

# 卵巢癌病人腹水细胞的培养及其分化研究

路巧然, 吴欣欣, 贾晓渊, 陈 磊, 陈 侃

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

**摘 要:** 肿瘤干细胞是指能分化出不同表型、自我更新和不断分化的肿瘤细胞群, 具有与干细胞相似的特征。文章通过流式细胞术分析从人卵巢癌腹水分离所得的细胞表面蛋白的分化特征, 发现这些腹水细胞具有部分干细胞表面标志( $CD44^+$ ,  $CD90^+$ ,  $\beta 2M^+$ ) 蛋白, 但却不表达  $CD133$  和  $CD34$ , 且体外培养 2 周后, 腹水细胞表面标志发生了变化, 这些结果为卵巢癌干细胞研究提出了新的启示。

**关键词:** 肿瘤干细胞; 卵巢癌病人腹水细胞; 表面标志

**中图分类号:** R737.31 **文献标识码:** A

## 0 引 言

尽管目前人类在癌症治疗方面取得了巨大成就, 但其高复发率仍是癌症治疗的主要瓶颈。肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)学说认为在肿瘤组织中存在着少量具有自我更新、无限增殖和成瘤能力的干细胞, 这些细胞是导致肿瘤耐药、复发的主要因素<sup>[1-3]</sup>。近年来, 随着肿瘤干细胞相关研究的不断深入<sup>[4-8]</sup>, 人们对肿瘤的生物学特性也有了新的认识<sup>[9]</sup>。Bonnet 等<sup>[10]</sup>报道从急性髓性白血病样本中分离出一群  $CD34^+CD38^-$  标记的细胞, 并证实它们具有白血病干细胞特性。随后, Singh 等<sup>[11]</sup>的研究发现从脑肿瘤中分离出的  $CD133^+$  细胞群具有更强的致瘤能力, 可分化为普通肿瘤细胞, 这使得探索细胞表面的分子标记成为肿瘤干细胞研究的新策略。

卵巢癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 且多数患者一旦出现症状已属晚期, 目前针对卵巢癌干细胞的研究已经展开<sup>[12]</sup>。Zhang Shu 等<sup>[13]</sup>利用悬浮培养法获得了与病人腹水细胞相似的悬浮细胞团, 并用免疫荧光技术鉴定出了这些具癌干细胞特性的悬浮细胞团表面标记为  $CD44^+CD117^+$ , 这为我们进行卵巢癌干细胞研究提供了参考。

本文就卵巢癌患者腹水细胞的分离、培养与体外分化进行研究, 并采用流式细胞术检测腹水细胞表面标志物, 来证明此种细胞是干细胞来源的, 以期为进一步研究卵巢癌干细胞奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

卵巢癌患者血性腹水标本取自浙江大学妇产科医院, 患者年龄 45~53 岁。携带报告基因的肿瘤特异性增殖腺病毒 Ad. TERT-EGFP 及人肺腺癌细胞 A549 均由本实验室保存, 培养基 DMEM、RPMI1640、胎牛血清、胰蛋白酶均购自 GIBCO 公司, 荧光标记抗体 PE- $CD133$  购自 Miltenyi 公司, 其他抗体 FITC- $CD44$ 、

收稿日期: 2010-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(30801379); 浙江省教育厅科研项目(20060593); 浙江省重中之重学科开放基金项目(SWYX0812); 浙江理工大学科研启动基金项目(0916819-Y)

作者简介: 路巧然(1984-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤的靶向基因病毒治疗研究。

通讯作者: 陈 侃, 电子邮箱: chenkan\_xjtu@163.com

PE-CD34、FITC-CD90、PE- $\beta$ 2M 均购自 BD 公司。

## 1.2 仪器

FACSAria 型流式细胞仪(BD 公司),SW-CJ-1FB 超净台(苏州净化设备有限公司),DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司),XDS-1B 倒置生物显微镜(Olympus 公司),BCD-277 冰箱(博西华家用电器有限公司)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 腹水细胞的分离、培养

卵巢癌血性腹水分别放入 50 mL 离心管,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 10 mL 红细胞裂解液重悬沉淀,混匀后室温放置 5 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 重悬细胞,离心弃上清,置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液(内含青霉素 100 U/mL、链霉素 100  $\mu$ g/mL)中常规培养,条件为 37℃,5% CO<sub>2</sub>。

### 1.3.2 荧光显微镜检测 Ad. TERT-EGFP 在血性腹水细胞中的表达

将分离所得腹水细胞以每孔  $1 \times 10^6$  接种于 6 孔板,每孔含 10% DMEM 培养液 2 mL。待细胞贴壁后换成含 2% DMEM 培养液,每孔加入  $1 \times 10^7$  vp( virus particle)Ad. TERT-EGFP 感染细胞,每个标本设 3 个平行孔,24 h 后在荧光显微镜下观察细胞绿色荧光表达情况来检测腹水细胞中的肿瘤细胞含量。

### 1.3.3 流式细胞术检测腹水细胞表面蛋白表达情况

分离所得腹水细胞先用抗体 Buffer 洗 2 遍,再悬浮于 4℃ 预冷 100  $\mu$ L 的抗体 Buffer 中,以 10  $\mu$ L /  $10^7$  个细胞的浓度分别加入荧光标记的抗体 PE-CD133、PE-CD34、FITC-CD44、FITC-CD90、PE- $\beta$ 2M 及其同型对照 PE-Isotype, mouse anti-IgG1 $\kappa$ ,FITC-Isotype, mouse anti-IgG1 $\kappa$ ,PE-Isotype, mouse anti-IgM  $\lambda$ (PE- $\beta$ 2M),然后将细胞放入 4℃ 冰箱避光孵育 30 min,上机检测前用 PBS 洗 2 遍,同样用 2  $\mu$ g/mL 的 PI 染色以区别死细胞,用 488 nm 波长的光源激发待测细胞,以检测其表面蛋白表达情况。

## 2 结 果

### 2.1 光学显微镜下观察细胞形态

为了研究细胞的形态变化,采用在 200 倍普通光镜下观察,发现新鲜分离得到的细胞胞体呈梭形、条索状,而经过传代体外培养 2 周后细胞体积渐渐增大,且形态也逐渐变成卵圆形或扁圆形、上皮状,见图 1。

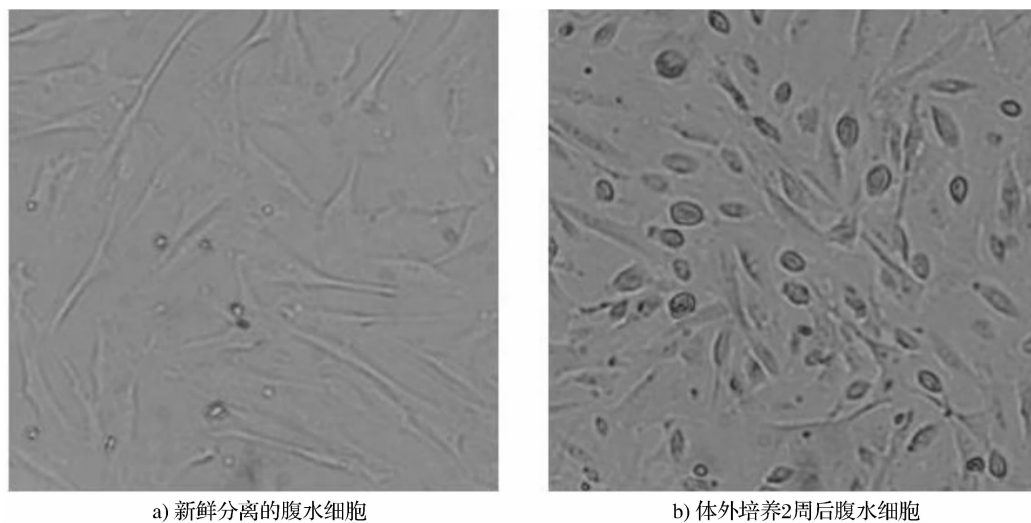


图1 普通倒置显微镜下观察腹水细胞形态(200 $\times$ )

### 2.2 荧光显微镜下观察 Ad. TERT-EGFP 感染血性腹水细胞后 EGFP 的表达情况

人端粒酶逆转录酶基因(hTERT)的启动子在 90% 的肿瘤细胞中活性升高,在正常细胞中活性较低<sup>[14-16]</sup>,而腺病毒因为具高感染率及非致癌性等特点,将携带 EGFP 基因的肿瘤特异性增殖病毒 Ad. TERT-EGFP 加入到血性腹水细胞中,观察腹水细胞的绿色荧光表达情况,以证明腹水细胞确为癌细胞。结果显示腹水细胞均可大量表达绿色荧光蛋白(见图 2)。

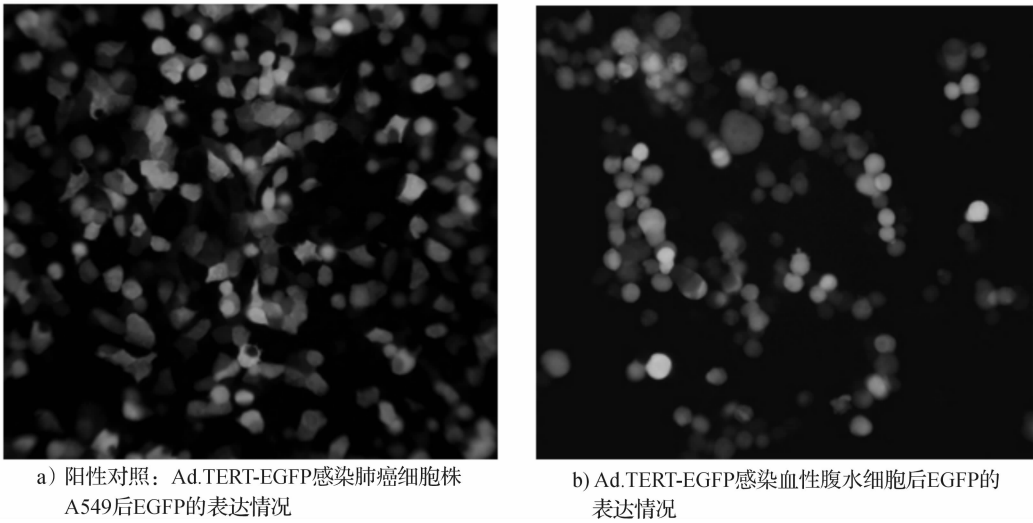


图 2 病毒感染细胞 24 h 后的荧光表达(200×)

2.3 流式细胞仪检测细胞表面抗原表达情况

为了检测卵巢癌腹水细胞表面蛋白的分化表达情况,本研究分别取新鲜分离的腹水细胞和在体外培养 2 周以后的腹水细胞,选用部分干细胞标记对其表面蛋白进行检测,如:CD44 是卵巢癌干细胞来源的;CD133 是造血干细胞来源的等。结果发现,约 60%新鲜分离的腹水细胞表达 CD44 蛋白,而在体外培养 2 周后,表面表达 CD44 的腹水细胞增加到 96%;新鲜和体外培养的腹水细胞均高表达 CD90(约 93.8%)和  $\beta$ 2M 蛋白(71.5%),而不表达 CD133 和 CD34 蛋白(见图 3)。

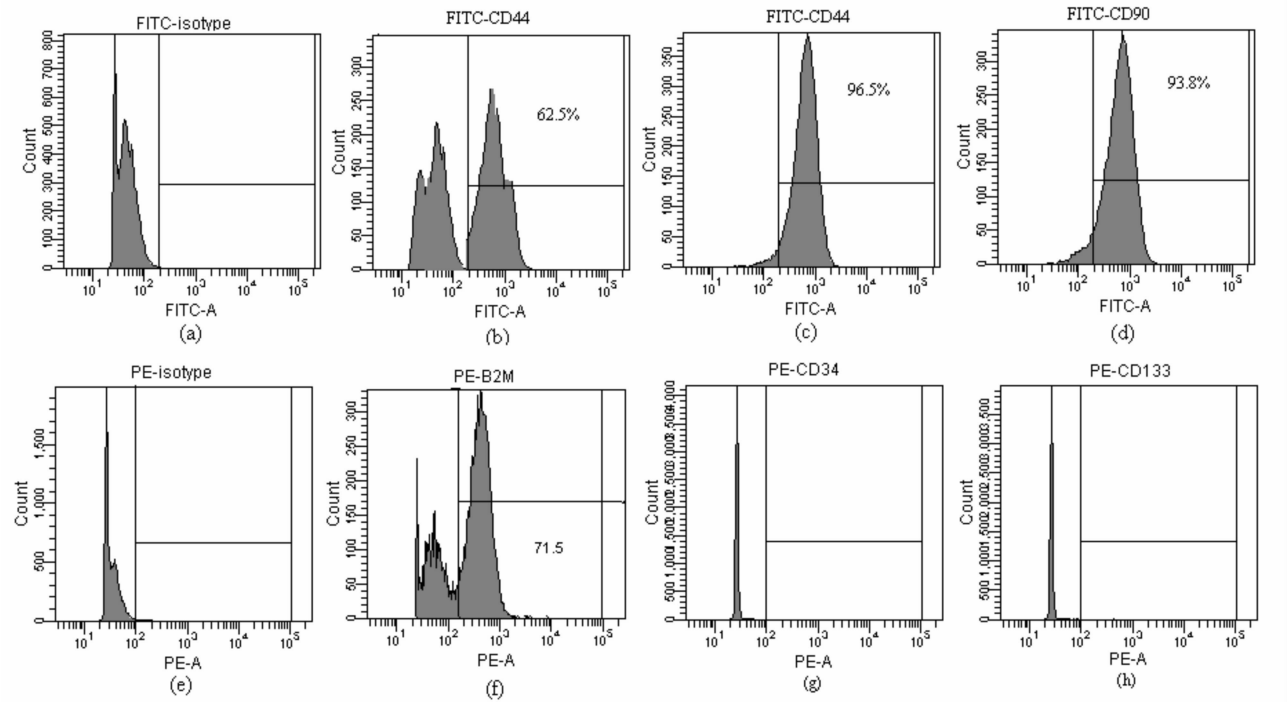


图 3 流式细胞术检测细胞表面蛋白表达情况

3 讨 论

肿瘤干细胞的概念是基于肿瘤细胞和正常干细胞之间的相似性而提出的。肿瘤组织中存在一小群具有

干细胞性质的细胞群体,与干细胞一样,均有自我更新能力和多向分化的潜能,以及相似的生长调控机制<sup>[1,8]</sup>。肿瘤干细胞具有自我更新的能力,因此在体外缺乏生长因子的条件下仍然生长迅速。1997年 Bonnet 等<sup>[10]</sup>发现只占细胞总数 2%的  $CD34^+CD38^-$  细胞具很强的成瘤性,这是首次获得 CSC 存在的证据。随着近年来对 CSC 研究的发展,CSC 表面分子陆续被发现,目前研究者已一致认为白血病是由表面标志为  $CD34^+CD38^-$ <sup>[17]</sup> 的白血病干细胞引起的恶性肿瘤。Singh 等<sup>[11,18]</sup>发现人脑胶质瘤组织中存在膜分子  $CD133^+$  为细胞表面标志的脑肿瘤干细胞(brain tumor stem cell, BTSC)。近来研究发现。Al-Hajj 等<sup>[19]</sup>从乳腺癌中分离出  $CD44^+CD24^{-/low}$  (占 2%)的乳腺癌干细胞(breast cancer cells, BCC)。随后,研究者们在消化道肿瘤、黑色素瘤、前列腺癌、肺癌、胰腺癌等实体瘤中都证实了肿瘤干细胞的存在<sup>[20-21]</sup>。这些研究结果为肿瘤干细胞理论提供了有力的证据。CD34 被认为是造血干/祖细胞的标志物,它会随着细胞的分化逐渐减少直至消失。近年来这一理论受到挑战,Osawa 等首先证明拥有完全重建能力的小鼠肝星状细胞(HSC)可以是  $CD34^-$  的,人的  $CD34^-$  细胞也有低水平的嫁接和造血能力,移植研究表明胎绵羊  $CD34^-$  细胞有重新繁殖的能力;表型为胸腺抗原-1 Thy-1 或 CD90 阳性的细胞群能够重建受致死量紫外线照射宿主的淋巴造血系统,证明其具有干细胞性质; $\beta 2$  微球蛋白( $\beta 2M$ )是哺乳动物体内广泛表达于有核细胞表面、最具保守性的蛋白质,由于其不出现在某些永生性生长的肿瘤细胞及胚囊期 ES 细胞表面,因此  $\beta 2M$  阴性细胞被认为是具有旺盛增殖潜能的细胞<sup>[22]</sup>。

本文新鲜分离的卵巢癌腹水细胞并不表达 CD34 和 CD133 蛋白,大多数细胞均可表达 CD90 蛋白,少部分细胞不表达  $\beta 2$  微球蛋白,且随着体外培养时间延长,表达 CD44 的细胞数目增多。本研究说明卵巢癌腹水中存在着  $CD90^+$  和  $\beta 2M^-$  细胞,这些细胞并非来源于造血干细胞,它们可能具有部分分化潜能;而体外培养使一部分  $CD44^-$  细胞转变为  $CD44^+$ ,因此卵巢癌腹水细胞中的  $CD44^-$  细胞可能是比  $CD44^+$  表达细胞更早期的细胞,而在  $CD44^-$  细胞转变为  $CD44^+$  这一过程中, $CD90^+$  细胞和  $\beta 2M^-$  细胞可能发挥了一定的作用。

目前对于卵巢癌干细胞的研究还处于初级阶段,虽然笔者已经进行了分离培养,也已筛选出一些细胞表面的蛋白标记,但这些表型是否是卵巢癌干细胞的特异标记还不很清楚。因此需要进一步研究来确定卵巢癌干细胞的稳定表型及其体外分化情况,以便对卵巢癌的发生、转移和预后等进行深入研究。

## 参考文献:

- [1] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, et al. Stem cells, cancer and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
- [2] Cannistra S A. Cancer of the ovary[J]. N Engl J Med, 2004, 3(51): 2519-2529.
- [3] Pecorelli S, Favalli G, Zigliani L, et al. Cancer in women[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2003, 8(2): 369-379.
- [4] Godwin A K, Testa J R, Hamilton T C. The biology of ovarian cancer development[J]. Cancer, 1993, 7(1): 530-536.
- [5] Ness R B, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer[J]. Natl Cancer Inst, 1999, 9(1): 1459-1467.
- [6] Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumor than do serum-cultured cell lines[J]. Cancer cell, 2006, 9(5): 391-403.
- [7] Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of  $CD133^+$  cancer stem cells in glioblastoma[J]. Mol Cancer, 2006, 12(5): 63-67.
- [8] Wang J C, Dick J E. Cancer stem cells: lessons from leukemia[J]. Trends Cell Biol, 2005, 1(5): 494-501.
- [9] Hope K, Jin L, Dick J E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity[J]. Nat Immunol, 2004, 3(5): 738-743.
- [10] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. Nat Med, 1997, 3(7): 730-737.
- [11] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [12] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(1): 10-30.
- [13] Zhang Shu, Balch C, Michael W, et al. Identification and characterization of ovarian Cancer-initiating cells from primary

- human tumors[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4311-4320.
- [14] Counter C, Gupta J, Harley C, et al. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies[J]. *Blood*, 1995, 8(5): 2315-2320.
- [15] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*, 1994, 26(6): 2011-2015.
- [16] Shay J. Telomerase in human development and cancer[J]. *Cell Physiol*, 1997, 17(3): 266-270.
- [17] Hosen N, Park C Y, Tatsumi N, et al. CD34 is aleukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(26): 11008-11013.
- [18] Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al. CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> glioblastoma derived cancer stem cels show diferential growth characteristics and molecular profiles[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9): 4010-4015.
- [19] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [20] Houghton J M, Stoicov C, Nomura S. Gastric cancer originating from bone marrow-derivad cells[J]. *Science*, 2004, 306(5701): 1568-1571.
- [21] Li C, Heidt D G, Simeone D M, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(5): 1030-1037.
- [22] 裴雪涛. 干细胞实验指南[M]. 北京: 北京科学出版社, 2006.

## Research on the Culture and Differentiation of Ovarian Cancer Ascites Cells

LU Qiao-ran, WU Xin-xin, JIA Xia-yuan, CHEN Lei, CHEN Kan

(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences,  
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Cancer stem cells(CSC)are cells that can differentiate the different phenotype, self-renewal and continued differentiation, also have similar characteristics with the stem cells. In this paper, by flow cytometry the authors analyze the differentiation characteristics of cell surface proteins that isolate from human ovarian cancer ascites, to find that these ascites cells have some stem cell surface marker(cluster of differentiation(CD) CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>)proteins, but don't have CD133 and CD34 proteins. After two weeks culture in vitro, there has some change in the markers of the ascites cells, these results raise new revelation for the research of ovarian cancer stem cell.

**Key words:** cancer stem cell; cancer ascites cell; surface marker

(责任编辑: 许惠儿)