

5-FU 富集人白血病细胞系 KG-1a 中 肿瘤干细胞样亚群细胞

杨松 钟晓明 张伶* 高玉洁 骆展鹏 何鹏

(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 探讨利用细胞周期特异性药物 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)从人白血病细胞系 KG-1a 中富集肿瘤干细胞样亚群细胞。体外药物敏感试验确定 5-FU 的最佳作用浓度和作用时间; KG-1a 细胞经 5-FU 药物处理后, 流式细胞术检测存活细胞群中 CD34⁺CD38⁻亚群细胞比例; 吖啶橙染色观察细胞内的核酸组成; RT-PCR 半定量检测细胞内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) mRNA 的表达; 半固体培养观察细胞的集落形成能力。结果显示, 50 μg/ml 5-FU 作用 KG-1a 细胞 4 天后, CD34⁺CD38⁻亚群细胞比例提高 10 倍以上; 吖啶橙染色可见大部分细胞核酸以发出绿色荧光的 DNA 为主, RNA 含量低; 此类细胞高表达 ABCG2 mRNA 水平; 而药物处理后细胞集落形成数量较未处理细胞明显减少。研究结果表明, 利用 5-FU 能够杀死增殖期细胞的性质, 成功建立体外药物筛选富集人白血病细胞系 KG-1a 中肿瘤干细胞样亚群细胞的方法。

关键词 白血病干细胞; 5-氟尿嘧啶; KG-1a 细胞系; 集落形成; 耐药

肿瘤干细胞(tumor stem cell, 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, 此类细胞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。Bonnet 等^[1]最早在血液系统肿瘤中证实了 TSC 的存在, 发现只有极少量人急性髓性白血病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⁻, 是导致白血病发生的 TSC, 称之为白血病干细胞(leukemia stem cell, LSC)。

目前认为 LSC 多处于静止期, 并且表达 ATP 结合转运蛋白(ATP binding cassette, ABC)而外排药物, 导致对化疗药物不敏感; 但却有着干细胞样的自我更新和多向分化能力, 维持着白血病的发生发展。2003 年起陆续在乳腺癌^[2]和脑肿瘤^[3]等实体肿瘤组织中成功分离出 TSC, 最近研究报道实体肿瘤细胞系中也存在 TSC 亚群, 可为 TSC 的分离纯化提供方便的细胞来源^[4,5]。我们前期研究工作初步探明了 CD34 阳性的人白血病细胞系 KG-1a 中存在一小部分细胞为 LSC 样细胞^[6]。在此研究基础之上, 本研究拟根据 LSC 耐药的生物学特性, 通过细胞周期特异性药物 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)杀死大部

分增殖期细胞, 富集 KG-1a 细胞系中的 LSC 样细胞亚群, 并对筛选出的细胞从免疫表型、RNA 含量、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)表达、集落形成等几个方面进行 LSC 生物学性质鉴定。

1 材料与方法

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; RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品; 胎牛血清为 PAA 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; 5-FU 购自 Sigma 公司; 吖啶橙试剂购自南京凯基公司; RNase 购自上海华舜公司; ABCG2 引物为 Invitrogen 公司合成; RT-PCR 试剂为 TaKaRa 公司产品。

收稿日期: 2008-06-18 接受日期: 2008-09-03

国家自然科学基金(No.30872418)和重庆市教委科学技术研究基金(No.KJ050309)资助项目

* 通讯作者。Tel/Fax: 023-68485223, E-mail: cqumszhl@sina.com

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 RPMI 1640 培养基培养, 细胞接种密度为 2×10^5 个/ml, 置于 37°C , 5% CO_2 温箱中培养, 每 3 天换液一次。

1.2.2 药敏实验确定 5-FU 富集 LSC 样细胞亚群的最佳浓度和作用时间 收集对数生长期细胞以 2×10^5 个/ml 浓度接种于 5 ml 培养液中。同时加入终浓度为 $10 \sim 80 \mu\text{g/ml}$ 的 5-FU 于 37°C 、5% CO_2 中常规培养 24 h, 每个药物浓度接种 3 个培养瓶。台盼蓝染色计数求平均细胞存活数, 绘制量效曲线, 确定有效杀死 KG-1a 细胞系中增殖期细胞的最小药物浓度。以此浓度把 5-FU 加入 KG-1a 细胞悬液, 连续培养 6 天, 每天取出细胞进行台盼蓝染色计数, 绘制细胞生长曲线, 确定药物的最佳作用时间。根据上述实验确定的 5-FU 最佳浓度和作用时间, 富集 LSC 样细胞亚群。

1.2.3 流式细胞仪检测药物处理前后细胞系中 $\text{CD}34^+\text{CD}38^-$ 亚群细胞比例变化 取 5-FU 药物未处理组与处理组细胞, 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 $20 \mu\text{l}$, 25°C 避光 25 min, PBS 洗 2 遍后用 $400 \mu\text{l}$ 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。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。

1.2.4 吖啶橙染色观察药物处理前后细胞内核酸组成的变化 取 5-FU 药物未处理组与处理组细胞吹打混匀后, 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。

1.2.5 RT-PCR 半定量检测药物处理前后细胞内 ABCG2 mRNA 的表达 用 RNAse 分别提取 5-FU 药物未处理组与处理组细胞总 RNA 后, 立刻进行逆转录, 操作按说明书要求进行。根据 GenBank ABCG2 mRNA 序列和 β -肌动蛋白 mRNA 设计合成引物, ABCG2 引物序列为 5'-GCTGGGTAATCCCCAGGCC-TCT-3', 5'-AGAGATCGATGCCCTGCTTTACCA-3';

内参照 β -肌动蛋白的引物序列为 5'-AGCGAGCAT-CCCCCAAAGTT-3', 5'-GGGCACGAAGGCTCATC-ATT-3'。PCR 按常规条件进行, 取 $10 \mu\text{l}$ PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶成像分析系统(BIO RAD)检测 ABCG2 与 β -肌动蛋白光密度值, 计算 ABCG2/ β -肌动蛋白 mRNA 相对量的变化。

1.2.6 半固体培养观察药物处理前后细胞集落形成能力的变化 取 5-FU 药物未处理组与处理组细胞, 用新鲜 RPMI 1640 培养液制成单细胞悬液。采用甲基纤维素半固体法培养集落, 培养体系含 0.9% 甲基纤维素, 10% 胎牛血清及 1×10^3 个/ml 细胞密度。按 1000 个/皿培养, 两组各 3 皿。 37°C 培养 14 天后, 在 XDS-1B 型倒置显微镜下观察集落形成情况。计数细胞集落, 每集落细胞数 ≥ 50 个。集落形成率 = 集落数 / 1000 $\times 100\%$ 。

1.2.7 统计学分析 实验所得数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示, SPSS 11.0 统计分析软件包进行数据的正态性、方差齐性检验及独立样本的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-FU 富集 LSC 样细胞亚群的最佳浓度和作用时间

不同浓度 5-FU 处理 KG-1a 细胞 24 h 后, 可见药物对细胞的杀死作用在 $10 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 浓度范围内呈剂量依赖关系(图 1), 其中 $50 \mu\text{g/ml}$ 是使 KG-1a 细胞存活数达到最低值的最小药物浓度, 据此确定为 5-FU 的最佳作用浓度。在此浓度作用下连续培养细胞 6 天, 发现 KG-1a 细胞存活数呈时间依赖关系, 在第 4 天达到最低值(图 2)。因此确定 $50 \mu\text{g/ml}$ 5-FU 作用 KG-1a 细胞 4 天为富集 LSC 样细胞的最佳实验条件。

2.2 5-FU 处理前后 KG-1a 细胞中 $\text{CD}34^+\text{CD}38^-$ 亚群细胞比例变化

KG-1a 细胞经抗人 CD34 和 CD38 双抗标记后流

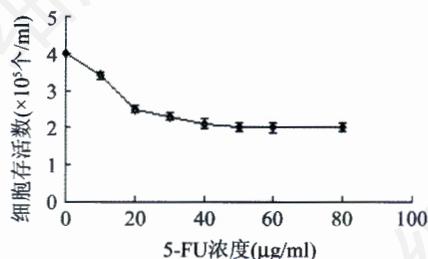


图 1 不同浓度 5-FU 作用 24 h 后 KG-1a 细胞的存活数

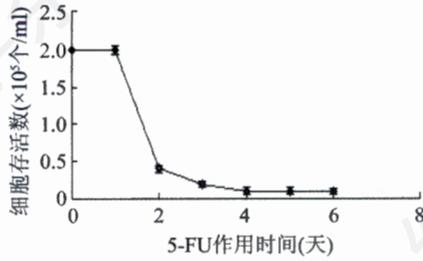


图2 50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 作用不同时间后 KG-1a 细胞的存活数

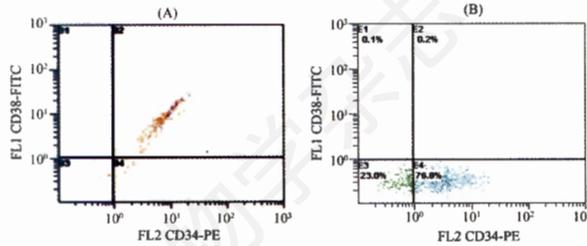


图3 5-FU 处理前后 KG-1a 细胞中 CD34⁺CD38⁻ 亚群细胞流式图

A: 5-FU 未处理组; B: 5-FU 处理组。

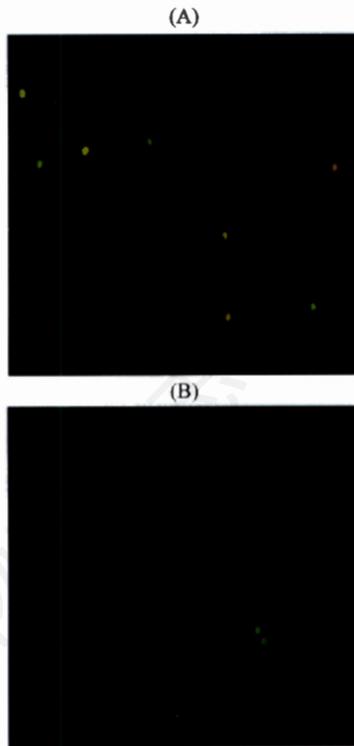


图4 5-FU 处理前后 KG-1a 细胞内核酸组成的比较(吡啶橙染色, 200 \times)

A: 5-FU 未处理组; B: 5-FU 处理组。

式细胞术检测结果表明, 5-FU 未处理时 KG-1a 细胞中以 CD34⁺CD38⁺ 祖细胞亚群为主, 所占比例为 85%, 而 CD34⁺CD38⁻ 干细胞亚群仅占 7.02% (图 3A)。50 $\mu\text{g/ml}$ 5-FU 作用 4 天后, KG-1a 细胞中 CD34⁺CD38⁻ 亚群细胞比例为 76.8%, 而 CD34⁺CD38⁺ 亚群细胞为

0.2%, 同时可见有 23.0% 的 CD34⁻CD38⁻ 亚群细胞(图 3B)。提示 5-FU 处理后 KG-1a 细胞系中具有 CD34⁺CD38⁻ 表型特征的 LSC 亚群细胞比例明显升高。

2.3 5-FU 处理前后 KG-1a 细胞核酸组成变化

吡啶橙染色后倒置荧光显微镜下观察, 5-FU 处理前大部分 KG-1a 细胞表现为发橘黄色或橘红色荧光, 其中部分细胞发橘黄色或橘红色荧光的同时伴有绿色荧光, 少数细胞仅发绿色荧光, 表明未处理的 KG-1a 细胞中仅有小部分细胞核酸含量是以发绿色荧光

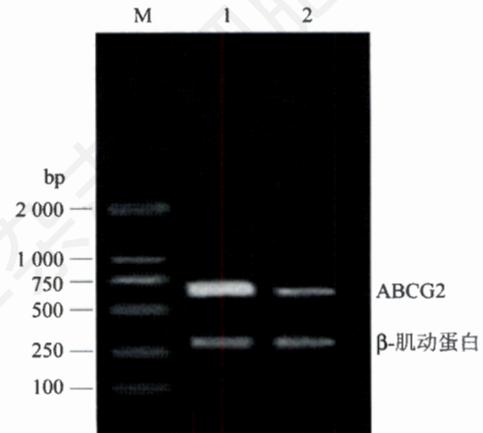


图5 5-FU 处理前后 KG-1a 细胞 ABCG2 mRNA 的表达

M: marker; 1: 5-FU 处理组; 2: 5-FU 未处理组。

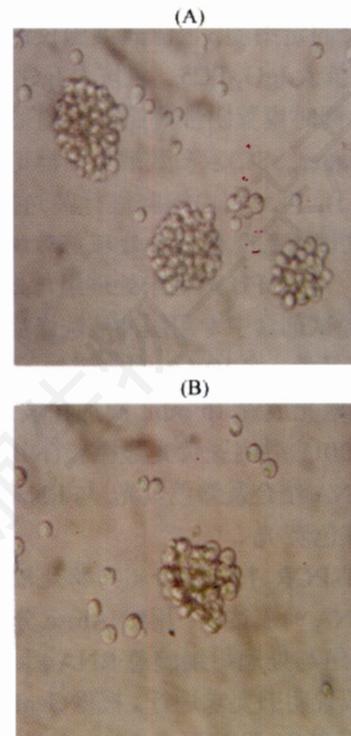


图6 5-FU 处理前后 KG-1a 细胞半固体培养的集落形成 (400 \times)

A: 5-FU 未处理组; B: 5-FU 处理组。

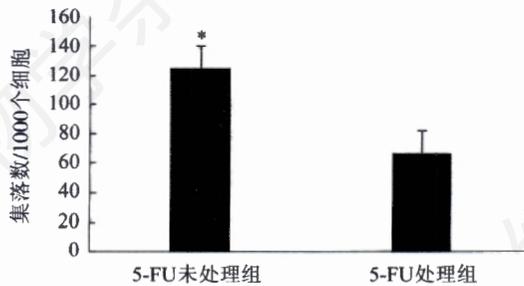


图7 5-FU处理前后 KG-1a 细胞半固体培养基集落形成数比较
* 表示两组有显著差异($P < 0.01$)。

的 DNA 为主, 其 RNA 含量少(图 4A); 处理后 KG-1a 细胞大部分发出绿色荧光, 核酸组成中 RNA 含量明显低于 DNA (图 4B)。提示经药物富集的亚群细胞大多处于静止状态, RNA 转录水平低, 符合干细胞的特性。

2.4 5-FU 处理前后 KG-1a 细胞 ABCG2 mRNA 表达量的改变

ABCG2 的 PCR 产物大小为 701 bp, β -肌动蛋白的 PCR 产物大小为 285 bp。PCR 产物经凝胶电泳图像显示 5-FU 处理组 KG-1a 细胞的 ABCG2 条带丰度明显强于未处理组细胞(图 5)。凝胶成像分析结果显示: 5-FU 处理组细胞 ABCG2 mRNA 相对量为(1.306 \pm 0.120), 高于 5-FU 未处理组细胞(0.346 \pm 0.075), 差异有显著性($P < 0.05$)。

2.5 5-FU 处理前后 KG-1a 细胞体外集落形成变化

5-FU 处理前后的 KG-1a 细胞接种于半固体培养基中培养, 结果发现 5-FU 处理前 KG-1a 细胞的体外集落形成能力较强, 集落形成率为(12.5% \pm 9.6%), 集落形成细胞数为 50~80 个; 5-FU 处理后集落形成反而减少, 半固体培养基中的细胞团以小丛为主, 集落形成率为(6.7% \pm 5.0%) (图 6)。两组集落形成率比较有显著差异($P < 0.05$) (图 7)。

3 讨论

TSC 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, 如何从肿瘤组织中富集数量极少的 TSC 是研究面临的首要问题。近年来, 有大量研究结果支持体外传代的头颈肿瘤^[4]、胰腺癌^[5]等实体肿瘤细胞系中存在少数具有 TSC 特性的细胞亚群; 在人乳腺癌细胞系 SK-3rd 中大约 16% 的细胞具有乳腺癌干细胞的生物学特性^[6]。我们前期研究证实人白血病细胞系 KG-1a 中存在少数具有 LSC 样特性的细胞亚群, 是分离 LSC 和后续研究的理想细胞模型^[7]。为此本研究采用药物进一步富集 KG-

1a 细胞系中的 LSC 亚群细胞。

根据 LSC 多处于静止期和耐药特性, 我们设想通过细胞周期特异药物 5-FU 体外杀死 KG-1a 细胞系中增殖期细胞, 从而达到富集 LSC 样细胞亚群的目的。5-FU 是一种嘧啶拮抗剂, 作用靶点是胸腺嘧啶合成酶(thymidylate synthase, TS), TS 主要催化一磷酸脱氧尿嘧啶(deoxyuridine monophosphate, dUMP)甲基化生成一磷酸脱氧胸腺嘧啶(deoxythymidine monophosphate, dTMP), 后者是 DNA 合成的主要原料。5-FU 在细胞内的活性产物氟尿嘧啶一磷酸脱氧尿苷(fluorodeoxyuridine monophosphate, FdUMP)与 TS 形成紧密的共价结合, 抑制 TS 酶活性, 进而使 dTMP 合成受阻, DNA 合成中断, 增殖期肿瘤细胞停止分裂增殖, 最终走向死亡。5-FU 是临床上最常用的治疗中晚期实体瘤的化疗药物之一, 同时 5-FU 常用于正常造血干细胞生物学特性的研究。祝瑾等^[8]在研究 5-FU 诱导人 T 淋巴细胞白血病细胞系 Jurkat 凋亡的分子机制时发现, 5-FU 作用 Jurkat 细胞 48 h 的半数致死量(IC₅₀ 值)为 20 μ g/ml。鉴于此, 我们在 0~80 μ g/ml 药物浓度范围内摸索了 5-FU 作用 24 h 与 KG-1a 细胞存活数之间的量效关系, 结果发现在药物浓度低于 50 μ g/ml 时, KG-1a 细胞存活数呈剂量依赖关系, 随着 5-FU 浓度逐渐增加, KG-1a 细胞存活数逐渐下降, 当 5-FU 浓度为 50 μ g/ml 时, KG-1a 细胞存活数达到最低值, 确定有效杀死 KG-1a 细胞系中增殖期细胞的最小药物浓度为 50 μ g/ml。在此浓度作用下, KG-1a 细胞存活数呈时间依赖关系, 于第 4 天达到最低值, 为了有效杀死 KG-1a 细胞系中增殖期细胞且对 LSC 的损伤降低到最小程度, 确定 50 μ g/ml 5-FU 作用 4 天为筛选 LSC 样细胞的最佳实验条件。

进一步对 5-FU 富集的亚群细胞进行 LSC 相关生物学特性研究。流式细胞术检测发现 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(85%), 表明 KG-1a 细胞群中多数已分化到祖细胞阶段。而 5-FU 处理后 CD34⁺CD38⁻ 亚群细胞占 76.8%, 较未处理前富集 LSC 10 倍以上; 同时出现 23% 的 CD34⁻CD38⁻ 亚群细胞, 目前认为该亚群细胞性质不太确定, 可能代表了比 CD34⁺CD38⁻ 亚群细胞更为原始的 LSC^[9]。LSC 与造血干细胞一样大多处于静止期状态, 其 RNA 含量低。实验发现用 5-FU 富集后的细胞大多发出明显的绿色荧光, 提示细胞中核酸种类是以 DNA 为主, RNA 含量明显偏低, RNA 转录水平低, 符合干细胞的特性。

已知LSC膜上存在多种ABC,特别是ABCG2的表达,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^[10]。根据LSC膜上高表达ABCG2的性质,人们提出ABCG2可能成为潜在的干细胞新标记^[11]。我们通过5-FU杀死增殖期细胞后,利用RT-PCR检测到存活细胞亚群高表达ABCG2 mRNA,表明存活细胞群体中富含LSC样细胞。

集落形成试验是测定单个细胞增殖能力的有效方法之一,其基本原理是单个细胞在体外持续增殖6代以上,其后代所组成的细胞群体,称为克隆或集落。一般认为只有干细胞才具有分化、形成集落的能力^[12]。我们通过半固体培养法观察到未经5-FU处理的KG-1a细胞集落形成率为(12.5%±9.6%),表明KG-1a细胞中存在一部分LSC样细胞亚群;而5-FU处理KG-1a细胞后集落形成率为(6.7%±5.0%)。理论上,5-FU杀死增殖期细胞后LSC样细胞得到富集,集落形成率应该增高,但实验结果集落形成率反而减少,原因有待进一步分析。

综上所述,作者通过体外药物敏感试验摸索出5-FU筛选KG-1a中LSC样细胞的最佳条件,并对筛选出的细胞从免疫表型、RNA含量、ABCG2表达和集落形成等几个方面进行LSC生物学性质的鉴定。研究结果初步表明5-FU能够富集人白血病细胞系KG-1a中的LSC样亚群细胞,而后续实验尚需在NOD/SCID移植鼠模型中进一步明确其自我更新能力和致瘤能力,这也是下一步研究的方向。

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] Yu FY *et al. Cell*, 2007, 131: 1109
- [7] 杨松等. *细胞生物学杂志*, 2008, 30: 527
- [8] 祝瑾等. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13: 586
- [9] Goodell MA. *Blood*, 1999, 94: 2545
- [10] Gottesman MM *et al. Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 48
- [11] Raaijmakers MH *et al. Clin Cancer Res*, 2005, 11: 2436
- [12] 司徒镇强等. *细胞培养*, 西安: 世界图书出版公司, 2004, 198

Enrichment of Tumor Stem-like Subpopulation Cells with 5-FU in Human Leukemia Cell Lines KG-1a

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

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

Abstract To enrich tumor stem cell-like subpopulation in human leukemia cell lines KG-1a with 5-fluorouracil (5-FU), optimal concentration and effect time of 5-FU were determined with *in vitro* drug sensitivity assay. The CD34⁺CD38⁻ subpopulation in the enriched subpopulation of KG-1a cells was detected with flow cytometry. The RNA content of enriched subpopulation cells was measured by using acridine orange staining, and their expression of ABCG2 mRNA by RT-PCR. The colony-forming ability of this subpopulation cells was evaluated by semi-solid culturing. It was indicated through our research that after treatment of KG-1a cells with 50 μg/ml 5-FU for 4 days, the proportion of CD34⁺CD38⁻ cells in enriched subpopulation was elevated by more than 10 folds; The RNA content of enriched subpopulation cells was low, but the ABCG2 mRNA was highly expressed. The colony forming ability of enriched subpopulation cells was lower than of non-enriched KG-1a cells. Our study suggested that utilizing 5-FU for killing most proliferating cells, we successfully established the method in which selecting and enriching tumor stem-like subpopulation cells in human leukemia cell lines KG-1a with 5-FU.

Key words leukemia stem cells; 5-fluorouracil; KG-1a cell lines; colony forming; drug resistance

Received: June 18, 2008 Accepted: September 3, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30872418) and the Science and Technology Research Program of Education Commission Foundation of Chongqing City (No.KJ050309)

*Corresponding author. Tel/Fax: 023-66785390, E-mail: cqumszhl@sina.com