

[文章编号] 1000- 4718(2009) 11- 2187- 05

5氟尿嘧啶上调干细胞标记物 CD133 在结肠癌细胞中的表达*

邓艳红¹, 黄美近¹, 汪建平¹, 林桐榆², 肖健¹, 蔡永华¹, LIN Edward-H³
(¹中山大学附属第六医院化疗科, 结直肠外科, 广东 广州 510655; ²中山大学附属肿瘤防治中心化疗科,
广东 广州 510065; ³Seattle Cancer Care Alliance, WA 98115 USA)

[摘要] 目的: 研究通过 5 氟尿嘧啶 (5-FU) 对结肠癌干细胞标记物 CD133 表达的影响, 探讨 5-FU 对结肠癌干细胞的影响。方法: 用流式细胞仪检测 CD133 在结肠癌细胞株表面的表达, 磁珠细胞分离的方法分离结肠癌细胞株 DLD1 中 CD133 阳性和阴性的细胞群, 细胞克隆形成实验检测 2 群细胞的自我更新能力, 新型四唑氮盐方法 (MTS) 检测 2 群细胞对 5-FU 敏感性的差异, qPCR 方法检测 5-FU 处理结肠癌细胞后 CD133mRNA 水平的变化。结果: 结肠癌细胞株 DLD1、HT29、SW 480、HCT116、Lovo、RKO 细胞表面 CD133 的表达率分别为 30.20%、82.00%、0.34%、91.80%、85.30%、0.28%。DLD1 细胞中以 CD133 为标记有 2 群明显的细胞, MACS 方法分离后阳性细胞群中 CD133 为 87.21% ± 5.33%, 而阴性细胞群中阴性细胞的比例为 84.30% ± 4.65%; CD133 阳性的细胞与未分离及 CD133 阴性细胞相比, 克隆形成能力强 (46.33% ± 4.44% vs 31.00% ± 2.00%, $P < 0.05$), 对 5-FU 的敏感性下降 20%, $P < 0.01$ 。在 DLD1 和 HT29 细胞中, 5-FU 1 mg/L 上调 CD133mRNA 水平的表达, 从 1 升为 1.684 ± 0.012 ($P < 0.01$)、HT29 细胞从 30.702 ± 0.284 升为 49.379 ± 0.460 ($P < 0.01$)。结论: 与 CD133 阴性细胞相比 CD133 阳性细胞克隆形成能力强, 对 5-FU 的敏感性下降; 5-FU 上调干细胞标记物 CD133mRNA 水平的表达, CD133 阳性的结肠癌干细胞在 5-FU 的治疗过程中被富集。

[关键词] 结肠肿瘤干细胞; CD133; 氟尿嘧啶

[中图分类号] R735.3 **[文献标识码]** A

5-FU upregulates stem cell marker CD133 expression in colon cancer cells

DENG Yan-hong¹, HUANG Mei-jin¹, WANG Jian-ping¹, LIN Tong-yu², XIAO Jian¹, CAI Yong-hua¹, LIN Edward-H³

(¹Department of Medical Oncology, Colorectal Surgery, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655 China; ²Department of Medical Oncology, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510065 China; ³Seattle Cancer Care Alliance, WA 98115 USA. E-mail: littleqica@163.com)

[ABSTRACT] **AM:** To investigate the effect of 5-fluorouracil (5-FU) on the expression of the stem cell marker CD133 on colon cancer stem cells. **METHODS:** CD133 expression on several colon cancer cell lines was detected by flow cytometry. The CD133 positive cells from DLD1 cells were separated by the method of magnetic activated cell separation. Colony assay was used to measure self-renewal ability and MTS assay was used to detect the sensitivity to 5-FU after separation. After 5-FU treatment, the change of CD133 mRNA level was measured by qPCR. **RESULTS:** CD133 expression on the surface of colon cancer cell lines DLD1, HT29, SW 480, HCT116, Lovo, RKO was 30.20%, 82.00%, 0.34%, 91.80%, 85.30%, 0.28% respectively. DLD1 cells had two obvious populations according to CD133 expression. CD133 positive cells were separated from DLD1 cells, the positive purity was 87.21% ± 5.33% and the negative purity was 84.30% ± 4.65%. CD133 positive cells formed more colonies with limited dilution colony assay (46.33% ± 4.44% vs 31.00% ± 2.00%, $P < 0.05$). CD133 positive cells were less sensitive to 5-FU compared to CD133 negative cells (20% less, $P < 0.01$). 5-FU at concentration of 1 mg/L upregulated CD133 mRNA expression in both DLD1 and HT29 cells, the relative quantity was increased from 1 to 1.684 ± 0.012 ($P < 0.01$) and 30.702 ± 0.280 to 49.379 ± 0.460 ($P < 0.01$) in HT29 and DLD1, respectively. **CONCLUSION:** Compared to CD133 negative cells, CD133 positive cells show more ability to form colonies *in vitro*, and are less sensitive to 5-FU. 5-FU upregulates the mRNA expression of CD133, resulting in the CD133 colon cancer stem cells enrichment during 5-FU treatment.

[KEY WORDS] Colon neoplasm stem cells; CD133; Fluorouracil

[收稿日期] 2009-02-10 [修回日期] 2009-08-15

* [基金项目] 广东省自然科学基金博士启动资助项目 (No. 06300805)

Tel: 020-38250745 E-mail: littleqica@163.com

随着中国生活水平的提高,结直肠癌的发病率不断上升。在美国,结直肠癌所致的死亡位于癌症所致死亡的第2位^[1]。新药研发改善了转移性结直肠癌患者的总体生存,然而,对于大多数晚期患者而言,治疗依然是姑息性的^[2]。最近的证据表明,结肠癌由1组异质性的细胞组成,这些细胞的致肿瘤形成的能力不同。肿瘤起始细胞亦称肿瘤干细胞(cancer stem cell CSC)定义为能启动并形成肿瘤细胞,而且这些细胞能通过其表面的标记物被识别,CD133就是其中的标记物^[3]。CD133(prominin-1)是5跨膜蛋白家族的首个成员,含865个氨基酸,有胞外N端,胞内C端,2个大的胞外环含8个糖基化位点。尽管CD133已经用于分离各种肿瘤干细胞(包括结肠癌),其功能还不很清楚^[4]。

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil 5-FU)是消化系统肿瘤的基础用药,尤其是结直肠癌,所有的化疗方案都含氟尿嘧啶类药物,即使在疾病发展较缓慢,或者存在严重的合并症而使用单药治疗的患者,也必定使用5-FU,而不是其它有效的细胞毒药物如奥沙利铂或者伊立替康。根据肿瘤干细胞的理论,常规的细胞毒药物只能杀灭快速增长的细胞,而CSC对细胞毒药物耐药,从而导致肿瘤的复发及转移。那么,传统的化疗药物如5-FU到底对结肠癌干细胞有怎么样的影响?本文拟通过5-FU对结肠癌干细胞标记物CD133的作用,探讨5-FU对结肠癌干细胞的影响,同时论证肿瘤干细胞的理论在结肠癌细胞株的应用。

材 料 和 方 法

1 试剂

5-FU购于Sigma,将其溶于双蒸水中制成100 g/L浓度的储存溶液,置于-20℃的冰箱中备用,根据需要稀释成不同浓度的实验溶液。

2 细胞培养

6个结肠癌细胞株DLD1、HT29、HCT116、SW480、Lovo、RKO(由华盛顿大学干细胞中心Moon教授的实验室提供)培养于含 1×10^5 U/L青霉素和链霉素的10% DMEM中(Invitrogen),置于5% CO₂的培养箱中在37℃下培养,用于实验的细胞最多传代10次。

3 细胞活性测定及计数

新型四唑氮盐方法(MTS)通过线粒体功能测定细胞活性,试剂盒为CellTiter aqueous assay kit(Promega)。细胞以3000 cells/well的浓度种于96孔板的培养皿,限制性稀释的方法将5-FU加入各个孔中,形成倍增的浓度梯度。48 h后,加入20 μL MTS,37℃孵育1-4 h,然后在酶标仪490 nm下读数,以空白对照为参照,计算出细胞活性的百分比。所有

试验设平行3组,独立重复3次。

4 流式细胞仪分析 (fluorescence activated cell analysis FACS)

单个细胞混悬液与 anti-CD133/2(293C3-PE, M ilteny i) 10:1或者异构体对照(mouse IgG2b-PE) 10:1混合4℃下染色30 min, PBS洗脱后加入7AAD(BD Biosciences)以排除死细胞对结果的影响,上流式细胞仪(FACS Canto II, BD Biosciences)检测CD133⁺细胞的比例,所有试验设平行3组,独立重复3次。

5 磁珠激活细胞分离 (magnetic activated cell separation MACS)

单个混悬的细胞与 anti-CD133/1磁珠微粒4℃下混合(AC133 mouse IgG1, cell isolation kit m ilteny i) 30 min,洗脱后通过磁柱,阳性细胞被吸附,而阴性细胞直接流过柱子,然后将阳性的细胞洗出。磁性分离后,台盼蓝染色评估细胞活性,分离后的细胞以流式细胞仪检测阳性细胞和阴性细胞的纯度。细胞与 anti-CD133/2(293C3-PE, m ilteny i)或者异构体对照(mouse IgG2b-PE)混合染色30 min,洗脱后加入7AAD(BD Biosciences)以排除死细胞对结果的影响,上流式细胞仪(FACS Canto II, BD Biosciences)检测CD133⁺细胞的比例,所有试验设3组并独立重复3次。

6 细胞克隆形成实验

MACS方法将DLD1细胞分为DLD1CD133⁺和DLD1CD133⁻2群细胞后,限制性稀释的方法将细胞稀释成1 cell/well的浓度种植于96孔板,各3板,每3 d更换培养液,10 d后在显微镜下计算克隆形成的数量。

7 实时定量 PCR (qPCR)

Qiagen试剂盒提取总RNA, Invitrogen逆转录酶逆转录成cDNA。与Taqman探针混合后在ABI PRISM 7300HT仪器(Applied Biosystems)进行PCR反应,引物为Hs01009257_m1 prominin1,或者内源性对照4333762T ACTB(Applied Biosystems)。反应条件为:95℃ 10 min,然后50×15 s 95℃, 60℃ 1 min。相对定量通过比较Ct。数据处理和统计使用软件ABI PRISM SDS version 2.1(Applied Biosystems)。所有试验设3组并独立重复3次。

8 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。t检验比较两组间的差别。

结 果

1 CD133在各个细胞株中的表达情况

FACS的方法检测结肠癌细胞株DLD1、HT29、SW480、HCT116、Lovo、RKO中CD133的表达情况,

见图 1, 其表达率分别为 30.20%、82.00%、0.34%、91.80%、85.30%、0.28%。其中只有 DLD1 细胞中有 2 个明显分开的细胞群分别为 DLD1CD133⁺ 和 DLD1CD133⁻, HT29 中几乎所有的细胞都表达 CD133 因此, 以下的实验选取 DLD1 和 HT29 为主要

研究对象。5-FU 剂量依赖性抑制结肠癌细胞生长: 为最佳地选用体外使用 5-FU 浓度, 我们以 MTS 方法测定梯度 5-FU 浓度对 HT29、DLD1 细胞增殖的影响。细胞活性的测定在 48 h 后, 见图 2。5-FU 对 HT29 和 DLD1 的抑制呈剂量依赖性, IC₅₀ 约为 10 mg/L。

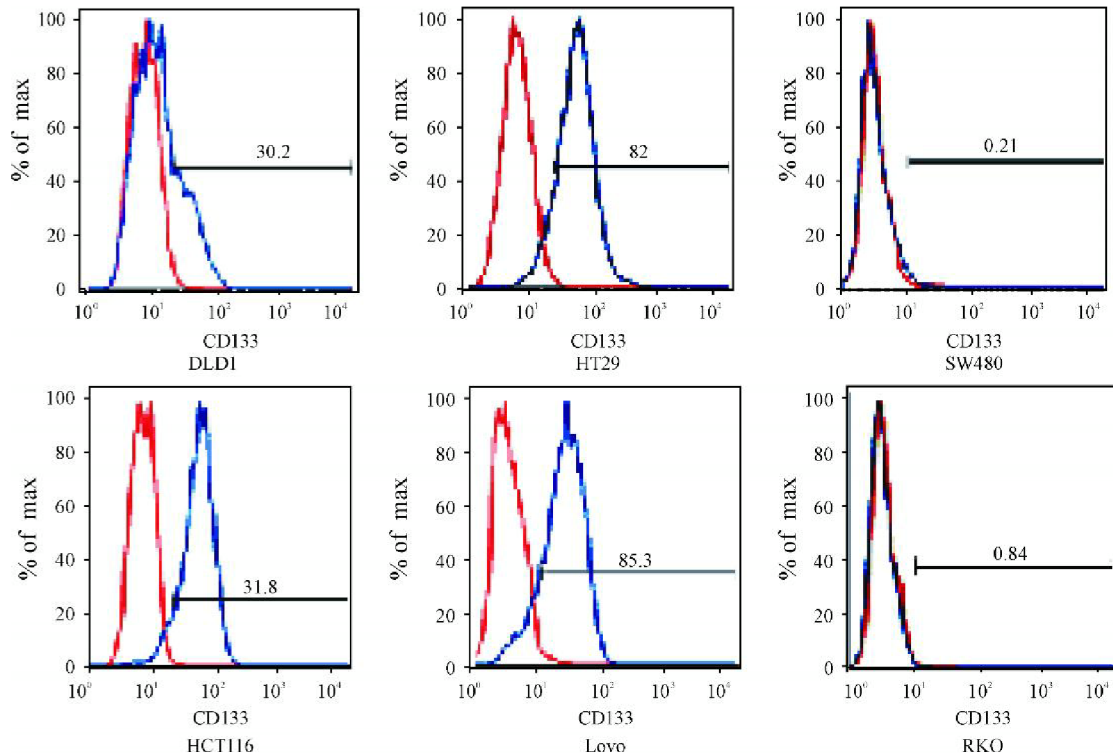


Fig 1 CD133 expression in 6 colon cancer cell lines DLD1 cells have two obvious populations according to CD133 expression Most of the cells expressed CD133 in HT29 HCT116 and Lovo CD133 was barely expressed in SW 480 and RKO.

图 1 CD133 在不同结肠癌细胞株中的表达

2 CD133⁺ 的细胞克隆生长能力较 CD133⁻ 的细胞强

DLD1 细胞明显存在 CD133⁺ 和 CD133⁻, 阳性的细胞比例为 30.87% ± 2.51%, 见图 2A。通过 MACS 方法分离后阳性细胞群中 CD133⁺ 细胞比例为 87.21% ± 5.33%, 而阴性细胞群中阴性细胞的比例为 84.30% ± 4.65%, 见图 3A, DLD1 细胞分为 DLD1CD133⁺ 和 DLD1CD133⁻ 2 群细胞后, 限制性稀释法将未分离和分离后的 3 群细胞以 1 cell/well 的浓度种植于 96 孔板, 各 3 板, 10 d 后在显微镜下计算克隆形成的数量, 结果显示 DLD1、DLD1CD133⁺ 和 DLD1CD133⁻ 细胞形成的克隆数分别为: 39.67% ± 5.62%、46.33% ± 4.44%、31.00% ± 2.00%, DLD1CD133⁺ 和 DLD1CD133⁻ 细胞之间的克隆形成能力比较有显著差异, $P < 0.05$ 如图 3B 所示。2 群细胞形成的克隆如图 3C、D 所示。

3 CD133⁺ 的细胞对 5-FU 敏感性下降

MACS 方法分离 DLD1 细胞后, DLD1、DLD1CD133⁺ 和 DLD1CD133⁻ 细胞被不同浓度的 5-FU 处理, 浓度梯度为 0 mg/L、6.25 mg/L、12.5 mg/L、

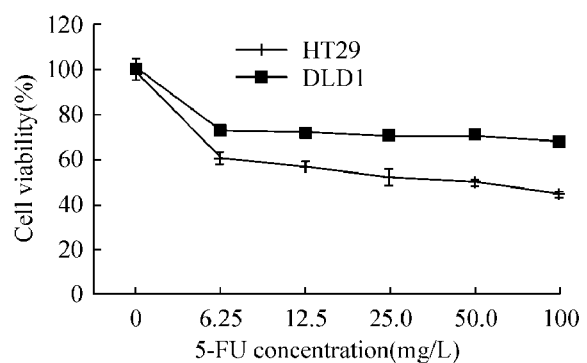


Fig 2 MTS assay of HT29 and DLD1 cell response to 5-FU. $\bar{x} \pm s$ n = 3

图 2 HT29 和 DLD1 对 5-FU 的敏感性测定

25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L, 48 h 后 MTS 方法测定 3 群细胞的活性, 结果显示 3 条曲线基本平行, 未分离的 DLD1 细胞位于中间, DLD1CD133⁺ 细胞的曲线在其它 2 条曲线的上方, 与 DLD1CD133⁻ 细胞相比, 对 5-FU 的敏感性显著下降 20%, $P < 0.01$, 见图 4。

4 5-FU 上调结肠癌细胞中 CD133 mRNA 水平

2 组浓度的 5-FU (1 mg/L、10 mg/L) 处理 HT29 和 DLD1, 48 h 后 RT-PCR 的方法检测药物处

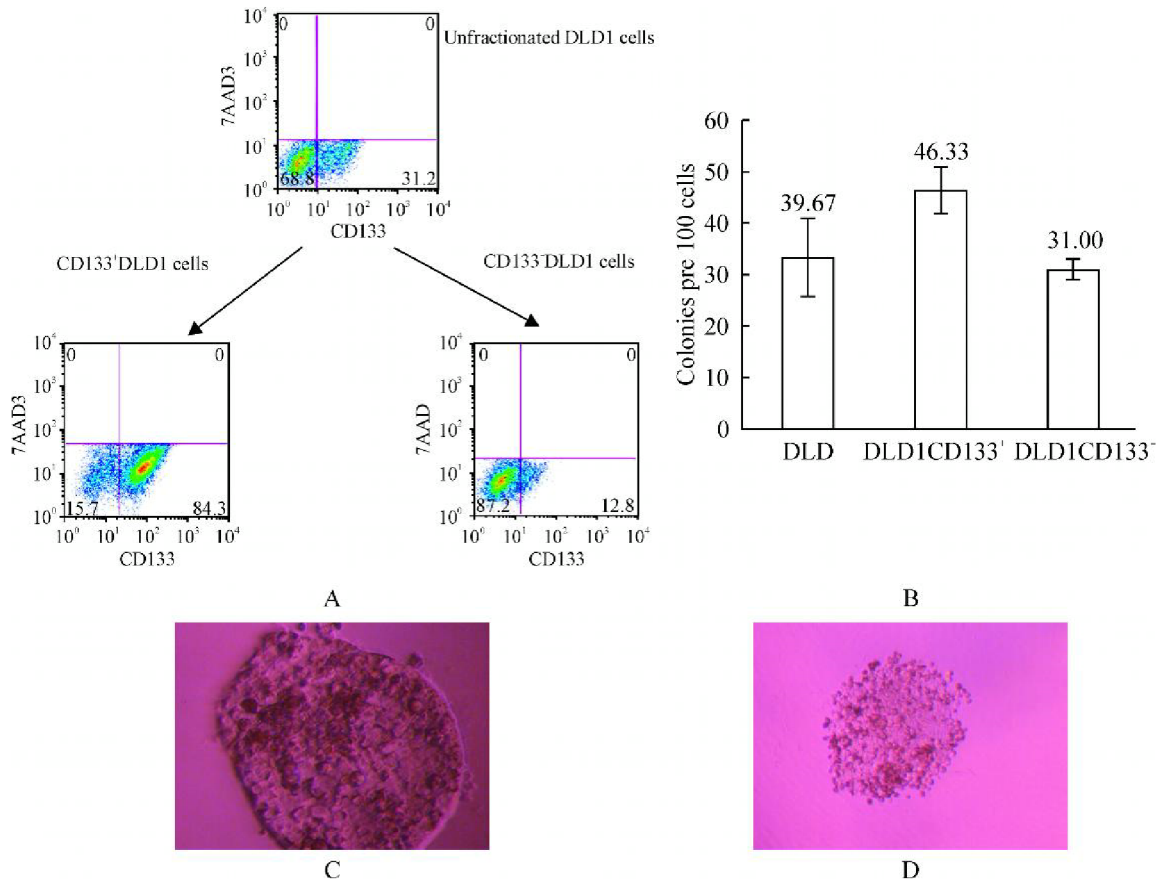


Fig 3 A: CD133 expression before and after MACS separation. CD133⁺ cells were enriched from 30.87% ± 2.51% to 87.21% ± 5.33%; B: colony assay after MACS separation. DLD1CD133⁺ cells formed more colonies than DLD1CD133⁻ cells (46.33% ± 4.44% vs 31.00% ± 2.00%, *P* < 0.05). C: typical colony formed by DLD1CD133⁺. D: typical colony formed by DLD1CD133⁻.

图 3 A: CD133在未分离 DLD1和分离后 DLD1CD133⁺、DLD1CD133⁻细胞中的表达; B: MACS分离后细胞克隆形成实验; C: DLD1CD133⁺形成的克隆; D: DLD1CD133⁻形成的克隆

理后 CD133mRNA 水平的变化, 未处理的 DLD1mRNA 水平相对量为 1, 5-FU 1 mg/L 处理后 DLD1 细胞 mRNA 水平从 1 升为 1.684 ± 0.012 (*P* < 0.01), HT29 细胞从 30.702 ± 0.280 升为 49.379 ± 0.460 (*P* < 0.01)。5-FU 10 mg/L 处理后 DLD1 和 HT29 细胞 CD133mRNA 水平分别变为 0.877 ± 0.010 (*P* > 0.05), 40.318 ± 0.380 (*P* > 0.05)。5-FU 1 mg/L 的浓度能显著增加 CD133mRNA 在 2 种细胞株中表达, 且与处理前相比差异显著。

讨 论

尽管治疗策略不断发展, 综合应用目前所有对转移性结直肠癌有效的药物, 晚期结直肠癌患者的平均生存期只有 20-24 个月, 其治疗依然只是姑息性的^[21]。因此进一步探讨结直肠癌的发生学理论, 靶向某些对肿瘤生长起决定性作用的细胞群是关键。肿瘤干细胞的理论认为, 肿瘤起始细胞对传统的细胞毒药物耐药, 对放疗不敏感, 在传统治疗中存

活从而导致了肿瘤的复发和转移^[7]。根据肿瘤干细胞理论的模型, 未来发展方向将是研发针对这些对治疗不敏感的肿瘤干细胞的药物, 可能为治愈肿瘤带来新的希望。

多种不同类型的细胞中, CD133 是成人干细胞表面膜的标记物, 其表达意味着干细胞性的保持^[4]。从外周血中分离的 CD133⁺ 细胞能用于骨髓移植, CD133⁺ 的细胞能分化成肌肉细胞和心肌细胞等^[8]。肾脏分离出来的 CD133⁺ 的细胞在体内外有自我更新的能力, 可通过向肾脏上皮和内皮细胞分化而再生肾脏^[9]。最近, CD133 被认为是多种肿瘤干细胞的标记物, 包括结肠癌、前列腺癌、胰腺癌、肝癌和脑恶性胶质瘤^[7]。尽管其蛋白功能还不太明确, 由于是 1 个肿瘤干细胞的标记物, 用于分离肿瘤干细胞, 能有助于寻找靶向治疗肿瘤干细胞的靶点。

Bao 等^[10] 从恶性胶质瘤细胞中分离了 CD133⁺ 肿瘤干细胞, 发现这些细胞对离子型的放疗不敏感, 可能是由于 DNA 修复功能强。Woodward 等^[11] 也发

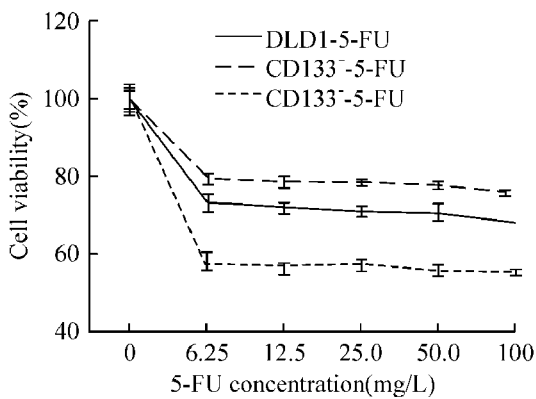


Fig 4 The sensitivity of unfractionated DLD1, DLD1CD133⁺ and DLD1CD133⁻ to 5-FU (MTS assay). DLD1CD133⁺ cells were less sensitive to 5-FU compared to DLD1 and DLD1CD133⁻ (20% inferior $P < 0.05$, $n = 3$).

图 4 DLD1、DLD1CD133⁺ 和 DLD1CD133⁻ 细胞对 5-FU 的敏感性 (MTS 分析)

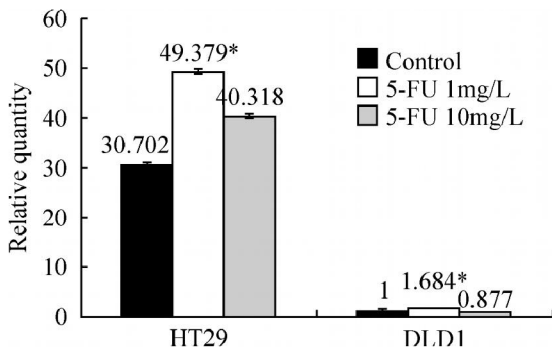


Fig 5 Real-time PCR showed change of CD133 mRNA level after 5-FU treatment. In both cell lines, 5-FU (1 mg/L) upregulated CD133 mRNA expression significantly. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$, $P < 0.05$ vs control. 49.379 ± 0.460 vs 30.702 ± 0.280 , 1.684 ± 0.012 vs 1 for HT29 and DLD1, respectively.

图 5 实时定量 PCR 显示 5-FU 1 mg/L 处理 2 种细胞后, CD133 mRNA 表达的水平上调

现乳腺癌的干细胞对放疗不敏感, Todaro 等^[12]发现 CD133⁺ 细胞对 5-FU 和奥沙利铂的敏感性下降。本研究将结肠癌细胞株 DLD1 中的 2 群细胞通过 MACS 的方法分离, 发现 CD133⁺ 细胞在克隆形成能力方面较 CD133⁻ 的细胞强, 说明 CD133⁺ 细胞体外自我更新的能力比阴性的细胞强; 通过 MTS 方法发现阳性细胞对 5-FU 的敏感性下降, 也证实了干细胞对传统化疗药物耐药的假设; 并且 5-FU 导致干性标记物 CD133 mRNA 水平表达上调与肿瘤干细胞的假设相符, 即传统的细胞药物杀灭快速分裂的细胞 (CD133⁻ 细胞), 而无法杀灭肿瘤干细胞, 那么在细胞毒药物处理细胞后, 肿瘤干细胞 (CD133⁺) 所占的比例将上调, 表现为其标记物表达的上调, 说明 5-FU 能富集 CD133 高表达的结肠癌干细胞, 能为将来靶向治疗干细胞提供一种富集的方法。

本研究通过探讨从结肠癌细胞中分离 CD133⁺ 的细胞群, 并证实阳性细胞自我更新能力强, 对传统化疗药物不敏感, 证明了肿瘤干细胞的理论在结肠癌细胞株的应用。5-FU 能富集结肠癌肿瘤干细胞群。而肿瘤干细胞的治疗将给晚期癌症治疗的患者带来新的希望。

(致谢: 感谢美国华盛顿大学干细胞研究中心 Blau 教授及其所有实验室成员的指导, 感谢美国华盛顿大学干细胞研究中心 Moon 教授实验室提供细胞株。)

[参 考 文 献]

[1] 邓艳红, 兰平. 直肠癌的综合治疗及对中低位直肠癌功能保护的意义 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2007, 10 (4): 396-398

[2] Huwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer [J]. N Engl J Med 2004, 350(23): 2335-2342

[3] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human coloncancer-initiating cells [J]. Nature, 2007, 445(7133): 111-115

[4] Lin E, Jiang Y, Deng Y, et al. Cancer stem cells, endothelial progenitors, and mesenchymal stem cells: "seed and soil" theory revisited [J]. GCR, 2008, 2(4): 169-174

[5] Jen J, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics 2006 [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(2): 106-130

[6] Hirai I, Kimura W, Fuse A, et al. Surgical management for metastatic liver [J]. Hepatogastroenterology, 2006, 53 (71): 757-763

[7] 郭运杰, 崔秀英, 姚和瑞. 乳腺癌细胞株 MCF-7/ADM 中肿瘤干细胞的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(12): 2374-2377

[8] Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment [J]. J Pathol 2008, 214(1): 3-9

[9] Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, et al. Adult stem cells and their trans-differentiation potential—perspectives and therapeutic applications [J]. J Mol Med 2008, 86(12): 1301-1314

[10] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response [J]. Nature, 2006, 444(7120): 756-760

[11] Woodward WA, Chen MS, Behbod F, et al. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104 (2), 618-623

[12] Todaro M, Alea MP, DiStefano AB, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4 [J]. Cell Stem Cell 2007, 1(4): 389-402