

人白血病细胞系 KG-1a 中肿瘤干细胞样亚群细胞的初步研究

杨松 钟晓明 张伶* 骆展鹏 何鹏 高玉洁

(重庆医科大学医学检验系, 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室、重庆市重点实验室, 重庆 400016)

摘要 探讨人白血病细胞系 KG-1a 中是否存在具有肿瘤干细胞样生物学特性的亚群细胞。瑞氏染色和吖啶橙染色分别观察白血病细胞系 KG-1a 细胞形态和 RNA 含量; 流式细胞术检测细胞周期分布; 免疫组化和流式细胞术检测 KG-1a 细胞 CD34 的表达; 流式细胞术检测 CD34⁺CD38⁻ 亚群细胞; 烟酸己可碱 Hoechst33342 染色后用荧光显微镜观察 KG-1a 细胞中侧群(side population, SP) 样细胞所占比例。结果显示, 白血病细胞系 KG-1a 细胞核仁易见, 形态原始; 部分细胞 RNA 含量低, 细胞处于 G₀/G₁ 期的比例占 15.5%。绝大多数细胞的胞浆和胞膜皆表达 CD34 抗原, KG-1a 中 CD34⁺ 细胞占 96.3%, CD34⁺CD38⁻ 亚群细胞占 7.02%; SP 样细胞大致比例为 7.60%。本研究表明, 人白血病细胞系 KG-1a 中存在具有肿瘤干细胞样生物学特性的亚群细胞。

关键词 肿瘤干细胞; KG-1a 细胞系; 免疫表型; 侧群细胞

肿瘤干细胞(tumor stem cells, TSC)学说认为肿瘤细胞具有异质性, 在肿瘤组织中存在极少量干细胞样肿瘤细胞亚群, 它具有无限增殖的潜能, 在启动肿瘤形成和生长中起着决定性的作用。TSC 的存在最早在血液系统肿瘤中得到了证实, Bonnet 等^[1]研究急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者时发现, 只有极少量人 AML 骨髓细胞可在非肥胖型糖尿病/重症联合免疫缺陷(nonobese diabetic/severe combined immunodeficient, NOD/SCID)小鼠体内形成人源白血病, 此类白血病细胞免疫表型为 CD34⁺CD38⁻, 是导致 AML 发生的 TSC, 称之为白血病干细胞(leukemia stem cells, LSC)。2003 年起陆续在乳腺癌和脑肿瘤等实体肿瘤组织中成功分离出 TSC^[2,3], 最近研究报道肿瘤细胞系中可能存在 TSC 亚群, 可为 TSC 的分离纯化提供方便的细胞来源^[4,5]。为此我们采用 CD34 阳性的人白血病细胞系 KG-1a 作为研究对象, 通过细胞形态观察、免疫化学染色并结合流式细胞术检测, 明确 CD34⁺CD38⁻ 细胞亚群和 SP 样细胞所占比例, 主要从细胞免疫表型和生物学功能两个方面观察白血病细胞系中是否存在具有 LSC 样生物学特性的亚群细胞, 为下一步从人白血病细胞系 KG-1a 中分离纯化 LSC, 以及深入研究 LSC 的特异信号转导机制和靶向治疗等后续工作打下基础。

1.1 材料

人急性髓细胞性白血病细胞系 KG-1a 购于北京大学第一医院血液学研究室。RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品; 胎牛血清为 PAA 公司产品; 免疫组化试剂盒为北京中杉金桥公司产品; 碘化丙锭(propidium iodide, PI)、鼠抗人 CD45-PC5、鼠抗人 CD34-PE、鼠抗人 CD38-FITC、鼠抗人 IgG1-PC5、鼠抗人 IgG1-PE、鼠抗人 IgG1-FITC 均为 Beckman Coulter 公司产品; Hoechst33342 购自 Sigma 公司; 吖啶橙试剂购自南京凯基公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人急性髓细胞性白血病细胞系 KG-1a, 用内含 15% 灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养, 细胞接种密度为 2×10⁵ 个/ml, 置于 37 °C, 5% CO₂ 温箱中培养, 每 3 天换液一次。

1.2.2 细胞形态观察 KG-1a 细胞培养后离心涂片, 经瑞氏染色, 于 ECLIPSE E200 型光学显微镜(Nikon)下观察细胞形态。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期分布 取对数生长期的细胞, 离心后用 PBS 洗 2 次, 75% 乙醇固定细胞 30 min。上机前离心去乙醇, 用 PBS 洗 2 次, 50 μg/ml PI 染色 30 min, 经尼龙网过滤后, 用 Epics XL-MCL 型

1 材料与方法

收稿日期: 2008-01-17 接受日期: 2008-04-09

重庆市教委科学技术研究基金资助项目(No.KJ050309)

* 通讯作者。Tel/Fax: 023-66785390, E-mail: cqumzshl@sina.com

流式细胞仪(Beckman Coulter)测定。实验结果经配套周期分析软件分析,计算出细胞周期的分布。

1.2.4 免疫细胞化学和流式细胞术检测 CD34 表面分子表达 免疫细胞化学采用 SAP 法,具体步骤为:取对数生长期 KG-1a 细胞,吹打混匀后用 PBS 洗涤 3 次,制成单细胞悬液(10^6 个/ml)后离心涂片。4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 10% 正常羊血清封闭,室温放置 10 min,甩片后加鼠抗人 CD34 一抗 4 °C 温育过夜, PBS 洗涤 3 次,加生物素标记二抗 37 °C 温育 30 min, PBS 洗涤 3 次,加碱磷酶标记链霉素卵白素 37 °C 温育 30 min, PBS 洗涤 3 次,加 DAB 显色 5 min,自来水冲洗,苏木素复染 2 min,自来水冲洗,凉干封片,于光学显微镜下观察,细胞膜和胞浆着红色,胞核着蓝色为 CD34 阳性细胞。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,用已知阳性细胞作为阳性对照。

流式检测取对数生长期 KG-1a 细胞,经 PBS 洗涤 2 次后制成单细胞悬液(10^6 个/ml),加入鼠抗人 CD45-PC5、鼠抗人 CD34-PE 各 20 μ l, 25 °C 避光 25 min, PBS 洗 2 遍后用 400 μ l 含 1% 多聚甲醛的 PBS 液重悬固定细胞,上流式细胞仪测定。同型对照分别为鼠抗人 IgG₁-PC5,鼠抗人 IgG₁-PE,同时设置阴性对照。检测采用 CD45/侧向角(side scatter, SSC) 双参数散点图框定 KG-1a 细胞的位置(设门),再对门内细胞进行荧光抗体的分析。

1.2.5 吖啶橙染色观察细胞内 RNA 含量 KG-1a 细胞吹打混匀后,经试剂盒中专用缓冲液洗涤后,制成约 10^6 个/ml 细胞悬液,按 19:1 的比例加入吖啶橙染液,混匀后室温避光放置 15 min,滴加在玻片上,加盖玻片在 TE2000U 型倒置荧光显微镜(Nikon)下观察。吖啶橙与 DNA 结合发绿色荧光,与 RNA 结合则发橘黄色或橘红色荧光。

1.2.6 流式细胞仪检测 CD34⁺CD38⁻ 亚群细胞 取对数生长期 KG-1a 细胞,经 PBS 洗涤 2 次后制成单细胞悬液(10^6 个/ml),加入鼠抗人 CD45-PC5、鼠抗人 CD34-PE、鼠抗人 CD38-FITC 各 20 μ l, 25 °C 避光 25 min, PBS 洗 2 遍后用 400 μ l 含 1% 多聚甲醛的 PBS 液重悬固定细胞,上流式细胞仪测定。同型对照分别为鼠抗人 IgG₁-PC5、鼠抗人 IgG₁-PE、鼠抗人 IgG₁-FITC,同时设置阴性对照。同样采用 CD45/SSC 双参数散点图进行细胞定位。

1.2.7 Hoechst33342 染色和 SP 样细胞分析 取状态良好的 KG-1a 细胞,离心弃旧培养液后,加入 2 ml 含 2% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,再加入 Hoechst33342

至终浓度为 5 μ g/ml, 37 °C 水浴 90 min,每 15 min 混匀一次, PBS 洗涤 2 次后离心涂片,在倒置荧光显微镜下观察。Hoechst33342 与活细胞核中 DNA 结合后使细胞核着蓝色,而具有外排荧光染料特性的 SP 细胞应不着色或仅着成淡蓝色,在 400 \times 镜下随机取 10 个视野,计算 SP 样细胞所占比例。

2 结果

2.1 细胞形态和胞内 RNA 含量观察

取对数生长期细胞经瑞氏染色在光学显微镜下观察,可见细胞体积较大,核浆比高,核染色质细致疏松,核仁明显,多为 1~3 个,胞浆中无颗粒,伴空泡变性,细胞形态原始,见图 1。吖啶橙染色后倒置荧光显微镜下观察,可见大部分细胞因细胞质中 RNA 含量较高,表现为发绿色荧光同时伴有橘黄色或橘红色荧光,甚至掩盖染料结合 DNA 发出的绿色荧光,整个细胞只表现为发橘黄色或橘红色荧光,而少量细胞仅发绿色荧光(图 2),表明 KG-1a 细胞中有小部分细胞的核酸含量是以 DNA 为主,其 RNA 含量明显低于细胞系中大多数的白血病细胞。

2.2 细胞周期分布

流式细胞仪分析细胞周期见图 3, KG-1a 细胞中处于 G₀/G₁ 期所占比例为 15.5%, S 期细胞最多,占 82.3%,表明大部分细胞处于 DNA 复制活跃状态,而有小部分细胞处于细胞周期的静止状态。

2.3 细胞 CD34 表面分子表达

免疫细胞化学染色可见绝大部分 KG-1a 细胞膜和胞浆为红色,胞核着蓝色,呈阳性反应(图 4)。经流式细胞术检测, CD34⁺ 细胞在 KG-1a 细胞占 96.3% (图 5),位于图中 D2 区域,结果表明绝大部分 KG-1a 细胞表达 CD34 表面分子。

2.4 CD34⁺CD38⁻ 亚群细胞比例

KG-1a 细胞经抗人 CD34 和 CD38 的双抗标记后,流式细胞术检测结果表明, CD34⁺CD38⁻ 亚群细胞位于图中 B4 区域,占 KG-1a 细胞的比例为 7.02%;其余大部分同时表达 CD34 和 CD38 抗原, CD34⁺CD38⁺ 亚群细胞位于图中 B2 区域,所占比例为 85%,见图 6。

2.5 SP 样细胞分析

Hoechst33342 染色后用倒置荧光显微镜观察,在紫外光激发下,可见大多数细胞发强蓝色荧光,而少量细胞发微弱蓝色荧光(箭头所示,图 7A),此即为 SP 样细胞,比例为 7.60%。图 7B 为同一视野在可见光下所见。

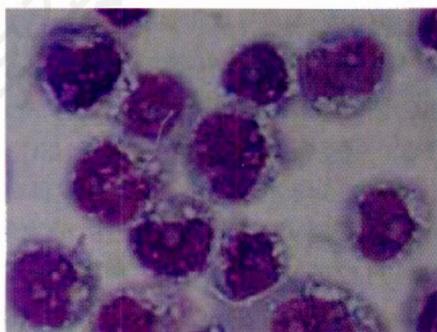


图 1 KG-1a 细胞瑞氏染色(1 000×)

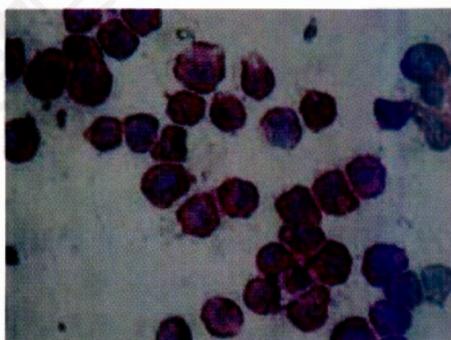


图 4 KG-1a 细胞 CD34 免疫组化染色(1 000×)

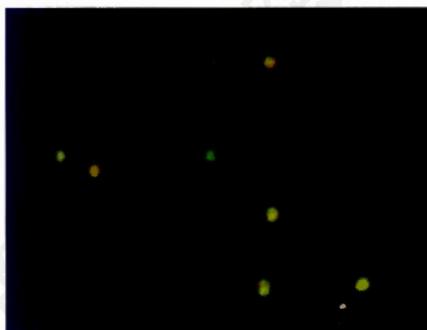


图 2 KG-1a 细胞吡啶橙染色(200×)

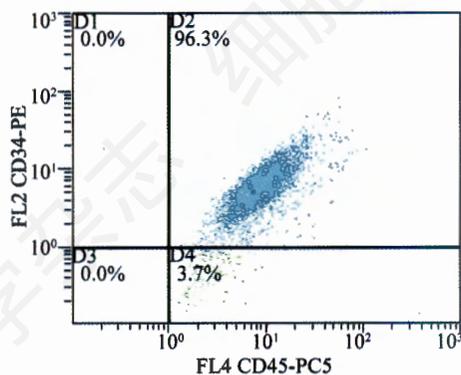


图 5 KG-1a 细胞 CD34 检测流式点图

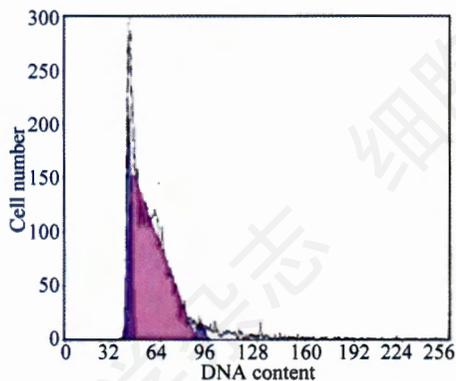


图 3 KG-1a 细胞的细胞周期分布

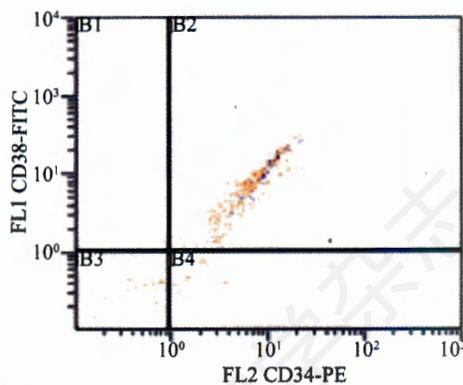


图 6 KG-1a 细胞中 CD34 和 CD38 流式点图

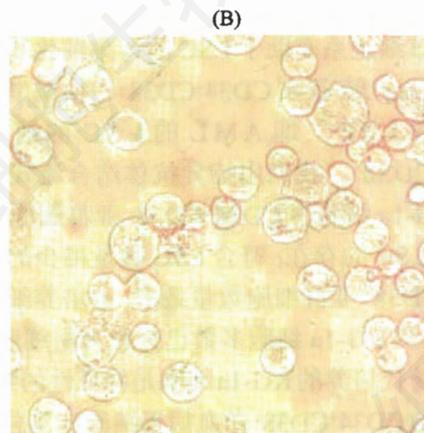
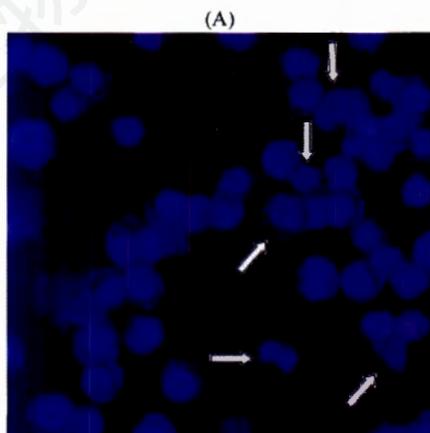


图 7 KG-1a 细胞 Hoechst33342 染色(400×)

A: 在紫外光下; B: 在可见光下。

3 讨论

TSC 的概念早在 20 世纪 70 至 80 年代就有人提出,但直到近几年随着在白血病、乳腺癌和脑肿瘤中相继发现,对它的研究亦逐渐增多。TSC 学说认为肿瘤组织中存在极少量肿瘤细胞,具有自我更新能力和分化潜能,是肿瘤增殖生长、转移和复发的根源,TSC 已成为肿瘤研究的热点。近来,有大量研究结果支持体外传代的头颈肿瘤、胰腺癌等实体肿瘤细胞系中存在少数无限增殖具有 TSC 特性的细胞亚群^[4,5],白血病细胞系同样具有体外无限制传代的特性,且白血病患者骨髓组织中 LSC 的存在早已得到证实,本项目拟通过系列体外实验对人白血病细胞系 KG-1a 中是否存在 LSC 进行初步探讨。

研究表明,KG-1a 是来源于 AML 未分化的 M₀ 亚型白血病细胞系,光镜下细胞形态原始,核仁易见。KG-1a 细胞经吖啶橙染色后,可见有少量细胞仅发出绿色荧光,此类细胞中核酸种类是以 DNA 为主, RNA 含量明显偏低,提示 KG-1a 细胞群具有异质性,其中小部分细胞可能处于静止状态, RNA 转录水平低,符合干细胞的特性。流式细胞仪分析细胞周期可见,KG-1a 细胞中处于 G₀/G₁ 期所占比例为 15.5%,进一步证实了小部分细胞处于细胞周期的静止状态。

CD34 主要在干/祖细胞上表达,随着细胞成熟其表达呈进化性下降,继而消失,故 CD34⁺ 白血病细胞带有更为原始的细胞特性,其中包括 LSC。国内有学者检测了 8 种不同白血病细胞系 CD34 的表达情况,CD34⁺ 细胞比例范围为 0~6.2%,并发现 CD34⁺ 细胞具有 LSC 的特性^[6]。我们通过免疫细胞化学检测到 KG-1a 细胞普遍表达 CD34 表面分子,并经流式检测证实,KG-1a 细胞中 CD34⁺ 细胞占 96.3%。我们前期研究发现 KG-1a 细胞中含有的 CD34⁺ 细胞明显比其他白血病细胞系多(K562 占 0.17%,结果未给出),故选择该细胞系有助于 LSC 的富集纯化和鉴定等研究。Bonnet 等^[7]证实 CD34⁺CD38⁻ 白血病细胞是导致 AML 的 LSC,即 AML 的 LSC 的细胞表型为 CD34⁺CD38⁻。我们用特异抗体结合流式细胞术检测到 KG-1a 细胞中 CD34⁺CD38⁻ 亚群细胞占 7.02%,提示了 LSC 的存在,符合 LSC 数量稀少的特点;而 CD34⁺CD38⁺ 亚群细胞数量最多,占培养细胞比例的 85%,表明 KG-1a 细胞多数已分化为祖细胞阶段,提示体外传代培养的 KG-1a 细胞是异质性的细胞群,除了有多数 CD34⁺CD38⁺ 白血病祖细胞和部分 CD34⁺ 的成熟白血病细胞外,的确存在表达 CD34⁺CD38⁻ 的

LSC 样亚群细胞。

LSC 具有与正常造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)诸多类似的生物学特性,除了两者都表达 CD34⁺CD38⁻ 免疫表型外,LSC 也具有 HSC 外排荧光染料 Hoechst33342 的功能。从而形成目前 TSC 的分离纯化两大策略:基于免疫表型的分离和基于外排 Hoechst33342 的 SP 细胞分选。利用 TSC 膜上 ATP 结合转运蛋白(ATP binding cassette, ABC)能够外排荧光染料 Hoechst33342 而不能发出或仅发出微弱荧光的性质建立起来的方法,最早用于 HSC 的研究。1996 年,Goodell 等^[7]用 Hoechst33342 染色研究小鼠骨髓细胞时,发现有极少一部分细胞可以将进入细胞核的荧光染料排出细胞外,经过紫外激发后用双波长(450 nm 和 675 nm 以上波长)监测,可以观察到这群细胞发出微弱的蓝色和红色荧光,在流式二维分析点阵图上,呈彗星状分布在造血干/祖细胞主群的一侧,因此被称为 SP 细胞,小鼠骨髓中 SP 细胞含量为 0.07%~0.10%,这种 SP 细胞具有重建造血的活性^[8]。最近有研究者将这种方法借鉴用于 TSC 的分离纯化和鉴定。2004 年,Kondo 等^[9]研究了不同肿瘤细胞系是否存在 SP 细胞,发现在人乳腺癌细胞系 MCF7 中占 2%,在小鼠胶质瘤 C6 中占 0.4%,在人腺癌细胞系 HeLa 中 1.2%,并且 C6 胶质瘤细胞系中的 SP 细胞在体外培养条件下,能分化形成神经元和神经胶质细胞,并且 SP 细胞能在裸鼠体内形成肿瘤,推测 SP 细胞含有 TSC。2007 年,Komuro 等^[10]分析了 16 种儿童肿瘤细胞系,在 15 种细胞系中能够检出 SP 细胞,比例在 0.12%~14.6%,也提示并不是每种肿瘤细胞系都能检出 SP 细胞。国内学者利用 SP 分选细胞也有报道,张玥等^[11]从人乳腺癌细胞系 MCF-7 中检测出约占 4% 的 SP 细胞;王宁等^[12]利用 SP 分选技术检测人胃癌 MKN-28 细胞系,SP 细胞亚群占 0.25%。由于 SP 细胞流式分选需要具备紫外激发光源的流式细胞仪,限制了该方法的广泛应用,目前已有利用荧光显微镜观察 SP 样细胞的文献报道^[11]。我们利用荧光显微镜来观察 SP 样细胞的形态及大致比例,该方法的最大优点在于形象直观,能够定性或半定量反映细胞系 KG-1a 中存在具有能够外排 Hoechst33342 特性的侧群细胞。本实验研究结果显示,细胞系 KG-1a 中 SP 样细胞约占 7.60%,结果偏高,可能原因为 SP 细胞是根据 Hoechst33342 发出的两种荧光特性而鉴定出来的,而荧光显微镜只观察到蓝光,故特异性欠佳。

ABC 包括了多药耐药蛋白 1 (multidrug resistance

transporter 1, MDR1)和三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 (ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)/乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein 1, BCRP1)等,能够将外源性化学物质和某些染料泵出细胞外,从而有保护细胞作用,介导了肿瘤耐药性^[13],同时也是 SP 细胞形成的物质基础。在血液系统肿瘤中,SP 细胞的形成与 ABCG2/BCRP1 的作用尤为重要^[14,15]。由此人们推测 SP 表型有可能是潜在的新的干细胞标记^[16,17]。我们正在进行 ABCG2 在细胞系 KG-1a 的表达以及利用这一标记进行 LSC 的筛选等研究工作。

本实验结果表明人白血病细胞系 KG-1a 存在小部分细胞,具有形态原始、RNA 含量低下,处于静止的周期状态;CD34⁺CD38⁻ 细胞和 SP 样细胞分别从细胞免疫表型和生物学功能两个方面鉴定肿瘤干细胞样亚群细胞的存在,但这两种细胞类型所代表的细胞群体不尽相同,SP 细胞可能代表了更为早期的 LSC,各自反映了不同发育阶段的肿瘤干细胞样亚群细胞^[18]。本研究结果可为今后从白血病细胞系中分离 LSC 打下理论基础,同时也克服了从白血病患者骨髓组织中

提取 LSC 进行研究的样本来源困难。当然,后续实验尚需把细胞系中分离的 CD34⁺CD38⁻ 细胞或者 SP 细胞进行移植鼠动物实验,以进一步明确亚群细胞是否具有 LSC 自我更新和无限增殖的生物学特性。

参考文献(References)

- [1] Bonnet D *et al.* *Nat Med*, 1997, **3**: 730
- [2] Al-Hajj M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 3983
- [3] Singh SK *et al.* *Cancer Res*, 2003, **63**: 5821
- [4] Harper LJ *et al.* *J Oral Pathol Med*, 2007, **36**: 594
- [5] Olempska M *et al.* *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, **6**: 92
- [6] 任乐荣等. *解剖学报*, 2005, **36**: 367
- [7] Goodell MA *et al.* *J Exp Med*, 1996, **183**: 1797
- [8] Goodell MA *et al.* *Nat Med*, 1997, **3**: 1337
- [9] Kondo T *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 781
- [10] Komuro H *et al.* *J Pediatr Surg*, 2007, **42**: 2040
- [11] 张 玥等. *上海交通大学学报(医学版)*, 2006, **26**: 507
- [12] 王 宁等. *世界华人消化杂志*, 2007, **15**: 1000
- [13] Gottesman MM *et al.* *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**: 48
- [14] Zhou S *et al.* *Nat Med*, 2001, **7**: 1028
- [15] Zhou S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 12339
- [16] Welm BE *et al.* *Dev Biol*, 2002, **245**: 42
- [17] Welm B *et al.* *Cell Prolif*, 2003, **36**: 17
- [18] Wulf GG *et al.* *Blood*, 2001, **98**: 1166

Identification of Tumor Stem-like Subpopulation Cells in Human Leukemia Cell Lines KG-1a

Song Yang, Xiao-Ming Zhong, Ling Zhang*, Zhan-Peng Luo, Peng He, Yu-Jie Gao

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To identify tumor stem-like subpopulation cells in human leukemia cell lines KG-1a, we observed the morphology and RNA content of KG-1a cells respectively using Wright's staining and acridine orange staining, then detected the cell cycle distribution and the CD34⁺CD38⁻ subpopulation cells of KG-1a cells with flow cytometry, and also determined the expression of CD34 with immunohistochemistry assay and flow cytometry, at last detected the side population-like cells in KG-1a cells using fluorescent microscope after Hoechst33342 staining. It was shown that KG-1a cells were primitive and nucleoli were apparent; RNA content in small subpopulation cells was low, and the G₀/G₁ cells were 15.5% about KG-1a cells. CD34 were generally expressed in cytoplasm and on membrane of KG-1a cells, the percentage of CD34⁺ cells was 96.3%, and the proportion of CD34⁺CD38⁻ cells was 7.02%; the percentage of side population-like cells in KG-1a cells was 7.60%. Our study suggested that tumor stem-like subpopulation cells existed in human leukemia cell lines KG-1a.

Key words tumor stem cells; KG-1a cells lines; immunophenotype; side population cells

Received: January 17, 2008 Accepted: April 9, 2008

This work was supported by the Science and Technology Research Program of Education Commission Foundation of Chongqing City (No.KJ050309)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-23-66785390, E-mail: cqumszhl@sina.com