

## 探索·发现

## 非贴壁微球体培养法分离T-淋巴细胞瘤干细胞及鉴定

王珊珊<sup>1</sup> 殷勤伟<sup>2</sup> 张洪杰<sup>3</sup> 谭 琰<sup>1</sup> 华 茜<sup>1\*</sup><sup>(1</sup>北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; <sup>2</sup>北京军区总医院, 北京 100700; <sup>3</sup>中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 通过非贴壁微球体无血清培养法, 体外构建并鉴定了T-淋巴细胞瘤干细胞。采用细胞球悬浮培养方法富集T-淋巴细胞肿瘤干细胞, 利用抑制分化作用的抑制剂CHIR99021和PD173074(2i)进行肿瘤干细胞的筛选, 采用RT-PCR法检测Sox2、Oct4、Nanog、Klf4、Bmi1、C-Myc干细胞特征基因的表达, 进一步采用Western blot验证Oct4蛋白水平表达, 流式细胞术分析CD34、CD44抗体表达情况, 用PI检测细胞周期, 用CFSE观察细胞增殖能力, 并将富集的T-淋巴细胞肿瘤干细胞进行裸鼠异体移植实验。在细胞球悬浮培养法基础上, 利用具有抑制分化作用的抑制剂CHIR99021和PD173074, 成功富集出Hut-102干细胞球。经RT-PCR鉴定, Hut-102干细胞球的其干细胞特征基因Sox2、Oct4、Nanog、Klf4、Bmi1、C-Myc表达均显著性高于Hut-102细胞并且高表达Oct4蛋白; 经流式细胞术分析CD34、CD44抗体表达, 有74.20%的Hut-102干细胞球表现为CD34<sup>+</sup>, 有90.82%的Hut-102干细胞球表现为CD44<sup>+</sup>, 证明抑制分化药物应用于细胞球悬浮培养方法中, 能够有效富集出具有CD34<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>表型特征的Hut-102干细胞球; 用PI检测细胞周期, 富集的Hut-102干细胞球中处于G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>期的细胞为64%, 处于S期的细胞为30.56%, 表明该细胞暂不增殖或处于休止状态; 用CFSE检测到富集的Hut-102干细胞球分化增殖能力显著高于Hut-102细胞。在NON/SCID裸鼠中, 分别移植Hut-102细胞球和Hut-102细胞, 结果显示, 前者检测到67.74%±5.32%的淋巴细胞表达Hut-102细胞特异性标记物(CD3), 而后的裸鼠中未检测到, 说明Hut102细胞球在NON/SCID裸鼠体内表现了T-淋巴细胞肿瘤干细胞特点和移植能力。首次在传统的非黏连微球体无血清培养法中加入两种抑制剂(CHIR99021和PD173074), 富集出大量的微球体, 通过干细胞特征鉴定及裸鼠移植实验, 证明Hut-102细胞球具有T-淋巴细胞肿瘤干细胞特性。

**关键词** CHIR99021; PD173074; 肿瘤干细胞; T-淋巴细胞瘤(Hut102); CD34; CD44; 裸鼠移植

## Construction and Identification a Culture Method of Non-adherent Microspheres for Human T-cell Lymphoma Stem Cells

Wang Shanshan<sup>1</sup>, James Yin<sup>2</sup>, Zhang Hongjie<sup>3</sup>, Tan Yan<sup>1</sup>, Hua Qian<sup>1\*</sup>

<sup>(1</sup>Preclinical Medicine College, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China; <sup>2</sup>General Hospital of Beijing Military Region, Beijing 100700, China; <sup>3</sup>Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract** In this work, we established a serum-free culture method for non-adherent microspheres of

收稿日期: 2014-02-26 接受日期: 2014-04-29

教育部博士点基金博导类项目(批准号: 20120013110013)和国家自然科学基金项目(批准号: 81072901)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-64286190, Fax: 010-64286871, E-mail: hqianz@aliyun.com

Received: February 26, 2014 Accepted: April 29, 2014

This work was supported by the New Teacher Fund for Doctor Station, Chinese Ministry of Education (Grant No.20120013110013) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81072901)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-64286190, Fax: +86-10-64286871, E-mail: hqianz@aliyun.com

网络出版时间: 2014-07-21 10:11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0056.html>

human T-cell lymphoma (Hut-102) stem cells, and identified them. Enrichment of sphere cells with stem-like properties from human T-cell lymphoma lines were grown in a defined serum-free medium (SFM) with two differentiation inhibitor, CHIR99021 and PD173074 (2i). The expressions of *Sox2*, *Oct4*, *Nanog*, *Klf4*, *Bmi1*, *C-Myc* were measured by RT-PCR. The antigen effect of CD34, CD44 was analyzed by flow cytometry. The cell cycle of Hut-102 cancer stem cells was assessed by PI and nude mouse xenograft assay. Hut-102 sphere enriched in SFM with 2i expressed cancer stem cells markers, including *Sox2*, *Oct4*, *Nanog*, *Klf4*, *Bmi1*, *C-Myc*, the over-expression of Oct4 protein, and high expressions of CD34, CD44 (74.20%, 90.82%). By observing the cell cycle, we found that most cells in the enriched spheres were in G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase (64%), and less cells in S phase (30.56%) compared to the Hut-102 cells. In the T-cell lymphoma derived from caudal vein injection of Hut-102 spheres in athymic nude mice, 67.74%±5.32% of cells expressed Hut-102 specific surface marker (CD3). We reported for the enrichment and characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from Hut-102 cell lines in non-adherent sphere culture with two differentiation inhibitor such as CHIR99021 and PD173074.

**Key words** CHIR99021; PD173074; cancer stem cells; human T-cell lymphoma (Hut-102); CD34; CD44

全球每年约有700万人是因癌症而死亡, 中国因癌症而死亡的人数占到了其中的24%。目前, 癌症患者生存和治愈的比例还不高, 我国仅为13%<sup>[1]</sup>。成人T细胞淋巴瘤又名逆转录病毒相关T细胞白血病(adult T cell leukemia, ATL)。它的产生与一种反转录病毒HTLV-1的感染有关。此病预后甚差, 无论以何种化疗组合其缓解期均十分短暂, 且大部分病人于诊断确立后十二个月内死亡<sup>[2-3]</sup>。Cuzman等<sup>[4]</sup>研究表明, 人白血病干细胞对阿糖胞苷的抵抗力强于其他白血病细胞。传统治疗方法均主要针对大部分没有增殖和自我更新能力的肿瘤细胞, 不能够有效杀死肿瘤干细胞, 每次治疗后残存的肿瘤干细胞成为肿瘤复发和转移的根源, 这可能是目前大部分肿瘤无法根治的原因<sup>[5-9]</sup>。George等<sup>[10]</sup>证实, 表面标记物为CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>的白血病干细胞对柔红霉素的敏感性明显低于CD34<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>的肿瘤细胞。肿瘤干细胞学说使人们对肿瘤的认识提高到一个新的水平, 在肿瘤研究中的地位显得越来越重要。

目前, 常选用分选技术来富集出肿瘤干细胞, 它能够一次性进行多标志分选, 而且能够选择荧光强度大的肿瘤细胞, 分选纯度高、特异性强, 但需要具备分选功能的流式细胞仪, 并且无菌操作过程相对繁琐, 且拘束于肿瘤干细胞表面标记物的识别。SP分选干细胞基于ABC转运蛋白家族ABG2的外排药物能力, 和耐药性有一定关系, 但和干细胞的其他特性没有必然联系, 目前还没有研究证明所有肿瘤的SP细胞都是干细胞。而且此方法同样具有细胞分选流程带给细胞的物理伤害, 不利于后续实验。

我们采用的细胞球悬浮培养被认为是一种富集肿瘤干细胞的最简单最有效的方法, 此方法培养的细胞能够保持多向分化的潜能, 其干细胞比率可达到4%~20%。近年的研究表明, 通过非贴壁微球体无血清培养可以富集出乳腺癌和前列腺癌等多种实体瘤的干细胞/前体细胞<sup>[11-14]</sup>。与干细胞分选富集方法相比, 悬浮培养方法简单、方便、成本小、对细胞基本无毒害作用。现在也成为肿瘤干细胞研究中富集干细胞常用和主要的方法。

CHIR99021是GSK-3 $\beta$ 的抑制剂, 而GSK-3 $\beta$ 与WNT信号通路相关。WNT信号通路已经被证明与干细胞的自我更新能力相关。Ying等<sup>[15]</sup>采用三种化学小分子: CHIR99021、PD184352和SU5402, 分别抑制小鼠的胚胎干细胞GSK3、Mitogen-activated protein kinase(MEK)和Fibroblast growth factor(FGF)受体酪氨酸激酶这三个与细胞分化相关的信号通路后, 发现小鼠胚胎干细胞可长期保持自我更新而不需要促进细胞自我更新相关的信号。在这其中, CHIR99021抑制GSK3后激活Wnt信号通路可能与细胞代谢以及ERK等信号受到抑制后细胞的生长有关。这种三个化学小分子抑制剂可以用于大鼠胚胎干细胞株的分离建株。Hanna等<sup>[16]</sup>也发现, CHIR99021抑制GSK3有助于Nonobese Niabetic(NOD)鼠系早期胚胎干细胞及重编成的多功能干细胞多能性的维持。小鼠、大鼠和人的胚胎干细胞通过抑制GSK3信号都能够长期地维持多能性状态和自我更新能力, 提示它们存在着共同的调控通路。还有研究发现, 通过联合使用CHIR99021和PD0325901抑制剂进一步增强

自我更新,这两种抑制剂分别抑制GSK-3和ERK1/2信号通路。GSK-3是复杂激酶,涉及AKT、Wnt和Hedgehog通路,GSK-3抑制剂通过调控Wnt/ $\beta$ -catenin或PI3K信号通路刺激ES细胞自我更新,调节下游因子,例如 $\beta$ -catenin和c-Myc。PD173074是TGF- $\beta$ 抑制剂,竞争FGFR3胞内结构域ATP结合位点。根据报道<sup>[7]</sup>,通过PD173074诱导使得表达突变FGFR3的细胞被显著抑制。

迄今为止的研究中,没有人将抑制剂CHIR99021和PD173074用于T淋巴细胞肿瘤干细胞的筛选和培养,本研究首次将两种抑制剂用于Hut-102肿瘤干细胞筛选,通过研究两种抑制剂加入后细胞富集差异,鉴定加入两种抑制剂后富集出的细胞与肿瘤干细胞的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 人T-淋巴瘤细胞株Hut-102购自美国细胞库(American Type Culture Collection, ATCC)(TIB-162),在含10%胎牛血清的DMEM培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下培养,每2~3 d换液传代,实验选用处于对数生长期的细胞。

1.1.2 试剂 DMEM培养基(北京钮因华信科技有限公司),胎牛血清(PAA公司),分化抑制剂CHIR99021和PD173074(Stemgent公司),抗生素、DMSO、B27(Gibco公司),胰岛素(insulin)、表皮生

长因子(EGF)、成纤维生长因子(bEGF)(Promega公司),Trizol(Invitrogen公司),PI、CFSE(Sigma公司),Anti-human CD34 FITC、Anti-human CD44 PE、Anti-human CD3 PE(BD公司),NON/SCID裸鼠(北京维通利华有限公司),Real-time PCR试剂盒(TaKaRa公司),Anti-Oct4 antibody(Abcam公司),Anti- $\beta$ -actin antibody(Sigma公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 Hut-102体外微球体培养及传代 细胞生长至对数期,观察细胞状态是否良好。将细胞重悬,制成单细胞悬液,计数,1 $\times$ 10<sup>6</sup>/孔接种于6孔板中,使用HEScGRO™培养基,加入B27、10<sup>-7</sup> mol/L CHIR99021、10<sup>-7</sup> mol/L PD132074、100 nmol/L DEX、5  $\mu$ g/mL insulin、10 ng/mL EGF,每隔2 d换液1次,培养7 d后,细胞球长至半径达到60  $\mu$ m后收集细胞球,入无菌离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,PBS清洗1次,用trypLE express消化5 min,并用微量加样器吹打。待细胞球明显被吹散后,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用上述培养基进行重悬,计数,1 $\times$ 10<sup>6</sup>/孔接种于6孔板中,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。7 d、14 d后计数其中的微球体(大于60  $\mu$ m)数目,并计算微球体形成效率(微球体形成效率=微球体数目/接种细胞数 $\times$ 100%)。

1.2.2 RT-PCR法检测Sox2、Oct4、Nanog、Klf4、Bmi1、C-myc基因表达 从Hut-102细胞、14 d的Hut-102干细胞球中提取总RNA。细胞用Trizol裂解,

表1 PCR引物序列  
Table 1 PCR primer sequence

基因 Gene	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)	PCR产物(bp) PCR product (bp)	循环数 Cycles
$\beta$ -actin	Forward primer: AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT Reverse primer: GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT	60	283	40
Oct4	Forward primer: AGA AGG ATG TGG TCC GAG TGT Reverse primer: CCA GAG TGG TGA CGG AGA CAG	60	251	40
Nanog	Forward primer: TTC GCC TAT GCC TGT GAT TTG T Reverse primer: CTC CAG AAG TGG GTT GTT TGC C	60	482	40
Sox2	Forward primer: CAG CCC CCC TGT GGT TAC CTC TTC C Reverse primer: CTC TAT TGC ACC CCT CCC ATT TCC C	60	287	40
KIF4	Forward primer: TGG TGA TGA TGA TGA GGG Reverse primer: GTG GCA CAG ACG GGA TTA	60	306	40
C-myc	Forward primer: TAC CCT CTC AAC GAC AGC AGC TCG CCC AAG TCC T Reverse primer: TCT TGA CAT TCT CCT CGG TGT CCG AGG ACC T	60	478	40
Bmi1	Forward primer: AAG TCT TGC CTG CTT TCC AA Reverse primer: CAG CGG TAA CCA CCA ATC TT	60	316	40

RNA释放到溶液中,使用逆转录酶试剂盒和适当的逆转录溶液将总RNA逆转录成cDNA,样品在42 °C孵育1 h,95 °C加热5 min,RNA完整性用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

所有反应体系为20  $\mu$ L,使用ABI PRISM 7500 PCR仪检测,每个反应体系包含10  $\mu$ L的2 $\times$ TaqMan PCR mix,10  $\mu$ mol/L引物和cDNA。94 °C变性5 min,40个循环(94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s),72 °C延伸7 min,4 °C保存。并设有非模板对照组,排除试剂影响。

**1.2.3 Western blot检测Oct4蛋白表达情况** 收集14 d的细胞球,提取蛋白,进行10% SDS-PAGE电泳,转至PVDF膜;加入含5%脱脂奶粉的TBS缓冲液封闭;加入兔抗人OCT4多克隆抗体,4 °C过夜;洗膜30 min,经HRP标记的羊抗兔二抗室温孵育2 h,经化学发光法检测蛋白条带并在化学发光仪采集图像,并用Image Lab software分析光密度。内参采用 $\beta$ -actin。用Hut-102细胞作为对照细胞。此实验重复三批实验。

**1.2.4 流式细胞术分析CD34、CD44抗体表达** 收集14 d的细胞球,入无菌离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,PBS清洗1次,用trypLE express消化5 min,并用微量加样器吹打。待细胞球明显被吹散后,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用PBS清洗2次,加入1% BSA封闭液重悬细胞,制成 $1\times 10^6$ /mL细胞悬液,4 °C放置30 min,加入1% BSA稀释的带荧光一抗,每 $1\times 10^6$ 细胞加入20  $\mu$ L,室温避光放置30 min,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用PBS清洗2次,用含1%多聚甲醛的PBS重悬,流式细胞仪BD FACSCalibur检测分析。

**1.2.5 PI染色检测细胞周期** 收集14 d的细胞球,入无菌离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,PBS清洗1次,用trypLE express消化5 min,并用微量加样器吹打。待细胞球明显被吹散后,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用预冷的PBS清洗2次,加入预冷的70%乙醇,于4 °C固定过夜,离心收集细胞,1 mL PBS洗细胞1次,加入500  $\mu$ L PBS(含50  $\mu$ g/mL PI,100  $\mu$ g/mL RNase A,0.2% Triton X-100),4 °C避光孵育30 min,流式细胞仪BD FACSCalibur检测分析。

**1.2.6 CFSE标记观察细胞增殖能力** 收集14 d的细胞球,入无菌离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,PBS清洗1次,用trypLE express消化5 min,并用微量加

样器吹打。待细胞球明显被吹散后,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用PBS清洗2次,在15 mL管中用含有5  $\mu$ mol CFSE的1 mL PBS(pH7.4)重悬细胞,37 °C孵育10 min,期间轻轻混匀2次。加入8 mL冰冷的含10%胎牛血清的DMEM培养基,轻轻混匀1 min,然后1 000 r/min离心5 min,弃上清,将细胞重悬,制成单细胞悬液,计数, $1\times 10^4$ /孔接种于6孔板中,使用含10%胎牛血清的DMEM培养基,每隔2 d换液1次,培养1,3,5 d,用荧光显微镜观察细胞增殖能力,并进行计数。用Hut-102细胞作为对照细胞。

**1.2.7 观察Hut-102细胞球体内移植能力** CD3分子表达在人全部T-淋巴细胞上,是鉴定T-淋巴细胞的重要标记。所以采用CD3标记物检测人外周血T-淋巴细胞瘤(Hut-102),观察在NON/SCID裸鼠体内Hut-102细胞和Hut-102细胞球移植情况。

NON/SCID裸鼠,分别尾静脉注射Hut-102细胞和Hut-102细胞球,均接种 $1\times 10^6$ ,空白对照组接种PBS。喂养两周后,取20  $\mu$ L全血,提取淋巴细胞,用流式细胞仪、免疫组化检测外周血人淋巴细胞表面抗原(CD3)表达量。

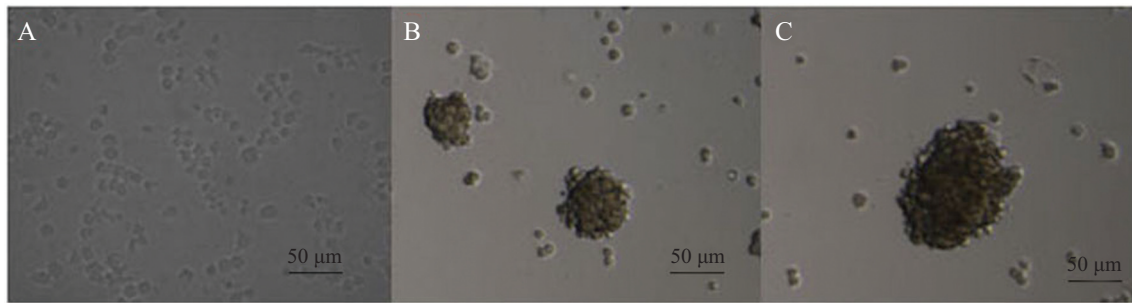
## 2 结果

### 2.1 Hut-102微球体富集

倒置显微镜下观察,单个肿瘤细胞接种在普通培养基下培养,仍保持单个细胞状态;接种在干细胞培养基培养24~48 h后,细胞分裂增殖,形成2~3个细胞构成的漂浮小球体,随后肿瘤球体逐渐增大;7 d后,形成微球体细胞数目达到20个左右,约60  $\mu$ m,微球体形成数量约为60~66个,肿瘤球体呈悬浮生长,微球体内细胞排列紧密、透亮、富有折光性,类似于干细胞球体;14 d后,形成微球体细胞数目达到50个左右,约80  $\mu$ m,微球体形成数量约为50~66个,明显看到紧实的细胞球的形成(图1、表2)。进行传代培养,仍可形成类似于原代的肿瘤干细胞球。

### 2.2 Hut-102细胞球干细胞特征基因的表达情况

为了验证干细胞培养基富集出微球体的方法是富集干细胞可靠的途径,我们对干细胞培养基中细胞球的干细胞特征基因的表达情况进行验证。结果发现,在14 d的Hut-102细胞球中,特征基因*Sox2*、*Oct4*、*C-myc*、*Klf4*、*Nanog*、*Bmi1*高表达;而在Hut-102细胞系中,呈低表达,且有显著性差异( $P<0.05$ ,图2)。

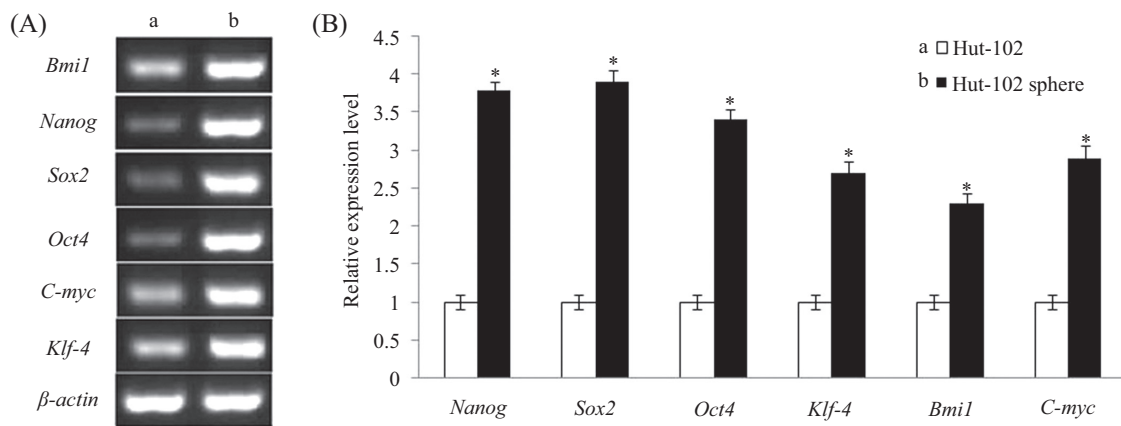


A: Hut-102细胞, 10%胎牛血清培养基中, 正常培养4 d; B: Hut-102细胞球, 加入抑制剂CHIR99021和PD173074的无血清培养基, 培养7 d; C: Hut-102细胞球, 加入抑制剂CHIR99021和PD173074的无血清培养基, 培养14 d。

A: Hut-102 cell, medium containing 10% fetal bovine serum, cultured for 4 d; B: Hut-102 mammospheres, serum-free medium with two differentiation inhibitor, CHIR99021 and PD173074, cultured for 7 d; C: Hut-102 mammospheres, serum-free medium with two differentiation inhibitor, CHIR99021 and PD173074, cultured for 14 d.

图1 细胞形态观察

Fig.1 Cell morphology observation



A: RT-PCR电泳结果, a: 10%胎牛血清培养下的Hut-102细胞, 培养7 d; b: 加入抑制剂CHIR99021和PD173074的无血清培养基下富集14 d的Hut-102细胞球; B: RT-PCR定量分析结果。\* $P < 0.05$ , 与Hut-102细胞组比较。

A: result of RT-PCR, a: Hut-102 cells were cultured in medium containing 10% fetal bovine serum after 7 d; b: enrichment of sphere cells from Hut-102 cells in a defined serum-free medium with two differentiation inhibitor CHIR99021 and PD173074 for 14 d; B: result of RT-PCR assay. \* $P < 0.05$  vs Hut-102 cells group.

图2 干细胞特征基因的RT-PCR结果

Fig.2 The mRNA expressions of feature genes from stem cells detected by RT-PCR

### 2.3 Western blot检测Oct4蛋白表达情况

进一步验证了表达干细胞特征基因的微球体对蛋白水平表达的影响。结果显示, 14 d的Hut-102细胞球高表达Oct4蛋白, 与Hut-102细胞相比提高3倍左右, 且差异显著( $P < 0.01$ , 图3)。

### 2.4 流式细胞术检测Hut102细胞球表面标记

为了进一步验证14 d的Hut-102细胞球是否具有肿瘤干细胞特征, 我们进行了CD34、CD44抗体鉴定。CD34、CD44是被广泛证明的Hut-102肿瘤干细胞特征表面标记, 在Hut-102肿瘤干细胞中CD34、CD44表达特征为CD34<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>。流式分析结果表示, 在Hut-102细胞中, 2.24%表现为CD34<sup>+</sup>, 4.8%表现为

表2 微球形成效率(MFE)( $\geq 60 \mu\text{m}$ )

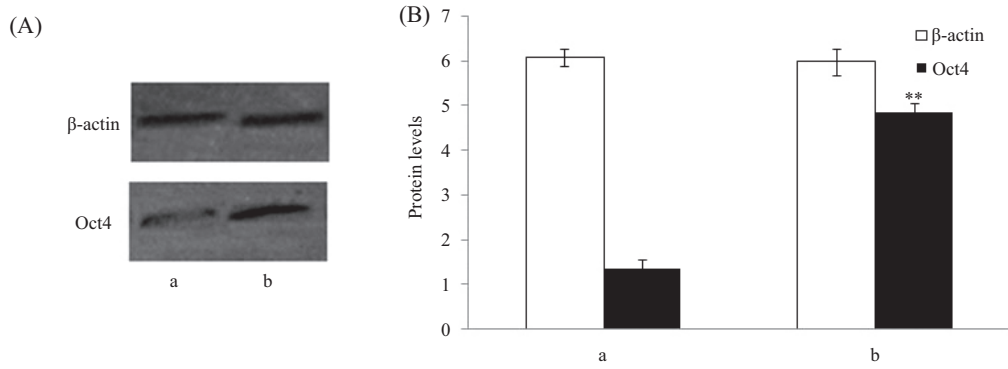
Table 2 Mammosphere formation efficiency (MFE) ( $\geq 60 \mu\text{m}$ )

微球体 Mammosphere	微球体形成率(%) MFE (%)
Hut-102 spheres (cultured after 7 d)	1.93±0.12
Hut-102 spheres (cultured after 14 d)	2.53±0.14

CD44<sup>+</sup>; 在Hut-102细胞球中, 74.20%表现为CD34<sup>+</sup>, 90.82%表现为CD44<sup>+</sup>(图4A), 并且Hut-102细胞球CD34<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>的表达显著高于Hut-102细胞( $P < 0.01$ , 图4B)。

### 2.5 Hut-102细胞球细胞周期检测

Hut-102细胞球中处于G<sub>1</sub>期的细胞为64.09%,

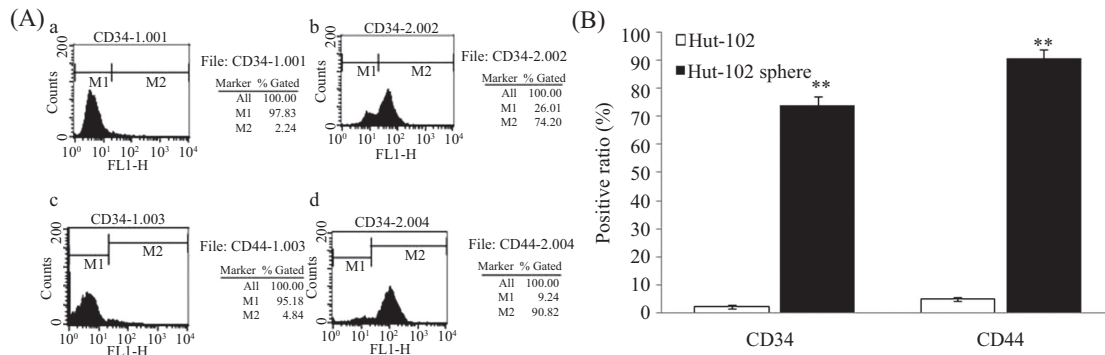


A: Western blot结果。a: 10%胎牛血清培养下的Hut-102细胞, 培养7 d; b: 加入抑制剂CHIR99021和PD173074的无血清培养基下富集14 d的Hut-102细胞球; B: 用Image Lab software分析光密度的结果。\*\* $P < 0.01$ , 与Hut-102细胞组比较。

A: result of Western blot, a: Hut-102 cells were cultured in medium containing 10% fetal bovine serum after 7 d; b: enrichment of sphere cells from Hut-102 cells in a defined serum-free medium with two differentiation inhibitor, CHIR99021 and PD173074, after 14 d; B: result of the optical density with Image Lab software analysis. \*\* $P < 0.01$  vs Hut-102 cells group.

图3 Western blot检测OCT4蛋白表达

Fig.3 The expressions of OCT4 detected by Western blot

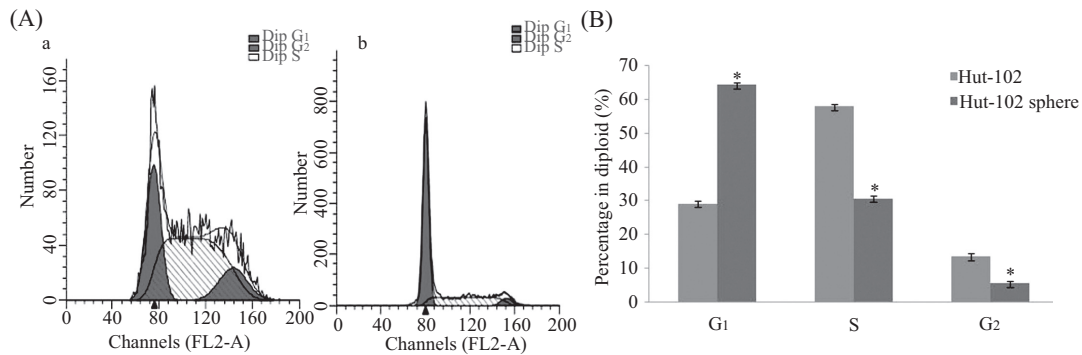


A: CD34、CD44表面抗原流式结果。a、c: 在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养7 d的Hut-102细胞; b、d: 加入抑制剂CHIR99021和PD173074的无血清培养基中富集14 d的Hut-102细胞球; B: CD34、CD44表面抗原统计结果。\*\* $P < 0.01$ , 与Hut-102细胞组比较。

A: flowcytometric analysis of CD34、CD44. a,c: Hut-102 cells were cultured in medium containing 10% fetal bovine serum after 7 d; b,d: enrichment of sphere cells from Hut-102 cells in a defined serum-free medium with two differentiation inhibitor, CHIR99021 and PD173074, after 14 d; B: the statistical result of CD34 and CD44. \*\* $P < 0.01$  vs Hut-102 cells group.

图4 流式细胞术检测细胞表面CD34、CD44表达结果

Fig.4 The expressions of CD34 and CD44 detected by flow cytometry

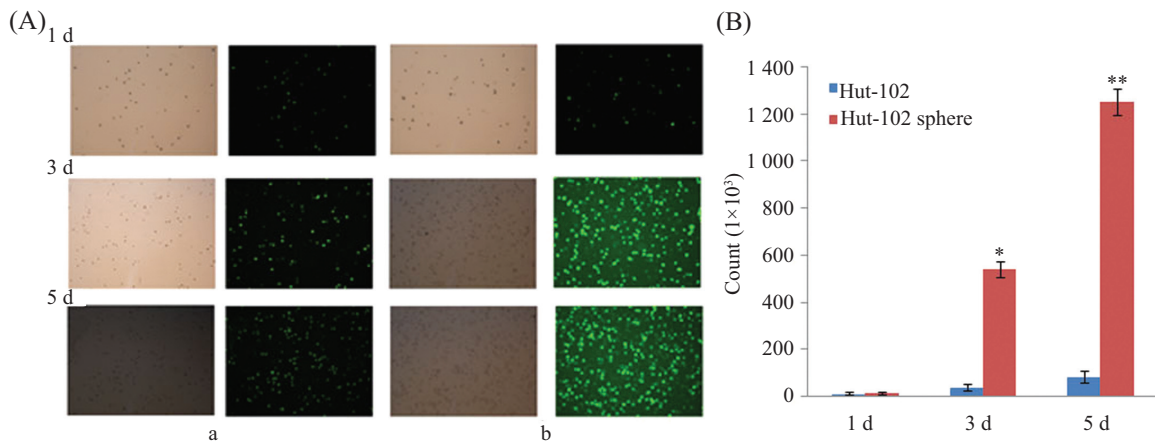


A: 细胞周期检测结果。a: 10%胎牛血清的DMEM培养基中培养的Hut-102细胞; b: 加入抑制剂CHIR99021和PD173074的无血清培养基中富集14 d的Hut-102细胞球。B: 细胞周期统计结果。\* $P < 0.05$ , 与Hut-102细胞组比较。

A: the detection of cell cycle. a: Hut-102 cells were cultured in medium containing 10% fetal bovine serum after 7 d; b: enrichment of sphere cells from Hut-102 cells in a defined serum-free medium with two differentiation inhibitor, CHIR99021 and PD173074, after 14 d; B: the statistical result of cell cycle. \* $P < 0.05$  vs Hut-102 cells group.

图5 PI染色法检测Hut-102细胞球细胞周期

Fig.5 Cell cycle profiles of Hut-102 sphere cells by PI staining

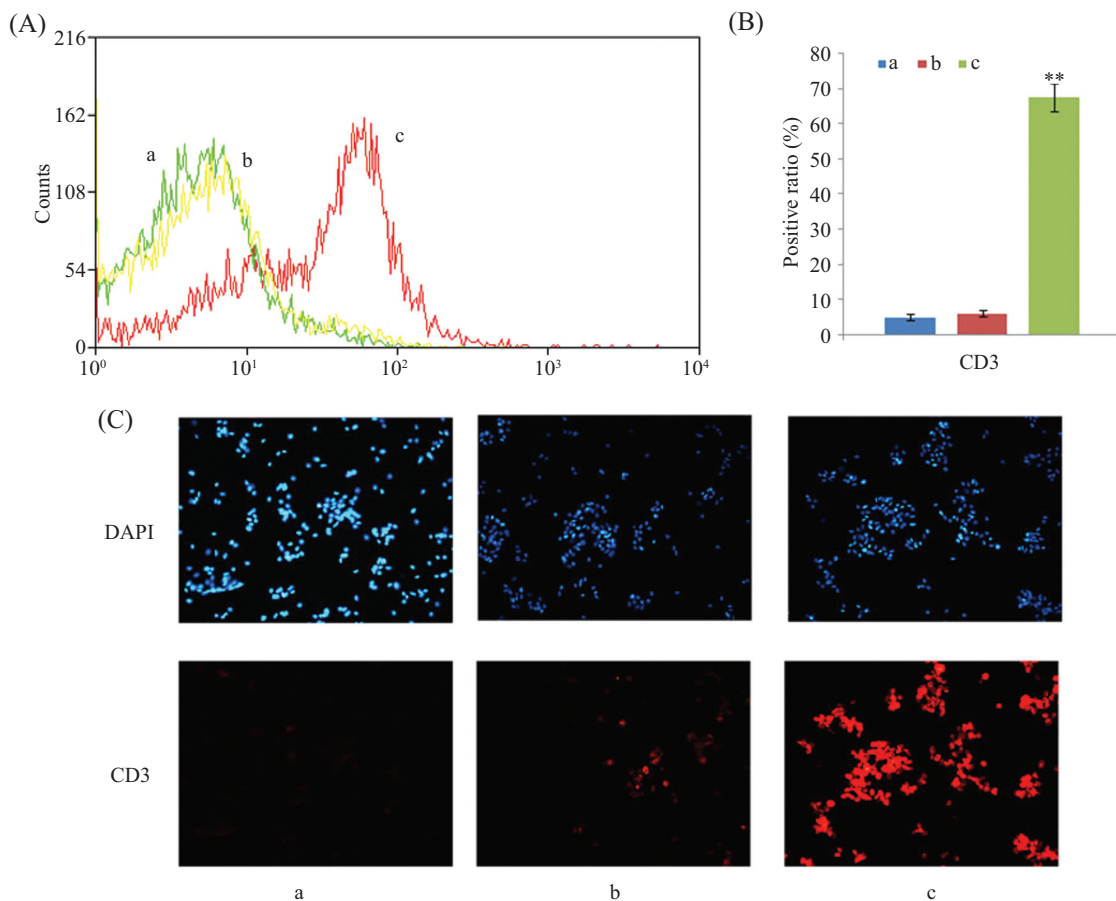


A: 荧光显微镜观察结果。a: 10%胎牛血清的DMEM培养基中培养7 d的Hut-102细胞; b: 加入抑制剂CHIR99021和PD173074的无血清培养基中富集14 d的Hut-102细胞球。B: 细胞计数统计结果。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与Hut-102细胞组比较。

A: the observations of fluorescence, a: Hut-102 cells were cultured in medium containing 10% fetal bovine serum after 7 d; b: enrichment of sphere cells from Hut-102 cells in a defined serum-free medium with two differentiation inhibitor, CHIR99021 and PD173074, after 14 d; B: the statistical result of cell counts. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Hut-102 cells group.

图6 Hut-102细胞球标记CFSE观察细胞增殖能力

Fig.6 Cell proliferation ability of Hut-102 sphere cells by CFSE staining



A: CD3表面抗原流式结果。a: 尾静脉注射PBS; b: 尾静脉注射 $1 \times 10^6$  Hut-102细胞; c: 尾静脉注射 $1 \times 10^6$ 由于加入抑制剂CHIR99021和PD173074富集的Hut-102细胞球; B: CD3表面抗原统计结果。\*\* $P < 0.01$ , 与Hut-102细胞组比较。C: CD3表面抗原免疫组化结果。

A: flowcytometric analysis of CD3. a: PBS injected to the caudal vein of mice; b: Hut-102 cells ( $1 \times 10^6$  cells/mouse), injected to the caudal vein of mice; c: enrichment of sphere cells from Hut-102 cells in a defined serum-free medium with two differentiation inhibitor, CHIR99021 and PD173074 ( $1 \times 10^6$  cells/mouse), injected to the caudal vein of mice; B: the statistical result of CD3. \*\* $P < 0.01$  vs Hut-102 cells group; C: the immunohistochemistry of CD3.

图7 观察Hut-102细胞球在NON/SCID裸鼠体内移植能力

Fig.7 *In vivo* ability of Hut-102 sphere cells transplantation in NON/SCID mice

Hut-102细胞中处于G<sub>1</sub>期细胞为29.06%; Hut-102细胞球中处于S期的细胞为30.56%, 而Hut-102中处于S期细胞为57.71%(图5A), 并且Hut-102细胞球与Hut-102细胞比较, G<sub>1</sub>期有显著性提高, S期有显著性降低( $P<0.05$ , 图5B)。

## 2.6 CFSE标记观察细胞增殖能力

荧光染料CFSE是一种可穿过细胞膜的染料, 常被用来做活细胞检测和观察细胞长期活动, CFSE进入细胞后可以不可逆地与细胞内的氨基结合偶联到细胞蛋白质上, 只有当细胞分裂时, CFSE标记荧光才平均分配至两个子代细胞中。

将14 d的Hut-102细胞球, 消化成单个细胞, 用CFSE标记后, 培养1, 3, 5 d, 用荧光显微镜观察细胞增殖速度, 并进行计数。用Hut-102细胞作为对照细胞。结果显示, Hut-102细胞球分化后细胞增殖速度明显高于Hut-102细胞(图6A), 计数得到Hut-102细胞球分化后细胞与Hut-102细胞相比数量增加15倍( $P<0.01$ , 图6B)。

## 2.7 观察Hut-102细胞球体内移植能力

在NON/SCID裸鼠中, 分别接种Hut-102细胞、Hut-102细胞球, 均接种 $1\times 10^6$ , 喂养两周后, 取20  $\mu$ L全血, 提取淋巴细胞, 用流式细胞仪、免疫组化检测Hut-102细胞特异性表面标记物(CD3)表达量。

流式结果显示, 空白对照组, CD3表面抗原表达量是5.12%; Hut-102细胞组, CD3表面抗原表达量是6.15%; Hut-102细胞球组, CD3表面抗原表达量是67.74%(图7A)。同时, 移植Hut-102细胞球的NON/SCID裸鼠CD3<sup>+</sup>的表达量显著高于Hut-102细胞组( $P<0.01$ , 图7B)。

通过流式-荧光抗体检测蛋白水平, 检测了NON/SCID裸鼠移植Hut-102细胞球两周后, Hut-102肿瘤干细胞特异性表面标记物(CD3)表达。细胞免疫荧光法检测CD3细胞表面蛋白在裸鼠外周血中表达, 可见移植Hut-102细胞球的外周血中布满红色荧光, 而移植Hut-102细胞组和空白对照组未见红色荧光(图7C)。

## 3 讨论

CHIR99021和PD173074分别是GSK-3 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 抑制剂, 与WNT和TGF信号通路相关, 而WNT和TGF信号通路参与细胞生长、发育、再生、代谢、分裂和自我更新过程, 也是肿瘤干细胞自我

更新和致瘤过程中的重要信号通路, 可以起到调控肿瘤干细胞的作用<sup>[18-21]</sup>。本研究在传统的非黏连微球体无血清培养法中加入了上述两种抑制剂, 发现Hut-102细胞在普通非黏连细胞球无血清培养条件下, 富集成功率低, 仅为15%, 而加入了两种抑制剂CHIR99021和PD173074以后, 富集细胞球数量高达60%以上。将富集出的Hut-102细胞球进行肿瘤干细胞基因(*Sox2*、*Oct4*、*Nanog*、*KLF4*、*Bmi1*、*C-myc*)、肿瘤干细胞蛋白(Oct4)、肿瘤干细胞表面抗原(CD34、CD44)及细胞周期、细胞增殖检测, 发现高表达肿瘤干细胞特征基因, 并具有肿瘤干细胞表型特征。通过测定肿瘤细胞体内移植能力是鉴定肿瘤干细胞最具说服力的方法, 肿瘤干细胞具有繁殖能力, 对肿瘤的发生、侵袭、转移和播散起着决定性作用。在NON/SCID裸鼠中, 分别移植Hut-102细胞球和Hut-102细胞, 两周后, 通过检测肿瘤干细胞特异性标记物, 发现Hut-102细胞球在裸鼠体内增殖60%, 并有(67.74 $\pm$ 5.32)%的淋巴细胞表达Hut-102细胞特异性标记物(CD3), 而后者的裸鼠中未检测到。

传统的肿瘤化疗药物的选择主要考虑是否能迅速缩小瘤体, 而忽视了肿瘤干细胞和非致瘤肿瘤细胞药物敏感性的不同, 使药物未能充分杀伤肿瘤干细胞, 这些残余的肿瘤干细胞极可能导致肿瘤复发, 这也解释了为什么目前的药物治疗不能根除实体肿瘤。我们的研究为提高富集肿瘤干细胞的效率提供了一种新方法, 为将来Hut-102肿瘤干细胞的自我更新、耐药及致瘤能力的具体机制的研究奠定了一定的基础。

## 参考文献 (References)

- 1 钱波, 蔡寒青, 冯洁. 干细胞、肿瘤干细胞与肿瘤发生. 世界华人消化杂志 (Qian Bo, Cai Hanqing, Feng Jie. Association of stem cells and cancer stem cells with tumorigenesis. World Chinese Journal of Digestology) 2007; 15(13): 1526-31.
- 2 吴求吉, 杜丽蓓, 周云峰. 皮肤T淋巴细胞瘤的研究进展. 临床肿瘤学杂志 (Wu Qiuji, Du libei, Zhou Yunfeng. Progress of researches on cutaneous T-cell lymphoma. Chinese Clinical Oncology) 2011; 16(3): 278-81.
- 3 吕俊廷, 杨志刚. 白血病干细胞研究现状. 河北医学 (Lv Junting, Yang Zhigang. Leukemia stem cell research present situation. He Bei Medicine) 2011; 17(4): 545-84.
- 4 Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, Grimes BA, Rossi RM, Szilvassy SJ, et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(25): 16220-5.
- 5 Nam-Cha SH, Serrano-Vargas R, Escario E, Azaña JM, Calero-



- Oliver R, Martín AG, *et al.* CD133 expression in normal skin and in epithelial cutaneous tumors. *Biomed Res Int* 2013; 385604.
- 6 Pei S, Minhajuddin M, Callahan KP, Balys M, Ashton JM, Neering SJ, *et al.* Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem* 2013; 288(47): 33542-58 .
- 7 Tarayrah L, Chen X. Epigenetic regulation in adult stem cells and cancers. *Cell Biosci* 2013; 3(1): 41.
- 8 Moumen M, Chiche A, Decraene C, Petit V, Gandarillas A, Deugnier MA, *et al.* Myc is required for betacatenin mediated mammary stem cell amplification and tumorigenesis. *Mol Cancer* 2013; 12(1): 132.
- 9 Aldaz B, Sagarido A, Nogueira L, Guruceaga E, Grande L, Huse JT, *et al.* Involvement of miRNAs in the differentiation of Human glioblastoma multiforme stem-like cells. *PLoS One* 2013; 8(10): e77098.
- 10 George AA, Franklin J, Kerkof K, Shah AJ, Price M, Tsark E, *et al.* Detection of leukemic cells in the CD34(+)CD38(-) bone marrow progenitor population in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001; 97(12): 3925-30.
- 11 de la Mare JA, Sterrenberg JN, Sukhthankar MG, Chiwakata MT, Beukes DR, Blatch GL, *et al.* Assessment of potential anti-cancer stem cell activity of marine algal compounds using an *in vitro* mammosphere assay. *Cancer Cell Int* 2013; 13(1): 39.
- 12 Klopp AH, Lacerda L, Gupta A, Debeb BG, Solley T, Li L, *et al.* Mesenchymal stem cells promote mammosphere formation and decrease E-cadherin in normal and malignant breast cells. *PLoS One* 2010; 5(8): e12180.
- 13 Rappa G, Lorico A. Phenotypic characterization of mammosphere-forming cells from the human MA-11 breast carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 2010; 316(9): 1576-86.
- 14 Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR, Chiapero-Stanke L, *et al.* Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008; 10(3): R52.
- 15 Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 2008; 453(7194): 519-23.
- 16 Hanna J, Markoulaki S, Mitalipova M, Cheng AW, Cassady JP, Staerk J, *et al.* Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 513-24.
- 17 Pardo OE, Latigo J, Jeffery RE, Nye E, Poulosom R, Spencer-Dene B, *et al.* The fibroblast growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks small cell lung cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2009; 69(22): 8645-51.
- 18 Nguyen PT1, Tsunematsu T, Yanagisawa S, Kudo Y, Miyauchi M, Kamata N, *et al.* The FGFR1 inhibitor PD173074 induces mesenchymal-epithelial transition through the transcription factor AP-1. *Br J Cancer* 2013; 109(8): 2248-58.
- 19 Ye S, Tan L, Yang R, Fang B, Qu S, Schulze EN, *et al.* Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes self-renewal of embryonic stem cells from refractory mouse strains. *PLoS One* 2012; 7(4): e35892.
- 20 Liu J, Han G, Liu H, Qin C. Suppression of cholangiocarcinoma cell growth by human umbilical cord mesenchymal stem cells: A possible role of Wnt and Akt Signaling. *PLoS One* 2013; 8(4): e62844.
- 21 Ko BS, Lu YJ, Yao WL, Liu TA, Tzean SS, Shen TL, *et al.* Cordycepin regulates GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling in Human leukemia cells. *PLoS One* 2013; 8(9): e76320.