位。近年来, 癌干细胞(CSC)学说的提出, 引起了研究者的关注。学者认为手术、放疗及化疗等手段不能彻底地清除肿瘤细胞, 是由于肿瘤细胞中存在极少的 CSC, 这类特殊细胞具有自我更新、分化、转移、耐药的干细胞生物学活性^[1-2]。而卵巢癌干细胞(OCSCs)的存在可能是造成卵巢癌高复发率、病死率的重要原因, 但目前卵巢癌特有的标记物并没有得到证实。因此 OCSCs 分离鉴定及功能探讨是研究卵巢癌发生机制、耐药性及抗肿瘤药物开发的前提。本实验拟对卵巢癌细胞表面相关抗原 CD133CD117 进行筛选, 通过克隆集落形成试验、致瘤试验、癌细胞 Wnt-2 基因表达对其生物学功能及基因表达水平进行初步探讨^[3-4]。为今后 OCSCs 分离、鉴定、耐药性及靶向治疗等研究提供理论和实验依据, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 4~6 周 Balb/c 小鼠 16 只, 购于扬州大学动物实验中心。人卵巢癌细胞株 SKOV3 由东南大学微生物免

疫学实验室提供。反转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自上海生工公司, CD133、CD117 抗体购于美国 eBioscience 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫磁珠法 选取对数生长期单层细胞制成单细胞悬液后活细胞计数; 用 Buffer 缓冲液进行重悬, 镜下计数收集 10^7 个细胞, 离心后 200 μ L 缓冲液重悬, 按抗体、细胞悬液一定比例混匀, 冰上孵育 30 min, 加入缓冲液充分洗涤离心 2 次, 细胞沉淀用 500 μ L 缓冲液重悬, 磁珠分选获取 CD133CD117 和 CD133⁻CD117⁻ 细胞。

1.2.2 平皿克隆形成试验 将分选的细胞悬液按每皿 100 个细胞接种于培养皿中。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 环境下培养, 当培养皿中出现肉眼可见的细胞克隆后终止培养, 甲醇固定后染色计数, 用肉眼直接计数克隆数, 或显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 $\times$ 100%。

1.2.3 软琼脂克隆形成试验 24 孔培养板中每孔分别浇入含 0.5% 低熔点琼脂的底层琼脂 0.8 mL 及含 0.3% 琼脂和一

^{*} 基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学基金资助项目(KJ2013B323); 皖南医学院中青年基金资助项目(WF2012F27)。

作者简介: 刘春生, 男, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为肿瘤免疫学和临床检验。

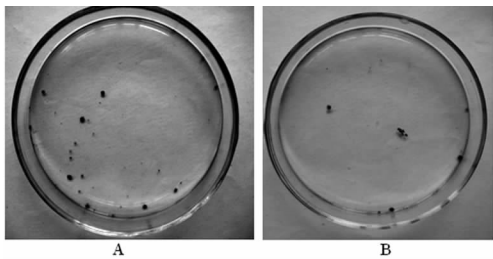
定细胞密度的上层琼脂 0.8 mL,置于室温使琼脂凝固。在 37℃、5%CO₂ 培养。镜下计数含 50 个细胞以上的克隆,并计算克隆形成率。

1.2.4 致瘤试验 1×10⁴/100 μL CD133CD117 和 1×10⁵/100 μL 的 CD133⁺CD117⁺ 细胞,皮下注射随机分组(1、2 组注射 CD133CD117,3、4 组注射 CD133⁺CD117⁺)的 4~6 周龄 Balb/c 小鼠。观察各组小鼠肿瘤生长情况,肿块体积。

1.2.5 RT-PCR 检测癌细胞 Wnt-2 基因表达 参照 Gen Bank 登录的小鼠的 Wnt-2 基因碱基序列,应用 Primer Premier 5.0 软件,于基因不同外显子上设计正反引物(5'-TGG ACA GCT GCG AAG TTA T-3',5'-AAC AAC CCA GAG GTC CAG T-3')。按设定反应体系进行 Wnt-2 的 RT-PCR,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参对照。

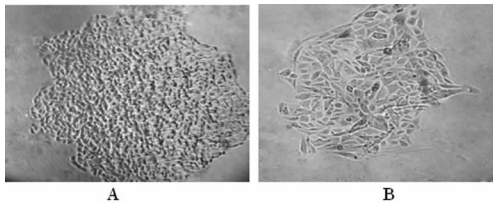
2 结 果

2.1 平皿克隆形成试验 CD133CD117 细胞克隆形成率为 16/100(16%),CD133⁺CD117⁺ 细胞克隆形成率为 5/100(5%)。见图 1。



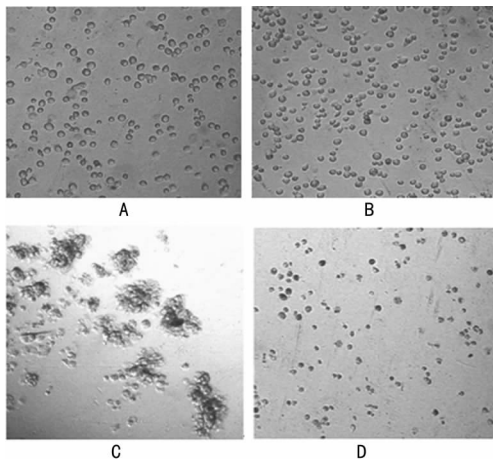
注:A 为 CD133CD117 细胞;B 为 CD133⁺CD117⁺ 细胞。

图 1 平皿克隆形成试验



注:A 为 CD133CD117 细胞克隆;B 为 CD133⁺CD117⁺ 细胞克隆。

图 2 软琼脂克隆形成试验



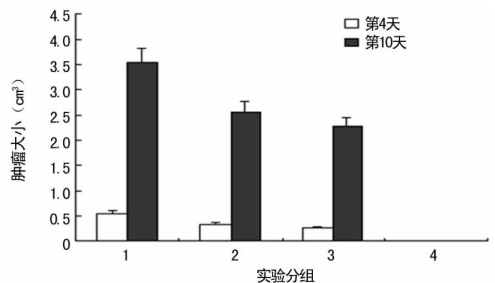
注:A、B 分别为 CD133CD117 和 CD133⁺CD117⁺ 细胞在无血清培养基中第 1 天;C、D 分别为 CD133CD117 和 CD133⁺CD117⁺ 细胞在无血清培养基中第 7 天。

图 3 CD133CD117 和 CD133⁺CD117⁺ 细胞
分别在无血清培养基中生长状态

2.2 软琼脂克隆形成试验 CD133CD117 细胞克隆多呈现层叠、集中的球形,而 CD133⁺CD117⁺ 细胞克隆形态扁平,多数呈梭形,且排列松散。CD133CD117 细胞克隆形成率明显高于 CD133⁺CD117⁺。见图 2。

2.3 无血清培养试验 CD133CD117 细胞在含生长因子的无血清培养基中悬浮、存活、增殖,形成漂浮的细胞球;而 CD133⁺CD117⁺ 细胞在第 7 天后出现凋亡,不能在无血清培养基中存活和增殖。见图 3。

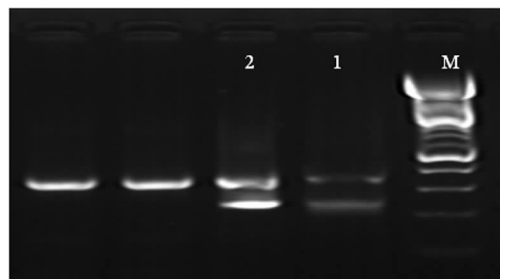
2.4 致瘤性比较 肿瘤长出后第 4、10 天,注射 CD133CD117 的小鼠肿瘤体积明显大于注射 CD133⁺CD117⁺ 的肿瘤体积。见图 4。



注:1、2 组分别为注射 CD133CD117 细胞 3×10⁵、1×10⁵ 个;3、4 组分别为注射 CD133⁺CD117⁺ 细胞 3×10⁵、1×10⁵ 个。

图 4 CD133CD117 和 CD133⁺CD117⁺ 细胞
小鼠肿瘤体积大小比较

2.5 RT-PCR 扩增 Wnt-2 检测结果 见图 5。CD133CD117 及 CD133⁺CD117⁺ 细胞中均存在 Wnt-2 基因的表达,在相同细胞数量及实验条件下,2 泳道(CD133CD117 细胞区带)较 1 泳道(CD133⁺CD117⁺ 细胞区带)明亮。



注:1 为 CD133⁺CD117⁺ 细胞泳道;2 为 CD133CD117 细胞泳道;M 为 DNA 相对分子质量标准。

图 5 CD133CD117 和 CD133⁺CD117⁺ 细胞 Wnt-2 基因表达

3 讨 论

卵巢癌属于高发病率的妇科肿瘤,目前的主要治疗手段是通过手术切除、药物,但以上治疗方法并不能有效控制肿瘤细胞扩散,因此预后差,复发率较高。而 CSC 理论的提出,拓宽了卵巢癌研究的视野,为研究卵巢癌发生机制及干细胞靶向治疗提供了新的思路和靶标^[1]。

由于 CSC 存在,可能是造成肿瘤生长、蔓延的主要原因^[5-7]。随着白血病、脑癌、乳腺癌等 CSC 不断深入地研究,结果证实不同的肿瘤所特有的 CSC 标志物也不尽相同。而如何有效地针对不同肿瘤找出其特定的 CSC 标志物,将是 CSC 靶向治疗及抗耐药药物研究的基础^[8-10]。

CD133 是细胞表面结合胆固醇的糖蛋白,高表达于肿瘤细胞中,且具有单细胞形成克隆的能力,是目前研究最广泛的 CSC 标记物。在 2009 年有研究就证实 CD133⁺ 卵巢癌细胞较 CD133⁺ 细胞具有更强的成瘤能力,且 CD133⁺ 细胞的抗药性

明显高于 CD133⁺ 细胞。而在 2011 年, Silva 等^[11] 利用联合标志物 CD133 与 ALDH⁺ 进行卵巢癌干细胞功能研究, 其结果表明 CD133 与 ALDH⁺ 癌细胞较 ALDH⁻ 细胞致瘤明显。CD117 是近年来被研究的另一种标记物^[12], 其存在于多种肿瘤蛋白中, 属一类跨膜的酪氨酸激酶受体。陈峻崧等^[13] 以 CD44、CD117 等标记作为靶点对卵巢癌进行抗药性研究, 为 OCSCs 的耐药性及相关生物学功能的研究提供了可靠的依据。

目前 CSC 表面标志物的分离方法包括包括荧光激活细胞分类法和免疫磁珠细胞分选法。本实验通过免疫磁珠技术从卵巢上皮癌细胞 SKOV3 株中分离出 CD133CD117 细胞, 继而进行克隆集落形成试验, 比较 CD133CD117 细胞和 CD133⁻CD117⁻ 细胞在平皿、软琼脂及无血清培养基中克隆形成能力, 结果显示 CD133CD117 细胞克隆形成能力明显强于 CD133⁻CD117⁻ 细胞, 具有干细胞基本的生物学活性。同时作者比较了 2 种细胞在小鼠中的致瘤性, 结果存在差异。这提示 OCSCs 的一些特性不仅与 CD133CD117 相关, 可能有其他的表面标记分子参与, 需要进一步对其研究。

Wnt/ β -catenin 信号通路不仅能活化增殖和抑制凋亡, 也可以维持 CSC 的自我更新, 增强 CSC 的抗药性, 是典型的癌细胞标记^[14]。本研究利用 RT-PCR 检测结果发现, CD133CD117 和 CD133⁻CD117⁻ 细胞均有 Wnt-2 基因的表达, 说明 Wnt 信号通路可能在 OCSCs 的生长、转移、耐药机制中发挥重要作用, 同时发现 Wnt-2 基因在 CD133CD117 细胞中的表达略高于 CD133⁻CD117⁻ 细胞, 但由于未进一步做荧光实时定量 PCR, 缺乏有效、可靠的定量数据进行比较。

如何进一步分离和鉴定相关表型干细胞样卵巢癌细胞, 将对 OCSCs 抗药性^[15]、抗放射性^[16]、信号传导通路分子的调控^[17-18] 及靶向治疗^[19-21] 等深入研究奠定基础。可见, 本研究通过免疫磁珠技术筛选的 CD133CD117 表型 OCSCs 具有干细胞基本生物学特性, 为今后进一步深入研究卵巢癌提供了科学依据和基础数据。

参考文献

- [1] 唐权, 窦骏, 顾宁. 癌干细胞研究进展[J]. 东南大学学报: 医学版, 2005, 24(4): 196-198.
- [2] Phillips A, McBride WH, Pajonk B, et al. The response of CD24⁻/low/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation[J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(24): 1755-1757.
- [3] Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007, 6(1): 92-97.
- [4] Florek M, Haase M, Marzesco AM, et al. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer[J]. Cell Tissue Res, 2005, 319(1): 15-26.
- [5] Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma[J]. Mol Cancer, 2006, 5(2): 67-73.
- [6] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of

human brain tumour initiating cells[J]. Nature, 2004, 432(7015): 396-401.

- [7] Hilbe W, Dirnhofer S, Gnett H, et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(9): 965-969.
- [8] Singh SK, Clarke ID, Hide T, et al. Cancer stem cells in nervous system tumors[J]. Oncogene, 2004, 23(43): 7267-7273.
- [9] Casagrande F, Cocco E, Bellone S, et al. Eradication of chemotherapy-resistant CD44⁺ human ovarian cancer stem cells in mice by intraperitoneal administration of clostridium perfringens enterotoxin[J]. Cancer, 2011, 117(24): 5519-5528.
- [10] Luo L, Zeng J, Yang K, et al. Ovarian cancer cells with the CD117 phenotype are highly tumorigenic and are related to chemotherapy outcome[J]. Exp Mol Patho, 2011, 91(2): 596-602.
- [11] Silva IA, Bai S, Yang K, et al. Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival[J]. Cancer Res, 2011, 71(11): 3991-4001.
- [12] 孙可慧, 李连宏. 卵巢癌肿瘤干细胞标记物及其靶向治疗[J]. 大连医科大学学报, 2013, 35(5): 486-489.
- [13] 陈峻崧, 杨洁, 邵家胜, 等. 卵巢癌干细胞对 5 种化疗药物的耐药性及其机制[J]. 遵义医学院学报, 2014, 37(3): 329-334.
- [14] Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer[J]. Nature, 2005, 434(7035): 843-850.
- [15] Eisele L, Klein-Hitpass L, Chatzimanolis N, et al. Differential expression of drug-resistance-related genes between sensitive and resistant blasts in acute myeloid leukemia[J]. Acta Haematologica, 2007, 117(1): 8-15.
- [16] Hambardzumyan D, Squatrito M, Holland EC. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors[J]. Cancer Cell, 2007, 11(1): 97-105.
- [17] Woodward WA, Chen MS, Behbod F, et al. WNT/ β -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells[J]. PNAS, 2007, 104(17): 618-623.
- [18] Shaw A, Bushman W. Hedgehog signaling in the prostate[J]. J Urol, 2007, 177(3): 832-838.
- [19] Pan CX, Zhu W, Cheng L. Implications of cancer stem cells in the treatment of cancer[J]. Future Oncol, 2006, 2(6): 723-731.
- [20] Al-Hajj M. Cancer stem cells and oncology therapeutics[J]. Curr Opin Oncol, 2007, 19(1): 61-64.
- [21] Williams DA, Cencelas JA. Leukaemia: niche retreats for stem cells[J]. Nature, 2006, 444(7121): 827-828.

(收稿日期: 2015-03-08 修回日期: 2015-08-12)