# 研究论文

# CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>的人肺癌多耐药性肿瘤细胞 亚群的分离及鉴定

赵雅瑞1 张立凡2\* 刘 特3

(1上海医药职工大学,上海 200050; 2复旦大学附属华东医院,上海 200040; 3上海中医老年医学研究所,上海 200031)

摘要 肿瘤干细胞的多耐药性是导致肿瘤化疗失败的重要因素之一。因此,鉴定和明确耐药性肺癌干细胞亚群(cancer stem-cell subpopulations)的特征和机制是当前的热点。该研究从肺癌病人的肿瘤组织中分离出一个高表达CD133和ABCG2蛋白的细胞亚群。发现该CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌细胞高表达干细胞的生物标志,如: Nanog、Oct4、Sox2、Nestin、CD44、CD117、CD133和ABCG2等。不仅如此,这群细胞在体外具有高增殖性和高侵袭性,对于多种常用的化疗药物(如:顺铂和吉西他滨等)都具有耐受性。而且,少量的CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌细胞即可以在免疫缺陷小鼠体内形成肿瘤。为了研究耐药性机制,我们检测了CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>中ABCG2基因启动子区域的CpG岛(CpG islands)DNA甲基化修饰状态。实验结果表明,该细胞中,ABCG2基因启动子区域的CpG岛处于去甲基化修饰状态。综上所述,作者成功地从肺癌病人肿瘤组织中分离、富集得到了CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细胞亚群,</sub>并利用该群细胞在体外建立了肿瘤耐药性研究模型。对于肺癌CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细胞可为开发肺癌个体化治疗和新型化疗药物的设计和研发提供理论依据。

关键词 肺癌; 肿瘤干细胞; 耐药性; DNA甲基化

# Establishment and Characterization of CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> Multi-drug Resistant Lung Carcinoma Cells Subpopulation

Zhao Yarui<sup>1</sup>, Zhang Lifan<sup>2\*</sup>, Liu Te<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Shanghai Pharmaceutical Vocational College, Shanghai 200050, China; <sup>2</sup>Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China; <sup>3</sup>Shanghai Geriatric Institute of Chinese Medicine, Shanghai 200031, China)

**Abstract** Multi-drug resistance is an important element which leads to ineffectiveness of chemotherapeutics. Identification of subpopulations of cancerous lung cells with multi-drug resistance and cancer stem cell properties has recently become a major research interest. We identified a subpopulation from the primary lung tumor tissues, which had high surface expression of both CD133 and ABCG2. We found this subpopulation of cells termed CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> also overexpressed stem cells markers such as Nanog, Oct4, Sox2, Nestin, CD44, CD117, CD133 and ABCG2. These cells are not only highly prolific and invasive, but also resistant to treatment with a variety of chemotherapeutics such as casplatin and gemcitabine. Additionally, CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> cells can readily form tumors

收稿日期: 2013-06-07 接受日期: 2013-09-06

上海市科委医学引导基金(批准号: 10411967100)资助的课题

<sup>\*</sup>通讯作者。Tel/Fax: 021-62483180, E-mail: lifanzhang2013@126.com

Received: June 7, 2013 Accepted: September 6, 2013

This work was supported by the Shanghai Committee Medical Science Foundation of China (Grant No.10411967100)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-62483180, E-mail: lifanzhang2013@126.com

网络出版时间: 2013-09-26 09:54 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130926.0954.002.html

*in vivo* in a relatively short time. To investigate the mechanism of aggressive tumor growth and drug resistance, we examined the CpG islands on the *ABCG2* promoter of CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> cells and found they were remarkably hypomethylated. Thus, these data suggest that CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> cells could be reliably sorted from the human lung cancer primary tissues, and represent a valuable model for studying cancer cell physiology and multi-drug resistance. Furthermore, identification and study of these cells could have a profound impact on selection of individual treatment strategies, clinical outcome, and the design or selection of the next generation of chemotherapeutic agents.

Key words lung carcinoma; carcinoma-initiating cells; multi-drug resistant; DNA methylation

肺癌是一类高死亡率的肿瘤疾病。在全世界, 每年将近140万人死于肺癌[1-2]。肺癌的预后较差,其 5年生存期仅有15%左右,因此,其是一类恶性程度 较高的肿瘤疾病[3]。虽然多年来的研究成果,已经 为肺癌的治疗提供了许多新思路,但是仍然无法根 治肺癌,也很难抑制其转移、复发和耐药性的发生。 近年来,许多研究指出,在多种肿瘤组织中存在一群 特殊的细胞亚群,该亚群既呈现出干细胞的特性(如: 较高的自我增殖能力和不对称分裂性质等),又具有 典型的肿瘤细胞特征(如:较高的侵袭、转移特性和 化疗药物耐受性等), 故该类细胞被称为肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSC)或者肿瘤启示细胞(carcinoma-initiating cells, CIC)。研究发现, 该类细胞与肿 瘤复发、转移和耐药性存在密切的关系,或许是肿 瘤无法得到根治的根源所在<sup>[4-9]</sup>。CIC细胞最早是在 血液肿瘤中被发现并被分离鉴定的。Bonnet等<sup>[10]</sup>通 过流式细胞分选技术(FCM sorting),从原代白血病 肿瘤细胞中筛选得到了一群CD34+/CD38-的细胞亚 群,后续实验证实,该细胞亚群具有非常高的自我增 殖(self-renewal)能力,其恶性程度也非常高。随后, Eramo等<sup>[11]</sup>从肺癌病人的组织中,也分离得到了CIC 细胞,该细胞表面高表达CD133蛋白,并且实验证 实,该群细胞可以在无血清的培养基中以悬浮生长 的方式大量增殖。不仅如此,该细胞可以表达许多 干细胞的生物学标志(biomarkers),如Nanog、Oct4、 CD117等。而且, 仅有少量的CD133<sup>+</sup>的肺癌CIC细 胞(约为10 000个左右)即可以使得裸鼠形成肺癌肿 瘤。该研究证实, 肺癌中也存在CIC细胞, 并且该细 胞的活性与肺癌的恶性程度有密切的关系。然而, 在实际治疗过程中,许多肺癌病人会出现不同程度 的化疗药物耐受现象, 该现象的出现直接导致了肺 癌的转移复发。但是至今,肺癌细胞耐药性机制仍 然不明。近年来,已经有报道指出,前列腺癌细胞株 中的CD117<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细胞亚群不仅具有很高的恶性 程度,其对于化疗药物的耐受特性也比普通前列腺 癌细胞高出很多倍<sup>[12]</sup>。基于上述的研究结果,我们 推测,在肺癌肿瘤组织中,或许也存在这样一类CIC 细胞。因此,本课题利用流式细胞分选技术,从肺 癌病人原代肿瘤细胞中,分选得到CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> 的肺癌CIC细胞,通过细胞体外增值实验、细胞迁 徙与克隆集落形成实验、耐药性实验和裸鼠荷瘤形 成实验证实,该CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>的肺癌CIC细胞具 有较高的恶性程度和耐药性特征。随后,通过DNA 甲基化检测证实,多耐药(multi-drug resistant)基因 ABCG2启动子差异性甲基化是导致该细胞呈现出 化疗药物耐受性的重要原因。

### 1 材料与方法

### 1.1 CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>的肺癌CIC细胞的分离

参考Cheng等<sup>[9]</sup>、 Eramo等<sup>[11]</sup>和Liu等<sup>[12]</sup>的方法, 略有改动。实验方法简略描述如下:无菌条件下收 集肺癌病人手术中切除的肺癌肿瘤组织,用PBS缓冲 液清洗组织2次,利用眼科剪去除组织中的坏死部分 和血管等,将肿瘤组织块浸泡于5倍体积的peniclillin (1 000 U/mL)和streptomycin(1 000 U/mL)混合液中 10 min。弃抗生素, 将肿瘤组织剪成1 mm×1 mm×1 mm左右的组织小块,然后加入5倍体积的胰酶消化 液(0.25%胰酶含0.02% EDTA), 于37 °C环境下震荡 消化30 min。随后,加入5倍体积的含10%胎牛血清 的细胞完全培养基加以终止,上下颠倒震荡使细胞 脱落, 过200目筛网, 于1 500 r/min离心5 min。收集 细胞沉淀,加入100 μL冰预冷的PBS缓冲液,随后加 入rabbit anti-human CD133-FITC和rabbit anti-human ABCG2-PE monoclonal antibodies(eBioscience 生 物科技有限公司)各4 µL, 并于4 ℃环境中避光孵育 30 min。利用流式细胞仪(BD FACSAria, BD Bioscience, CA, USA)将CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>/ ABCG2<sup>-</sup>分选出来,并悬浮于无血清的干细胞培养基 [DMEM/F12, 10 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF), 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF), 5 µg/mL insulin和0.5% bovine serum albumin (BSA), 上述试剂均购于Sigma-Aldrich试剂公司]中,在37 °C、 5% CO<sub>2</sub>的环境中培养。

## 1.2 RNA抽提与实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测

按TrIzol Reagent说明书的步骤, 抽提各组细胞 的Total RNA, 并且利用ReverTra Ace M-MLV Reverse Transcriptase和寡核苷酸引物Oligo(dT)18经RT-PCR 生成对应的cDNA。测定其浓度, -20 °C保存。以 上述反转录获得的cDNA作为模板, 在Eppendorf RealPlex4(Eppendorf CO., LTD)上, 利用两步法进 行qRT-PCR, 根据相对定量法(mRNA的相对变化 量Ratio=2<sup>-44Ct</sup> | ΔΔCt=[ΔCt\_CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>–ΔCt\_ CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>])计算目标片段的扩增比例。扩增 产物以2%的Agrose Gel电泳进行分析。检测中设立 空白对照(blank control), 均以ddH<sub>2</sub>O作为模板, 各样 本设立3个重复, 以18S rRNA作为内参。目标片段 的扩增引物序列见参考文献[12]。

### 1.3 免疫荧光(IF)鉴定

各组细胞用PBS(0.02 mol/L, pH7.4)清洗2次, 然 后用4%多聚甲醛溶液常温下固定20 min固定液, 用 封闭液(0.02 mol/L PBS中加入0.2% Triton-100和5% 正常山羊血清)在37 °C下封闭60 min。弃封闭液, 用 PBST(0.02 mol/L PBS中加入0.2% Triton-100)漂洗3 次, 每次5 min。弃废液, 加入一抗(rabbit anti-human Oct3/4 antibody; rabbit anti-human Nanog antibody; Santa Cruz公司), 于37 °C下孵育45 min。反应完毕后, 用PBST漂洗3次, 每次10 min, 然后加入荧光标记 二 抗(goat anti-rabbit Cy3-conjection antibody; Santa Cruz公司)及DAPI, 于37 °C下避光孵育45 min。反 应结束后, 用PBST漂洗3次, 用50%丙三醇封片, 荧 光显微镜观察拍照。

### 1.4 软琼脂(SoftAgar)克隆集落形成实验

在42°C水浴中,将存储浓度为1.2%的低熔点琼 脂糖与2×细胞完全培养基以1:1(v/v)混合,形成终浓 度0.6%的底层琼脂,取1.4 mL加入6孔板的一个孔 中。待完全凝固后,取对数期细胞吹打成单细胞悬 液,并调细胞浓度为2×10<sup>4</sup>/mL。再将存储浓度为0.6% 的低熔点琼脂糖与2×细胞完全培养基以1:1(v/v)混 合,形成终浓度为0.3%的上层琼脂,取1.0 mL上层琼脂与0.1 mL细胞悬液充分混匀,加入已有下层琼脂的6孔板中,待其凝固后,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养3周,计算细胞克隆集落形成率。

### 1.5 MTT比色法检测肿瘤干细胞耐药性

各组细胞接种于96孔细胞培养板中(密度为 2×10<sup>3</sup>)。在药物组孔中分别加入30 nmol/μL的顺 铂和35 nmol/μL的吉西他滨,而阴性对照组中分别 加入等体积的PBS缓冲液,置于37 °C,5% CO<sub>2</sub>环境 中分别培养24,48,96 h。在检测前的4 h加入MTT 20 μL(5 mg/L),继续培养4 h。离心去上清且加入 DMSO溶解沉淀。用酶标仪在490 nm处读取所对应 的吸光度值(D<sub>490</sub>),设立3个复孔,取其平均值。测得 各孔吸光度数值,利用公式:(1-实验组D值/对照组D 值)×100%,计算出药物对于细胞的增殖抑制率。

### 1.6 Western blot检测

收集各组细胞,根据Western blot Kit(武汉博士 德生物科技有限公司)说明书中的步骤,抽提各组 细胞的总蛋白,利用Lowry法测定总蛋白浓度,以 每个泳道20 μg浓度的蛋白样品上样,经30%变性 SDS-PAGE电泳后,利用半干电转化法将蛋白转移 至PVDF膜上,经过封闭、一抗(稀释倍数1:1 000)孵 育、PBST洗脱、HRP标记的二抗(稀释倍数1:500) 孵育、PBST再洗脱等步骤后,ECL化学发光及X光 片暴光,并且经定影显影处理,获得清晰条带。利用 BandScan软件分析各条带的A值。

### 1.7 裸鼠致瘤实验

收集各组细胞,离心,收集沉淀,利用冰预冷的 PBS重悬细胞,调整至细胞密度为10 000 /μL。取2 只裸鼠(购自上海斯莱克实验动物中心),分别于背部 皮下组织注射20 μL细胞悬液,其中1只注射CD133<sup>+</sup>/ ABCG2<sup>+</sup>的肺癌CIC细胞,另1只注射CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup> 的肺癌细胞。所有裸鼠均饲养于相同的环境(SPF级)中, 每周观察一次背部瘤体形成情况。

### 1.8 组织切片HE染色

肿瘤组织利用冰冻切片技术获得,然后用4%多 聚甲醛溶液常温下固定1 h。蒸馏水清洗后用二甲 苯通透1 min,然后用苏木精染色5 min,浸入稀盐酸– 乙醇溶液(75%乙醇与1%盐酸混合)分色数秒钟,再 浸入淡氨水溶液(400 μL氨水溶于400 mL蒸馏水中) 使细胞核蓝化3 min,蒸馏水清洗。然后,伊红染色 5 min,蒸馏水清洗,接着分别经过70%、80%、90% 乙醇溶液各1次,进行逐级脱色。最后,二甲苯透明3次,每次 1 min。完成后,中性树胶封片,显微镜下观察并拍照。

# 1.9 亚硫酸氢钠处理及甲基化特异性PCR(MS-PCR)鉴定ABCG2启动子甲基化

抽提各组细胞的基因组DNA,并按CpGenome<sup>™</sup> DNA Modification Kit说明书的步骤完成基因 组DNA的体外修饰。取各组细胞重亚硫酸盐修饰 后的基因组DNA(2 µL)作为模板,同时在PCR管中分 别加入上下游引物(0.01 nmol)各0.5 µL、2×HotStart Taq PCR MasterMix 10 µL及ddH<sub>2</sub>O 7 µL,使得MS-PCR总反应体系为20 µL。根据文献[12]的引物序列 及PCR反应过程及温度进行MS-PCR检测。PCR反 应完成后,其产物进行1.5%琼脂塘凝胶检测,并且利 用BandScan软件分析各条带的A值。

### 1.10 统计方法

本实验的数据以均数±标准差(x±s)表示,利用 SPSS 10.0统计软件对数据进行方差分析(ANOVA) 或独立样本t检验, P<0.05认为差异有统计学意义。

### 2 结果

# **2.1 CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细胞高表达干细胞** 标志

本研究中,我们共收集了3例肺癌病人的手 术切除肿瘤组织(编号为: LC1~LC3), 都为肺腺癌, 病理分期为Ⅱ期。通过胰酶消化和流式细胞分选 技术,我们从肺癌组织中获取了CD133+/ABCG2+ 的细胞群。经过流式细胞仪检测(FCSA)发现,在 肺癌原代细胞中, CD133+/ABCG2+细胞亚群所 占的比例非常小,约为1.73%±0.49%,而绝大多 数肿瘤细胞为CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>细胞(占总细胞数 的82.53%±4.67%)。后续实验样本均来自于LC3 手术切除肿瘤组织。原代的CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>均以无血清培养基在体外进行悬 浮培养(suspended cultured), 当传代至第9代的时候, CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>出现大量的死亡细胞,而CD133<sup>+</sup>/ ABCG2<sup>+</sup>细胞成团生长,其中细胞颗粒小且密集,折 光度好,显示出非常好的生长状态(图 1)。我们利 用qRT-PCR检测了各类细胞群干细胞生物标志(bio-



图1 流式细胞仪分析CD133和ABCG2在不同病人肺癌组织中的表达(LC1~LC3代表三个病人肺癌组织) Fig.1 Flow cytometric analysis of CD133 and ABCG2 expression in different human lung cancer tumors (LC1~LC3 were three patients' tumors)



A: qRT-PCR检测结果; B: Western blot检测结果。\*P<0.05,\*\*P<0.01, <sup>#</sup>P>0.05, n=3。 A: relative mRNA expression levels of stem cell markers in different lung cancer subpopulations using qRT-PCR; B: protein expression of CD133, CD44 and ABCG2 in different lung cancer subpopulations detected by Western blot. \*P<0.05,\*\*P<0.01, <sup>#</sup>P>0.05, n=3. **图2** 干细胞标志在不同肺癌细胞亚群中的检测

Fig.2 Expression levels of stem cell markers assay in different lung cancer subpopulations



图3 免疫荧光检测Oct3/4和Nanog在不同肺癌细胞亚群中的表达 Fig.3 Immunofluorescence staining of Oct3/4 and Nanog expression in different lung cancer subpopulations

markers)表达情况,实验结果表明,CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> 细胞群较CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>细胞群高表达Nanog、 Sox2、Oct4、CD133、CD117、CD44和ABCG2 等干细胞标志(趋近于5倍以上的差异)(图2)。同 时,Western blot和免疫荧光(IF)检测也同样显示了 CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细胞群较CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>细胞群 高表达干细胞生物标志(图3)。实验证实,CD133<sup>+</sup>/ ABCG2<sup>+</sup>细胞群具有典型的干细胞特性。

# 2.2 CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细胞在体外快速增 殖且具有高侵袭性

选择第7代的细胞,每2天统计一次细胞的增值 数量,连续计算8天,统计结果表明,CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> 肺癌CIC细胞群自第2天起出现明显的增殖趋势,而 CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>肺癌细胞至第4天才进入增殖期。 本实验起始阶段, 两者细胞数均维持在1×10<sup>3</sup>悬浮 细胞/mL左右[CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细胞为(1 026±26)悬 浮细胞/mL, CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>细胞为(1 266±66)悬 浮细胞/mL, P>0.05, n=3], 在实验终止时, CD133<sup>+</sup>/ ABCG2<sup>+</sup>细胞数量约为(9 533±886)悬浮细胞/mL, 远 远多于CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>的细胞数[(5 445±936)悬浮 细胞/mL, P<0.05, n=3]。实验表明, CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> 肺癌CIC细胞具有很强的自我增殖(self-renewal)能 力(图4)。同时, SoftAgar细胞克隆集落形成实验证实, CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细胞在介质中的侵润能力 和克隆形成能力, 均远远高于CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>肺癌 细胞(图4)。实验证实, CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细 胞具有恶性肿瘤细胞典型的增殖快、侵袭性高的特 征。



A: 0到8天不同组别肺癌亚群细胞的体外增殖检测; B: 不同细胞软琼脂集落形成率; C: 不同细胞对顺铂和吉西他滨耐受性的MTT检测. \*P<0.05, \*\*P<0.01, <sup>#</sup>P>0.05, n=3。

A: average cell numbers of different lung cancer subpopulations counted on days 0 to 8 after passage; B: invasion of different lung cancer subpopulations detected by softagros; C: inhibition of different lung cancer subpopulations growth after treatment with casplatin or Gemcitabine as measured by MTT proliferation assays. P<0.05, \*P<0.05, n=3.

图4 不同肺癌细胞亚群体外细胞增殖、侵袭和耐药性的检测

Fig.4 Proliferation rates, invasion and multi-drug resistance of different lung cancer subpopulations in vitro



A: CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>肺癌细胞注射组; B: CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌细胞注射组; C: CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌细胞注射所致肺癌肿瘤组织的病理学检测; D: 肿瘤组织Ki-67免疫组织化学染色结果。

A: CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup> lung cancer subpopulations injection group; B: CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> lung cancer subpopulations injection group; C: H&E staining revealed the cell heterogeneity existed on pathological sections of the tumor; D: the immunohistochemistry staining showed that the expression of Ki-67 elevated on tumor.

图5 各组细胞在裸鼠体内致瘤性检测及瘤体组织病理学分析 Fig.5 in vivo xenograft experiments and section forms of pathological organization stain and analysis

### 2.3 CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细胞具有高耐药性

利用MTT比色法检测各组细胞在顺铂或吉 西他滨处理下的增殖抑制情况,实验结果显示, CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>细胞在上述化疗药物刺激下,呈 现出显著的增殖抑制现象,其增殖抑制强度与化疗 药物刺激时间的长短具有明显的相关性(图4)。而 CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细胞对于顺铂或吉西他滨均表现 出很好的耐受性,在各个时间点上,其增殖抑制率均 显著低于CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>细胞;不仅如此,CD133<sup>+</sup>/ ABCG2<sup>+</sup>细胞在化疗药物刺激下的增殖抑制强度与 时间变化无关。故实验结果证实,CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> 肺癌CIC细胞具有典型的肿瘤细胞化疗药物耐受 性。

### 2.4 CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细胞具有高致瘤性

为了证实CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细胞具有典型的致 瘤能力,我们选取少量的细胞(约为10 000/μL)接种 于裸鼠背部皮下。大约在8周之后,CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup> 细胞接种鼠的背部可以观察到有明显的瘤体产生, 而接种CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup>细胞的裸鼠背部相同位置上 并未发现有瘤体。继续饲养2周,CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细 胞接种鼠的瘤体不断长大,而接种CD133<sup>-</sup>/ABCG2<sup>-</sup> 细胞的裸鼠背部仍然未发现有瘤体长出(图5)。待10 周左右,处死裸鼠,切下瘤体行HE染色和免疫组织 化学检测,实验证实,CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细胞所形成的 荷瘤,其病理结构与病人手术切除的肺癌肿瘤一致。 说明,该细胞具有很强的致瘤性。此外,免疫组织化 学染色鉴定表明,该荷瘤细胞高表达Ki-67蛋白,表明 该肺癌细胞具有旺盛的增殖能力。裸鼠体内成瘤实验说明, CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细胞具有典型的肿瘤干细胞强致瘤性的特征。

# 2.5 多耐药基因ABCG2启动子区域在CD133<sup>+</sup>/ ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细胞中呈现去甲基化状态

为了证实多耐药基因ABCG2的差异性表达是 由于DNA甲基化差异所致,各组细胞的基因组DNA 经重亚硫酸盐处理后,以ABCG2启动子区甲基化和 非甲基化特异性引物进行MS-PCR检测。实验结果 显示,在CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细胞中,ABCG2 非甲基化引物PCR结果呈现出明显的阳性条带,而 以非甲基化引物所扩增的PCR产物均未发现有阳 性条带,提示此该细胞中,上述基因的启动子区域



图6 ABCG2基因启动子区域CpG岛甲基化修饰检测 Fig.6 CpG island methylation assay on the ABCG2 promoter 存在去甲基化现象(demethylation)。而在CD133<sup>-/</sup> ABCG2<sup>-</sup>肺癌细胞中, *ABCG2*基因启动子区甲基化 特异性PCR产物呈现显著的阳性条带, 而非甲基化 扩增的PCR产物则无明显条带(图6)。说明在该细 胞中, *ABCG2*基因启动子区域呈现出高甲基化修饰 (hypemethylation modification)现象。该实验证实, CD133<sup>+/</sup>ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细胞中, 由于ABCG2启动 子去甲基化而导致其高表达, 以至于该细胞具有很 强的化疗药物耐受性。另外, 5-Aza-CdR是一种脱 氧胞苷类物质, 其作为DNA甲基化转移酶(DNMT) 的抑制剂, 可以大大降低基因组DNA的高甲基化状 态。该研究中, 利用5-Aza-CdR(10 µmol/L)处理细胞, 作为MS-PCR检测的阴性对照。

## 3 讨论

目前,越来越多的研究指出,众多肿瘤组织中 存在肿瘤干细胞(CIC), 而CIC细胞的活性和数量与 肿瘤恶性程度的高低、肿瘤侵袭与转移能力及病 人预后有着密切的关系。CIC细胞具有非常典型 的性质[13]: 第一, CIC细胞具有很强的自我更新和 增殖能力; 第二, 它们表达众多干细胞(如: 胚胎干 细胞和祖细胞等)的生物标志,并且具有一定的组 织定向分化多能性; 第三, 其在体内的自我更新总 是遵循非对称性分裂的方式(即一个CIC细胞通常 分裂成一个CIC子代和一个肿瘤细胞); 第四, CIC 细胞比普通肿瘤细胞具有更强的侵袭能力和致瘤 性; 第五, CIC细胞通常要比普通肿瘤细胞具有更 强的化疗药物耐受能力。CIC细胞的发现为肿瘤的 治疗提供了新的思路, 而其耐药性机制的深入研究 也为肿瘤靶向治疗提供了理论依据。前期研究指 出,在CIC细胞表面高表达一个ABCG2蛋白,该蛋 白属于肿瘤多耐药基因(multi-drug resistance)家族 的成员。ABCG2蛋白通常被称为乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP)、 胎 盘ATP 结合蛋白(placental ABC protein, ABCP)、米托蒽醌 耐药蛋白(mitoxantrone resistance protein, MXR), 是 一个普遍的ATP结合盒(ATP-binding cassette, ABC) 跨膜蛋白,通常表达于高耐药肿瘤表面和胚胎干 细胞表面[14-15]。对ABCG2基因启动子区域分析可 知,其含有一个TATA-less Box和能与Sp1、AP1和 AP2等转录因子结合的顺式作用位点(cis-acting locus)。同时, 在ABCG2基因启动子CCAAT Box 上游,存在一个CpG岛(CpG islands),并且推测,该 CpG岛的甲基化修饰调控着该基因的转录活性[16-17]。 在本研究中,我们首先从肺癌病人原代肿瘤组织细 胞中分选到了一群CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>的细胞亚群(cell subpopulation), 通过细胞计数、Transwell小室及软 琼脂细胞克隆集落形成实验证实,该群细胞具有比 普通肺癌细胞更强的侵袭性和克隆形成能力。同 时,MTT增殖抑制实验显示CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>细胞对 于顺铂和吉西他滨药物具有比普通肺癌细胞更强的 耐受能力。另外,该群细胞高表达干细胞标志物(如: Oct4、Sox2、Nanog、CD117等),同时也高表达端 粒酶基因(Tert)。不仅如此,我们将少量的CD133<sup>+</sup>/ ABCG2<sup>+</sup>细胞注射于裸鼠皮下,经过一段时间的饲 养, 注射部位出现了与该肺癌病人相同的肺癌荷瘤。 上述实验结果证实, CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌细胞具有 典型的肿瘤干细胞(CIC)特征。

随后,我们从表观遗传学角度出发,探讨了 CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细胞高表达*ABCG2*基因 的机制。通过DNA甲基化分析,我们发现,位于 CD133<sup>+</sup>/ABCG2<sup>+</sup>肺癌CIC细胞内的*ABCG2*基因,其 启动子CpG岛部位未发生甲基化修饰;而CD133<sup>-</sup>/ ABCG2<sup>-</sup>肺癌细胞的*ABCG2*基因,其启动子CpG岛部 位存在高甲基化修饰。实验结果表明,由于肺癌CIC 细胞的*ABCG2*基因启动子区域存在去甲基化修饰, 故该细胞表面的*ABCG2*基因具有较高的转录活性, 最终表达产物帮助该类细胞逃逸化疗药物的攻击。

本研究通过将CD133和ABCG2两个蛋白相结合,从原代肺癌细胞中筛选出了一群高耐药性的肿瘤干细胞,并且初步研究了该细胞多耐药性基因特异性表达的表观遗传学机制。该研究结果为肺癌临床化疗提供了新的思路。

### 参考文献 (References)

- Meng J, Xie W, Cao L, Hu C, Zhe Z. shRNA targeting HDGF suppressed cell growth and invasion of squamous cell lung cancer. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2010; 42(1): 52-7.
- 2 Doebele RC, Oton AB, Peled N, Camidge DR, Bunn PA Jr. New strategies to overcome limitations of reversible EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy in non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2010; 69(1): 1-12.
- 3 Sun Y, Fang R, Li C, Li L, Li F, Ye X, et al. Hsa-mir-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun 2010; 396(2): 501-7.
- 4 Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Cora-

dini D, *et al.* Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. Cancer Res 2005; 65(13): 5506-11.

- 5 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001; 414(6859): 105-11.
- 6 Marx J. Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. Science 2003; 301(5638): 1308-10.
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. Nat Rev Cancer 2003; 3(12): 895-902.
- 8 Qin W, Ren Q, Liu T, Huang Y, Wang J. MicroRNA-155 is a novel suppressor of ovarian cancer-initiating cells that targets CLDN1. FEBS Lett 2013; 587(9): 1434-9.
- 9 Cheng W, Liu T, Wan X, Gao Y, Wang H. MicroRNA-199a targets CD44 to suppress the tumorigenicity and multidrug resistance of ovarian cancer-initiating cells. FEBS J 2012; 279(11): 2047-59.
- 10 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997; 3(7): 730-7.
- 11 Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et

*al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death Differ 2008; 15(3): 504-14.

- 12 Liu T, Xu F, Du X, Lai D, Zhao Y, Huang Q, et al. Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinomainitiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1. Mol Cell Biochem; 340(1/2): 265-73.
- 13 Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. Cancer Res 2005; 65(8): 3025-9.
- 14 Chen Z, Liu F, Ren Q, Zhao Q, Ren H, Lu S, *et al.* Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation. Int J Cancer 2010; 126(4): 841-51.
- 15 To KK, Zhan Z, Bates SE. Aberrant promoter methylation of the ABCG2 gene in renal carcinoma. Mol Cell Biol 2006; 26(22): 8572-85.
- 16 Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. Trends Genet 2000; 16(4): 168-74.
- 17 Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, *et al.* Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet 1998; 19(2): 187-91.