

黑素瘤细胞诱导人胚上皮干细胞的恶性转化

孙红玉, 胡凯猛, 刘厚奇*

(第二军医大学基础部组织胚胎学教研室, 发育生物学研究中心, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探索体外肿瘤微环境中正常成体干细胞是否可以发生恶性转化而具有相关肿瘤学特性。**方法:**利用共培养池建立黑素瘤 A-375 细胞诱导表皮干细胞转化的模型, 应用相差显微镜观察诱导前后表皮干细胞形态变化, 免疫荧光法检测诱导后表皮干细胞 E-钙黏着蛋白、肿瘤相关抗原 P53 突变蛋白的表达变化和双层软琼脂实验鉴定诱导后表皮干细胞克隆形成能力情况。**结果:**7 d 后与黑素瘤细胞 A-375 直接接触共培养的表皮干细胞开始克隆样生长, 细胞 E-钙黏着蛋白表达下降, 部分细胞表达 P53 突变蛋白, 软琼脂培养克隆形成率为 0.55%。**结论:**表皮干细胞经黑素瘤细胞直接诱导后, 可以具有肿瘤细胞的相关生物学特性。结果表明, 肿瘤微环境可以造成干细胞自我更新能力的失控。

[关键词] 黑素瘤; 表皮干细胞; 肿瘤干细胞; 钙黏着蛋白; 蛋白质 P53; 突变

[中图分类号] R 730.231

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2007)11-1161-04

Melanoma cell induces malignant transformation of epidermal stem cells

SUN Hong-yu, HU Kai-meng, LIU Hou-qi* (Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Institute of Developmental Biology Center, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study whether normal adult stem cells can have malignant transformation (have tumor characteristics) when exposed to tumor microenvironment. **Methods:** We established an *in vitro* model of melanoma cell-induced malignant transformation of epidermal stem cells in a cell co-culture system. The morphological changes of epidermal stem cells were observed before and after induction by phase-contrast microscope; the expression of E-cadherin and P53 mutant protein were examined by immunofluorescence method. Soft agar test was used to examine the colony forming ability of epidermal stem cells after co-culture. **Results:** Seven days after co-culture with A-375 cells, epidermal stem cells began to form visible colonies. The expression of E-cadherin protein was decreased and P53 mutant protein was observed in some cells. Soft agar test showed that 0.55% epidermal stem cells formed colony in the soft agar. **Conclusion:** This study shows that epidermal stem cells can obtain the characteristics of tumor cells when exposed to inducement of A-375 cells, suggesting that tumor microenvironment can cause disturbance in self-renewing and differentiation of stem cells.

[KEY WORDS] melanoma; epidermal stem cells; tumor stem cells; cadherins; protein P53; mutation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(11): 1161-1164]

目前已在白血病^[1]、乳腺癌^[2]、脑胶质瘤^[3]、黑素瘤^[4]和前列腺肿瘤细胞系^[5]中证实存在肿瘤干细胞。随着对肿瘤干细胞研究的不断深入, 越来越多的证据提示肿瘤中某些细胞具有干细胞特性, 并提出了肿瘤干细胞的学说, 认为肿瘤是干细胞异常增殖分化并逃避机体免疫识别而形成的细胞群体。尽管大多数肿瘤转化突变的靶细胞并不清楚, 但是已有相当多的证据表明某些结肠癌^[6]和白血病^[7]产生于积累多次突变的干细胞。此外, 肿瘤干细胞理论的一个关键点是细胞微环境 (cell niche) 的改变是干细胞分化受阻的主要原因^[8]。细胞微环境改变后可能会导致基因的突变, 故倾向于认为是微环境破坏而使维持正常干细胞分化的调控发生紊乱受阻并导致增殖信号的加强。在本研究中我们探讨黑素瘤 A-375 细胞对表皮干细胞的诱导作用, 以期为干细

胞在肿瘤微环境中分化失常理论提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 A-375 黑素瘤细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所, 该细胞株用含 10% 新生牛血清 DMEM 培养液于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。人胚表皮干细胞 (human embryo epidermal stem cell, HEESC) 由本室保存, 用无血清培养基

[基金项目] 军队“十一五”科技攻关项目 (06G62); 国家海外青年合作基金 (30428001). Supported by Project of the “11th Five-Year Plan” for Tackling Scientific Program of PLA (06G62) and Joint Research Fund for the Overseas Chinese Young Scholars (30428001).

[作者简介] 孙红玉, 硕士. E-mail: shongyu2008@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: houqiliu@126.com

(Keratinocyte-SFM, K-SFM) 培养。其中, DMEM 培养液、胰蛋白酶、K-SFM 均购自美国 Gibco 公司。山羊抗人 E-钙黏着蛋白单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 兔抗人 P53 单克隆抗体购自武汉博士德公司。BD 公司 Falcon™ 细胞培养池 (cell culture inserts), 其多孔 PET 膜有效直径 23.1 mm, 厚 13 μm, 与 6 孔板底间距离 0.9 mm; 膜孔直径 0.4 μm。

1.2 共培养模型的建立 将 A-375 和 HEESC 分别种植于 cell culture inserts PET 膜的两侧, 作为直接接触共培养组; 将 A-375 种植于放有 cell culture inserts 的 6 孔板上, 然后 PET 膜内面种植 HEESC, 作为间接接触共培养组; 将 HEESC 单独种在 PET 膜一侧, 作为阴性对照组。

1.3 模型的检测

1.3.1 形态学观察 相差显微镜下每天观察 HEESC 的生长状态情况, 并进行必要的拍照。

1.3.2 E-钙黏着蛋白表达 在共培养 7 d 后, 用镊子从 cell culture inserts 上撕下多孔 PET 膜, 接触共培养组需用棉签迅速拭去膜 A-375 细胞, 用免疫荧光法检测 HEESC E-钙黏着蛋白的表达情况, 方法如下: PBS 迅速洗 2~3 次; 置 -10℃~-20℃ 冷丙酮中, 细胞面向上, 7 min; PBS 洗 3 min×3 次; 加一抗 (羊抗多克隆抗体, 1:50 稀释) 50 μl 于盖玻片上, 阴性对照用 50 μl 抗体稀释液代替一抗, 湿盒内 4℃ 过夜; PBS 洗 3 min×3 次; 加二抗 (TRITC 标记鼠抗山羊 IgG, 1:50 含 1% BSA 的 PBS 稀释) 50 μl

于盖玻片上, 湿盒内 37℃ 50 min; PBS 洗 3 min×3 次; (R) DAKO Fluorescent Mounting Medium 封片, 4℃ 避光存放, 1 个月内荧光显微镜观察。

1.3.3 P53 突变蛋白表达 共培养 7 d 后, 免疫荧光法检测 HEESC 的 P53 突变蛋白的表达。如 1.3.2 项下方法, 一抗为兔抗多克隆抗体 (1:100 稀释), 二抗用 TRITC 标记鼠抗兔 IgG 显示 (1:50 稀释)。

1.3.4 转化能力 双层软琼脂克隆形成实验鉴定共培养后 HEESC 是否具有恶性转化的能力。方法如下: 按 1:1 混合 1.2% 的琼脂和 2×DMEM, 然后取 2 ml 注入直径约 3.5 cm 平皿中令其凝固, 置 5% CO₂ 孵箱中备用, 作为琼脂底层。按 1:1 混合 0.7% 琼脂和 2×DMEM, 然后加入待检测的细胞悬液, 使其细胞终密度为每毫升约含 350 个待检测细胞, 充分混匀后, 向含有 1.2% 琼脂底层的平皿中注入 2 ml, 使其形成琼脂层。待上层琼脂凝固后, 置 37℃, 5% CO₂ 孵箱中, 培养 10~14 d。观察细胞集落; 集落形成率 = 形成集落数 / 接种细胞数 × 100%。

2 结果

2.1 细胞形态的变化 相差显微镜下观察到共培养 4 d 时有克隆出现, 7 d 时可见明显的克隆; 直接接触共培养 7 d 后的 HEESC 于正常培养基中贴壁后可见部分细胞变为梭形, 说明 A-375 诱导后 HEESC 接触抑制开始丧失 (图 1)。

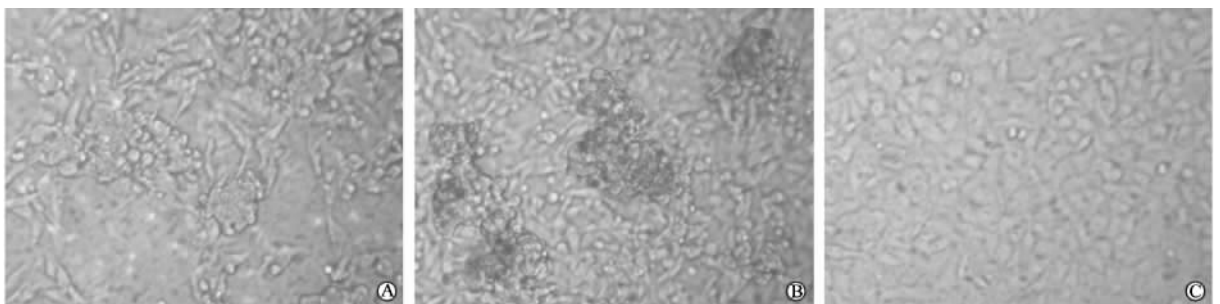


图 1 共培养 4 d(A) 和 7 d(B) 后 HEESC 形成的克隆及其对照组 (C)

Fig 1 Colonies formed by HEESC 4 d(A), 7 d(B) after co-culture and not formed in control group(C) (×100)

2.2 共培养后 HEESC 的 E-钙黏着蛋白鉴定结果 免疫荧光法显示 A-375 诱导后 HEESC 表达 E-

钙黏着蛋白的阳性信号比诱导前明显减弱 (图 2), 提示 E-钙黏着蛋白表达量下降, 说明其黏附能力下降。

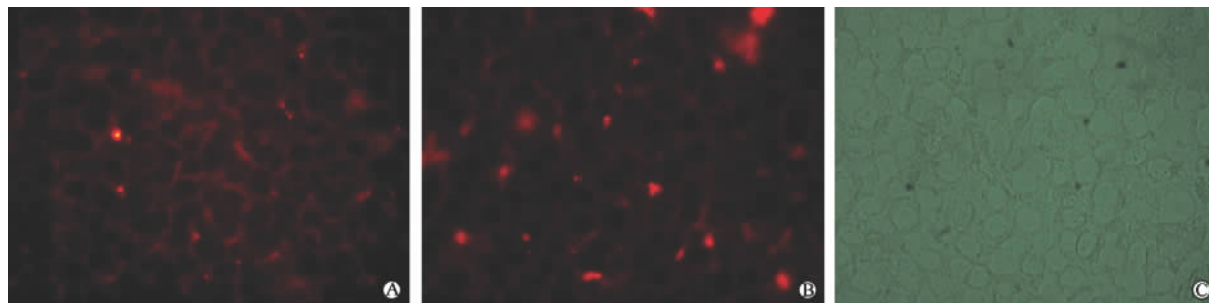


图 2 阴性对照组(A)和共培养组(B)及其相差显微镜下(C)HEESC E-钙黏着蛋白免疫荧光检测结果

Fig 2 Immunofluorescence staining of E-cadherin in negative control group(A), and co-culture group(B), C was B under phase-contrast microscope($\times 400$)

2.3 共培养后 HEESC 的 P53 鉴定结果 免疫荧光法显示 A-375 诱导后有部分 HEESC 的 P53 呈现

核阳性信号(图 3),这说明转化后 HEESC 部分细胞 P53 蛋白发生突变。

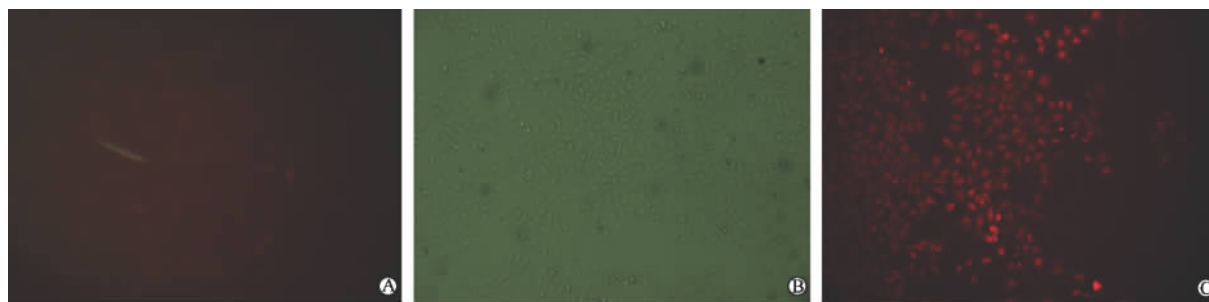


图 3 阴性对照组(A)及其相差显微镜下(B),共培养组(C)HEESC P53 的免疫荧光检测结果

Fig 3 Immunofluorescence staining of P53 in negative control group (A) and co-culture group(C), B was A under phase-contrast microscope($\times 100$)

2.4 转化能力的检测结果 3 次软琼脂克隆形成实验数据显示接触共培养组克隆形成率为 0.55%, 间接共培养组克隆形成率为 0.01%, 对照组克隆形

成率为 0%(图 4)。0.55% 细胞能在双层软琼脂生长,说明这部分细胞已获得恶性转化。

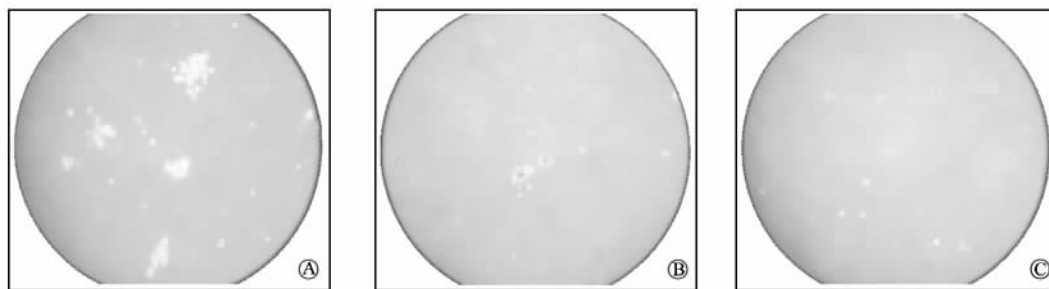


图 4 接触共培养组(A)、间接共培养组(B)和对照组(C)HEESC 的软琼脂克隆形成实验结果

Fig 4 Images of soft agar colony assay in contact co-culture group(A), indirect co-culture group(B) and control group(C) ($\times 40$)

3 讨论

近年来,随着对干细胞和肿瘤研究的深入,越来越多的证据表明干细胞和肿瘤有很多共同的特点:都具有自我更新和分裂增殖的能力,有高端粒酶活性以及共享一些信号转导通路^[9]。但是干细胞与肿瘤细胞最大的差别是生长是否受到严格调控,因此有理由怀疑干细胞在肿瘤微环境中是否失去自身的调节能力,向肿瘤细胞方向靠近或者促进肿瘤的生长^[10]。

同时,人们逐渐认识到存在于上皮组织的成体干细胞与皮肤发生、修复、改建以及上皮源性肿瘤有密切关系^[10]。因此表皮干细胞逐渐成为研究热点。

本研究中我们用黑素瘤细胞来诱导表皮干细胞,发现接触共培养组中表皮干细胞形成克隆,细胞形态变为梭形,说明表皮干细胞间的接触抑制开始丧失。只有接触组共培养组形成克隆,这提示黑素瘤细胞和表皮干细胞间的接触是必要的,至于发生的机制需要进一步探讨。

E-钙黏着蛋白介导细胞与细胞之间的黏附维持细胞结构和形态的稳定,其表达下降可影响细胞间的黏附使细胞容易分离。本研究结果表明转化后的表皮干细胞 E-钙黏着蛋白表达量下降,说明其黏附能力下降。最近发现黑素瘤细胞表达 N-钙黏附蛋白、PC42 及 ME1-ME6 等新的钙黏附分子,但 E-和 P-钙黏附蛋白的表达却减少^[11],这提示诱导后的表皮干细胞和肿瘤细胞的相关生物学特性一致。

抑癌基因 p53 突变后即具有癌基因的作用,可导致多种肿瘤的发生和恶化。本研究中经黑素瘤细胞诱导后有部分细胞 P53 抗体免疫荧光染色呈核阳性,说明该部分细胞 P53 蛋白已发生突变。Stretch 等^[12]报道黑素瘤常发生 P53 突变,这提示诱导后的表皮干细胞和肿瘤细胞的相关生物学特性一致。

软琼脂克隆形成实验从功能上证明表皮干细胞在黑素瘤的诱导下可获得恶性转化能力。

总之,黑素瘤细胞诱导表皮干细胞后,部分表皮

干细胞获得了肿瘤细胞的相关生物学特性,说明微环境破坏可使表皮干细胞分化的调控发生改变。即细胞微环境的改变可引发细胞与细胞、细胞与间质信号交流的异常,从而造成了细胞失控性增殖,这为干细胞在肿瘤微环境中分化调控能力失调提供了一定的依据。

[参考文献]

- [1] 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, 3:730-737.
 - [2] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Acad Sci USA*, 2003, 100:3983-3988.
 - [3] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:5821-5828.
 - [4] Fang D, Nguyen T K, Leishear K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas [J]. *Cancer Res*, 2005, 65:9328-9337.
 - [5] Matsueda S, Yao A, Ishihara Y, et al. A prostate stem cell antigen-derived peptide immunogenic in HLA-A24-prostate cancer patients[J]. *Prostate*, 2004, 60:205-213.
 - [6] Calabrese P, Tavaré S, Shibata D. Pretumor progression: clonal evolution of human stem cell populations [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164:1337-1346.
 - [7] Passegué E, Jamieson C H M, Ailles L E, et al. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics[J]? *PNAS*, 2003, 100: 11842-11849.
 - [8] Li L, Neaves W B. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 4553-4557.
 - [9] Crowe D L, Parsa B, Sinha U K. Relationships between stem cells and cancer stem cells [J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19: 5905-5919.
 - [10] Owens DM, Watt F M. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3:444-451.
 - [11] Bonitsis N, Batistatou A, Karantima S, et al. The role of cadherin/catenin complex in malignant melanoma[J]. *Exp Oncol*, 2006, 28:187-193.
 - [12] Stretch J R, Gatter K C, Ralfkiaer E, et al. Expression of mutant p53 in melanoma[J]. *Cancer Res*, 1991, 51:5976-5979.
- [收稿日期] 2007-04-03 [修回日期] 2007-09-24
[本文编辑] 尹 茶