doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.04.013

• 临床研究 •

人结直肠肿瘤干细胞的分离培养与生物学特性

马丽君[1]，王立斌[1]，李　海[2]，叶　萍[1]，谢晓亮[2]，李玉奎[1]，杨银学[2]

Isolation, Culture and Biological Characteristics of Tumor Stem Cells in Human Colorectal Carcinoma

MA Lijun[1], WANG Libin[1], LI Hai[2], YE Ping[1], XIE Xiaoliang[2], LI Yukui[1], YANG Yinxue[2]

1.Ningxia Human Stem Cell Institute,The General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004,China,2.Surgical Department of Colon

Corresponding Author:LI Yukui,E-mail:yukuili@hotmail.com;YANG Yinxue,E-mail:53512756@qq.com

Abstract: Objective To isolate colon cancer stem cells from human colorectal carcinoma and study the biological characteristics *in vitro*. **Methods** Primary colorectal carcinoma cells were cultured in serum free conditions which give rise preferentially to self-renewal stem cell spheres. Cells have capability of developing into tumor spheres were cloned by limiting dilution and clones from single-cell proliferation were isolated. The proliferative potential of cloned cells was tested using MTT colorimetric method. Expression of cell surface marks, including CD133, CD166, CD24, CD47, CD200, CD90, CD44 and EPCAM were analyzed by flow cytometry. The expression of stem cell-specific genes, Oct4, Sox2, C-myc and Nanog, by cell clones was tested and quantified by real-time quantitative PCR. **Results** From primary cultures, 10 clones which were capable of unlimited self-renewal were isolated and expended by continuous subcultures. These clones were positive for surface marks CD166, CD47, CD44, and CD90, and negative for CD133, CD24, CD200 and EPCAM. Cell proliferation analysis showed that, comparing with their original cultures, cloned cells had higher proliferation rate and expressed higher levels of stem cell-specific genes Oct4, Sox2 and C-myc. Expression of Nanog was not detected in both cloned cells and their original cultures.**Conclusion** Colon cancer stem cells existing in human colorectal carcinoma have biological characteristics of self-renewing and indefinite proliferation. Those tumor cells could be isolated, culture and purified *in vitro*.

Key words: Colorectal cancer;Cancer stem cells;Clone cell

摘　要：目的　从人结直肠肿瘤细胞中分离培养结直肠肿瘤干细胞(Colon cancer stem cells)并研究其生物学特性。**方法**　采用有限稀释法筛选分离具有连续克隆能力的单细胞，通过MTT比色法对其体外增殖能力进行鉴定，流式细胞仪分析细胞表面标记CD133、CD166、CD24、CD47、CD200、CD90、CD44、EPCAM的表达情况；PCR检测Oct4、Sox2、Nanog、C-myc等相关基因的表达，实时荧光定量PCR检测其表达量。**结果**　三例能够形成肿瘤球的原代培养细胞CD166阳性细胞所占比例分别为61.9%、52.4%、47.8%，CD47阳性细胞所占比例分别为99.8%、97.2%、99.9%；不能形成肿瘤球的原代培养细胞中CD166阳性细胞为10.8%，CD47阳性细胞为0.1%；CD133、EPCAM、CD24、CD200四个表面标记在两种细胞中的表达均低于0.5%，CD44、CD90在两种细胞中的表达均高于95%；与原代细胞相比，克隆细胞具有较强的体外增殖能力并且高表达Oct4(P<0.05)、C-myc (P<0.01)及Sox2基因，不表达Nanog基因。**结论**　人结直肠肿瘤中存在具有自我更新和增殖潜能的结直肠肿瘤干细胞，在体外可将其分离、培养和纯化。

关键词：结直肠肿瘤；肿瘤干细胞；克隆细胞

中图分类号：R735.3　　**文献标识码**：A

收稿日期：2012-12-28；**修回日期**：2013-05-13

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81260309）；宁夏科技攻关计划资助项目（79）;宁夏医科大学校级资助课题（XM201035）

作者单位：1.750004 银川，宁夏医科大学总医院干细胞研究所，2.结直肠外科

通信作者：李玉奎，E-mail：yukuili@hotmail.com；杨银学，E-mail：53512756@qq.com

作者简介：马丽君（1981-），女，硕士，技师，主要从事肿瘤干细胞研究

0　引言

结直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤，其发病率和死亡率呈逐年上升趋势，随着肿瘤干细胞理论的提出，突破了以往对肿瘤发生发展的认识，认为肿瘤的发生以及耐药性源于肿瘤组织中存在的肿瘤干细胞[1]。既往的大多数研究都是基于结直肠肿瘤细胞系，然而对细胞系的研究不能体现人体内的真实状况，本研究以人结直肠肿瘤组织来

源细胞为研究对象，从原代培养的肿瘤细胞中获得能持续传代的肿瘤干细胞克隆，建立纯化的肿瘤干细胞群，并对克隆细胞生物学特性进行研究。

1　资料与方法

1.1　临床资料

随机选取宁夏医科大学总医院2009年9月—2011年9月结直肠外科手术切除结直肠肿瘤组织标本37例，术前与患者签订标本使用知情同意书。

1.2　主要试剂与仪器

DMEM、F12、HEPES、EGF、N2、胎牛血清均购于Gibco公司；bFGF（R&D）；鼠抗人CD133-PE(MACS)；鼠抗人CD166-PE、CD24-PE、CD47-PE、EPCAM-PE、CD200-PE、CD90-FITC、CD44-FITC、IgG1-PE、IgG2a- FITC均购于美国BD公司（Becton,Dickinson and Company）；RNeasy plus Mini Kit（QIAGEN）；T ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit（Fermentas）；Trans Start Green qPCR Super Mix（TIANGEN）；所用引物由上海捷瑞生物工程公司合成；流式细胞仪（FACS，Caliber，美国 BD公司）；实时荧光定量 PCR 仪（ABI，Prism 7300，美国ABI公司）；核酸蛋白测定仪（ND- 1000，美国NanoDrop）。

1.3　结直肠肿瘤细胞的原代培养

结直肠肿瘤组织标本取自病理鉴定为肠腺癌的实体肿瘤组织。术中在无菌条件下取结直肠癌患者肿瘤组织标本。用眼科剪将组织反复剪切至1 mm^3的小块；加入胶原酶37℃水浴1 h，每10 min充分振摇试管一次；离心(700 r/min，4 min)，弃上清液；加入适量的含血清培养液（取DMEM培养液46 ml，F12培养液46 ml，向DMEM/F12混合培养液中加入5 ml FBS，10 μl 200 μg/ml的EGF，10 μl 100μg/ml的bFGF，100 μl 1 000×ITS配成含50%DMEM，50%F12，5%FBS，1% Anti-Anti，1% Pen Strep，1%HEPES，bFGF终浓度为10 ng/ml，EGF终浓度为20 ng/ml及ITS终浓度为1×ITS的溶液）培养细胞；第二天观察细胞状态，若状态良好5~7天后换液并进行常规传代冻存培养。

1.4　肿瘤细胞的无血清培养

将培养的原代肿瘤细胞消化后以2×10^2/ml接种于培养皿中，培养液采用无血清培养液（DMEM 50%，F12 50%，1×N2，葡萄糖6 mg/ml，1×谷氨酰胺，$NaHCO_3$ 1 mg/ml，1×HEPES，1×Anti-Anti，1×Pen Strep，肝素4 μg/ml，人血清白蛋白0.5%，10 ng/ml bFGF，20 ng/ml EGF），细胞在37℃、5%CO_2培养箱中培养。每3~4天换液1次，连续观察细胞生长情况。

1.5　有限稀释法培养肿瘤细胞克隆

取生长状态良好的原代肿瘤细胞，用消化液消化后经锥虫蓝染色后计数细胞，应用有限稀释法以每孔2~3个细胞种于96孔板中，次日观察96孔板中每孔存活的细胞数，选取只有一个细胞的孔并标记。7天后观察标记孔，并观察细胞状态，去除细胞死亡的孔，给有细胞存活的孔换液。10~14天后观察已经换液的孔，将生长状态良好的孔进行标记，每三天观察一次并换液直至细胞可传代为止。

1.6　流式细胞术检测

对原代培养细胞及克隆细胞进行流式分析，将细胞悬液计数并离心(80 $g\times4$ min)，以浓度为1×10^5/500 μl PBS重悬细胞于流式管中，每管中加入相应的荧光标记抗体10 μl，并设置同型对照，室温避光孵育15 min后PBS洗涤一次，加500 μl PBS重悬后上机检测。

1.7　细胞生长曲线的检测

取对数生长期的细胞（原代细胞及克隆细胞），调整细胞浓度为2×10^5/ml，以每孔100 μl接种于已经处理好的48孔板中（每孔20 000个细胞）。每种细胞设置3个平行对照，及空白对照（不加细胞只加培养液，其他步骤相同）；将加好细胞的48孔板培养过夜，并在培养后12、24、36、48、60、72 h分别用MTT法检测细胞生长情况。

1.8　Sox2、Oct4、C-myc、Nanog四种基因mRNA水平的检测

取克隆细胞以及原代细胞，根据RNeasy plus Mini Kit(QIAGEN)试剂盒提取总RNA。核酸蛋白测定仪确定提取的 RNA 浓度和纯度。按照ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit（Fermentas）试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA 保存于−20℃备用。运用荧光定量 PCR 方法检测4种基因在克隆细胞以及原代细胞中的表达差异，以管家基因GAPDH作为对照。所用引物序列见表1。反应体系为20 μl，0.5 μl cDNA，10 μl Trans Start Green qPCR Super Mix（TIANGEN），Forward Primer(10 μmol/ L) 0.5 μl，Reverse Primer (10μmol/ L) 0.5 μl，0.3 μl reference 染料，加RNase Free dH_2O至总体积20 μl。反应条件：50℃ 2 min，95℃ 10 min; 95℃ 15 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，共45个循环。

表1 PCR扩增所用引物序列以及扩增的长度(5'~3')

Table1 Primer sequence and length for PCR amplification (5'-3')

Gene	Forward primer	Downstream primers	Size/bp
Nanog	tgcaaatgtcttctgctgagat	gttcaggatgttggagagttc	157
Oct-4	gaaggtattcagccaaacgac	gttacagaaccacactcgga	265
Sox2	atgcaccgctacgacgtga	cttttgcacccctcccattt	235
C-myc	actctgaggaggaacaagaa	tggtagacgtggcacctctt	227
GAPDH	aggtcggagtcaacggat	tcctggaagatggtgatg	507

1.9 统计学方法

所有数据采用SPSS 13.0软件包进行分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析(One-Way Anova)，$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养结直肠肿瘤细胞的生长情况

新鲜的肿瘤组织经消化后培养，第3天部分细胞贴壁生长，7天后，大量细胞贴壁，小部分细胞已经开始进行分裂。12天后细胞数量较多，局部细胞密度较大，不同的贴壁区域细胞形态差别较大，部分区域细胞生长较好，细胞较小呈梭形，细胞核大，胞质内颗粒较少，可见正在分裂的细胞。部分区域细胞已经开始分化，细胞变大细胞形态不规则，核质比减小，见图1。

2.2 原代培养的肿瘤细胞形成克隆

选择能够形成肿瘤球的原代细胞进行克隆培养，培养至7天后发现标记的培养孔中细胞数量增加，继续培养12~14天后发现有明显的克隆形成，通过有限稀释法培养共获得克隆10个。

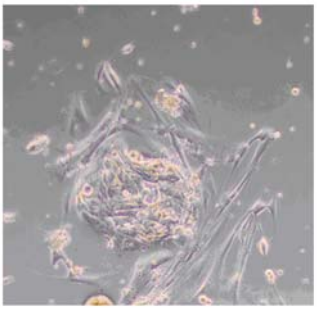


图1 原代培养后12天观察细胞发现贴壁细胞形态不一 (× 200)

Figure1 The cell morphology is different after 12 days of primary cell culture (× 200)

2.3 流式细胞仪分析原代细胞以及克隆细胞的表面标记

主要检测的表面标记物有CD133、CD166、EPCAM、CD24、CD44、CD47、CD200、CD90。检测结果发现，在无血清培养条件下能够形成肿瘤球的原代培养细胞，其CD166阳性细胞所占比例分别为61.9%、52.4%、47.8%，CD47阳性细胞所占比例分别为99.8%、97.2%、99.9%；不能形成肿瘤球的原代培养细胞中CD166阳性细胞为10.8%，CD47阳性细胞为0.1%；其中CD133、EPCAM、CD24、CD200四个表面标志物在两种细胞中的表达均低于0.5%，CD44、CD90在两种细胞中的表达均高于95%，见表2。此外，从10例克隆细胞中随机选取6例做流式分析，结果显示6例克隆细胞的表面标记物表达基本一致，且与克隆来源细胞相比差异不大，分析结果见表3。

2.4 原代细胞与克隆细胞的体外增殖情况

运用MTT比色实验绘制细胞生长曲线，见图2，在相同的时间点上，克隆细胞的吸光度值较其

表2 四例原代培养细胞的表面标记表达情况

Table2 Four cases of primary cultured cell surface marker expression

Cell	CD133	CD166	EPCAM	CD24	CD47	CD200	CD44	CD90
1	0.5%	61.9%	0.2%	0.1%	99.8%	0.2%	96.5%	99.9%
2	0.3%	52.4%	0.1%	0.2%	97.2%	0.6%	99.5%	99.9%
3	0.2%	47.8%	0.1%	0.1%	99.9%	0.2%	99.9%	99.8%
4	0.3%	10.8%	0.4%	0.3%	0.1%	0.3%	99.8%	99.9%

Note:1: for one case of primary cultured cell; 2-4: others like 1

表3 原代细胞及克隆细胞表面标记的表达情况

Table3 The expression of cell surface markers in primary cell and clone cell

Cell	CD133	CD166	EPCAM	CD24	CD47	CD200	CD44	CD90
Primary cell	0.5%	61.9%	0.2%	0.1%	99.8%	0.2%	96.5%	99.9%
G8	0.2%	96.3%	0	0.1%	99.9%	0.2%	99.2%	100%
C4	0.2%	92.3%	0.1%	0.1%	99.9%	1.0%	99.1%	100%
C9	0.2%	82.4%	0.2%	0.2%	100%	0.1%	99.9%	100%
C6	0.6%	92.8%	0.1%	0.2%	99.9%	0	100%	100%
B10	0.3%	79.7%	0.1%	0.1%	100%	1.1%	99.7%	100%
D3	0.5%	95.6%	0.1%	0.2%	99%	0.1%	99.9%	100%

Note: G8 for single cloned cell growth in 96 - well plates by the coordinates of the corresponding 96 - well plates;Others like G8

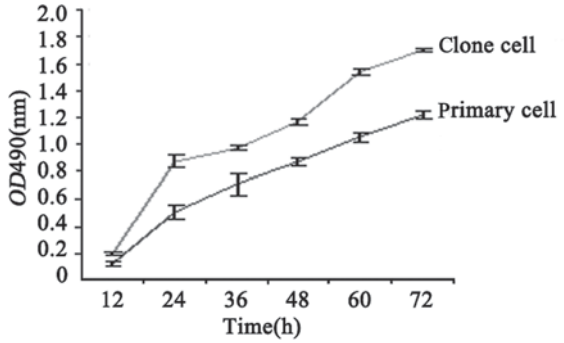


图2　原代培养细胞和克隆细胞的生长曲线

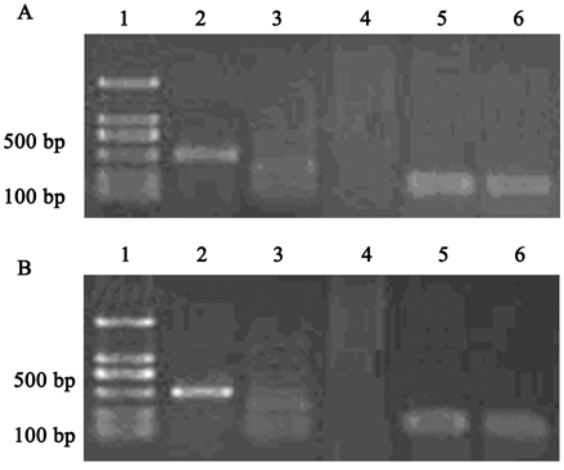
Figure2　The growth curve of primary cell and clone cell

原代细胞的吸光度值高，说明在相同的增殖条件和时间内克隆细胞比其原代细胞的细胞数量多，也就是说克隆细胞较其原代细胞具有更强的体外增殖能力。

2.5　PCR分析细胞Oct4、Sox2、Nanog、C-myc基因的表达

提取总RNA后用1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定其质量，在凝胶上可以看到三条带，其中18S和28S的条带明显、清晰，而5S的条带亮度比较弱，28S的条带亮度是18S条带亮度的2倍左右，说明RNA保持完整。用核酸蛋白测定仪检测RNA的浓度及纯度，A260/A280在1.8~2.0之间，总RNA纯度较好可用于合成cDNA。运用PCR技术检测克隆细胞与原代细胞Oct4、Sox2、Nanog、C-myc基因的表达情况，凝胶电泳结果显示克隆细胞与原代细胞同时表达Oct4、Sox2、C-myc但都不表达Nanog，见图3。

进一步用荧光定量PCR检测Oct4、Sox2、C-myc三个基因在克隆细胞以及原代细胞中的表达



1:DL2000DNA marker;2:GAPDH;3:Oct-4;4:Nanog;5:Sox-2;6:C-myc

图3　克隆细胞(A)和克隆来源细胞(B)中胚胎干细胞相关基因的电泳图

Figure3　Electrophoretogram of embryonic stem cell gene expression in clone cell(A) and primary cell(B)

差异。用ΔCT、$2^{-\Delta\Delta CT}$相对定量的方法分别表示在不同细胞中三个基因相对于管家基因GAPDH的表达水平及克隆细胞相对于其原代细胞三个基因表达水平的倍数，见表4。分析结果发现三种基因在四种克隆细胞的表达水平均高于原代细胞，其中C-myc基因在克隆细胞的表达水平高于原代细胞($P<0.01$)，Oct4在三种克隆细胞中的表达明显高于原代细胞($P<0.05$)，但克隆细胞B10的表达水平与原代细胞基本持平。

表4　荧光定量PCR检测不同细胞中Oct4、Sox2、C-myc基因的表达情况

Table4　Fluorescence quantitative PCR detect Oct4, Sox2,C-myc gene expression in different cells

Cell	Gene ΔCT value($2^{-\Delta\Delta CT}$)		
	Oct4	*Sox2*	*C-myc*
Primary cell	12.66	7.69	10.88
G8	8.04(24.59)*	5.31(5.21)	5.82(33.56)#
D3	7.74(30.27)*	6.49(2.30)	4.50(83.29)#
B10	12.19(1.39)	6.49(2.30)	4.78(68.59)
C4	7.42(37.79)*	6.27(2.68)	4.91(62.68)#

Note:*:there are significant difference compared with primary cell, $P<0.05$; #:there are significant difference compared with primary cell, $P<0.01$

3　讨论

肿瘤干细胞具有自我更新的能力，在无血清的培养条件下肿瘤干细胞可增殖形成致密的球体且保持未分化的状态。本实验在无血清的培养条件下培养原代的肿瘤细胞，其中三例原代培养的细胞在无血清环境中形成了肿瘤球，说明这三例原代培养的细胞中存在肿瘤干细胞，而一例原代培养的肿瘤细胞不能形成肿瘤球，认为这一例原代培养的细胞中没有或有少量的肿瘤干细胞，这可能是因为在不同患者来源的肿瘤组织中肿瘤干细胞的数量存在差异。

为了在肿瘤细胞中获得肿瘤干细胞亚群，本实验运用有限稀释法培养获得了10例肿瘤克隆细胞，并对克隆细胞和原代细胞的体外增殖情况进行了研究，结果发现克隆细胞可传代至20代，且生长状态良好，而作为克隆来源的原代培养细胞只可传代至12代。说明克隆细胞较原代培养细胞有更强的生长能力和自我更新能力。同时由于原代培养的细胞是一个混杂的群体，因此在培养过程中大量的肿瘤干细胞经历了分化；而克隆细胞群体相对均一，在培养过程中能够保持原有的细胞特性，这可能是原代细胞在体外培养过程中增殖能力较克隆细胞差的原因之一。

O'Brien等[2]于2006年首先证实CD133+的细

胞在注射NOD/SCID小鼠后能够产生肿瘤，而CD133-的细胞并不具有小鼠致瘤性。但2008年Shmelkov等[3]报道在正常的结直肠细胞中有部分表达CD133，在转移的结直肠肿瘤中CD133阴性的肿瘤细胞也具有肿瘤再生的能力，提示CD133本身与肿瘤生长并没有直接的联系。有研究报道CD47与CD200分子与肿瘤的免疫逃逸相关，表达在巨噬细胞表面的CD47R与CD47结合后可以抑制巨噬细胞对其的吞噬作用[4]，CD200分子具有免疫调节作用，其可下调啮齿类动物组织或器官的同种移植排斥反应[5]。本实验观测了肿瘤克隆和克隆来源的原代细胞表面CD133、CD166、EPCAM、CD24、CD200、CD47、CD44以及CD90的表达情况，发现不论是克隆还是克隆来源的原代细胞表面均表达CD166、CD44、CD47、CD90等细胞表面标记，然而CD133、EPCAM、CD200、CD24为阴性表达，这与Shmelkov等报道一致；然而对原代培养的四例肿瘤细胞做流式分析发现，其中三例能够在无血清的环境中形成肿瘤球的细胞表面均为CD166、CD47高表达细胞。

肿瘤干细胞具有与干细胞相似的表面抗原；相同的信号通路如Wnt信号通路[6]；表达相似的蛋白(Oct-4、Sox2、Nanog)保持干细胞的永生性并具有自我更新的能力[7-8]。有研究表明，在结肠癌细胞中也有Sox2的表达，认为这种转录因子在肿瘤细胞中异位表达的现象可能是导致肿瘤的原因[9]。基于以上的研究，本实验运用荧光定量PCR检测了克隆细胞及原代细胞的四种基因表达差异，由于对扩增产物进行电泳发现Nanog在两种细胞中均未表达，因此只对Oct4、Sox2、C-myc三种基因进行了定量检测，结果发现Oct4和C-myc在两种细胞中的差异较大，而Sox2在两种细胞中的差异不大。这也与体外增殖实验的实验结果相符，即具有自我更新能力的克隆细胞高表达Oct4、C-myc，而增殖能力较差的克隆来源细胞其Oct4、C-myc表达也较低。EpCAM被认为是一个肿瘤标志物，其表达的强度可以作为临床上皮来源肿瘤诊断和预后的标志，EpCAM可上调癌基因C-myc的表达，使细胞增殖速度加快[10]。本实验发现克隆细胞C-myc的表达是克隆来源原代细胞的62.03±10.43倍，而通过流式鉴定发现克隆细胞不表达EpCAM，其机制有待后续的研究。本实验从人结直肠肿瘤中得到具有自我更新和增殖潜能的结直肠肿瘤干细胞，在体外可将其分离、培养和纯化，为进一步研究结直肠肿瘤干细胞的体内功能奠定了基础。

参考文献:

[1] Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, *et al*. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(39): 14228-33.

[2] O’Brien CA, Pollett A, Gallinger S, *et al*. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. Nature，2007，445(7123):106-10.

[3] Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, *et al*. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133− metastatic colon cancer cells initiate tumors[J]. J Clin Invest，2008, 118(6): 2111-20.

[4] Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, *et al*. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2004, 350(16):1617-28.

[5] Gorczynski RM, Chen Z, Hu J, *et al*. Evidence of a role for CD200 in regulation of immune rejection of leukaemic tumor cells in C57BL/6 mice [J]. Clin Exp Immunol, 2001,126(2):220-9

[6] Bisson I, Prowse DM.WNT signaling regulates self-renewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics [J]. Cell Res, 2009, 19(6): 683-97

[7] Huang D, Gao Q, Guo L, *et al*. Isolation and identification of cancer stem-like cells in esophageal carcinoma cell lines[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(3): 465-73

[8] Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, *et al*. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells [J]. Cell, 2009, 138(6): 1083-95.

[9] Tani Y, Akiyama Y, Fukamachi H, *et al*. Transcription factor SOX2 up-regulates stomach specific pepsinogen A gene expression[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133(4):263-9.

[10] Gires O, Klein CA, Baeuerle PA. On the abundance of EpCAM on cancer stem cells [J].Nat Rev Cancer, 2009, 9(2):143.

[编辑：刘红武；校对：杨　卉]