

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 23. 012

肺癌细胞株侧群细胞的分选及干细胞特性的鉴定

度 蔚,陈昭颖[△]

(武汉市精神卫生中心检验科 430012)

摘 要:**目的** 探讨分选肺癌细胞株侧群细胞(SP 细胞)及鉴定干细胞特性。**方法** 选择肺癌细胞株 SK-MES-1 和 NCI-H460,通过流式细胞仪对 SP 与非 SP(NSP)细胞进行分选,然后进行培养并且传代,选择的培养基分别为正常情况及干细胞培养基当中,对细胞分化能力与表型进行观察;通过电镜对细胞进行观察,了解其超微结构;利用免疫荧光对干细胞标志物 CD44 的表达进行检测;利用 CCK-8 法对细胞增殖能力进行检测,采用平板克隆、裸鼠成瘤实验及 Transwell 侵袭实验对细胞进行了解,明确其恶性程度。**结果** 初次分选 NCI-H460 和 SK-MES-1 细胞株 NSP 和 SP 细胞百分比,以及再纯化 NSP 和 SP 细胞百分比的比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。在干细胞培养基中,NSP 和 SP 细胞都无法形成干细胞球,但具有较快的增殖速度。NSP 细胞表现出的是接触抑制的单层生长,SP 细胞表现出的是集落生长。当培养到第 5 代时,SP 细胞与 NSP 细胞分别表现出的是不显著的变化及混杂表型。电镜下 SP 细胞核质比较高,NSP 细胞核质比低。NCI-H460 和 SK-MES-1 细胞株 SP 细胞能够对 CD44 高表达,组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。对比 NCI-H460 和 SK-MES-1 细胞株 SP 细胞与 NSP 细胞的细胞增殖活力,在第 2、5 和 7 天时的数据情况,前者明显比后者高,差异有统计学意义($P<0.05$)。NCI-H460 和 SK-MES-1 细胞株 SP 细胞克隆形成率和平均克隆数明显比 NSP 细胞高;在侵袭过膜方面,平均细胞数有所提高,成瘤裸鼠的数量也有所增加,差异均有统计学意义($P<0.05$),都没有转移灶,瘤体 HE 与免疫组织化学染色都得到了证实,均属于典型肺癌细胞。**结论** 肺癌细胞株 SP 细胞具有干细胞特性,在肿瘤的侵袭、增殖及分化等方面都有参与。

关键词:肺癌细胞; 侧群细胞; 肿瘤干细胞

中图分类号:R447

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)23-3521-04

Identifying of characteristics of side population and sorting of stem cell in Lung cancer cell lines

DU Wei, CHEN Zhaoying[△]

(Department of Clinical Laboratory, Mental Health Center of Wuhan, Wuhan, Hubei 430012, China)

Abstract:**Objective** To study the side population (SP) cells sorting and stem cell characteristics identifying in lung cancer cell lines. **Methods** Lung cancer cell lines SK-MES-1 and NCI-H460 were selected, SP cells and non-SP (NSP) cells were sorted with flow cytometer. Cell phenotype and differentiation after they were cultured in normal and stem cell media were observed. Cell ultrastructure was observed with electron microscopy. Expression of stem cell marker CD44 was detected with immunofluorescence. Cell proliferation was measured with CCK-8 method. Cell malignant degrees with plate cloning, Transwell invasion test, tumor formation in nude mice were conducted. **Results** The percentages of SP and NSP cells in SK-MES-1 and NCI-H460 lines first sortation and re-purification had no statistical differences ($P>0.05$). The SP and NSP cells in SK-MES-1 and NCI-H460 lines in stem cell medium could not form stem cell spheres, while proliferation rate had accelerated. SP cells were agglomeration growth, and NSP were single layer growth with contact inhibition. SP cells still had no obvious phenotypic changes to the fifth generation, but NSP cells preformed hybrid phenotype. SP cells were higher nuclear cytoplasmic ratio than NSP under electron microscopy. Expression of SP cells CD44 in NCI-H460 lines was higher than that of SK-MES-1, but difference was not statistical significance ($P>0.05$). The proliferation activity values of second, fifth and seventh day in SP cells in SK-MES-1 and NCI-H460 lines were all significantly more than NSP cells ($P<0.05$). What's more, the average number of clones and rate of colony formation, average number of cells invading the membrane, number of tumor formation in nude mice with SP cells were all significantly higher ($P<0.05$). While there were no metastases in the tumor formation, typical lung cancer cells were identified with tumor HE and immunohistochemical staining. **Conclusion** SP cells could perform stem cell characteristics in lung cancer cell lines, which involved in the processes of tumor proliferation, differentiation, invasion and tumorigenesis.

Key words:lung cancer cell; side population; cancer stem cell

肺癌的发病率和病死率居我国恶性肿瘤首位,有 80% 的患者为非小细胞肺癌(NSCLC),在诊断时,70% 的 NSCLC 患者都已经达到晚期,5 年生存率较低^[1]。肺癌的复发和转移成为患者长期生存的重要因素^[2]。有研究显示,在肿瘤的发生、发展过程中,肿瘤干细胞(CSC)具有非常重要的作用。此种细胞是指具有多向分化潜能、无限自我更新的干细胞生物学特性的一种细胞群体^[3]。侧群细胞(SP 细胞)是在流式细胞实验中发现的一组细胞亚群,含有丰富的造血重建细胞,存在较为明显的干细胞特性^[4]。研究发现,大部分肿瘤 SP 细胞中可能含有大量的肿瘤起始细胞,在实验过程不仅在体外表现出显著的增殖活力,而且在体内异种移植瘤实验中也表现出较强的成瘤能力,比非 SP 细胞(NSP 细胞)明显较强^[5]。针对此种情况,本研究旨在对分选肺癌细胞株 SP 及鉴定其干细胞特性进行分析,从而更好实施肺癌的预后评估以及靶向治疗。

1 材料与方法

1.1 材料来源 肺癌细胞株 NCI-H460 和 SK-MES-1 购买自中国科学院细胞库,在常规复苏结束之后通过 RPMI 1640 培养基进行培养,其中还包括了链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$ 、青霉素 100 U/mL 和 10% 的胎牛血清。然后将培养基放置在 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 饱和湿度为 5% 的培养箱中进行培养,定期更换培养液,进行传代培养。选择从上海生工动物实验中心购买的 18 只 BALB/C 裸小鼠进行裸鼠成瘤实验,小鼠均为雌性,且均为 4 周龄大小,正常的方式进行饲养,适应 1 周。

1.2 方法 通过流式细胞仪对 SP 与非 SP 细胞进行分选,然后进行培养并且传代,选择的培养基分别为正常情况及干细胞培养基。对细胞分化能力与表型进行观察;通过电镜对细胞进行观察,了解其超微结构;利用免疫荧光对干细胞标志物 CD44 的表达进行检测;利用 CCK-8 法对细胞增殖能力进行检测,平板克隆、裸鼠成瘤实验及 Transwell 侵袭实验对细胞进行了解,明确其恶性程度。

1.2.1 流式细胞仪分选 SP 细胞 选择对数生长期细胞,然后采取胰酶消化并进行离心操作,选择含 2% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬,制备浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 单细胞悬液。加入 Hoechst 5 $\mu\text{g/mL}$ 和维拉帕米 50 $\mu\text{mol/L}$,采取水浴孵育的方式,温度设定为 37 $^{\circ}\text{C}$,时长为 60 min;当染色完成后马上放置在冰上,然后停止染色操作,进行离心,并且充分的洗涤与重悬后,将 1 $\mu\text{g/mL}$ 的碘化丙啶加入其中,放置 30 min;选择美国 BD 公司生产的流式细胞仪进行分选,按照加维拉帕米组的流式,即“门”的图形来设定未加维拉帕米组流式图形的 SP 区域。

1.2.2 观察细胞表型和分化能力 对干细胞培养基进行配置:DMEM/F12(1:1)培养基+表皮细胞生长因子(20 $\mu\text{g/L}$) + 重组(人)碱性成纤维细胞生长因子

(20 $\mu\text{g/L}$) + B27(2%),培养基选择 RPMI 1640 培养液,其中加入 10% 胎牛血清,重悬细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$;选择直径为 6 cm 的培养皿,定期更换培养液,进行传代培养。培养 3 d 之后,通过倒置显微镜对细胞形态进行观察并拍照,然后重复 3 次实验。进行连续培养直到第 5 代,然后对 SP 细胞的分化能力与比例进行检测。

1.2.3 电镜观察超微结构 单细胞悬液的标准为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,然后进行离心运动,转速为 1 000 r/min,时长为 5 min,然后进行洗涤,结束之后继续进行离心操作;通过乙醇进行固定,然后进行离心操作等一系列过程中,最终进行充分的洗涤;进行离心操作,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下,在 1% 四氧化锇的环境中固定 2 h;首先进行脱水操作,然后利用 618 号树脂进行包埋处理,再者通过 Reicher 超薄切片机进行切片,最后利用 Philips CM120 透射电镜进行观察。

1.2.4 免疫荧光检测 CD44 的表达 选择标准为 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞,然后接种在培养皿中进行细胞爬片,培养 3 d 后通过免疫荧光进行检测;首先进行洗涤处理,然后放置在 4% 多聚甲醛进行固定,时长为 30 min,然后继续洗涤,然后加入 10% 封闭液放置在室温环境中 30 min;通过滴加的方式加入美国 Sigma 公司生产的鼠抗人单克隆一抗,标准为 1:2 000,放入到 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中进行孵育,时长为 2 h,然后放入到 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中过夜;通过滴加的方式加入美国 Sigma 公司生产的羊抗鼠多克隆抗体 IgG 二抗,标准为 1:2 000,放入到 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中进行孵育,时长为 45 min,采取闭环处理;选择的标准为 10 $\mu\text{g/mL}$ DAPI,放入到 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中进行孵育,时长为 10 min,然后进行洗涤处理,烘干操作;最后盖上玻璃片进行封片处理,通过荧光显微镜进行观察并且拍照。

1.2.5 细胞增殖能力和恶性程度 CCK-8 法:选择具有 96 个孔的孔板进行接种,每孔接种的细胞数量标准为 $1 \times 10^4/\text{mL}$,接种结束后通过 CCK-8 试剂分别对第 2、5 和 7 天的情况进行检测,通过光吸收度值(AV 值)来衡量活细胞的增殖速度。每个组中设置有重复孔,具体数量为 5,重复 3 次实验取得平均值。

平板克隆: $1 \times 10^4/\text{mL}$ 重悬细胞,培养板为 6 孔,选出 100 μL 进行接种,选择的培养液为 RPMI 1640,其中加入了 15% 胎牛血清,培养液的容量为 3 mL,每个组中设置有重复孔,具体数量为 3,然后将培养基放置在 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 饱和湿度为 5% 的培养箱中进行培养,时长为 2 周;结束后,每孔加入的染液标准为 1:10 Giemsa,在室温环境下进行染色,时长为 10 min,对克隆的形成过程进行观察并计数。

Transwell 侵袭实验:创造出人工重组基底膜,对细胞浓度进行调整,具体标准是 $1 \times 10^6/\text{mL}$,把 Transwell 小室的上室浸入到下室培养液当中,上室中加入细胞悬液,容量为 100 μL ,在下室中加入培养液

RPMI 1640,容量为 600 μ L,培养液中还加入了 20% 胎牛血清;小室放置在培养箱中进行孵育,时长为 24 h,然后进行充分的洗涤,利用浓度为 75% 的乙醇进行固定,时长为 10 min,然后 4% 台盼蓝进行染色,时长为 10 min,继续洗涤,然后通过 200 倍光镜对微孔滤膜下室面侵袭的肿瘤细胞数进行计数,每张膜选择上、中、下、左、右 5 个不同的视野,选择平均值。重复 3 次实验。

裸鼠成瘤实验:通过随机数字表法将裸鼠进行分组,共包括 3 组,每组 6 只,每组接种的细胞数量分别为 10^4 、 10^5 和 10^6 个。然后,通过 RPMI 1640 培养液和 Matrigel 混合液(1 : 1)重悬细胞为 5×10^4 /mL、 5×10^5 /mL 和 5×10^6 /mL 3 个浓度。浓度为 10% 的水合氯醛,共 75 μ L 对裸鼠进行麻醉,在腋下皮下进行注射细胞悬液,容量为 200 μ L,8 周后将裸鼠处死,对转移及成瘤的情况进行观察,取出瘤体行 HE 和免疫组织化学染色。

1.3 统计学处理 采用统计软件 SPSS20.0 进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 流式细胞仪分选 SP 细胞 初次分选 NCI-H460 和 SK-MES-1 细胞株 NSP 和 SP 细胞所占百分比,与再纯化细胞株 NSP 和 SP 细胞所占百分比进行比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

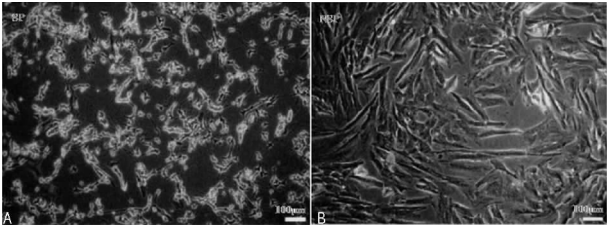
表 1 流式细胞仪分选两种肺癌细胞株中 SP 细胞百分比和再纯化百分比(%, $\bar{x} \pm s$)

细胞株	SP	NSP	SP 再纯化	NSP 再纯化
SK-MES-1	3.55 $\pm$ 0.43	95.84 $\pm$ 0.37	99.35 $\pm$ 0.27	99.18 $\pm$ 0.35
NCI-H460	3.46 $\pm$ 0.38	96.02 $\pm$ 0.35	99.42 $\pm$ 0.25	99.22 $\pm$ 0.36
<i>t</i>	0.102	0.132	0.089	0.121
<i>P</i>	0.867	0.824	0.905	0.864

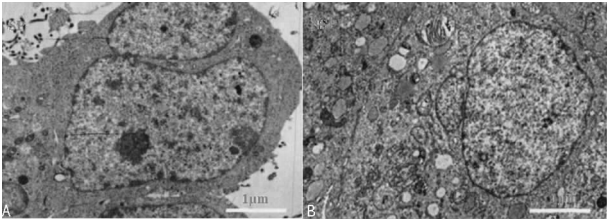
2.2 细胞表型和分化能力 在干细胞培养基中,NSP 和 SP 细胞都无法形成干细胞球,然而增殖速度较快。SP 细胞具有较小的胞体,存在折光性及较长的神经丝样突起,表现集聚生长;NSP 细胞具有较大

的胞体,存在扁平的特征,以及没有神经丝样突起,表现接触抑制的单层生长。当培养到第 5 代时,SP 细胞与 NSP 细胞分别表现出的是不显著的变化及混杂表型。其中,当培养到第 4 代的时候,NSP 细胞表现出的是一致的表型,逐渐表现出分化能力,见图 1。

2.3 电镜观察超微结构 电镜下 SP 细胞具有较大的核体、细胞质较少,即具有较高的核质比;NSP 细胞具有较小的核体、较多的细胞质,具有较低的核质比。从细胞器方面进行比较,SP 细胞质显著少于 NSP 细胞,见图 2。



注:A 为 SP 细胞表型;B 为 NSP 细胞表型
图 1 光镜下观察 SP 和 NSP 的细胞表型($\times 200$)



注:A 为 SP 细胞超微结构;B 为 NSP 细胞的超微结构
图 2 电镜观察 SP 和 NSP 的细胞超微结构($\times 1\,000$)

2.4 免疫荧光检测 CD44 的表达 NCI-H460 和 SK-MES-1 细胞株 SP 细胞能够对 CD44 高表达,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 免疫荧光检测两种肺癌细胞株中 SP 和 NSP 细胞 CD44 的表达(%, $\bar{x} \pm s$)

细胞株	SP	NSP	<i>t</i>	<i>P</i>
SK-MES-1	75.8 $\pm$ 10.5	21.5 $\pm$ 8.7	25.624	0.000
NCI-H460	76.2 $\pm$ 12.2	23.2 $\pm$ 7.6	23.241	0.000
<i>t</i>	0.235	0.213		
<i>P</i>	0.684	0.702		

表 3 两种肺癌细胞株 SP 和 NSP 细胞不同培养时间的细胞增殖能力比较($\bar{x} \pm s$)

细胞株	2 d		5 d		7 d	
	SP	NSP	SP	NSP	SP	NSP
SK-MES-1	0.35 $\pm$ 0.08 [#]	0.12 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.15 ^{#Δ}	0.33 $\pm$ 0.12 Δ	0.92 $\pm$ 0.21 ^{#*}	0.55 $\pm$ 0.14 [*]
NCI-H460	0.33 $\pm$ 0.07 [#]	0.11 $\pm$ 0.03	0.79 $\pm$ 0.16 ^{#Δ}	0.35 $\pm$ 0.13 Δ	0.94 $\pm$ 0.23 ^{#*}	0.54 $\pm$ 0.16 [*]

注:与同细胞株同时间 NSP 细胞比较,[#] $P < 0.05$;与同细胞株同细胞第 2 天比较, ^{Δ} $P < 0.05$;与同细胞株同细胞第 5 天比较,^{*} $P < 0.05$

2.5 细胞增殖能力 对比 NCI-H460 和 SK-MES-1 细胞株 SP 细胞与 NSP 细的 AV 值在第 2、5 和 7 天时的数据情况,前者明显比后者高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

2.6 细胞恶性程度 SK-MES-1 和 NCI-H460 细胞

株 SP 细胞平均克隆数和克隆形成率显著高于 NSP 细胞,侵袭过膜的平均细胞数增加,成瘤裸鼠数目增多,均无转移灶,瘤体 HE 和免疫组化染色证实为典型肺癌细胞,见表 4。

表 4 两种肺癌细胞株 SP 和 NSP 细胞的细胞恶性程度比较

细胞株	克隆数($\bar{x}\pm s$)		克隆形成率(%, $\bar{x}\pm s$)		侵袭细胞数($\bar{x}\pm s$)		成瘤裸鼠数目[n(%)]	
	SP	NSP	SP	NSP	SP	NSP	SP	NSP
SK-MES-1	465±58 [#]	48±15	56.7±15.4 [#]	10.2±3.4	76.5±15.6 [#]	35.4±10.2	14(77.8) [#]	0(0.0)
NCI-H460	472±67 [#]	53±17	58.3±16.7 [#]	13.3±3.5	78.3±17.5 [#]	33.5±11.3	15(8.3) [#]	0(0.0)

注:与 NSP 细胞比较,[#]*P*<0.05

3 讨 论

实验表明,大部分肿瘤细胞系和肺癌组织都具有 SP 细胞,且存在类干细胞特性^[6]。然而对于肺癌 SP 细胞而言,在生物学特性方面至今都没有给予肯定。本研究表明,经过初次分选之后,所得两种不同的肺癌细胞株 SP 达到 3.5%,再纯化之后具有较高的百分比,传代培养细胞具有良好的生长状况。在干细胞培养基中,NSP 和 SP 细胞都无法形成干细胞球,但具有更快的增殖速度;SP 细胞表现出的是集聚生长,NSP 细胞表现出接触抑制的单层生长;在传代培养过程中,SP 细胞变化表现不显著,当培养到第 5 代时,NSP 细胞表现出混杂表型,以及一定的分化潜能;通过电镜进行观察,从细胞核质方面进行分析,SP 细胞较高,而 NSP 较低。这些都反映出 SP 细胞具有肿瘤的分化与增殖能力^[7]。从 CSC 学说的角度进行研究,它们一方面启动了肿瘤的生长和形成,另一方面还对肿瘤的复发与转移具有重要的意义,是导致肿瘤异质性一项重要因素^[8]。SP 细胞中富含 CSC,SP 分选技术已成为富集 CSC 十分简单、有效方法。SP 细胞具有高致瘤性、自我更新、多向分化、耐药潜能,这些特性与 CSC 十分相似,已成为研究 CSC 的重要切入点。

通过深入研究得知,SP 细胞能够对 CD44 高表达,从增值能力进行对比发现 SP 细胞明显比 NSP 细胞高,克隆形成率和平均克隆数明显提高。在侵袭过膜方面,平均细胞数有所提高,成瘤裸鼠的数量也有所增加,都没有转移灶,瘤体 HE 与免疫组织化学染色都得到了证实,均属于典型肺癌细胞。需要注意的是肺癌细胞株 SP 细胞具有干细胞特性,在肿瘤的侵袭、增殖及分化等方面都有参与^[9-10]。目前,在多种肿瘤细胞系如 NSCLC、胃癌、肝癌、鼻咽癌、结肠癌、乳腺癌、子宫内膜癌等,和多种肿瘤组织如肝癌、胶质母细胞瘤、平滑肌瘤、骨髓中成功分离得到 SP 细胞。在悬浮肿瘤细胞球的形成能力方面,在无血清培养基中 SP 细胞比 NSP 细胞更强;在 SP 细胞中 ABCG2 和 CD133 的表达强度比 NSP 细胞更强;SP 细胞的耐药存活能力及体外增殖能力比 NSP 以及未分选出的细胞更强;在体外 SP 细胞能够发生分化现象,变成 NSP 细胞,然而 NSP 细胞无法分化成 SP 细胞,在裸鼠体

中 SP 细胞的致瘤性非常强。

综上所述,本研究证实肺癌细胞中的确存在 SP 细胞,并且存在干细胞促瘤特性,为更好地研究肿瘤的靶向治疗及发生机制提供了依据。

参考文献

[1] 姚晓军,刘伦旭.肺癌的流行病学及治疗现状[J].现代肿瘤医学,2014,22(8):1982-1986.

[2] 李艳,郭其森.晚期非小细胞肺癌维持治疗进展[J].中华肿瘤防治杂志,2014,10(21):800-804.

[3] 杨栋,张培彤.肺癌干细胞研究进展[J].中国肿瘤,2015,24(7):574-580.

[4] 郑丹薇,廖珊,朱广超,等.侧群细胞及其在肿瘤干细胞研究中的进展[J].中南大学学报(医学版),2014,39(5):525-531.

[5] 宋倩,徐笑红.侧群细胞及其在肿瘤干细胞研究中的应用[J].肿瘤学杂志,2015,21(11):928-933.

[6] 胡均,岳欣.干细胞样 SP 细胞研究进展[J].天津医药,2016,44(4):505-508.

[7] DAI Y,LIU S,ZHANG W,et al. YAP1 regulates ABCG2 and cancer cell side population in human lung cancer cells[J]. Oncotarget,2017,8(3): 4096-4109.

[8] GU H,WU X,FAN R,et al. Side population cells from long-term passage non-small cell lung cancer cells display loss of cancer stem cell-like properties and chemoradiore-sistance[J]. Oncol Lett,2016,12(4):2886-2893.

[9] CHOI S Y,KIM H R,PAN D R,et al. Regulation of volt-age-gated potassium channels attenuates resistance of side-population cells to gefitinib in the human lung cancer cell line NCI-H460[J]. BMC Pharmacol Toxicol,2017,18(1):14.

[10] GUHA P,BANDYOPADHYAYA G,POLUMURI S K,et al. Nicotine promotes apoptosis resistance of breast cancer cells and enrichment of side population cells with cancer stem cell like properties via a signaling cascade in-volving galectin-3,α9 nicotinic acetylcholine receptor and STAT3[J]. Breast Cancer Res Treat,2014,145(1): 5-22.

(收稿日期:2018-04-11 修回日期:2018-06-28)