

无血清培养法分离并鉴定胰腺癌细胞系 BxPC-3 中肿瘤干细胞

潘岩¹, 花永强¹, 刘鲁明¹, 沈剑刚²

(1. 复旦大学附属肿瘤医院, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032; 2. 香港大学中医药学院, 香港)

摘要: [目的] 从人胰腺癌细胞系 BxPC-3 中分离并鉴定胰腺癌干细胞。[方法] 用无血清培养基培养人胰腺癌 BxPC-3 得到肿瘤细胞球。将肿瘤细胞球传代扩增, 观察各传代后细胞成球能力; 并用含血清培养基诱导促使其分化; 蛋白印迹法测定肿瘤干细胞特异性转录因子 OCT-4 蛋白表达情况, 并将肿瘤细胞球细胞植入 NOD/SCID 小鼠皮下, 观察移植瘤的形成。[结果] 在无血清培养基中, BxPC-3 细胞能形成少量肿瘤细胞球, 具有很强的自我更新能力, 成球能力随着球体细胞传代次数的增加而增加。在含血清环境中, 球体细胞逐渐分化而呈贴壁生长。肿瘤细胞球 OCT-4 蛋白表达明显高于 BxPC-3 贴壁细胞。1×10⁴ 个球体细胞即能在 NOD/SCID 小鼠皮下成瘤。[结论] 无血清培养能够有效的分离和扩增人胰腺癌细胞系 BxPC-3 的肿瘤干细胞。

关键词: 胰腺癌; 肿瘤干细胞; 无血清培养; OCT-4; 分离; 鉴定

中图分类号: R735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)06-0441-05

Isolation and Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells from BxPC-3 Cell Line Cultured in Serum-Free Medium

PAN Yan, HUA Yong-qiang, LIU Lu-ming, et al.

(Cancer Hospital, and Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: [Purpose] To isolate and identify pancreatic cancer stem cells from human pancreatic cancer cell line BxPC-3. [Method] BxPC-3 cells were cultured in serum-free medium to derive tumor spheres. Tumor spheres were then expanded and passage to estimate the potency of sphere-forming, then cultured in serum-containing medium to induce their differentiation. The protein expression of stem cell related transcript factor OCT-4 was evaluated by western blot. The tumorigenesis of the sphere-forming cells was observed in subcutaneously implanted NOD/SCID mice models. [Results] A few of floating tumor spheres were isolated and expanded in serum-free medium. These tumor spheres attached to the bottom of culture plates and began to differentiate when cultured in serum-containing medium. The protein expression of OCT-4 was significantly higher in sphere-forming cells of BxPC-3 than that attached cells. Only one thousand spheroid cells can form tumor in NOD/SCID mice. [Conclusion] Serum-free medium culture is an effective way to isolate and expand the pancreatic cancer stem cell from BxPC-3.

Key words: pancreatic cancer; cancer stem cells; serum-free medium culture; OCT-4; isolation; identification

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)学说认为, 肿瘤组织中并非所有的肿瘤细胞都具有恶性特征, 只有 CSC 具有自我更新和分化潜能, 成为肿瘤增殖生长、转移和复发的根源^[1]。CSC 的研究目前几乎涵盖了恶性肿瘤的所有研究领域, 包括肿瘤发生、发展及转移机制、治疗靶点选择和新药研发等, 是当前的

研究热点之一。然而, 肿瘤干细胞的培养、分离及生物学性质的鉴定一直是制约肿瘤干细胞研究的瓶颈。目前, 肿瘤干细胞分选方法众多, 比如免疫学(流式或免疫磁珠)分选或功能学(Hoechst33342, 侧群细胞)分选, 但是所得细胞数量极少, 难以进入下一步研究。本研究采用无血清培养方法培养胰腺癌细胞系 BxPC-3, 以期从中分离出胰腺癌干细胞相关亚群, 并对其生物学特性进行验证。

收稿日期: 2012-01-03

基金项目: 国家自然科学基金(81072942; 81173461; 30901911)

E-mail: yanpan2013@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

人胰腺癌细胞系 BxPC-3 为本室保存。胎牛血清 (FBS) (Hyclone), RPMI1640 (GIBCO), 100KU/L 青霉素和 100KU/L 链霉素 (Sigma), DMEM/F12 (Invitrogen), 0.25% 胰酶+0.01% EDTA (GIBCO), 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) (Invitrogen), B27 添加剂 (Invitrogen), 抗 GAPDH、OCT-4 一抗和兔抗人二抗 (cell signaling technology)。

NOD/SCID 小鼠, 购自复旦大学医学院动物实验中心, 6 周龄, 体重 18~22g, 雌性, 饲养于 SPF 级环境中。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人胰腺癌细胞系 BxPC-3 用含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的 RPMI1640 培养基 (serum-containing medium, SCM) 在 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 当细胞融合达 75%~80% 时, 0.25% 胰蛋白酶消化, 1:3 传代。

1.2.2 肿瘤细胞球单克隆形成实验

无血清培养基 (serum-free medium, SFM) 由 DMEM/F12 (1:1)、B27 (1:50)、EGF (20ng/ml)、bFGF (20ng/ml) 组成。将肿瘤细胞球 BxPC-3 细胞或处于对数生长期的贴壁 BxPC-3 细胞消化、离心, PBS 清洗 2 次, 用 SFM 重悬, 稀释单细胞悬液至 500 个/ml, 取 2μl/孔加入超低粘附 96 孔板中, 即每孔 1 个细胞, 并加入 100μl SFM 培养基。在 96 孔板板底标记上含有单个细胞的孔, 于 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 隔天观察并记录肿瘤细胞球形成数目。肿瘤细胞球第 1 次、第 3 次传代所得的细胞重复上述实验, 观察肿瘤细胞球形成率的变化。

1.2.3 肿瘤细胞球的传代、扩增

培养条件同上, 以 5×10⁴/ml 浓度用 SFM 重悬 BxPC-3 细胞, 将细胞置于超低粘附六孔板中, 2ml/孔, 每 3d 加入 500μl SFM。10d 后收集细胞球, 吹散后按 1:2 传代, 以后每 3d 加入 500μl SFM, 10d 传代继续培养扩增。记录传代、扩增相关情况。

1.2.4 肿瘤细胞球诱导分化实验

将生长良好的第 3 代肿瘤细胞球置入 SCM 中

培养, 倒置显微镜观察细胞贴壁过程中的形态变化并摄片。

1.2.5 动物体内成瘤实验

将肿瘤细胞球 BxPC-3 细胞和贴壁 BxPC-3 细胞消化吹散制成单细胞悬液, 用 PBS 洗 2 次后, PBS 重悬, 调整浓度为 1×10⁵/ml, 取两种细胞各 100μl 对称注入 NOD/SCID 小鼠左右上肢肩胛骨处皮下, 观察移植瘤形成时间及生长速度。每周称量体重 1 次, 隔日观察 1 次。持续 6 周, 处死取瘤。

1.2.6 HE 染色

脱颈处死小鼠, 取 NOD/SCID 小鼠皮下瘤块, 10% 甲醛固定, 石蜡包埋、切片、HE 染色, 镜下观察瘤块病理表现。

1.2.7 蛋白质印迹法

收集提取细胞蛋白, Lowry 法检测蛋白质浓度。Western Blot: 固定: 蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 并从凝胶上转移到 PVDF 膜上; 封闭: 取下 PVDF 膜, TBST 清洗 5min×3 次, 在盛有封闭液的玻璃平皿中室温平缓摇动 2h; 一抗 4℃ 孵育过夜; TBST 清洗 5min×3 次后室温与二抗孵育 1h; 显色: 将 PVDF 膜放入 TBST 中平衡 5min, 根据 ECL 试剂盒说明, 于暗室中显影, Las4000 摄片。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析, 实验结果用均数±标准差表示, 两组资料比较采用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌肿瘤细胞球形成情况

胰腺癌 BxPC-3 细胞接种于 SFM 后 2~3d, 大部分细胞散在悬浮于培养基中, 少量细胞球形成, 细胞数目数个至数十个不等, 另一部分细胞凋亡崩解。第 6~8d 时, 类圆形或椭圆形细胞球逐渐增大, 细胞数目增多, 边界清晰, 细胞间连接紧密, 不能准确区分细胞与细胞间界限, 随着时间的延长生长速度逐渐减慢 (图 1)。随着培养时间的延长, 有一些处于短暂增殖期细胞形成的肿瘤细胞球进一步凋亡崩解。新生单个细胞常以“出芽”的方式连接在球体上。

2.2 肿瘤细胞球细胞具有更强的成球能力

贴壁 BxPC-3 细胞成球率为 4.50%±0.94%, 第 1

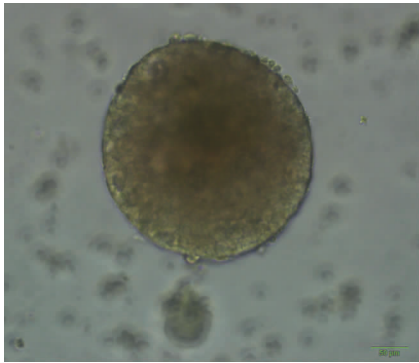


图1 倒置显微镜镜下 BxPC-3肿瘤细胞球形形态图($\times 200$)

代、第3代肿瘤细胞球通过胰酶消化法和机械吹打法分离成单细胞悬液,传代后肿瘤细胞球细胞形成的肿瘤球较贴壁 BxPC-3 细胞形成的肿瘤细胞球数目明显增多,形成时间亦较前缩短,但仍有部分肿瘤细胞球细胞未能形成新的肿瘤细胞球,第1代、第3代肿瘤细胞球细胞成球率为 $37.58\% \pm 1.96\%$ 和 $79.32\% \pm 0.86\%$ ($P < 0.05$)。见图2、3。

2.3 SCM 对胰腺癌细胞球的诱导分化

将胰腺癌细胞球置于 SCM 中,12h 后可见肿瘤细胞球周边细胞贴壁,中央仍可见球体结构,贴壁细胞呈梭形或不规则形,随着培养时间的延长,贴壁细胞逐渐增多,肿瘤细胞球体逐渐缩小。SCM 培养3d后,基本形成贴壁单细胞层,肿瘤细胞球完全消失(图4)。

2.4 肿瘤细胞球细胞具有强致瘤能力

在 NOD/SCID 小鼠上肢肩胛骨处皮下接种 BxPC-3 肿瘤细胞球细胞 1×10^4 个,4 周后即可观察到形成明显的移植瘤,成瘤率 100%(3/3),而接种贴壁 BxPC-3 细胞的 NOD/SCID 小鼠移植瘤形成不明显,成瘤率为 0(0/3)。当接种细胞数上升至 1×10^6 时,贴壁 BxPC-3 细胞方可成瘤。贴壁 BxPC-3 细胞和成球 BxPC-3 细胞所形成的瘤块病理 HE 染色镜下类型相似,均可见核大、多核的肿瘤组织(粗黑箭头),凝固性、含有炎性细胞浸润的坏死组织(细黑箭头)(图5)。

2.5 蛋白质印迹

采用蛋白质印迹法对肿瘤细胞球 BxPC-3 细胞和贴壁 BxPC-3 细胞干细胞相关核转录因子 OCT-4 蛋白进行检测,结果显示:BxPC-3 肿瘤细胞球 OCT-4 蛋白表达明显高于贴壁 BxPC-3 细胞(图6)。

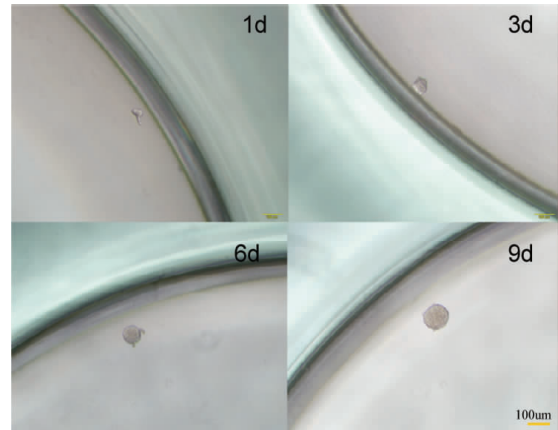


图2 倒置显微镜下单个 BxPC-3 细胞形成肿瘤细胞球过程($\times 100$)

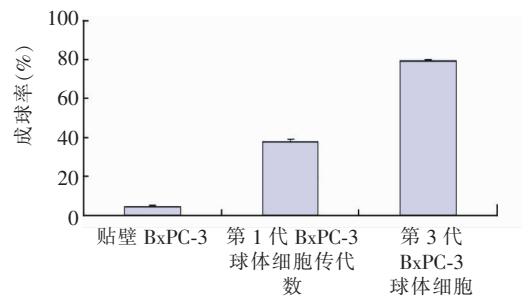


图3 不同传代数肿瘤细胞球细胞成球率变化

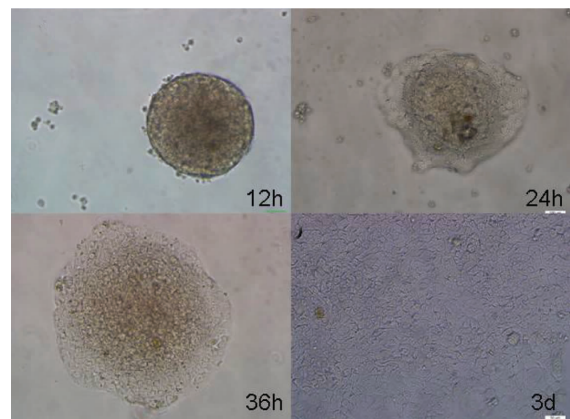


图4 SCM 中不同时间点胰腺癌细胞球分化、贴壁情况($\times 100$)

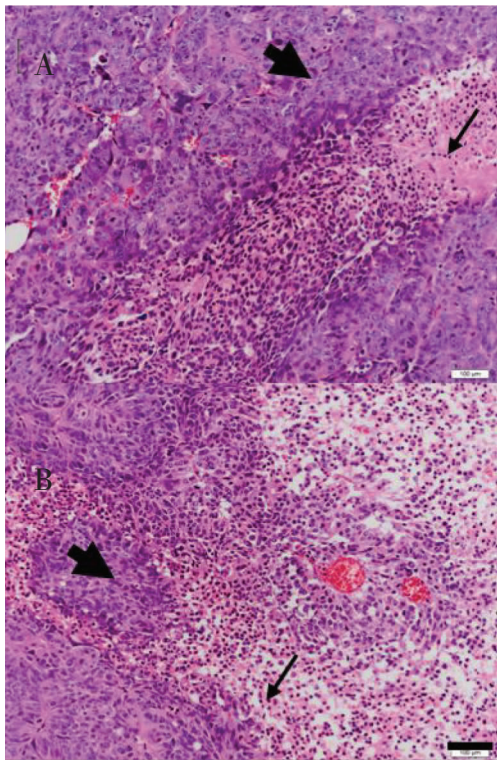
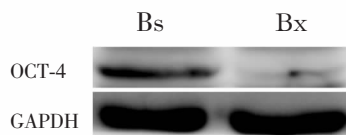


图5 贴壁 BxPC-3(A)细胞与 BxPC-3 肿瘤细胞球细胞(B)形成瘤块镜下表现(HE×100)



GAPDH 为内参;Bs 指 BxPC-3 肿瘤细胞球细胞;
Bx 指贴壁 BxPC-3 细胞。

图6 干细胞相关核转录因子 OCT-4蛋白表达情况

3 讨论

肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSC)学说认为:肿瘤组织中并非所有的肿瘤细胞都具有恶性特征,只有 CSC 具有自我更新和分化潜能,成为肿瘤增殖生长、转移和复发的根源^[1]。CSC 的研究目前几乎涵盖了恶性肿瘤的所有研究领域,包括肿瘤发生、发展及转移机制、治疗靶点选择和新药研发等,是当前的研究热点之一。因此,分离并鉴定肿瘤干细胞是首要任务。目前比较公认的肿瘤干细胞分离方法是利

用细胞表面抗原进行免疫学(流式或免疫磁珠)分选或功能学(Hoechst33342,侧群细胞)分选。Lee 等^[2]利用流式细胞仪成功分离人胰腺癌组织中的 CD44+CD24+ESA+细胞,但其比例仅为 0.2%~0.8%。Hermann 等^[3]采用另一细胞表面抗原 CD133+分离人胰腺癌组织中的肿瘤干细胞,所得细胞比例同样很低。各胰腺癌细胞系中侧群细胞约占 0.71%~6.41%^[4]。这些方法分离所得的目标细胞数量极少,而研究所需的细胞数量极大,这一矛盾大大限制了肿瘤干细胞研究的发展。

长期研究发现 EGF 和 bFGF 的无血清培养基可利于正常干细胞体外扩增。大量研究证实含生长因子的无血清培养可分离出各种实体瘤中的肿瘤干细胞^[5-10]。因此,本研究利用含有 EGF、bFGF 和 B27 添加剂的无血清培养条件分离胰腺癌细胞系 BxPC-3 中的肿瘤干细胞,并对其干细胞特性进行了一系列验证。一小部分单个贴壁 BxPC-3 细胞在 SFM 条件下形成肿瘤细胞球,成球率约为 4.50%±0.94%;随着培养时间的延长,球体体积不断增大,说明 BxPC-3 细胞中存在某一细胞亚群,这类细胞具有自我更新能力。形成的肿瘤细胞球可大量传代、扩增。随着肿瘤细胞球传代次数的增多,传代后细胞成球率明显升高,第 1 代、第 3 代肿瘤细胞球细胞成球率分别为 37.58%±1.96%和 79.32%±0.86%,提示 SFM 培养可富集这类型的细胞,且此类细胞在传代富集过程中不断纯化。这类肿瘤细胞球一旦置于 SCM 中,迅速贴壁生长,分化、增殖,直至恢复成与原贴壁 BxPC-3 细胞相同的细胞形态。

理论上讲,肿瘤干细胞具有成瘤能力,而非肿瘤干细胞因其有限增殖能力难以形成肿瘤。Lee 等^[2]研究提示只需 100 个 CD44+CD24+ESA+胰腺癌细胞就能形成具有典型胰腺癌病理学特性的肿瘤。与预期结果相同,本研究中肿瘤细胞球细胞表现出更为强大的致瘤能力,只需 1×10⁴ 个肿瘤细胞球细胞即能在 NOD/SCID 小鼠皮下成瘤,而贴壁细胞成瘤至少需 1×10⁶ 个细胞,并且两者瘤块病理学特征相似。这些结果均表明肿瘤细胞球细胞富集了肿瘤干细胞。

OCT-4 是一种干细胞相关核转录因子,是胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESC)自我更新的调控开关,在 ECS 维持自我更新和全能性分化中起关键作用^[11]。我们利用蛋白质印迹法检测贴壁 BxPC-3

细胞和 BxPC-3 肿瘤细胞球中 OCT-4 蛋白表达情况,结果显示后者表达明显高于前者。提示 BxPC-3 肿瘤细胞球细胞是肿瘤干细胞。

总之,BxPC-3 细胞中的一小部分能在 SFM 中存活并能自我更新形成肿瘤细胞球,这类肿瘤细胞球细胞具有更强的成瘤能力,且高表达干细胞核转录因子 OCT-4。无血清培养法是一种高效、便捷的胰腺癌 BxPC-3 肿瘤干细胞富集方法,为肿瘤干细胞研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Visvader JE,Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumors: accumulating evidence and unresolved questions [J]. Nat Rev Cancer,2008,8(10):755-768.
- [2] Lee CJ,Dosch J,Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells [J]. J Clin Oncol,2008,26(17):2806-2812.
- [3] Hermann PC,Huber SL,Herrler T,et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer [J]. Cell Stem Cell,2007,1(3):313-323.
- [4] Yao J,Cai HH,Wei JS,et al. Side population in the pancreatic cancer cell lines SW1990 and CFPAC-1 is enriched with cancer stem-like cells [J]. Oncol Rep,2010,23(5):1375-1382.
- [5] Li YF,Xiao B,Lai ZS,et al. Spheres isolated from Colo205 cell line possess cancer stem-like cells under serum-free culture condition [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao,2008,28(2):236-240.
- [6] Yu SC,Ping YF,Yi L,et al. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87 [J]. Cancer Lett,2008,265(1):124-134.
- [7] Fan X,Liu S,Su F,et al. Effective enrichment of prostate cancer stem cells from spheres in a suspension culture system [J]. Urol Oncol,2010. [Epub ahead of print]
- [8] Zhou S,Li F,Xiao J,et al. Isolation and identification of cancer stem cells from human osteosarcom by serum-free three-dimensional culture combined with anticancer drugs [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci,2010,30(1):81-84.
- [9] Cao L,Zhou Y,Zhai B,et al. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines [J]. BMC Gastroenterol,2011,11:71.
- [10] Hueng DY,Sytwu HK,Huang SM,et al. Isolation and characterization of tumor stem-like cells from human meningiomas[J]. J Neurooncol,2011,104(1):45-53.
- [11] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells [J]. Cell,2005,122(6):947-956.