

## 鼻咽癌肿瘤干细胞样细胞亚群的分离及初步鉴定\*

冀天星 张鑫 李祥勇 李彩虹 黄颖 周克元 李涛

**摘要 目的:**分离和鉴定具有肿瘤干细胞特性的鼻咽癌球形成细胞亚群。**方法:**利用无血清干细胞球悬浮培养技术从不同分化程度鼻咽癌细胞株中分离成球细胞,然后利用MTT法,软琼脂克隆形成实验,分别评价成球细胞的耐药性、克隆形成能力,最后利用RT-PCR和免疫荧光细胞技术分析干性基因及Wnt信号通路关键转录因子 $\beta$ -catenin在成球及未成球细胞中的表达情况。**结果:**低分化鼻咽癌细胞含有较高成球细胞,而高分化细胞株CNE-1中未见成球细胞。与CNE-2相比较,CNE-2S(来源于CNE-2的成球细胞)具有较强的抗肿瘤药物耐药性、克隆形成能力、高表达干性基因,且 $\beta$ -catenin在胞浆和核内都呈高表达。**结论:**本研究分离到干细胞样鼻咽癌成球细胞亚群,为最终靶向杀灭鼻咽癌肿瘤干细胞提供了可能。

**主题词** 鼻咽癌 肿瘤干细胞 球形成细胞 分离 鉴定

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.13.002

### Isolation and characterization of cancer stem cell-like sphere-forming cell subpopulation from the human nasopharyngeal cell line CNE-2

Tianxing JI, Xin ZHANG, Xiangyong LI, Caihong LI, Ying HUANG, Keyuan ZHOU, Tao LI

Correspondence to: Tao LI; E-mail: taoliby@hotmail.com

Guangdong Medical College, Key Laboratory for Medical Molecular Diagnostics of Guangdong Province, Dongguan 523808, China.

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81272434), Science and Technological Program for Dongguan's Higher Education, Science and Research, and Health Care Institutions (No. 2012105102005, 2011105102016).

**Abstract Objective:** The present study aimed to isolate and characterize a cancer stem cell-like sphere-forming cell subpopulation. **Methods:** By using a spheroid culture stem cell-conditioned medium, we isolated a subgroup of cancer stem-like cells from nasopharyngeal cancer cell lines. Chemotherapy resistance was analyzed by using methyl thiazolyl tetrazolium, and clone-forming capability was determined by using softer agar clone formation assay. Finally, we verified the expression of the stemness-specific gene and  $\beta$ -catenin by using immunocytochemistry staining and RT-PCR. **Results:** The lower-differentiated nasopharyngeal cancer lines contained more sphere-forming cells, whereas sphere-forming cells were not observed in the high differentiated nasopharyngeal cancer line CNE-1. Compared with CNE-2, CNE-2S (sphere-forming cells derived from CNE-2) exhibited higher chemotherapy resistance and clone-forming ability. Interestingly, the stemness genes BMI-1, ABCG2, and ALDH1 exhibited higher expression in CNE-2S than in CNE-2.  $\beta$ -catenin, a vital transcription factor of the WNT pathway related to stem cells, exhibited higher expression in CNE-2s cellular nucleus and plasma than in CNE-2. **Conclusion:** We isolated a subgroup of stem-like nasopharyngeal cancer sphere-forming cells. This discovery paves the way for the development of therapeutic strategies aimed at eradicating tumorigenic subpopulations in nasopharyngeal cancer.

**Keywords:** nasopharyngeal carcinoma, cancer stem cells, sphere-forming cells, isolation, characterization

有关肿瘤干细胞的研究在多种肿瘤中已经取得了极大的进展,但由于无公认的肿瘤干细胞筛选标记,研究者常常根据肿瘤干细胞外排荧光染料和抗失巢性凋亡特性分别分离SP(side population)细胞和球形成细胞<sup>[1-2]</sup>。就鼻咽癌而言,目前仅Wang等<sup>[1]</sup>从人NPC细胞株中鉴定出干细胞样的SP细胞。但是由

于SP细胞分离技术具有一定的缺陷:荧光染料Hoechst 33342具有细胞毒性和促分化特性,以及流式分离过程对肿瘤细胞具有损伤作用,因此SP细胞未能真正全面地反映肿瘤干细胞的生物学特性<sup>[3]</sup>。而成球细胞与肿瘤干细胞具有同一性,甚至利用无血清悬浮培养可以保持肿瘤干细胞在未分化状态下

作者单位:广东医学院,广东省医学分子诊断重点实验室(广东省东莞市523808)

\*本文课题受国家自然科学基金(编号:81272434)、东莞市医疗卫生单位科技计划重点项目(编号:2012105102005)和东莞市医疗卫生单位科技计划重点项目(编号:2011105102016)资助

通信作者:李涛 taoliby@hotmail.com

扩增<sup>[4-5]</sup>。因此本实验拟采用无血清悬浮培养技术建立具有干细胞特性的鼻咽癌成球细胞亚群。

## 1 材料与方法

### 1.1 鼻咽癌细胞培养

鼻咽癌细胞株(CNE-1、CNE-2、SUNE-1、HONE-1)以含10% FBS胎牛血清购自Gibco公司,加双抗的DMEM/F12(Gibco)培养基置于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养,选取对数生长期细胞用于下一步实验。

### 1.2 鼻咽癌成球细胞悬浮培养筛选以及扩增培养

将各鼻咽癌细胞处理为单细胞悬液,并用PBS清洗3次,以克隆密度接种于含干细胞球形成培养基的超低粘附性平板(ultra low cluster plate, corning): DMEM/F12(Gibco),2% B27(Gibco),20 ng/mL EGF(重组人表皮生长因子,Recombinant epidermal growth factor, PEPROTECH),20 ng/mL b-FGF(重组人碱性纤维生长因子,Recombinant human FGF-basic,PEPROTECH),10 μg/mL Heparin sodium salt(肝素钠, sigma),经约1周可见肿瘤细胞球形成。然后将肿瘤细胞球经0.25%胰酶处理为单个细胞,然后再以克隆密度传代培养十代以上。并进一步从由CNE-2培养形成的肿瘤细胞球中挑取单个细胞,以1个/孔细胞接种于含有干细胞球形成培养基超低粘附性96孔平板中培养,将由单个细胞形成的细胞球传代培养于6孔超低粘附性平板,建立细胞株CNE-2S。本研究将进一步对比分析原鼻咽癌细胞株CNE-2和CNE-2S的干细胞相关特性。

### 1.3 耐药性实验(MTT法)

分别以2×10<sup>3</sup>/孔将CNE-2和CNE-2S(来源于CNE-2的球形成细胞)接种于96孔普通平板,在细胞培养箱孵育4 h后,以二倍稀释梯度加入抗肿瘤药吉西他滨(健择),(50、25、12.5、6.25、3.13、0.56、0.78、

0.39、0.2、0.1、0 mmol/L),每一浓度为3复孔;并继续培养48 h后,加入20 μL/孔 MTT溶液(5 mg/mL即0.5% MTT),继续培养4 h;吸去孔内培养液,并加入150 μL/孔二甲基亚砷,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解;在酶联免疫检测仪OD490 nm处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砷),对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砷)。

### 1.4 软琼脂克隆形成实验

将含有0.6%琼脂、10%FBS、DMEM/F12培养液2 mL铺于6孔细胞培养板,形成底层琼脂;含有0.3%琼脂、10%FBS、1×10<sup>3</sup>个/mL的DMEM/F12培养液2 mL,铺于6孔细胞培养板形成上层琼脂;在37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下培养21d后,在倒置光学显微镜下计数克隆形成数。

### 1.5 逆转录-聚合酶链式反应

利用Trizol(Invitrogen)分别从CNE-2和CNE-2S中提其total RNA,引物均由上海生工公司设计(表1),最后利用QIAGEN Onestep RT-PCR Kit逆转录扩增目的基因。

### 1.6 免疫荧光细胞化学技术

将单个球形成细胞、细胞球、CNE-2分别以相应的培养基在置有盖玻片的6孔板内贴壁处理过夜;弃培养基,用PBS(phosphate buffered saline)清洗2次;加入4%多聚甲醛固定30 min;然后加入0.1% TritonX100透化45 min,(细胞球用冰冷丙酮透化10 min);用封闭剂(上海碧云天生物技术有限公司)封闭1h,弃去;直接加入10 μg/mL抗β-catenin 4℃孵育过夜;PBS清洗2次;加入FITC-兔抗鼠IgG室温孵育1 h,加入PI继续孵育4 min,弃去;PBS清洗2次;在共聚焦显微镜下观察结果。

表1 目的基因的引物序列、Tm和扩增片段长度

Table 1 Primer sequence, Tm, and product size for RT-PCR

Gene	Primer sequence	Tm (°C)	Product (bp)
GADPH	Sense: 5'-CTGGCCAAGGTCATCCATGACAACACT-3'	59.0	317
	Anti-sense: 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGT-3'	59.0	
ABCG2	Sense: 5'-GCTACACCACCTCCTTCTGTGTCAT-3'	57.0	498
	Anti-sense: 5'-CCACACTCTGACCTGCTGCTAT-3'	57.0	
BMI 1	Sense: 5'-GGTACTTCATTTGATGCCACAACCAT-3'	56.0	529
	Anti-sense: 5'-GGTTCCTCCTCATAATGACATCAAT-3'	56.0	
ALDH1	Sense: 5'-GCTGGCGACAATGGAGTCAATGAAT-3'	58.0	548
	Anti-sense: 5'-CCAAGTCGGCATCAGCTAACACAAT-3'	58.0	
β-catenin	Sense: 5'-GCTATTACGACAGACTGCCTT-3'	54.3	457
	Anti-sense: 5'-GAGCCTCTATACCACCCACTT-3'	55.3	

1.7 统计学分析

应用SPSS 11.5统计学软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差及t检验分析,所有实验均重复3次,独立完成。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻咽癌各细胞系的干细胞样成球细胞比例不同

利用干细胞球形成实验对比分析不同分化程度鼻咽癌细胞株成球比例,结果发现分化程度最低鼻咽癌细胞株CNE-2的成球比例最高(21.2%),其次为HONE-1和SUNE-1,而高分化鼻咽癌细胞株CNE-1则未见具有成球的细胞(图1)。且从低分化细胞株中筛选出的球形细胞可以多次传代培养(至少10代以上),由此可见低分化鼻咽癌低分化细胞株含有肿瘤干细胞。

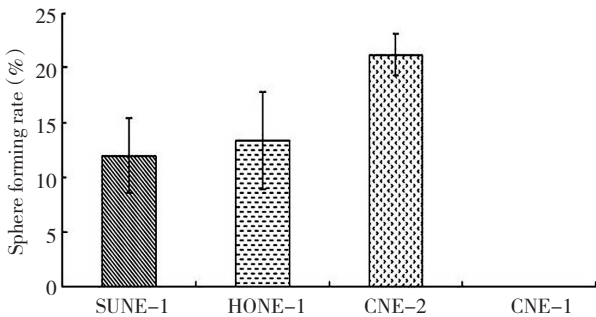


图1 不同分化程度鼻咽癌细胞株的成球比率(×400)  
Figure 1 Rate of sphere-forming cells in various differentiated NPC cell lines (×400)

2.2 CNE-2S与CNE-2比较克隆形成率

利用软琼脂克隆形成实验对比CNE-2S和CNE-2克隆形成率,发现CNE-2S的克隆形成能力较之CNE-2明显升高,二者的克隆形成率分别为2.7.0%和0.73%,而且CNE-2S的克隆形态较之CNE-2明显增大,有显著性差异( $P < 0.05$ ,图2)。

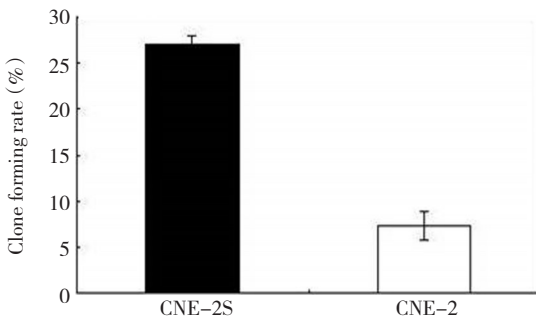


图2 利用软琼脂克隆形成实验比较CNE-2S与CNE-2的克隆形成率  
Figure 2 Clone formation rate of CNE-2 and CNE-2S measured by the soft agar clone-forming test

2.3 CNE-2S与CNE-2比较具有较高耐药性

利用MTT法对比分析CNE-2和CNE-2S对化疗药物吉西他滨的耐药性,发现CNE-2S在不同浓度吉西他滨处理下,均较CNE-2表现出了较强的耐受性(图3)。

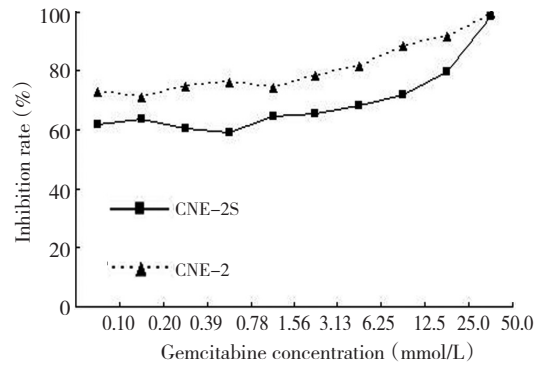


图3 MTT法对比CNE-2S和CNE-2对吉西他滨的耐受性  
Figure 3 Comparative analysis of the chemotherapy drug sensitivity of CNE-2 and CNE-2S by using methyl thiazolyl tetrazolium

2.4 CNE-2S与CNE-2比较干性基因

利用RT-PCR技术比较了CNE-2和CNE-2S的干性基因表达情况,结果证实鼻咽癌球形细胞CNE-2S高表达干性基因BMI-1、ABCG2、ALDH1(图4)。

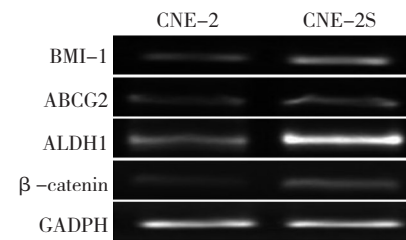


图4 RT-PCR技术分析干性基因在CNE-2S和CNE2中的表达情况  
Figure 4 Comparative analysis of the expression of "stem genes" (BMI-1, ABCG2, ALDH1, and  $\beta$ -catenin) in CNE-2S and CNE-2 by RT-PCR

2.5 与CNE-2相比,CNE-2S明显高表达 $\beta$ -catenin

利用RT-PCR和免疫荧光细胞化学技术,观察了 $\beta$ -catenin在CNE-2S和CNE-2中的表达情况。由图5可见, $\beta$ -catenin在CNE-2中低表达,而在CNE-2S胞浆和核内均呈较高水平表达。

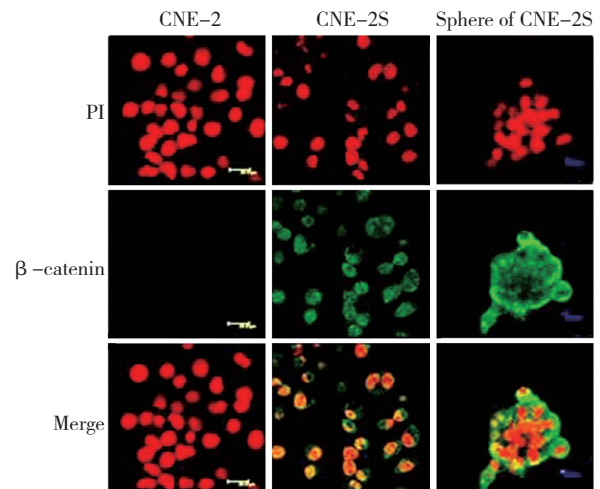


图5 免疫荧光技术 $\beta$ -catenin在CNE-2S和CNE-2中的表达情况(×400)  
Figure 5 Comparative analysis of the expression of  $\beta$ -catenin in CNE-2 and CNE-2S by using immunofluorescence (×400)



### 3 讨论

最近研究表明鼻咽癌干细胞是鼻咽癌复发和转移的根源<sup>[1]</sup>。为了阐明鼻咽癌干细胞相关分子机制,本实验利用肿瘤干细胞抗失巢性凋亡特性分离并扩增培养干细胞样鼻咽癌成球细胞。结果发现分化程度最低的鼻咽癌细胞株 CNE-2 含有最多的成球细胞为 21.2%,其次为 HONE-1 和 SUNE-1;而高分化细胞株 CNE-1 未见成球细胞。然而 Wang 等<sup>[1]</sup>报道恶性程度最高的鼻咽癌细胞株 CNE-2 中的 SP 细胞含量为 2.9%,明显低于 HONE-1 (6.8%),并且高分化细胞株 CNE-1 中也含有 0.7% 的 SP 细胞。而相比 SP 细胞,球形成细胞可较真实地反映不同分化程度鼻咽癌细胞株肿瘤干细胞含量<sup>[4]</sup>。另外,CNE-2S 较 CNE-2 具有较强的克隆形成能力,且相比 CNE-2,CNE-2S 形成克隆时间较早,体积较大,表明 CNE-2S 含有更多的肿瘤形成细胞,即肿瘤干细胞。而且 CNE-2S 较 CNE-2 具有明显较高的耐药性。

本实验利用 RT-PCR 检测了鼻咽癌球形成细胞干性基因的表达情况。结果发现:CNE-2S 高表达干性基因 ALDH1、BMI-1、ABCG2 和  $\beta$ -catenin。而且最近研究报道 ALDH1 可作为有效分离鼻咽癌干细胞的功能性标记物<sup>[6]</sup>。CNE-2S 相比 CNE-2 高表达 ALDH1,证明 CNE-2S 可有效富集鼻咽癌干细胞。且已有研究表明 BMI-1 可直接抑制肿瘤抑制基因 PTEN 的表达、激活 PI3K/Akt /GSK-3 $\beta$  诱导鼻咽上皮细胞发生上皮间质细胞转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 参与鼻咽癌的形成和进展<sup>[7]</sup>。而且 EMT 与肿瘤干细胞的产生密切相关,由此可推测 BMI-1 诱导的 EMT 与鼻咽癌干细胞形成有关。ABCG2 (ATP-binding cassette superfamily G member 2), ABC 超家族转运体中 G 族的第 2 个蛋白成员,其高表达在鼻咽癌干细胞的耐药性和外排荧光染料 hoechst33342 密切相关<sup>[1]</sup>。Xie 等<sup>[8]</sup>报道与其他 ABC 转运体相比,ABCG2 在鼻咽癌对顺铂和 5-氟尿嘧啶的耐药性中起着更为重要的作用。因此鼻咽癌化疗药物抵抗性与鼻咽癌干细胞 ABCG2 的表达相关。正常情况下,Wnt 信号通路关键因子, $\beta$ -catenin 在细胞浆和细胞核内累积是呈动态平衡,若这一动态平衡被打破, $\beta$ -catenin 在胞浆和核内持续积累将导致正常干细胞转化为无限扩增的肿瘤干细胞从而形成肿瘤,甚至提高肿瘤干细胞的放化疗抵抗性<sup>[9-10]</sup>。临床研究表明晚期鼻咽癌  $\beta$ -catenin 的表达率高于早期鼻咽癌,而且  $\beta$ -catenin 高表达与鼻咽癌进展有关<sup>[11]</sup>。由此可见 Wnt 信号通路的激活与鼻咽癌干细胞有关。

总之,无血清悬浮球培养鼻咽癌球形成细胞具

有肿瘤干细胞特性,为进一步筛选抗鼻咽癌干细胞药物和研究相关分子机制提供了良好素材。

#### 参考文献

- 1 Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of Cancer Stem Cell - Like Side Population Cells in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8):3716-3724.
- 2 Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005, 10(1):75-86.
- 3 Lichtenauer UD, Shapiro I, Geiger K, et al. Side population does not define stem cell-like cancer cells in the adrenocortical carcinoma cell line NCI h295R[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(3):1314-1322.
- 4 Liu JC, Deng T, Lehal RS, et al. Identification of Tumorsphere- and Tumor-Initiating Cells in HER2/Neu-Induced Mammary Tumors[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18):8671-8681.
- 5 Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3):504-514.
- 6 Wu A, Luo W, Zhang Q, et al. Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2013, 330(2):181-189.
- 7 Song LB, Li J, Liao WT, et al. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(12):3626-3636.
- 8 Xie SM, Fang WY, Liu TF, et al. Association of ABCG2 and CD- DP-Resistance in Two Sublines Resistant to CDDP Derived from a Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line[J]. *J Oncol*, 2010, 2010:915046.
- 9 Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(2):150-158.
- 10 Malanchi I, Peinado H, Kassen D, et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling[J]. *Nature*, 2008, 452(7187):650-653.
- 11 王菲莉,郭翔,袁太泽,等.Wnt-1、 $\beta$ -catenin 在鼻咽癌组织中的表达及其临床意义[J]. *癌症*, 2009, 28(1):91-95.

(2012-06-28 收稿)

(2013-03-16 修回)

(本文编辑:周晓颖)