

· 论 著 ·

结肠癌干细胞样细胞的无血清法培养及特性鉴定^{*}

杨 婷^{1,2}, 马 磊³, 李 盛⁴, 管向东^{1△}

(1. 中山大学附属第一医院外科 ICU, 广东广州 510080; 2. 中山市人民医院重症治疗科, 广东中山 528403;
3. 南海区第八人民医院外一科, 广东佛山 528216; 4. 黄陂区人民医院肝胆外科, 湖北武汉 430300)

摘要:目的 运用无血清细胞培养法培养出源于结肠癌细胞株 SW620 的细胞球, 并实现其在体外的繁殖及传代, 为深入研究结肠癌提供坚实的基础。方法 逐步驯化人结肠癌细胞株 SW620 适应无血清培养条件, 1 周后, 收集悬浮生长的细胞球。采用免疫荧光法检测胚胎干细胞标记物 SSEA-4、TRA-1-60 在 SW620 细胞及细胞球的表达情况; 采用 PI 染色法检测 2 种细胞的细胞周期; 采用脂肪诱导分化液对 2 种细胞进行体外诱导培养; 采用裸鼠成瘤实验比较 2 种细胞的成瘤能力。结果 SW620 细胞在无血清培养液中培养 1 周后, 可生出悬浮生长的细胞球。胚胎干细胞标记物 SSEA-4、TRA-1-61 在所有细胞球细胞中均呈阳性表达; 在 SW620 细胞中的表达率分别为(25.74±7.62)%、(27.74±4.31)%, 两者相比, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。细胞球细胞有(7.18±1.35)% 处于分裂期(S 期), (84.19±2.52)% 处于分裂前期(G_0/G_1 期); SW620 细胞有(20.89±3.84)% 处于 S 期, (63.02±6.73)% 处于 G_0/G_1 期, 两者相比差异有统计学意义($P<0.05$)。脂肪诱导液中培养 7 d 后, 油红特异性染色的脂肪颗粒在每 100 个细胞球细胞中为(583.80±77.69)个; 在每 100 个 SW620 细胞中为(169.20±26.43)个, 两者相比差异有统计学意义($P<0.05$)。 2×10^4 个细胞球细胞即可在裸鼠皮下成瘤, 移植瘤体积为(2 279.98±346.27) mm^3 ; 2×10^5 个 SW620 细胞才能形成裸鼠皮下移植瘤, 移植瘤体积为(889.75±78.79) mm^3 , 两者相比差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 人结肠癌细胞 SW620 经过无血清驯化, 可培养出细胞球, 并可进行体外的大量繁殖和稳定传代; 细胞球表现出肿瘤干细胞样细胞的特性。

关键词:结肠癌; 肿瘤干细胞; 无血清培养

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2221-03

Cultivation and identification of human colon cancer stem-like cells in the serum-free culture medium in vitro^{*}

Yang Ting^{1,2}, Ma Lei³, Li Sheng⁴, Guan Xiangdong^{1△}

(1. Department of Surgical Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510080, China; 2. Department of Intensive Care Unit, Zhongshan City Peoples Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China; 3. Department of General Surgery, the Eighth Hospital of Nanhai Region, Foshan, Guangdong 528216, China; 4. Department of Liver and Gallbladder Surgery, People's Hospital of Huangpi, Wuhuan, Hubei 430300, China)

Abstract: Objective To generate suspended spheres, Human colon cancer cell line SW620 cells were acclimated gradually in the free serum culture medium, 1 week later, a great quantity of spheres were obtained for the further research. **Methods** SW620 cells and spheres were incubated with the following Abs: anti-SSEA-4 Ab and anti-TRA-1-60 Ab and detected with confocal microscopy. SW620 cells and spheres were collected and stained by PI, Cell cycle distribution was then acquired by flow cytometry. SW620 cells and spheres were transferred into Adipocyte Differentiation Medium and cultured for 7 d and then lipid droplets were counted. SW620 cells and sphere cells were injected subcutaneously into the lateral root of one posterior limb of a nude mouse, tumor volume was calculated. **Results** Spheres formed when grown under serum-free conditions in 7 days, and the ability of SW620 cells to form spheres was sustained. A few of SW620 adherent cells be cultured in DF+10% FBS clearly showed the expression of pluripotent stem cell markers Ssea-4(25.739±7.62)%, Tra-1-60(27.742±4.31)%, but almost all spheres expressed the 2 markers and there was a significant difference between the two groups in the expression ratio($P<0.05$). It had been shown that the spheres exhibited a relatively high proportion of cells in G_0/G_1 phase(84.19±2.52)% and low proportion in S phase(7.18±1.35)%; when compared to SW620 cells, G_0/G_1 phase(63.02±6.73)%, S phase(20.89±3.84)%($P<0.05$). Adipocytes drops from spheres and adherent cells were calculated under microscope after been cultured in adipocytes liquid for 7 d. The number of adipocytes drops in spheres was (583.80±77.69), but(169.20±26.43)in SW620 adherent($P<0.05$). 2×10^4 sphere cells injected subcutaneously into the lateral root of one posterior limb of a nude mouse fromed transplantation tumor after 4 weeks, and the tumor size was (2 279.98±346.27) mm^3 ; 2×10^5 adherent cells injected subcutaneously into the lateral root of one posterior limb of a nude mouse fromed transplantation tumor after 4 weeks, and the tumor size was(889.75±78.79) mm^3 , ($P<0.05$). **Conclusion** In this study, it is successfully observed that SW620 cells being cultured in serum-free medium resulted in spheres rapidly and the spheres are serially passaged with relatively high efficiency. The spheres show the characteristics of the cancer stem cell.

Key words: colorectal cancer; cancer stem cells; serum-free culture

结肠癌(CRC)为起源于结肠黏膜上皮的恶性肿瘤, 是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 每年因 CRC 死亡的病例数呈上升

* 基金项目: 2015 年中山市人民医院科研基金项目(201516)。 作者简介: 杨婷, 女, 主治医师, 主要从事重症医学、肿瘤干细胞研究。

△ 通讯作者, E-mail: carlg@163.net。

趋势^[1]。目前,手术仍是治疗 CRC 的主要方式,但根治性手术后约 40%~50% 患者会出现复发和转移,严重影响患者的生活质量及 5 年生存率。肿瘤干细胞(CSC)学说认为恶性肿瘤组织中存在一群数量极少的具有干细胞样特性的细胞,这群细胞具有自我更新、无限增殖、多向分化的潜能及持续维持致瘤的能力,是肿瘤的启动细胞,也是肿瘤发生、转移和复发的根源^[2],已有多项研究表明,CRC 中也可能存在 CSC^[3~4],因此,根治 CRC,从 CSC 入手可能是一条全新的路径。研究 CSC 遇到的第一个“瓶颈”便是 CSC 在肿瘤细胞中比例稀少,培养及纯化大量 CSC 所需的工作量极大,这大大限制了研究的发展。建立成株的各种肿瘤细胞系品种多、易获得、易保存、易培养,已是研究肿瘤的经典模型,从中获取 CSC 可能是最佳途径,本研究拟从此思路入手,探究大量培养 CSC 的方法,以期为下一步的深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 细胞的培养及无血清驯化 人结肠癌细胞株 SW620 由中国科学院上海细胞生物研究所细胞库提供,于含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养液(pH 7.2)中,在 37 °C、5% CO₂、充分湿度条件下培养,2~3 d 传代 1 次。待细胞性状稳定后对 SW620 细胞进行无血清驯化,逐步降低血清培养液的比例,增加无血清培养液(专利保密)的比例,最后完全过度到无血清培养。驯化过程中仍需进行细胞传代,至少 2 代,约 1 周后可得到悬浮于培养液中的细胞球。细胞球仍可进行消化、接种、培养,如此反复,可得到大量的细胞球。

1.2 主要方法

1.2.1 免疫荧光实验 取对数生长的细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,接种到预先放置 1 张盖玻片的 6 孔培养皿中。待 SW620 细胞接近长成单层、无血清培养的细胞球长成小球囊,取出盖玻片,4% PFA 固定 10 min,0.1% Triton-X-100 透化 5 min,5% BSA+10% 山羊血清封闭,滴加适当稀释的特异性抗体 SSEA-4、TRA-1-60,置于湿盒内,4 °C 冰箱过夜后滴加 1:150 的荧光素标记抗体,室温孵育 60 min 后 DAPI 染色 3~5 min,1×PBS 清洗、封片后于 4 °C 冰箱干燥避光保存,1 d 后激光共聚焦显微镜观察。

1.2.2 细胞周期实验 消化 SW620 细胞,1 000 r/min 离心 4 min;用 70 μmol/L 滤网过滤收集无血清培养的细胞球,500 r/min 离心 4 min,1×PBS 清洗后用 1×TE 消化细胞球至单个细胞。将上述两种细胞分别离心、清洗后均匀打散,加入预冷 70% 乙醇 1.5 mL,吹打混匀,4 °C 固定 2 h,1×PBS 清洗,重悬,加入 200 μg/mL 的 PI 0.25 mL,稀释至 50 μg/mL,再加入 100 μg/mL 的 RnaseA 1 μL,稀释至 100 μg/mL。室温避光染色 60 min 后置于冰上,过 400 目尼龙网。上流式细胞仪检测,ModFit 软件分析 DNA 数据,读取 G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期细胞数。

1.2.3 体外诱导分化 以 4×10³/cm² SW620 细胞及 4 000 个细胞球细胞的密度将两种细胞接种于 6 孔板内。待 SW620 细胞融合达到 80%,细胞球生长 3 d 后加入脂肪诱导分化液 2 mL,隔天换液,共诱导 1 w。每天镜下观察细胞形态和活性变化,第 7 天用油红 O 染色法检测脂滴形成。

1.2.4 裸鼠体内成瘤实验 实验分为 6 组,每组 3 只裸鼠,分别接种 2×10³、2×10⁴、2×10⁵ 的对数生长期 SW620 细胞和细胞球细胞于裸鼠腋下,每 3 天观察 1 次肿瘤形成情况,连续观察 4 周,处死后测量肿瘤大小。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间率的比较用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SW620 细胞在无血清培养液中可形成细胞球 无血清培养液中培养 3 d 后,便可见 SW620 的单层细胞中有些区域逐渐增厚形成多层细胞,4~5 d 后从多层细胞中逐渐生成细胞球,细胞球贴壁能力差,6~7 d 即可悬浮于培养液中。镜下观察悬浮的细胞球,见细胞球由成百上千球状细胞聚集而成,结构致密,折光性良好。构成细胞球的细胞呈圆形,形态均一,核大、核仁清晰,核质比高。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 SW620 细胞及细胞球表达 SSEA-4、Tra-1-60 的情况 在 10×10 倍共聚焦显微镜下随机观察至少 5 个视野,计数荧光染色呈阳性的细胞数。结果显示:细胞球 10% FBS 的 SSEA-4、Tra-1-60 均呈阳性表达,SW620 细胞表达这 2 种抗原的比率分别为 SSEA-4 (25.74±7.62%)、Tra-1-60 (27.74±4.31%),两者相比差异具有统计学意义(*P*<0.05)。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 SW620 细胞及细胞球的细胞周期分析 用流式细胞仪检测分析 SW620 细胞及细胞球的细胞周期分布情况,发现 SW620 细胞中 (20.89±3.84)% 处于 S 期,(63.02±6.73)% 处于 G₀/G₁ 期;而细胞球中 (7.18±1.35)% 处于 S 期,(84.19±2.52)% 处于 G₀/G₁ 期,两者比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1 及图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 1 细胞球及 SW620 细胞的细胞周期分布(%)

项目	M ₁ (G ₀ /G ₁ 期)	M ₂ (S 期)	M ₃ (G ₂ /M 期)
细胞球	84.19±2.52	7.18±1.35	7.38±1.57
SW620 细胞	63.02±6.73	20.89±3.84	13.85±2.73

2.4 体外定向诱导细胞球分化为脂肪细胞 干细胞最主要的特征是具有多向分化的潜能,本实验比较了 SW620 细胞及细胞球在脂肪诱导液中诱导 7 d 后的改变。结果发现,细胞球在成脂诱导 7 d 后,细胞质内出现被油红特异性染色的红色脂肪颗粒,每 100 个细胞球细胞内油红特异性染色的脂肪颗粒为 (583.80±77.69) 个;而 SW620 细胞的细胞质中,这种颗粒的数目则较少,每 100 个 SW620 细胞中为 (169.20±26.43) 个。两者的差异具有统计学意义(*P*<0.05)。见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.5 SW620 贴壁细胞及细胞球的体内成瘤能力 4 周后,接种 2×10⁴ 个细胞球细胞组中,2 只裸鼠形成皮下移植瘤;接种 2×10⁵ 个细胞球细胞组中,2 只裸鼠形成皮下移植瘤。而 SW620 细胞至少需要 2×10⁵ 个才能形成皮下移植瘤(2/3)。另外,同样以 2×10⁵ 个细胞接种的情况下,细胞球细胞形成的移植瘤体积为 (2 279.98±346.27) mm³,SW620 细胞形成的移植瘤体积为 (889.75±78.79) mm³。两者比较,差异有统计学意义(*P*<0.05)。说明细胞球细胞具有更强的体内成瘤能力。见图 5(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

目前,有关肿瘤形成存在两种学说,即 Stochastic 和 Hierarchy 学说。前者认为所有肿瘤细胞的功能是同质的,每个肿瘤细胞都有再生形成肿瘤的能力,但其进入细胞周期发生增殖分裂是一些小概率的随机事件。而后者认为,肿瘤细胞在功能上存在很大异质性,只有极小部分肿瘤起始细胞才具有成瘤能力,且成瘤率较高。随着研究的深入,越来越多的研究结果支持 Hierarchy 学说,即认为肿瘤组织中存在极少数具有无限增殖和自我更新能力、导致肿瘤发生的细胞,即“肿瘤干细胞”,它

是肿瘤转移、复发及耐药的根源^[5]。人急性粒细胞白血病干细胞的分离和纯化,是人们认识 CSC 的里程碑,最近几年,实体瘤干细胞的研究发展迅速,乳腺癌干细胞的分离开启了占人类肿瘤 90% 的实体瘤干细胞研究的大门^[6]。此后,在多种实体瘤,如脑胶质瘤、头颈部鳞癌、胰腺癌等肿瘤中相继发现了 CSC。近年的研究发现,CRC 中也有 CSC 存在^[7-8],然而,由于目前缺乏公认的结直肠 CSC 标记物,很难通过常用方法获得大量 CSC,影响了对结肠的深入研究,为了解决干细胞来源的问题,本研究小组进行了此番尝试。

无血清培养基是在合成培养基的基础上,引入成分完全可知或部分明确的血清替代成分,使培养基既满足细胞培养要求,又有效避免因使用血清而带来的问题,已被广泛应用于研究和生产领域。最近有报道指出,一些哺乳动物成体干细胞可以在无血清培养基内呈非黏附性球形生长,在这种限定性的培养基内,大多数已分化的肿瘤细胞由于不能贴壁而经历了失巢凋亡,沉积在培养基底部,因而选择性地去除了成体肿瘤细胞,存留下来的则是一些增殖能力强、类似于干细胞样的肿瘤细胞,呈悬浮状球形生长^[9]。因此无血清培养基被认为是一种良好的干细胞培养基,悬浮培养法则成为一种富集肿瘤干细胞的有效方法。

干细胞最主要的特征是自我更新及增殖和分化,肿瘤干细胞同样也不例外。本实验用无血清培养法培养出细胞球,可以实现在体外的大量繁殖和稳定传代,并且连续传代并不影响细胞球的生长方式,实验结束时,此细胞球已稳定传代 12 代,这说明培养出的细胞球具有无限增殖的潜能,这符合干细胞的特性。

SSEA-4 为阶段特异性胚胎抗原,TRA-1-60 在全能的胚胎干细胞中特异性表达^[10],在体外培养人胚胎干细胞过程中,SSEA-4、TRA-1-60 均为阳性表达。CSC 与正常干细胞还有许多相似之处,包括表达某些共同的特异性的表面抗原^[11],已有研究表明 SSEA-4、TRA-1-60 在多种 CSC 中有表达,若培养的细胞球也同样表达这些抗体,说明这些细胞球具有干细胞特性。为此,采用了免疫荧光的方法,对细胞球进行了上述特异性标记物的鉴定,结果表明,无血清培养的细胞球,SSEA-4、TRA-1-60 均呈阳性染色,而在含有 10% FBS 中培养的 SW620 细胞中,SSEA-4 的阳性表达率为(25.74±7.62)%,Tra-1-60 为(27.74±4.31)%,与细胞球相比,差异有统计学意义,这说明细胞球具有干细胞特性。

细胞的生长周期主要有生长前期(G₀/G₁ 期)、合成期(S 期)及有丝分裂期(G₂/M)。通常,分裂旺盛的细胞处于 S 期和 G₂/M,如各种分裂旺盛的肿瘤细胞就是这样,而干细胞往往处于静止期,即生长前期(G₀/G₁ 期)。本试验用流式细胞仪检测了 SW620 细胞及细胞球的细胞周期,结果表明 SW620 细胞中有(20.89±3.84)% 的细胞处于 S 期,(63.02±6.73)% 处于 G₀/G₁ 期;而细胞球细胞中(7.18±1.35)% 的细胞处于 S 期,(84.19±2.52)% 处于 G₀/G₁ 期,两者的差异有统计学意义。这些结果表明经过无血清驯化后形成的细胞球,静止期的细胞增多,增殖期细胞减少,这正是干细胞的特点,说明 SW620 细胞球具有干细胞特性。

具有多项分化潜能是干细胞最为重要的特征之一,CSC 也不例外,有些肿瘤干细胞在特殊的诱导因子作用下可以实现跨越 3 个胚层的分化^[12]。本实验采用脂肪诱导分化液对细胞球及 SW620 贴壁细胞进行诱导,在脂肪诱导液中培养 7 d 后,细胞球内出现大量可被油红特异性染色的脂肪颗粒;而于 SW620 细胞仅见少许红染颗粒,分别计数 5 个视野的红色颗粒数目,两者间的差异具有统计学意义。说明,在脂肪诱导液

的作用下,无血清驯化生成的细胞球更具有分化为脂肪细胞的潜能,说明,细胞球具有干细胞的特性,是结肠癌干细胞样细胞。

高致瘤性是 CSC 最大的特点之一,也是鉴定是否 CSC 的“金标准”。为了证实培养得到的细胞球是 CSC,研究者对 SW620 细胞及细胞球进行裸鼠成瘤的研究。结果发现细胞球细胞具有很高的成瘤能力,只需要 3×10^3 个就能在裸鼠皮下形成肿瘤,而 10% FBS 培养的细胞则需要至少 3×10^5 个才能成瘤。这个实验结果再次证实,通过无血清法培养出的细胞球,是结肠癌干细胞样细胞。综上所述,本实验成功运用无血清细胞培养法驯化了 SW620 细胞,使其在无血清的环境中生成悬浮生长的细胞球,实现了细胞球在体外的大量繁殖和稳定传代,并且通过鉴定干细胞性标记物、分析细胞周期、成脂诱导分化、裸鼠成瘤等实验方法对细胞球的干细胞性进行鉴定,结果表明,无血清培养的细胞球具有自我更新、无限增殖和分化能力的生物学特性,这些都是 CSC 的特性,可以认为细胞球是结肠癌干细胞样细胞。

参考文献

- [1] Liu CS, Hsu HS, Li CI, et al. Central obesity and atherogenic dyslipidemia in metabolic syndrome are associated with increased risk for colorectal adenoma in a Chinese population[J]. BMC Gastroenterol, 2010, 27(5): 10-51.
- [2] Cabrera MC, Hollingsworth RE, Hurt EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy[J]. World J Stem Cells, 2015, 7(1): 27-36.
- [3] Cherciu I, Bârbâlan A, Pirici D, et al. Stem cells, colorectal cancer and cancer stem cell markers correlations[J]. Curr Health Sci J, 2014, 40(3): 153-161.
- [4] 杨治力,王志刚,郑起.结直肠癌干细胞研究进展[J].世界华人消化杂志,2010,18(9):913-919.
- [5] Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, et al. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance[J]. Radiother Oncol, 2013, 108(3): 378-387.
- [6] Czerwinska P, Kaminska B. Regulation of breast cancer stem cell features[J]. Contemp Oncol(Pozn), 2015, 19(1): 7-15.
- [7] Fan F, Bellister S, Lu J, et al. The requirement for freshly isolated human colorectal cancer(CRC) cells in isolating CRC stem cells [J]. Br J Cancer, 2015, 112(3): 539-546.
- [8] 潘兆君,姚和瑞.结肠癌干细胞研究进展[J].国际外科学杂志,2009,36(5):322-325.
- [9] Qiang L, Yang Y, Ma YJ, et al. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines[J]. Cancer Lett, 2009, 279(1): 13-21.
- [10] Corominas-Faja B, Cufí S, Oliveras-Ferraro C, et al. Nuclear reprogramming of luminal-like breast cancer cells generates Sox2-overexpressing cancer stem-like cellular states harboring transcriptional activation of the mTOR pathway[J]. Cell Cycle, 2013, 12(18): 3109-3124.
- [11] 冯燕君,夏璐.结肠癌干细胞标志分子及其功能研究现状[J].国际消化病杂志,2012,32(1):34-43.
- [12] 凌斌,陈静,孙洁,等.肿瘤干细胞与干细胞:来源、分化及其相关性[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(49):9743-9746.

(收稿日期:2015-05-16)

