

多种胶质瘤细胞系中获取胶质瘤干细胞方法的研究

赵林涛 陈俊颖 赵海兴 王双运 郑 沅

(324 医院病理科 重庆 400038)

摘要 目的 进一步证明胶质瘤干细胞是广泛存在的,并寻找一种简洁的方法从不同胶质瘤细胞系中提取肿瘤干细胞。方法 将胶质瘤细胞以合适的密度接种于 96 孔板中,获取胶质瘤干细胞,并通过检测其自我更新能力、多向分化能力、成瘤能力及胶质瘤干细胞标记物的表达情况对其进行鉴定。结果 多种细胞系中均成功获取了胶质瘤干细胞。并且这细胞球表达神经干细胞的标志物,不表达神经细胞分化标志物,同时又有多向分化的能力,仅 5000 个细胞就可以在裸鼠颅内成瘤。结论 我们的研究结果表明胶质瘤干细胞是广泛存在的,并为以后进一步研究胶质瘤干细胞的特性及靶向胶质瘤干细胞的药物做铺垫。

关键词 胶质瘤干细胞 U87 胶质瘤

中图分类号 Q95-3, R73-3 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 11-2098-05

Acquisition of Glioma Stem Cells from Different Glioma Cell Lines

ZHAO Lin-tao, CHEN Jun-ying, ZHAO Hai-xing, WANG Shuang-yun, ZHENG Yuan

(Institute of Pathology, 324 Hospital, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT Objective: To prove that GSCs are widely existed and to suggest a simple strategy for isolating them. **Method:** Tumor cells were seeded in proper density (100-200 cells) in each well of 96-well plates. We harvested tumorspheres after 2 weeks. Their capability to self-renew was detected. We further determine whether tumorspheres expressed multiple genes enriched in neural and other stem cells and whether they had the capability to differentiate into multiple lineages by laser scanning microscopy. At last, tumorigenicity of tumorspheres was tested. **Results:** We found that a small proportion of the cells from several human glioma cell lines could form tumorspheres in culture in a proper density in 96-well plates. These spheres can self-renew and express many genes characteristic of glioma stem cells. Besides, under conditions promoting differentiation, cells are multipotent. In nude mice brains, merely 5,000 cells from tumorspheres could form tumors. **Conclusion:** Our results further convinced that GSCs are widely existed and will facilitate future studies of initiation and progression of human gliomas.

Key words: Glioma stem cells; U87; Glioma

Chinese Library Classification: Q95-3, R73-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2098-05

随着干细胞研究领域的飞速发展和实验技术的进步,"肿瘤干细胞"理论再次引起人们的关注,并为越来越多的学者所接受。该理论认为 肿瘤是一个异质性的群体,只有肿瘤干细胞亚群具备自我更新、多向分化以及成瘤能力,而非肿瘤干细胞(包括祖细胞、分化的肿瘤细胞)则缺乏这些能力。研究者先后在白血病、乳腺癌、脑肿瘤、结肠癌、肝癌、前列腺癌等至少 20 类肿瘤中证实了肿瘤干细胞的存在^[1-5],并对其多种重要的生物学特性进行了细致的观察,包括治疗抵抗性、促血管生成能力、侵袭特性、免疫源性等。随着研究的深入,越来越多的研究者相信,这群数量稀少、性质特殊的细胞,才是恶性肿瘤发生、进展以及治疗后复发的根源,而探索针对肿瘤干细胞亚群的靶向治疗措施,是今后恶性肿瘤治疗的重要方向之一。

近期,在胶质瘤中也发现少量具有神经干细胞特性的细胞。这些胶质瘤细胞可以在神经干细胞培养基中形成肿瘤干细胞球、自我更新、表达多种神经干细胞标记物,并且可以多向分化^[2, 6-8]。与神经干细胞不同的是,这些细胞接种裸鼠后可以成瘤。相反,非肿瘤干细胞仅有较弱的增殖能力并且接种裸鼠后

也不能形成肿瘤。此外,以往的研究表明肿瘤干细胞还有较强的促血管生成及抵抗放疗化疗的能力^[6, 9-11]。这些细胞被认为是肿瘤复发的根源。

然而,大多数胶质瘤干细胞是从临床肿瘤标本中提取出来的。通常是使用流式分选技术分选 CD133 阳性的肿瘤干细胞。但是在胶质瘤细胞系中,由于长时间的体外培养,CD133 阳性的细胞所占比例通常低于 1%。这使得我们很难用流式细胞技术从细胞系中分选 CD133 阳性的细胞。由于临床肿瘤标本的稀缺,我们需要一种稳定的方法能使我们从胶质瘤细胞系中获取肿瘤干细胞。在以往的研究中,也有部分细胞系成功分选出了干细胞,但是他们使用的方法各异,且培养条件也有区别^[12, 13],这使得我们在比较不同的胶质瘤干细胞特性时无法区别这些细胞的异质性是由于培养条件不同还是由本身的区别引起的。除流式分选肿瘤干细胞外,用条件培养基筛选肿瘤干细胞也被广泛使用。但是在条件培养基中,胶质瘤细胞系中的细胞并不能像肿瘤标本中的细胞那样形成胶质瘤干细胞球。虽然,在细胞接种到条件培养基后,部分细胞可以非特异性聚集成团,但是这些细胞几乎不增殖,且仅能存活 7-10 天。然而,在我们的实验中发现,如果在 96 孔板中以适合的密度接种就可以获得肿瘤干细胞球。我们的研究可以为进一步表明胶质瘤干细胞是

作者简介 赵林涛 (1983-) 医师,硕士 主要从事胶质瘤干细胞方面的研究 电话号码 13637883702

(收稿日期 2011-01-03 接受日期 2011-01-25)

广泛存在的,为以后研究肿瘤干细胞的生物学特性作铺垫,使对肿瘤干细胞的研究更加便捷。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

U87 MG、C6 和 U251 引自美国菌种保藏中心(ATCC),用含 10%胎牛血清的 DMEM 常规培养。为了获取胶质瘤干细胞球,胶质瘤细胞以 100-200 个/孔接种到 96 孔板中,并用神经干细胞培养基培养 2 周。神经干细胞培养基由 DMEM/F12 (Gibco) 配置,并包含 20 ng/ml bFGF (Peprotech, USA), 20 ng/ml EGF (Peprotech, USA) 和 B27(1×, Gibco)。

1.2 自我更新能力检测

2 周后,将肿瘤干细胞球分离为单细胞悬液,并在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中恢复 12h。以 3 个/孔的密度将肿瘤干细胞接种到 96 孔板中,并用神经干细胞培养基进行培养。2 周后,检测肿瘤干细胞的二次成球率。

1.3 间接免疫荧光染色

由于胶质瘤干细胞与神经干细胞的许多表面标志物相似,我们又进一步用免疫荧光对肿瘤干细胞的表面标志物进行了检测,用正常山羊血清于 37℃ 封闭 1h,弃去血清,分别加入以下抗体:抗-CD133/1 (1:100, abcam), 抗-nestin (1:200, Chemicon), 抗-Olig-2 (1:200, abcam), 抗-NeuN (1:200, Chemicon), 抗-GFAP (1:1000, Chemicon), 和抗-MBP (1:1000, Chemicon), 于 4℃ 孵育过夜。加入荧光标记的二抗(1:100, Sigma)室温孵育 1.5h,用 Hoechst33258 标记细胞核,50%甘油封片后,激光共聚焦显微镜观察。

1.4 细胞多向分化能力的检测

将胶质瘤干细胞球接种到用多聚赖氨酸包被的盖玻片上放置在 24 孔板中,用 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养,培养 2 周后,检测其分化标志物 GFAP、MBP 和 NeuN 的表达情况。

1.5 成瘤能力的检测

1%戊巴比妥腹腔麻醉裸鼠(4 周龄雌性裸鼠,第三军医大学动物研究所);在层流超净台内以微量进样器吸取 5 μ l 含 5000 个瘤细胞的细胞悬液,在内眦连线与头矢状中线交汇处垂直进针,深度距颅骨表面约 4 mm,注射前略微回退 0.5~1 mm,将瘤细胞悬液缓慢、匀速注入裸鼠颅内,接种后动物全部饲养于 SPF 级环境中。

1.6 统计学分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行 t 检验分析,所有试验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 多种胶质瘤细胞系中均可获取胶质瘤干细胞

用神经干细胞培养基可以从胶质瘤外科手术标本中筛选出胶质瘤干细胞,而同样的方法在胶质瘤细胞系中却难以简单重复。在我们的研究中我们发现如果以合适的密度(100-200 个/孔)将胶质瘤细胞系中的细胞接种在 96 孔板中,同样可以从其中筛选并培养出胶质瘤干细胞。我们发现接种细胞 7-9 天后,大多数细胞均会死亡并崩解,仅有 1%左右的细胞可以存活,并

且增殖成为胶质瘤干细胞球。2 周后可从一个细胞增殖到 300-500 个细胞,1 月后胶质瘤干细胞球可增殖到 5000 个细胞左右,并且细胞球的直径仍然可以持续增加。此外,这些细胞还可以多次传代(图 1)。

2.2 自我更新能力的检测

自我更新是神经干细胞的重要特性,同时也是胶质瘤干细胞的重要特性,我们又进一步检测了我们获取的胶质瘤干细胞的自我更新能力,我们将获取的原代胶质瘤干细胞吹散制成单细胞悬液,重新将细胞以 3 个/孔的密度接种于 96 孔板。接种后 1 天后,可见单个散在的细胞,并未见到聚集成团的细胞。2 周后可见单细胞已增殖成团,这说明原代胶质瘤干细胞具有自我更新的能力,可以重新形成胶质瘤干细胞球。此外,二次成球率远高于胶质瘤细胞系的细胞。U87 细胞的成球率为 $0.9 \pm 0.1\%$,其胶质瘤干细胞球的再次成球率为 $9.3 \pm 0.7\%$ U251 的细胞成球率为 $2.0 \pm 0.2\%$,其胶质瘤干细胞球的再次成球率为 $10.6 \pm 2.1\%$ C6 细胞的成球率为 $1.7 \pm 0.2\%$,其胶质瘤干细胞球的再次成球率为 $8.8 \pm 0.8\%$ 。因为在胶质瘤的研究中 U87 细胞系的应用最为广泛,我们以下的研究均以 U87 细胞系细胞做为研究对象。

2.3 胶质瘤干细胞表达的分子标记物与神经干细胞相似

我们进一步检测培养出的胶质瘤干细胞球是否同样表达神经干细胞的标记物。我们分别检测了以下基因:神经干细胞的分子标记物 CD133, nestin; 胶质瘤干细胞高表达的分子 Olig2 和非胶质瘤干细胞高表达的 MBP、GFAP 和 NeuN。我们的结果表明,我们获取的胶质瘤干细胞高表达 CD133、nestin、Olig2,几乎不表达 MBP、GFAP 和 NeuN。这说明其表达的分子标记物与神经干细胞相似,与以往对胶质瘤干细胞的研究一致(图 2)。

2.4 胶质瘤干细胞具有多向分化能力

以往的研究表明肿瘤干细胞具有多向分化的能力,我们的实验表明,胶质瘤干细胞球经诱导分化 2 周后,肿瘤细胞中可见 GFAP、NeuN 和 MBP 阳性的细胞,这表明我们获取的胶质瘤干细胞同样具有多向分化的能力(图 3)。

2.5 胶质瘤干细胞成瘤能力的检测

我们进一步比较了 U87 中胶质瘤干细胞与 U87 细胞成瘤能力的区别。我们分别将 5000 个 U87 细胞和胶质瘤干细胞接种至裸鼠颅内。结果显示接种 U87 细胞的裸鼠颅内并未发现肿瘤形成,而在胶质瘤干细胞接种的裸鼠颅内可见明显的肿瘤形成(4/5)。此外我们在肿瘤组织中也发现 GFAP、MBP 和 NeuN 染色阳性的细胞,这与原代胶质瘤手术切除标本中的细胞表达相同。这表明我们获取的胶质瘤干细胞具有较强的成瘤能力,并且形成的肿瘤与母代肿瘤具有同样的特性(图 4)。

3 讨论

长期以来,肿瘤细胞的起源与增生一直是众多学者关注的焦点问题之一,越来越多的研究表明,无论是在实体肿瘤还是在非实体肿瘤中,均存在肿瘤干细胞,这些细胞被认为是肿瘤起始、复发、转移的根源^[6, 10, 11, 14]。近期,胶质瘤中也成功分离出了肿瘤干细胞。这些细胞可以自我更新,并且可以向胶质细胞及神经元细胞多向分化。此外,这些细胞还具有较强的抵抗放

化疗的能力^[6,11],这些细胞被认为是胶质瘤起始和复发的根源。寻找能够有效的靶向及消除胶质瘤干细胞的治疗方法才是目前治疗胶质瘤的关键。因此我们需要更进一步的分离及研究胶质瘤干细胞的生物学特性,为以后的研究做铺垫^[15,16]。然而,大多数胶质瘤干细胞均是从临床手术切除的肿瘤标本中获取的,

仅有少部分胶质瘤细胞系成功分离出了胶质瘤干细胞,并且所使用的方法及培养条件均不相同,这使得我们不便比较不同的细胞系之间胶质瘤干细胞生物学特性的差别,无法明确差别的原因是培养条件的不同还是其生物学特性的不同。

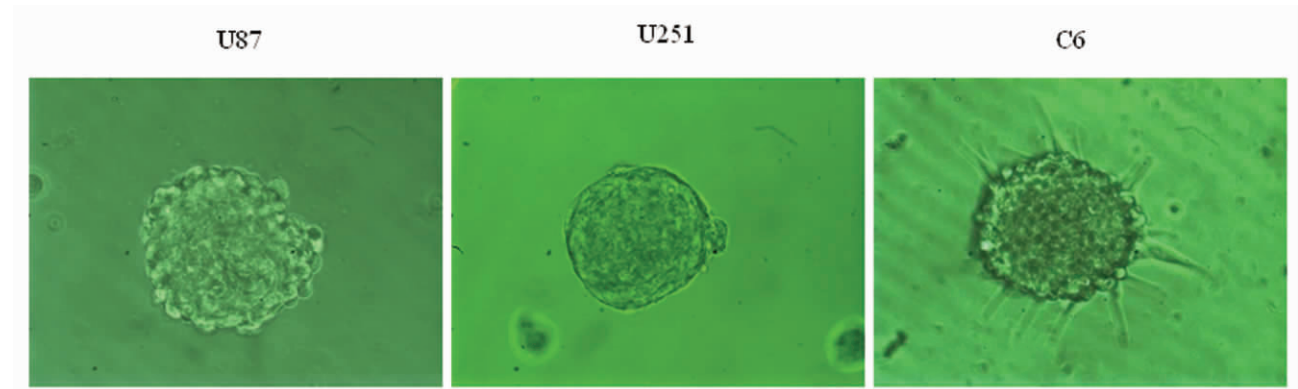
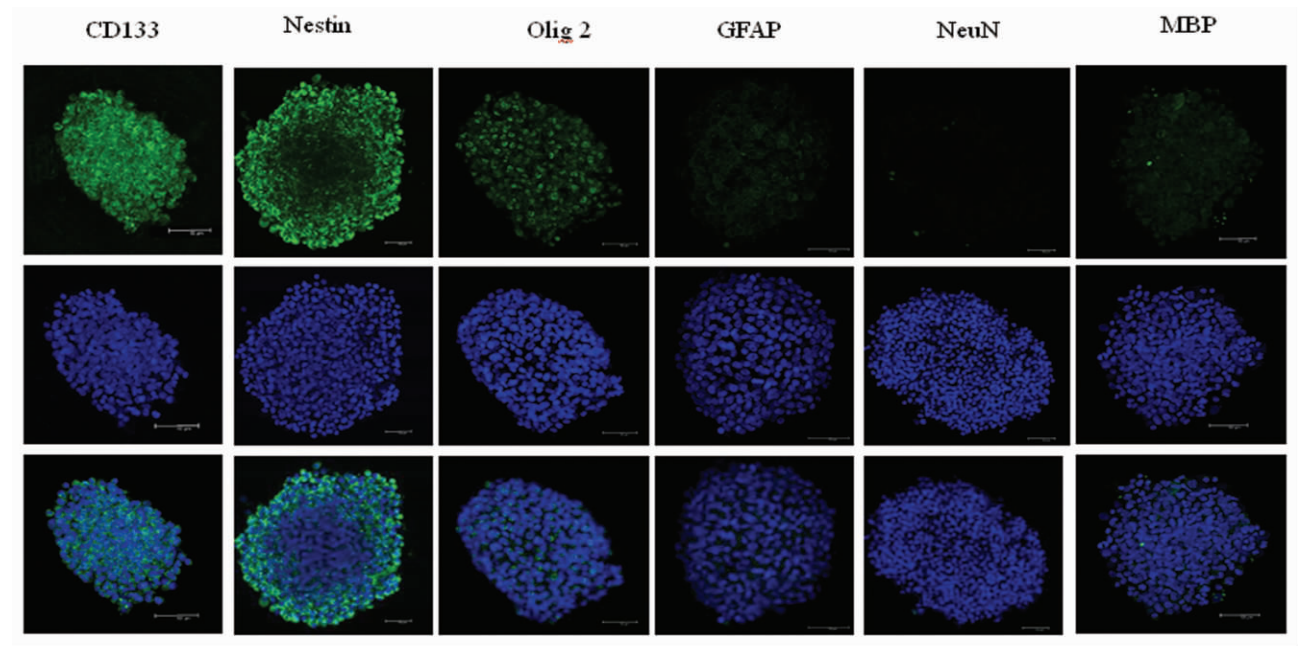


图1 不同胶质瘤细胞系中获取的胶质瘤干细胞球(200×)

Table1 The Glioma stem cell ball obtained from different glioma cell line



reen CD133,Nestin,Olig 2,GFAP,MBP,NeuN ;Blue DAPI (ruler 50μm)

图2 间接免疫荧光标记检测获取的胶质瘤干细胞球分子标记物的表达情况

Table2 Indirect immunofluorescence fluorescent marker detection access of glioma stem cells ball molecular marker expression

从手术切除的原代标本中获取胶质瘤干细胞只需要将细胞直接接种于神经干细胞培养基中进行筛选即可,培养 2-4 周即可获取胶质瘤干细胞球。但在现有的胶质瘤细胞系中用同样的方法通常无法获取胶质瘤干细胞,例如在 U87 细胞系中,将细胞接种于培养瓶中,用条件培养基进行培养,虽然细胞在接种后可以形成细胞球,但是这些细胞通常增殖能力较差,且通常在 10 天以内细胞会全部死亡、崩解。因为这些细胞球通常是由非肿瘤干细胞非特异性聚集形成的,并不是由单细胞增殖后形成的肿瘤干细胞球。我们推测这主要因为在长期的体外细胞培养中,丧失了体内干细胞的微环境,导致细胞系中肿瘤干细

胞的比例远低于手术标本中的干细胞比例。在以往的研究中表明,现有的一些胶质瘤细胞系中,胶质瘤干细胞的比例通常低于 1%^[12,17]。因为非肿瘤干细胞在条件培养基中无法生存,随着时间的推移,这些细胞会死亡、崩解,同时释放出大量影响细胞生长的物质,例如溶酶体酶,由于非肿瘤干细胞在细胞系中比例极高,这使得其死亡、崩解后,释放的影响细胞生长的物质足以杀死胶质瘤干细胞,从而使得同样的方法无法从现有的细胞系中获取胶质瘤干细胞。本研究显示我们将细胞系细胞以低密度(100-200 个/孔)接种于 96 孔板中,培养 2 周后即可成功的获取胶质瘤干细胞,如果将细胞接种密度提高到 500 个/

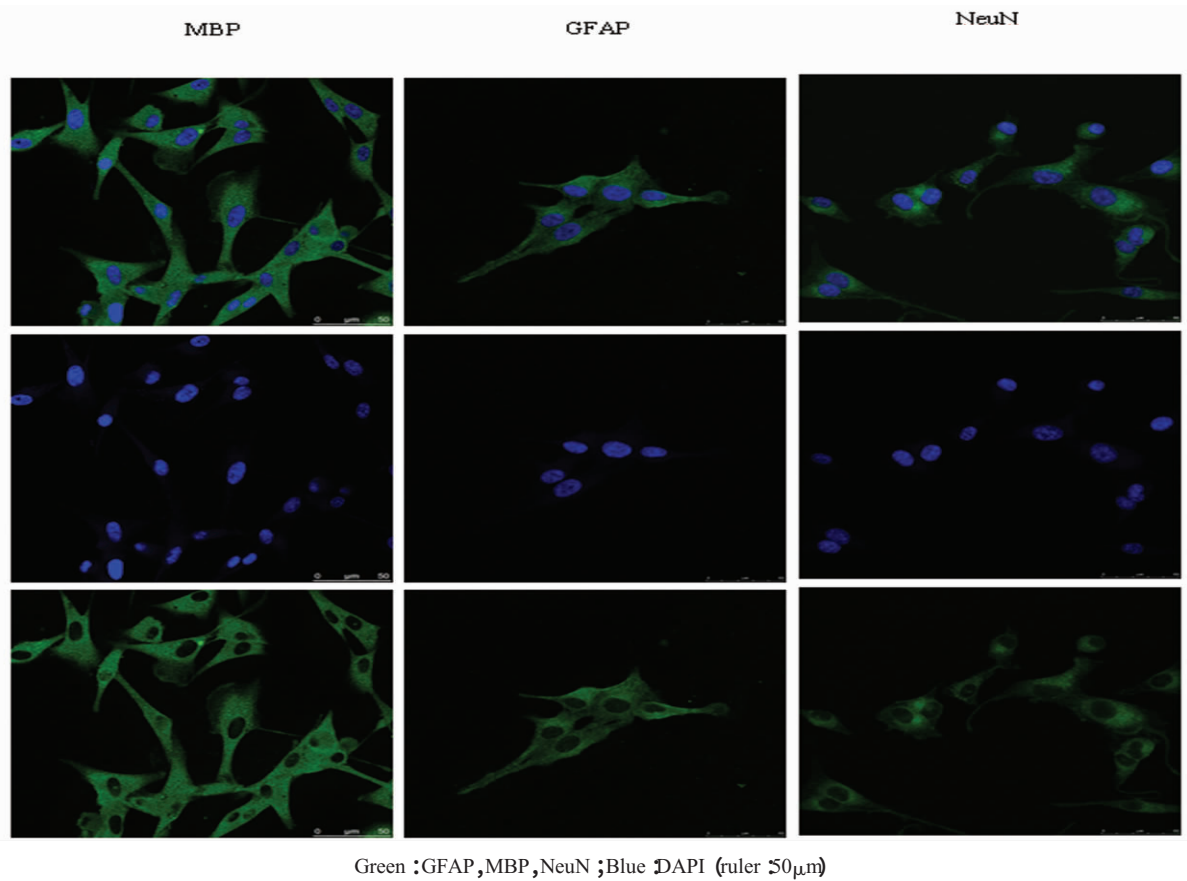


图 3 间接免疫荧光标记检测获取的胶质瘤干细胞球的多向分化能力

Table3 Indirect immunofluorescence fluorescent marker detection access of glioma stem cells ball multiway differentiation ability

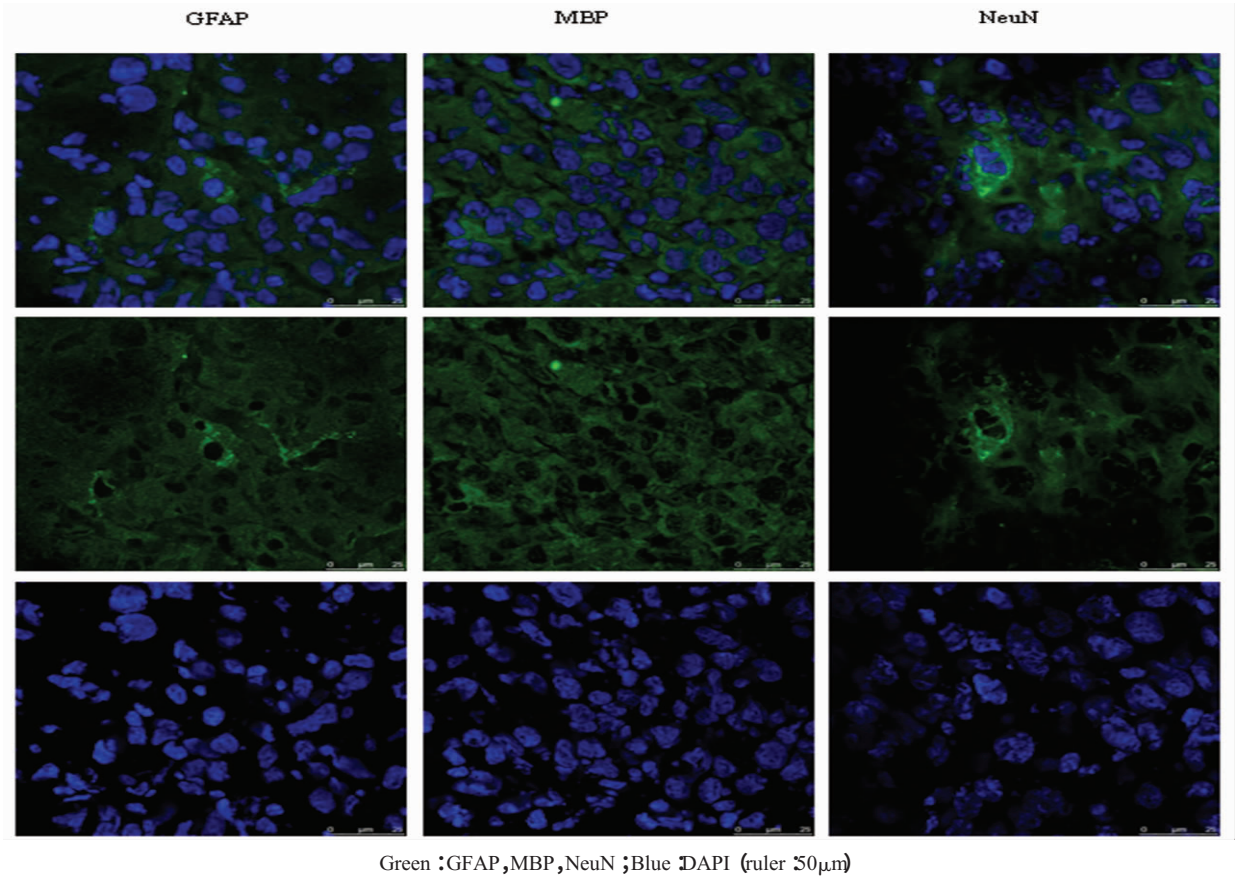


图 4 间接免疫荧光标记检测颅内移植瘤的分子标记物的表达情况

Table4 Indirect immunofluorescence fluorescent marker detection access of Intracranial transplant tumor molecular marker expression

孔,则无法获取胶质瘤干细胞。使用这种培养方法可以有效的降低非肿瘤干细胞死亡崩解后释放的物质在培养基中的浓度,降低其对胶质瘤干细胞生长的影响,且在 96 孔板中培养,可以最大程度的降低细胞的非特异性聚集,从而为肿瘤干细胞提供更有利的生存环境。目前,对于肿瘤干细胞的认识不断加深,我们需要更进一步的研究其生物学特性,寻找出能够靶向肿瘤干细胞的药物,但是由于临床手术标本的稀缺性,加之肿瘤干细胞在标本中所占的比例极低,极大的限制了研究的开展,我们的实验可以为下一步的研究打下基础,使肿瘤干细胞的获取更加便捷。

此外,EGF 和 bFGF 是肿瘤干细胞条件培养基的主要成分,这两者在胶质瘤的发生过程中都起到重要作用。并且其在肿瘤细胞中广泛表达,但是其对胶质瘤干细胞的作用仍有待进一步的研究,并且我们还须进一步研究其在胶质瘤干细胞与非胶质瘤干细胞中的作用是否有差别。

总之,我们的研究进一步证明了胶质瘤干细胞是广泛存在的,并且提供了一种更为简便的方法从细胞系中获取胶质瘤干细胞,为更进一步的研究打下了基础。

参考文献(References)

- [1] Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu XW, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas [J]. Cancer Research, 65: 9328-9337, 2005
- [2] Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma[J]. Cancer Research, 64: 7011-7021, 2004
- [3] Li CW, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang LJ, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. Cancer Research, 67: 1030-1037, 2007
- [4] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. Nature, 445: 106-110, 2007
- [5] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100: 3983-3988, 2003
- [6] Hambardzumyan D, Squartro M, Holland EC. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors[J]. Cancer Cell, 10: 454-456, 2006
- [7] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. Cancer Research, 63: 5821-5828, 2003
- [8] Yuan XP, Curtin J, Xiong YZ, Liu GT, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme[J]. Oncogene, 23: 9392-9400, 2004
- [9] Bao SD, Wu QL, McLendon RE, Hao YL, Shi Q, Hjelmeland AB, De whirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response[J]. Nature, 444: 756-760, 2006
- [10] Bao SD, Wu QL, Sathornsumetee S, Hao YL, Li ZZ, Hjelmeland AB, Shi O, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor[J]. Cancer Research, 66: 7843-7848, 2006
- [11] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance[J]. Nature Reviews Cancer, 5: 275-284, 2005
- [12] Platet N, Mayol JF, Berger F, Herodin F, Wion D. Fluctuation of the SP/non-SP phenotype in the C6 glioma cell line[J]. Febs Letters, 581: 1435-1440, 2007
- [13] Yu SC, Ping YF, Yi L, Zhou ZH, Chen HH, Yao XH, Gao L, Wang JM, Bian XW. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87 [J]. Cancer Letters, 265: 124-134, 2008
- [14] Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, Russo A, Calatozzolo C, Ciusani E, Sciacca FL, Ottolina A, Parati EA, La Porta C, Alessandri G, Marras C, Croci D, De Rossi M. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype[J]. Glia, 54: 850-860, 2006
- [15] Targeting brain tumor stem cells extends mouse survival [J]. Cancer Biology & Therapy 6: 1513-1514, 2007
- [16] Wicha M, Korkaya H. Therapeutic implications of cancer stem cells [J]. pp, 19-19
- [17] Toru Kondo, Takao Setoguchi, Tetsuya Taga. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line[J]. PNAS, 101:781-786,2004