

新型悬浮细胞连续培养法分离小鼠Lewis 肺癌干细胞及鉴定

刘永利 孔亮盛 孙志卫 王健宇* 邢若曦*

(重庆医科大学生命科学研究院, 肿瘤干细胞基础转化研究实验室, 重庆 400016)

摘要 该文主要探索从小鼠Lewis肺癌亲代细胞系(Lewis lung carcinoma parental cell line, LLC-Parental)中分离能够在体外长期培养的肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的方法。在体外贴壁条件下培养LLC-Parental细胞, 通过连续富集悬浮生长的细胞, 经过8代后, 成功富集出可悬浮成球的小鼠Lewis肺癌干细胞样细胞株(LLC-spheroid enrichment, LLC-SE)。为了验证其干细胞特性, 我们使用荧光定量PCR法(Real-time PCR)检测表示干细胞特性的基因*Bmi1*(B-cell-specific moloney murine leukemia virus insertion site 1)、*Cd133*(cluster of differentiation-133)、*Aldh1a1*(aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1)、*Oct4*(octamer-binding transcription factor 4)、*Sox2*(sex-determining region Y box 2)、*Nanog*和*Klf4*(Kruppel-like factor 4)的表达。6孔板琼脂成球实验检测其增殖和悬浮成球能力。96孔板单细胞克隆形成实验检测单个细胞的克隆形成能力。裸鼠皮下移植这一干细胞特性检测的经典模型检测其体内致瘤能力以及C57同源小鼠左肺原位种植模型检测其肿瘤转移能力。Real-time PCR结果显示, LLC-SE细胞中*Bmi1*的表达水平显著高于LLC-Parental细胞。6孔板琼脂成球实验、96孔板单细胞克隆形成实验表明, LLC-SE细胞的悬浮成球能力和单细胞克隆能力显著高于LLC-Parental细胞。动物实验表明, LLC-SE细胞的体内致瘤能力、肿瘤转移能力强于LLC-Parental细胞。该文首次运用连续8次悬浮聚球法分离获得大量的可稳定传代的具有干细胞特性的LLC-SE细胞, 为建立肿瘤干细胞细胞模型提供了新的方法, 为进一步研究肿瘤干细胞的生物学特性奠定了基础。

关键词 小鼠肺癌干细胞; 悬浮聚球; *Bmi1*

Isolation of Lewis Lung Carcinoma Cancer Stem Cells by Consecutive Spheroid Enrichment and Characterization of Their Stem Cell Properties

Liu Yongli, Kong Liangsheng, Sun Zhiwei, Wang Jianyu*, Xing Ruoxi*

(Laboratory of Translational Cancer Stem Cell Research, Institute of Life Sciences,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract We explored a new method for isolation and identification of cancer stem cells (CSCs) which could be passaged continuously from parental Lewis lung carcinoma cells (LLC-Parental). The LLC-spheroid enrichment (LLC-SE) culture can be established through 8 consecutive rounds of collecting floating cells that become independent of attachment for growth and form spheroids from the LLC-Parental cells. For stem cell

收稿日期: 2016-09-08 接受日期: 2016-12-01

国家自然科学基金(批准号: 81272405)和重庆市教委2015年度科学技术研究项目(批准号: KJ1500222)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68812290, E-mail: wjy2003123@163.com; Tel: 023-68486602, E-mail: rosiexing@163.com

Received: September 8, 2016 Accepted: December 1, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272405) and 2015 Science and Technology Research Project of Chongqing Municipal Education Commission (Grant No.KJ1500222)

*Corresponding authors. Tel: +86-23-68812290, E-mail: wjy2003123@163.com; Tel: +86-23-68486602, E-mail: rosiexing@163.com

网络出版时间: 2016-12-28 16:27:53 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161228.1627.016.html>

properties verification, the expressions of pluripotent genes *Bmi1* (B-cell-specific moloney murine leukemia virus insertion site 1), *Cd133* (cluster of differentiation-133), *Aldh1a1* (aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1), *Oct4* (octamer-binding transcription factor 4), *Sox2* (sex-determining region Y box 2), *Nanog* and *Klf4* (Kruppel-like factor 4) were measured by Real-time PCR. The abilities of proliferation and spheroid formation were assessed by 6-wells plate agar spheroid formation assay. The ability of single cell cloning was analyzed by 96-wells plate single cell cloning assay. *In vivo* tumorigenicity was measured by nude mice subcutaneous transplantation which was considered as the classical model for stem cell property assessment. And tumor metastasis ability was measured by left lung orthotopic implanting in syngeneic C57 mice. The results of Real-time PCR showed that the expression of *Bmi1* in LLC-SE was much higher than that in LLC-Parental. The results of spheroid formation assay and cloning assay showed that spheroid formation ability and single cell cloning ability of LLC-SE were better than that of LLC-Parental. The results of *in vivo* experiments showed that tumorigenicity and metastasis ability of LLC-SE were better than that of LLC-Parental. In this work, we developed a new method for the isolation of long-lasting CSCs from cultured tumor cells. This method will allow the generation of cellular models for mechanistic characterization of CSCs.

Keywords mouse lung cancer stem cell; spheroid enrichment; *Bmi1*

癌症是一个全球性的健康难题,它时刻威胁着我们的生命。近年来研究表明,肿瘤的生长很可能是由一小群叫做肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的细胞所驱动^[1-3]。CSCs又被叫做肿瘤起始细胞(cancer initiating cells),它具有正常干细胞的特征,如自我更新、无限增殖及表达一些特殊的多能性基因和表面抗原^[4-5]。基于肿瘤干细胞理论,目前对于癌症治疗的失败很可能是由于没有针对肿瘤干细胞的靶向治疗,传统的化疗药物旨在杀死增殖旺盛的肿瘤细胞。肿瘤干细胞往往呈现出高自我更新和低增殖的特性,从而逃脱传统的治疗。有报道认为,化疗药物的使用会促进CSCs的生长,导致肿瘤的复发和转移^[6]。因此,阐明CSCs生长的机制对于癌症的有效治疗至关重要。

但是,如何分离并鉴定CSCs也是目前的一大难题。传统分离CSCs的方法包括:(1)利用细胞表面抗原进行流式分选或磁珠分选^[7-8],流式分选方法分选纯度高、特异性强,但是成本高、对细胞物理损伤大、无菌操作过程繁琐且易污染、获得细胞数目有限且不能连续培养或建立稳定的细胞模型用于机制研究;(2)利用ABC转运蛋白(ATP binding cassette transporter proteins)ABCG2亚家族(ATP binding cassette subfamily G member 2)外排药物的能力筛选侧群细胞(side population cells, SP cells)。侧群细胞与CSCs的耐药性有一定关系^[9]。但是,此方法分选特异性和纯度较低,只能分选出部分干细胞,并且Hochest33342对细胞

的毒性不可忽视;(3)利用低吸附、无血清并添加特定干细胞相关生长因子的培养基富集悬浮细胞^[10],被认为是一种富集CSCs最简单、有效的方法,但是成本高,所获细胞数量不多,并且也难以在体外进行长期传代扩增,较难满足实验需要。近年来,有关于添加抑制剂富集微球体的报道^[11],此法简单、方便、成本小,但并不具有普适性。由此可见,前面所述的3种方法的共同劣势是所获得的肿瘤干细胞不能够长期传代扩增,这限制了对肿瘤干细胞自我更新调控机制以及生物学特性的基础研究。

本研究为了解决肿瘤干细胞体外不能够长期传代的问题,首次采用普通培养皿,在不添加特殊因子及药物的情况下,通过连续8次收集不需要贴壁而呈悬浮生长、扩增的细胞,成功获得了可稳定传代并成球的小鼠Lewis肺癌细胞株(LLC-spheroid enrichment, LLC-SE)。我们从干细胞相关基因的表达、悬浮成球能力、克隆能力和体内致瘤能力等方面对其进行了干性验证,表明所获得的LLC-SE具有干细胞特性。与其他方法相比,此法具有方便、简单、成本低、损伤小等诸多优点,且所获细胞已连续传至56代,为进一步研究肿瘤干细胞的生物学特性奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠Lewis肺癌亲代细胞(Lewis lung carcinoma parental cell, LLC-Parental)购自中国科学

院上海生命科学研究院细胞库, 在含10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素、1%两性霉素B的DMEM培养基中, 37℃、5% CO₂浓度的条件下培养, 3~4 d传代1次。显微镜下观察, LLC-Parental细胞大部分贴壁生长, 少数细胞悬浮在培养基中。贴壁细胞部分呈梭形, 部分为圆形; 悬浮细胞多为单个, 少数可见两两成对。

1.1.2 试剂 DMEM培养基、青霉素和链霉素、两性霉素B、磷酸盐缓冲液、0.25%胰蛋白酶均购于Hyclone公司。胎牛血清购于Excell Bio公司。RNA提取试剂Trizol、逆转录试剂盒、Real-time PCR试剂盒均购于TaKaRa公司。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。荧光定量PCR仪、Matrigel均购于BD公司。细胞培养箱购于Olympus公司。离心机、培养皿均购于Thermo公司。琼脂粉购于Sigma公司。

1.1.3 实验动物 BALB/cA-nu裸鼠购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 经中国医学科学院医学实验动物研究所质检合格。C57/BL6小鼠购于重庆医科大学重庆国家生物产业基地实验动物中心, 经动物伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 LLC-SE(LLC-spheroid enrichment)细胞的建立及培养 在含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素、1%两性霉素B的DMEM的培养基中培养LLC-Parental细胞, 待其生长至贴壁面积达80%, 收集培养液。800 r/min离心5 min, 可获得培养液中悬浮细胞的沉淀。将细胞沉淀重悬后全部接种于6 cm培养皿, 培养液仍为含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素、1%两性霉素B的DMEM培养基。待悬浮细胞扩增至较多数量时, 再次收集悬浮细胞, 离心再接种。按照此方法重复8次, 可获得较多悬浮成球的细胞, 然后将成球的细胞培养在含5%胎牛血清、1%青霉素/链霉素、1%两性霉素B的DMEM培养基中。每3 d传代1次。

1.2.2 Real-time PCR 检测干性基因*Bmi1*(B-cell-specific moloney murine leukemia virus insertion site 1)、*Cd133*(cluster of differentiation-133)、*Aldh1a1*(aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1)、*Oct4*(octamer-binding transcription factor 4)、*Sox2*(sex-determining region Y box 2)、*Nanog*和*Klf4*(Kruppel-like factor 4)以及上皮-间质转换(epithelial mesenchymal transition, EMT)转录调控因子的表达。收集LLC-Parental和

LLC-SE细胞, 用Trizol试剂法提取总RNA, 并用酶标仪检测 $D_{260/280}$ 、 $D_{260/230}$, 判断所提RNA的纯度及浓度, 后用逆转录试剂盒将2 000 ng总RNA逆转录为cDNA, 反应条件: 37℃, 15 min; 85℃, 5 s; 4℃保存。Real-time PCR反应体系为10 μL, 其中包括0.8 μL引物, 0.8 μL cDNA, 5 μL SYBR染料, 反应条件为: 95℃, 30 s; 95℃, 5 s, 65℃, 30 s, 共40个循环。*Tbp*作为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对数据进行分析。Real-time PCR反应中所用引物由生工生物(上海)股份有限公司设计并合成(表1)。

1.2.3 6孔板琼脂成球实验 取对数生长期的LLC-Parental和LLC-SE细胞制成单悬液, 血球计数板计数, 并用10×梯度稀释法稀释至10³数量级备用, 在15 mL离心管中分别制备含0.1%琼脂的LLC-Parental和LLC-SE细胞的培养基3 mL, 漩涡振荡仪上混匀, 加入300个细胞, 再次用漩涡振荡仪混匀。每组取1 mL液体(含100个细胞)接种于6孔板, 每组设置3个复孔, 及时摇匀6孔板。待琼脂成型后在上面添加1 mL新鲜培养基。置于37℃、5% CO₂饱和度的培养箱中培养7~10 d, 显微镜下统计大于50个细胞的悬浮球的数量, 成球率=(悬浮球数/接种数)×100%。

1.2.4 96孔板单细胞克隆形成实验 取对数生长期的LLC-Parental和LLC-SE细胞制成单悬液, 血球计数板计数, 并用10×梯度稀释法将细胞悬液稀释至每100 μL培养基中含1个细胞。将2种细胞分别接种在96孔板内, 每孔加入100 μL已稀释的细胞悬液, 显微镜下统计成功接种的孔数, 并置于37℃、5% CO₂饱和度的培养箱中培养7~10 d, 显微镜下统计长出大于50个细胞的克隆球的孔的数量。克隆形成率=(克隆球孔数/成功接种孔数)×100%, 计算出细胞克隆形成率。

1.2.5 裸鼠皮下移植 左手固定裸鼠, 右手持注射器, 在裸鼠左右两侧后大腿窝处皮下缓缓注入100 μL(含1×10⁵细胞)Matrigel胶与PBS(1:1)混合的细胞悬液, 小心拔出针头, 尽量减少液体漏出。裸鼠放回笼中继续喂养, 1周后每2 d观察1次裸鼠, 2周后视肿瘤生长情况解剖收集结果。

1.2.6 C57小鼠左肺原位种植 小鼠用1%戊巴比妥钠溶液腹腔注射进行麻醉, 右侧卧位暴露左胸。75%酒精消毒皮肤, 纵行剪开皮肤及皮下组织, 找到心肺交界(上面白色为肺, 下面红色为心)。在肺上垂直进针, 进针深度为0.5~0.6 cm, 缓慢注入20 μL(含

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	
	转录 Sense	反转录 Anti-sense
<i>Tbp</i>	CCG TGA ATC TTG GCT GTA AAC	CAG TTG TCC GTG GCT CTC TT
<i>Bmi1</i>	ATC CCC ACT TAA TGT GTG TCC T	CTT GCT GGT CTC CAA GTA ACG
<i>Cd133</i>	CTC CCA TCA GTG GAT AGA GAA CT	ATA CCC CCT TTT GAC GAG GCT
<i>Aldh1a1</i>	ATA CTT GTC GGA TTT AGG AGG CT	GGG CCT ATC TTC CAA ATG AAC A
<i>Oct4</i>	TTC CCT CTG TTC CCG TCA CT	TGT CTA CCT CCC TTG CCT TG
<i>Sox2</i>	AGG GCT GGG AGA AAG AAG AG	ATC TGG CGG AGA ATA GTT GG
<i>Nanog</i>	TTA GAA GCG TGG GTC TTG GT	CCC TCA AAC TCC TGG TCC TT
<i>Klf4</i>	GGA CCA CCT TGC CTT ACA CA	GAC TTG CTG GGA ACT TGA CC
<i>Zeb1</i>	CTC CCA GTC AGC CAC CTT TA	TAA CTC CAT CCA GCG GTA GG
<i>Zeb2</i>	TTT CCT GCC CTC TTT GTA GC	CCT TGG GTT AGC ATT TGG TG
<i>Snail1</i>	CAC ACG CTG CCT TGT GTC T	GGT CAG CAA AAG CAC GGT T
<i>Snail2</i>	TGG TCA AGA AAC ATT TCA ACG CC	GGT GAG GAT CTC TGG TTT TGG TA
<i>Snail3</i>	ACA GCG AAC TGG ACA CAC AC	GGG TAA AGG AGA GTG GAG TGG
<i>Twist1</i>	GGA CAA GCT GAG CAA GAT TCA	CGG AGA AGG CGT AGC TGA G
<i>Twist2</i>	GTC TCA GCT ACG CCT TCT CC	AGA TGT GCA GGT GGG TCC T
<i>E47</i>	GCA AAC GAA GGC AGA GTA GG	TGG TCA AGA GAC ACC TCA AGC
<i>Foxc2</i>	AAC CCA ACA GCA AAC TTT CCC	GCG TAG CTC GAT AGG GCA G
<i>Gsc1</i>	AAC GCC GAG AAG TGG AAC AAG	CCG AGT CCA AAT CGC TTT TAC C
<i>Gsc2</i>	CGT GGA GGT CTG GTT CAA G	CGG ACA GCA TCA ACA ACT CT

Tbp: TATA结合蛋白; *Zeb1*: 锌指E盒结合同源异形框1; *Zeb2*: 锌指E盒结合同源异形框2; *Snail1*: snail家族锌指1; *Snail2*: snail家族锌指2; *Snail3*: snail家族锌指3; *Twist1*: 碱性螺旋-环-螺旋转录因子1; *Twist2*: 碱性螺旋-环-螺旋转录因子2; *E47*: 转录因子3(Tcf); *Foxc2*: 叉头盒蛋白C2; *Gsc1*: goosecoid同源异形框1; *Gsc2*: goosecoid同源异形框2。

Tbp: TATA box binding protein; *Zeb1*: zinc finger E-box binding homeobox 1; *Zeb2*: zinc finger E-box binding homeobox 2; *Snail1*: snail family zinc finger 1; *Snail2*: snail family zinc finger 2; *Snail3*: snail family zinc finger 3; *Twist1*: basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor 1; *Twist2*: basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor 2; *E47*: transcription factor 3 (Tcf3); *Foxc2*: forkhead box C2; *Gsc1*: goosecoid homeobox 1; *Gsc2*: goosecoid homeobox 2.

1×10⁵细胞)Matrigel胶和PBS(1:1)混合的细胞悬液, 停留3~5 s后缓慢拔出针头。缝合皮肤, 待小鼠苏醒后放回笼中继续喂养。在3周后处死小鼠, 打开胸腔, 取出心肺, 观察左肺进针处、右肺、胸腺、胸壁有无肿瘤形成。

1.2.7 统计方法 用SPSS 22.0统计软件进行数据分析, 计数以 $\bar{x}\pm s$ 来表示, 采用 t 检验的分析方法, $P<0.05$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

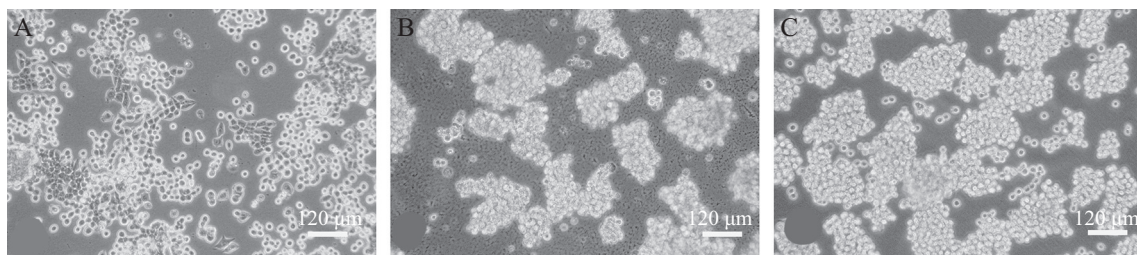
2.1 LLC-SE(LLC-spheroid enrichment)富集

将LLC-Parental细胞中的悬浮细胞收集起来进行单独培养, 显微镜下观察发现, 部分细胞贴壁分化, 另一部分细胞继续悬浮生长。再将悬浮细胞收集培养, 重复8次后可获得较多悬浮成球的细胞, 将

悬浮成球的细胞移入含5%胎牛血清的DMEM培养基中进行培养, 即可获得较为稳定的悬浮球(图1)。

2.2 干细胞特性相关基因表达

为了研究所获得LLC-SE是否具有干细胞特性, 我们首先采取Real-time PCR的方法对经典的多能性干细胞基因*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*和*Klf4*进行检测。结果表明, *Sox2*和*Nanog*在LLC-SE和LLC-Parental中均不表达, 而*Oct4*和*Klf4*在LLC-SE中的表达低于LLC-Parental, 且有极显著差异($P<0.01$)(图2)。随后, 我们又检测了之前文献报道中肿瘤干细胞高表达的*Bmi1*、*Cd133*和*Aldh1a1*基因^[3,12-13], 结果表明, *Cd133*和*Aldh1a1*在LLC-SE和LLC-Parental中均不表达, 而*Bmi1*在LLC-SE中的表达(2.03 ± 0.06)明显高于LLC-Parental(0.71 ± 0.01), 且有极显著性差异($P<0.01$)(图3)。上述结果表明, 在我们建立的LLC-SE中, *Bmi1*

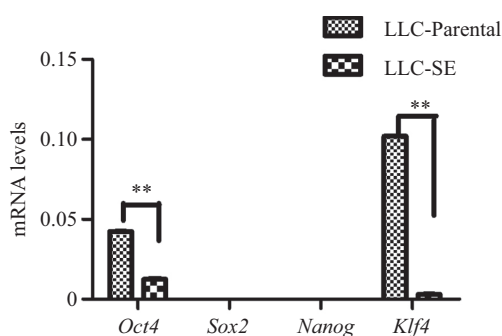


A: 在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养3 d的LLC-Parental细胞; B: 在含10%胎牛血清的DMEM培养基中连续8次悬浮聚球后富集的LLC-SE细胞; C: 在含5%胎牛血清的DMEM培养基中培养3 d的LLC-SE细胞。

A: LLC-Parental cultured for 3 d in medium containing 10% fetal bovine serum; B: LLC-SE collected floating cells for 8 consecutive times in medium containing 10% fetal bovine serum; C: LLC-SE cultured for 3 d in medium containing 5% fetal bovine serum.

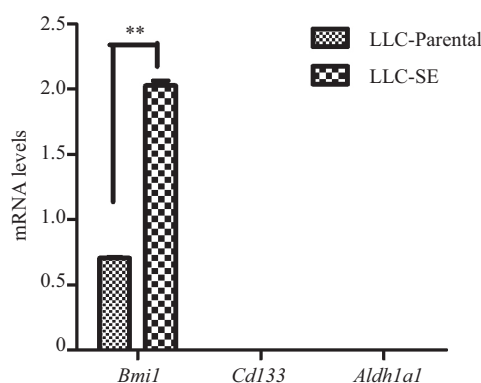
图1 不同培养条件下的LLC细胞形态

Fig.1 Morphology of LLC cells in different culture conditions



** $P < 0.01$.

图2 多能性基因的Real-time PCR结果
Fig.2 The expressions of pluripotent genes detected by Real-time PCR



** $P < 0.01$.

图3 肿瘤干细胞基因的Real-time PCR结果
Fig.3 The expressions of cancer stem cell genes detected by Real-time PCR

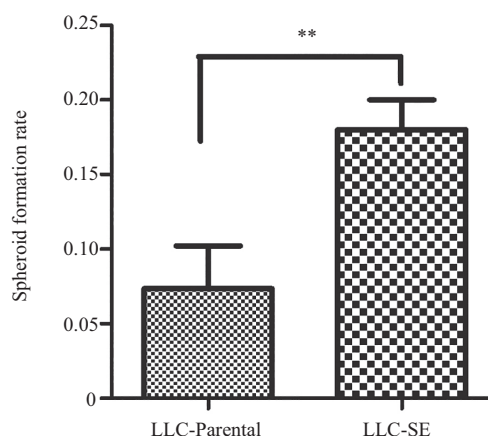
可能是重要的调控因子。

2.3 LLC-SE在琼脂中的成球能力

我们通过更为重要的肿瘤干细胞功能实验来检测所获的LLC-SE细胞是否具有干性, 首先采用6孔板琼脂成球实验来检测LLC-SE和LLC-Parental细胞体外单细胞悬浮成球能力。通过添加0.1%的琼脂使单个细胞悬浮于培养基中, 细胞之间的距离可基本保持不变。细胞在CO₂培养箱中培养9 d后在显微镜下统计大于50个细胞的悬浮球数目。结果表明, LLC-SE细胞的悬浮球形成率(0.18 ± 0.02)较LLC-Parental细胞(0.07 ± 0.03)高, 且有极显著性差异($P < 0.01$)(图4)。琼脂成球实验表明, 较LLC-Parental细胞而言, LLC-SE细胞具有更强的单细胞悬浮成球能力。

2.4 LLC-SE单细胞克隆形成能力

为了进一步检测LLC-SE的干性特征, 我们采用96孔板单细胞克隆形成实验检测LLC-SE和LLC-Parental的克隆形成能力。与琼脂成球实验相比, 单细胞克隆形成实验进一步排除了细胞群体效应的影



** $P < 0.01$.

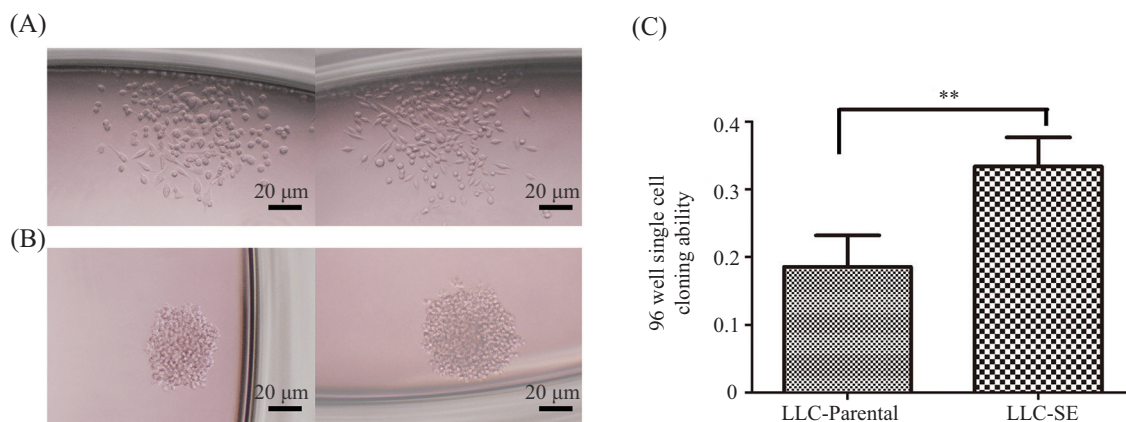
图4 克隆形成率统计结果
Fig.4 The statistical result of spheroid formation rate

响, 更能直接反映出单个细胞的克隆能力。结果表明, 单个LLC-SE细胞的克隆形成率(0.33 ± 0.04)高于LLC-Parental细胞(0.19 ± 0.05), 且有极显著差异($P < 0.01$), 说明LLC-SE的单细胞克隆生长能力强于LLC-Parental。在此实验中, 我们还发现了一个有趣的现象, LLC-SE

细胞形成的克隆多为规则的圆形斑, 细胞均为圆形; 而LLC-Parental细胞形成的克隆多为散在分布、不规则的斑, 且细胞部分为圆形、部分为梭形(图5)。这说明, LLC-SE在单细胞克隆生长时可能保持着较高的均质性, 符合干细胞生长特征。

2.5 裸鼠皮下成瘤

在进行LLC-SE体外干性指标检测后, 我们采用裸鼠皮下移植这一干性验证的经典模型来验证LLC-Parental和LLC-SE这2种细胞的体内致瘤能力。如图6所示, 将 1×10^5 细胞注入裸鼠皮下, 17 d裸鼠进

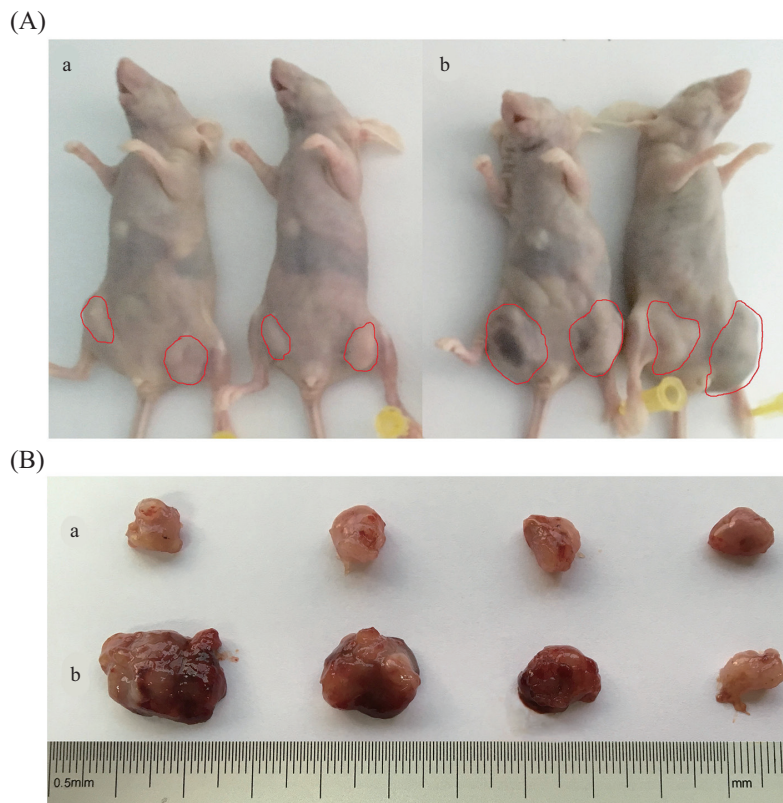


A: LLC-Parental在96孔板内用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养8 d后形成的克隆斑的形态图; B: LLC-SE在96孔板内用5%胎牛血清的DMEM培养基培养8 d后形成的克隆斑的形态图; C: 克隆形成率统计结果, $**P < 0.01$ 。

A: cloning morphology of LLC-Parental cultured for 8 d in medium containing 10% fetal bovine serum; B: cloning morphology of LLC-SE cultured for 8 d in medium containing 5% fetal bovine serum; C: the statistical analyses of cloning formation rate, $**P < 0.01$.

图5 96孔板单细胞克隆形成实验检测LLC-SE的克隆能力

Fig.5 The cloning ability of LLC-SE detected by the 96-well plate single cell cloning assay

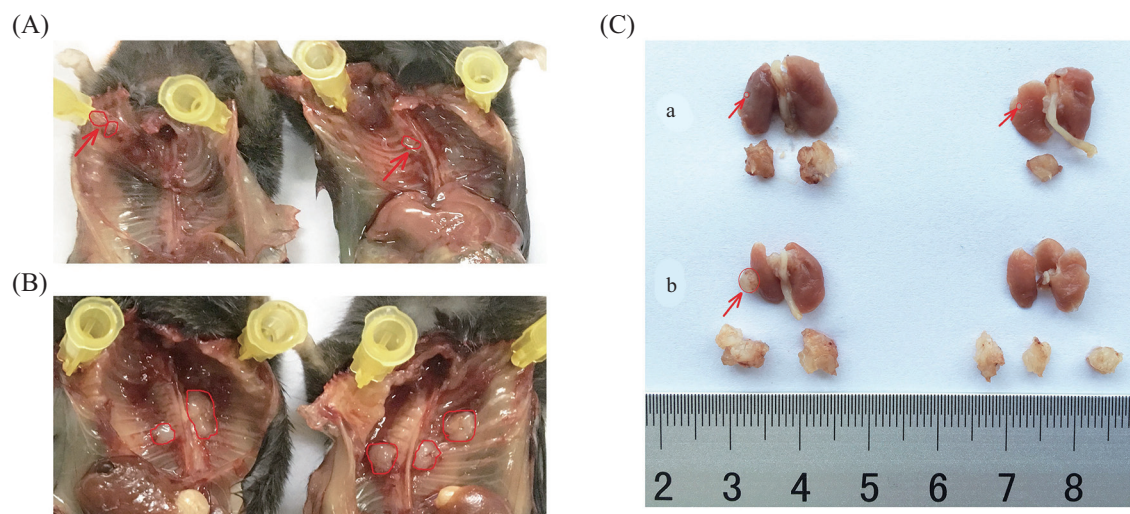


A: 裸鼠皮下成瘤情况, 红色标记处为肿瘤; B: 瘤体大小。a: LLC-Parental; b: LLC-SE。

A: tumorigenicity in nude mice, tumor marked by red; B: tumor volume. a: LLC-Parental; b: LLC-SE.

图6 裸鼠皮下注入细胞17 d后的成瘤情况

Fig.6 Tumorigenicity in the nude mice injected subcutaneously with tumor cells for 17 d



A: LLC-Parental细胞胸壁成瘤情况, 红色标记处为肿瘤组织; B: LLC-SE细胞胸壁成瘤情况, 红色标记处为肿瘤组织; C: 左肺原位灶和胸壁瘤解剖, 红色标记处为左肺进针处原位肿瘤。a: LLC-Parental; b: LLC-SE。

A: metastasis in thoracic wall of LLC-Parental, tumor and metastatic foci marked by red; B: metastatic foci in thoracic wall of LLC-SE, tumor and metastatic foci marked by red; C: tumor in left lung and tumor cut from thoracic wall, tumor marked by red. a: LLC-Parental; b: LLC-SE.

图7 C57小鼠左肺注入细胞21 d后的成瘤情况

Fig.7 The tumorigenicity and metastasis in C57 mice with left lung orthotopic implantation for 21 d

行断颈处死并解剖, 获取皮下肿瘤块。肉眼观察结果可知, 注射LLC-SE细胞的2只裸鼠大腿窝处的肿瘤明显大于注射LLC-Parental细胞的2只裸鼠的。而获取的肿瘤块显示, LLC-SE细胞成瘤体积明显大于LLC-Parental细胞的。裸鼠皮下移植实验表明, LLC-SE细胞的成瘤能力明显强于LLC-Parental细胞。

2.6 C57小鼠左肺原位种植成瘤

为了更好地验证所获取的LLC-SE细胞的癌症生物学特性, 我们采用具有正常免疫力的C57小鼠, 对其左肺原位植入LLC-SE和LLC-Parental细胞。该动物模型具有更好的临床匹配性。在检测细胞致瘤能力的基础上, 还能观察到细胞的转移情况。LLC-Parental和LLC-SE(1×10^5 细胞)注入C57小鼠左肺后21 d观察结果发现, 注射LLC-SE细胞的小鼠, 在左肺上的原位肿瘤、在胸壁上的转移灶数目以及体积均大于注射LLC-Parental细胞的小鼠; 其中1只注射LLC-SE细胞的小鼠在其左肺上并未发现明显的原位肿瘤, 其原因可能是细胞在早期便发生了转移^[14](图6)。C57小鼠左肺原位种植成瘤实验表明, LLC-SE细胞的致瘤能力明显强于LLC-Parental细胞, 且表现出更强的胸壁转移能力(图7)。

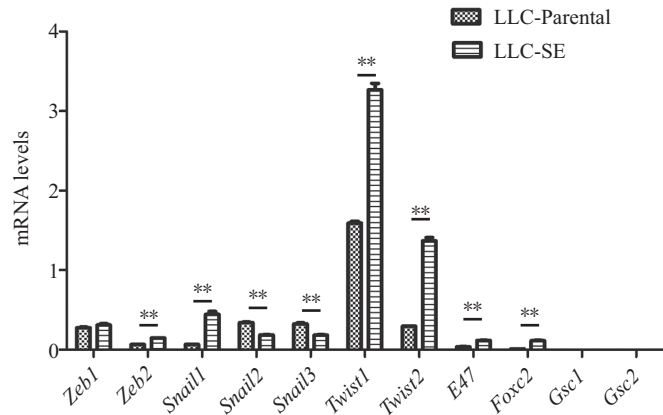
2.7 EMT基因的表达

之前Mani等^[15]和Morel等^[16]已报道EMT过程能够诱导肿瘤干细胞的产生。而上述结果表明, 我们

通过8次悬浮LLC-Parental细胞诱导获得了具有肿瘤干细胞特性的LLC-SE细胞。因此, 为了研究EMT过程是否也是诱导LLC-SE形成的关键因素我们采用Real-time PCR检测EMT基因*Zeb1*、*Zeb2*、*Snail1*、*Snail2*、*Snail3*、*Twist1*、*Twist2*、*E47*、*Foxc2*、*Gsc1*、*Gsc2*在LLC-SE和LLC-Parental细胞中的表达情况。结果表明, *Zeb*家族中的*Zeb2*、*Snail*家族中的*Snail1*、*Twist*家族中的*Twist1*、*Twist2*以及*E47*、*Foxc2*、*Gsc1*、*Gsc2*在LLC-SE细胞中的表达均高于LLC-Parental细胞(图8)。以上结果表明, EMT基因有可能诱导了LLC-SE细胞的形成。

3 讨论

本研究打破传统的表面抗原标记流式细胞分选、侧群细胞、低吸附培养皿分离肿瘤干细胞的方法, 首次采用连续8次悬浮聚球法, 成功获得干细胞样肿瘤细胞LLC-SE。随后, 我们通过Real-time PCR、6孔板琼脂成球实验、96孔板单细胞克隆形成实验、裸鼠皮下移植和C57小鼠左肺原位种植等实验方法检测, 结果显示, LLC-SE高表达干性基因*Bmi1*, 具有较强的单细胞悬浮成球能力和单细胞克隆能力, 并具有较强的体内致瘤能力及肿瘤转移能力, 说明我们获得的LLC-SE细胞具有肿瘤干细胞特性。更为重要的是, 此法具有简单、方便、成本低、



** $P < 0.01$.

图8 EMT基因表达的Real-time PCR结果

Fig.8 The expressions of EMT genes detected by Real-time PCR

对细胞损伤小等优点,且可能适用于各种实体肿瘤干细胞的筛选。

已有报道认为,肿瘤干细胞特性相关基因有 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Klf4*、*Cd133*、*Aldh1a1* 和 *Bmi1*。而本研究发现,LLC-SE细胞中仅有 *Bmi1* 的表达高于LLC-Parental细胞,但是随后的肿瘤干细胞功能验证表明,其体外悬浮成球能力和体内致瘤能力及肿瘤转移能力均高于LLC-Parental细胞。*Oct4*、*Sox2*、*Nanog* 和 *Klf4* 是小鼠胚胎干细胞自我更新的重要转录调控因子^[17-18],部分报道将它们的高表达作为评价干细胞样肿瘤细胞干性的重要标志物^[18],但是也有部分关于肿瘤干细胞的研究认为,它们并非都是肿瘤干细胞的标志物^[20]。同时,还有研究表明,多种有干性的实体肿瘤细胞高表达 *Cd133*、*Aldh1a1* 和 *Bmi1*^[12,21-22]。但是,并非所有的肿瘤干细胞都高表达以上几种基因^[20]。Tirino等^[8]报道显示,CD133的非小细胞肺癌细胞仍具有成球能力和致瘤能力。因此,干细胞特征基因的表达并不能作为细胞是否具有干性的唯一评判标准。我们需要从多方面、多标志物来综合判断细胞的干性。通过连续8次悬浮聚球法能够成功获得干细胞样肿瘤细胞,这令我们非常激动。但是,对于LLC-SE细胞悬浮成球能力、致瘤能力的调控机制我们仍知之甚少。研究报道显示,多个调节EMT过程的转录因子,如锌指转录因子 *Snail* 家族(*Snail1*、*Snail2* 和 *Snail3*)、*Zeb* 家族(*Zeb1* 和 *Zeb2*)、*Twist1* 和 *Twist2* 等都显示了调控有干性的肿瘤细胞的致瘤能力^[23]。上皮-间质转录调控因子在我们的细胞模型中是否也起到了相同的作用呢?于是,我们在LLC-Parental、LLC-SE细胞中检测了EMT相关的转录因子基因表达情况,发现 *Zeb2*、

Snail1、*Twist1*、*Twist2*、*E47*、*Foxc2* 在LLC-SE中的表达显著高于LLC-Parental,说明这几个基因很可能参与调控了LLC-SE细胞的干性,为我们进一步研究其自我更新提供了方向。

肿瘤干细胞作为肿瘤靶向治疗的新方向,需要研究与阐明的问题还有很多,如肿瘤干细胞的来源问题(普通细胞还是组织干细胞)、肿瘤干细胞的调控机制(EMT可能只是调控机制的冰山一角)和肿瘤干细胞的分化问题。对于这些关键问题的解决都需要体外大量获得和培养肿瘤干细胞,而现有的分离肿瘤干细胞的方法繁琐、成本大,获得的肿瘤干细胞数量较少且不能连续传代培养,本文建立的连续8次悬浮聚球的方法为肿瘤干细胞的分选提供了新的思路,其最大优点在于分选出的细胞能够在体外连续培养。希望此方法能够为更多的研究者提供便捷,在其他类型的肿瘤干细胞的分选和纯化中起到重要作用。

参考文献 (References)

- 1 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432(7015): 396-401.
- 2 O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445(7123): 106-10.
- 3 Ranji P, Salmani K, Saeedikhoo S, Alizadeh AM. Targeting cancer stem cell-specific markers and/or associated signaling pathways for overcoming cancer drug resistance. *Tumour Bio* 2016; 37(10): 13059-75.
- 4 Halim NH, Zakaria N, Satar NA, Yahaya BH. Isolation and characterization of cancer stem cells of the non-small-cell lung cancer (A549) cell line. *Methods Mol Biol* 2016; 1516: 371-88.
- 5 Michishita M, Ezaki S, Ogihara K, Naya Y, Azakami D, Nakagawa T, et al. Identification of tumor-initiating cells in a

- canine hepatocellular carcinoma cell line. *Res Vet Sci* 2014; 96(2): 315-22.
- 6 Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE. Drug-selected human lung cancer stem cells: Cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS One* 2008; 3(8): e3077.
- 7 Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, *et al.* Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009; 27(5): 1006-20.
- 8 Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G, *et al.* The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2009; 36(3): 446-53.
- 9 Song J, Chang I, Chen Z, Kang M, Wang CY. Characterization of side populations in HNSCC: Highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One* 2010; 5(7): e11456.
- 10 Im CN, Yun HH, Yoo HJ, Park MJ, Lee JH. Enhancement of SOX-2 expression and ROS accumulation by culture of A172 glioblastoma cells under non-adherent culture conditions. *Oncol Rep* 2015; 34(2): 920-8.
- 11 王珊珊, 殷勤伟, 张洪杰, 谭 琰, 华 茜. 非贴壁微球体培养法分离T-淋巴细胞瘤干细胞及鉴定. *中国细胞生物学学报* (Wang Shanshan, James Yin, Zhang Hongjie, Tan Yan, Hua Qian. Construction and identification a culture method of non-adherent microspheres for human T-cell lymphoma stem cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(8): 1133-41.
- 12 Koren A, Rijavec M, Kern I, Sodja E, Korosec P, Cufer T. BMI1, ALDH1A1, and CD133 Transcripts connect epithelial-mesenchymal transition to cancer stem cells in lung carcinoma. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 9714315.
- 13 Liang D, Shi Y. Aldehyde dehydrogenase-1 is a specific marker for stem cells in human lung adenocarcinoma. *Med Oncol* 2012; 29(2): 633-9.
- 14 Sanger N, Effenberger KE, Riethdorf S, Van Haasteren V, Gauwerky J, Wiegatz I, *et al.* Disseminated tumor cells in bone marrow of patients with ductal carcinoma *in situ*. *Int J Cancer* 2011; 129(10): 2522-6.
- 15 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133(4): 704-15.
- 16 Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008; 3(8): e2888.
- 17 Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 2004; 23(43): 7150-60.
- 18 Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008; 132(4): 567-82.
- 19 Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: Small genes make a big difference. *Chin J Cancer* 2013; 32(9): 483-7.
- 20 Justilien V, Regala RP, Tseng IC, Walsh MP, Batra J, Radisky ES, *et al.* Matrix metalloproteinase-10 is required for lung cancer stem cell maintenance, tumor initiation and metastatic potential. *PLoS One* 2012; 7(4): e35040.
- 21 Liu X, Wang L, Cui W, Yuan X, Lin L, Cao Q, *et al.* Targeting ALDH1A1 by disulfiram/copper complex inhibits non-small cell lung cancer recurrence driven by ALDH-positive cancer stem cells. *Oncotarget* 2016; doi: 10.18632/oncotarget.11305.
- 22 Zhou Y, Wang Y, Ju X, Lan J, Zou H, Li S, *et al.* Clinico-pathological significance of ALDH1A1 in lung, colorectal, and breast cancers: A meta-analysis. *Biomark Med* 2015; 9(8): 777-90.
- 23 Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer* 2013; 132(4): 745-54.