

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00487

AC133 和 EpCAM 在人肺腺癌中的表达及双阳性细胞的分选

赵振国[△], 罗福康[△], 安江宏, 段玉忠, 孙建国, 朱波, 陈正堂*

第三军医大学新桥医院肿瘤科, 全军肿瘤研究所, 重庆 400037

[摘要] **目的:**通过双重免疫荧光染色法检测人肺腺癌组织标本中 AC133 以及上皮细胞黏附分子(EpCAM)的表达,并以流式细胞术分选 AC133⁺EpCAM⁺细胞,为后续人肺腺癌干细胞研究提供实验基础。**方法:**取人肺腺癌组织标本,冰冻切片,进行双重免疫荧光染色,通过激光共聚焦显微镜检测腺癌组织内 AC133 和 EpCAM 的表达。以胶原酶和分散酶将新鲜肺腺癌组织标本制为单细胞悬液,滤除其中的胶原并去除红细胞后,以 AC133 和 EpCAM 共同标记单细胞,上流式细胞仪进行分选。**结果:**在人肺腺癌标本中具有 AC133 和 EpCAM 的表达;通过流式细胞术可分选到 AC133 和 EpCAM 共表达细胞。**结论:**验证了人肺腺癌组织中 AC133 和 EpCAM 的表达情况;通过流式细胞术分选获得 AC133 和 EpCAM 双标记阳性细胞,可为人肺腺癌干细胞的后续研究提供实验基础。

[关键词] AC133; 上皮细胞黏附分子; 人肺腺癌干细胞; 流式细胞术

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0487-04

Expression of AC133 and EpCAM in human pulmonary adenocarcinoma and isolation of their double positive cells

ZHAO Zhen-guo[△], LUO Fu-kang[△], AN Jiang-hong, DUAN Yu-zhong, SUN Jian-guo, ZHU Bo, CHEN Zheng-tang*

Department of Oncology, Cancer Center of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

[ABSTRACT] **Objective:** To determine the expression of AC133 and EpCAM in human pulmonary adenocarcinoma by dual immunofluorescent labeling technique and to isolate AC133⁺EpCAM⁺ cells by flow cytometry, so as to provide a basis for further investigation of human pulmonary adenocarcinoma stem cells. **Methods:** The human lung adenocarcinoma tissues were obtained and subjected to cryosection and dual immunofluorescent staining. AC133⁺EpCAM⁺ cells in human pulmonary adenocarcinoma were identified by using laser confocal microscopy. The fresh adenocarcinoma tissues were prepared into single cell suspension with the collagen and red blood cell removed. AC133 and EpCAM were used to label cells and the AC133⁺EpCAM⁺ cells were isolated by flow cytometry. **Results:** AC133⁺EpCAM⁺ cells were found in human pulmonary adenocarcinoma and they could be isolated by flow cytometry. **Conclusion:** The existence of AC133⁺EpCAM⁺ cells has been confirmed in the lung adenocarcinoma tissues; the double positive cells can be isolated by flow cytometry, which provides a basis for further investigation of lung cancer stem cells.

[KEY WORDS] AC133; EpCAM; human pulmonary adenocarcinoma stem cell; flow cytometry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5):487-490]

肺腺癌是最常见的肺部恶性肿瘤,但是这种类型肿瘤细胞的细胞起源和进展还不完全清楚。近年来,肿瘤干细胞学说成为肿瘤生物学领域非常重要的研究进展,该理论不但提供了肿瘤生成的可能原因,更解释了肿瘤产生抗药性导致难以治愈的可能原因。因此,对于各种肿瘤干细胞的鉴定以及相关生物学的研究成为当前的研究热点^[1-4]。Eramo 等^[5]的研究表明,人肺腺癌细胞中存在有少量未分

化 CD133⁺(AC133⁺)细胞,此类细胞可在无血清培养液中产生肿瘤分化球,而且少量的此类细胞就可以在免疫缺陷鼠成瘤,提示此类细胞为人肺腺癌中的肿瘤干细胞。目前,我们也对人肺腺癌干细胞开展了相关研究。我们首先检测了人肺腺癌组织中 AC133 的表达,并引入了特异性肿瘤标志物上皮细胞黏附分子(EpCAM)以去除癌组织中其他 AC133 阳性细胞(如造血干细胞)的影响;同时通过流式细

[收稿日期] 2009-03-19 **[接受日期]** 2009-04-30

[基金项目] 国家高技术发展研究计划(“863”项目)(2008aa02Z104). Supported by the National High Technology R&D Program(2008aa02Z104).

[作者简介] 赵振国, 博士生. E-mail: zhao_zhenguo@126.com; 罗福康, 博士生. E-mail: luofukang2002@sina.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-68755626, E-mail: zhengtangchen@yahoo.com.cn

胞术分选了 AC133 和 EpCAM 双阳性细胞,为后续研究人肺癌干细胞特性提供了实验基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源 人肺腺癌组织标本来自第三军医大学新桥医院手术切除标本。所有患者(男 3 例,女 7 例)均知情同意。

1.2 主要试剂和仪器 分散酶、胶原蛋白(Sigma 公司),胶原酶(罗氏公司),藻红蛋白(PE)标记的 AC133 单抗(Miltenyi Biotec 公司),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 EpCAM 抗体(Ebioscience 公司),4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,罗氏公司),DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司),氢化可的松(Stem Cell 公司),白血病抑制因子(LIF,上海欣百诺生物公司),乳腺上皮细胞培养液(Stem Cell 公司),台式低温高速离心机(Beckman 公司),流式细胞分选仪(FACSAria™ Cell Sorter, BD 公司),激光共聚焦显微镜(Leica SP5,第三军医大学中心实验室提供),其余试剂均为国产分析纯。

1.3 人肺腺癌组织标本 H-E 染色 经常规方法制备冰冻切片和石蜡切片,厚度 5 μm ;切片在二甲苯中脱蜡 5~10 min,移入二甲苯和纯乙醇(1:1)混合液中约 5 min;逐级通过 100%、95%、85%、70%乙醇溶液脱水,各级为 2~5 min;最后经蒸馏水转入染液,苏木精染色 5~15 min,0.5%~1%盐酸乙醇(70%乙醇溶液配制)分色片刻,镜检控制,直至细胞核及核内染色质清晰为止;约 30 s,流水冲洗 15~30 min,0.1%~0.5%伊红染色 1~5 min,依次经 70%、85%、95%、100%乙醇溶液脱水,二甲苯透明(2次),封片。

1.4 人肺腺癌单细胞培养 将人肺腺癌组织剪成 1 mm³大小的碎块,PBS 反复漂洗;加入 0.25%分散酶 1.5 ml、0.4%胶原酶 0.5 ml、50 μl 胎牛血清(FCS)消化,4℃过夜 12~16 h,再置于 37℃孵箱中消化 50~60 min;400 目尼龙筛网过滤,含 5%FCS 的 PBS 悬浮细胞;1 000 r/min 离心 5 min(离心半径 10 cm),调整有核细胞密度为 $1 \times 10^8/\text{ml}$ 。将上述细胞按 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养板中,加入含有 5%FCS 和氢化可的松的乳腺上皮细胞培养液,每孔 0.5 ml,37℃、5%CO₂孵箱中孵育 24 h,使细胞贴壁。24 h 后吸出培养液,去除未贴壁细胞,加入含有 LIF 和氢化可的松的无血清乳腺上皮细胞培养液,继续培养。

1.5 细胞免疫荧光染色 0.25%胰酶消化各种培养肺癌细胞,按合适的密度接种细胞,进行爬片培

养。冰丙酮固定 10 min,PBS 洗涤。正常兔血清室温孵育 30 min,加入 AC133(1:100)和 FITC-EpCAM(1:100)4℃过夜孵育,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。PBS 漂洗 5 min,共 3 次,缓冲甘油封片后激光共聚焦观察。

1.6 激光共聚焦显微镜检测双阳性细胞肺腺癌组织中的分布 用眼科剪剪除肿瘤标本外围癌旁组织,留取肿瘤组织(约 1 cm×1 cm×0.5 cm),放入液氮做冰冻切片。将冰冻切片置常温解冻;将 PE-AC133 和 FITC-EpCAM 按 1:50 稀释于 PBS 中,制备抗体稀释液 0.5 ml;将抗体稀释液滴加于切片上,常温避光孵育 20 min;以 PBS 洗涤 3 次,晾干;甘油封片;激光共聚焦显微镜下观察。

1.7 流式细胞术分选 AC133⁺EpCAM⁺细胞 制备小鼠肺组织单细胞悬液,方法同前。取制备好的肺单细胞悬液 4×10^7 ,加入 BD 公司专用试管中,加入 PE 标记的 AC133 抗体 20 μl 、FITC 标记的 EpCAM 抗体 80 μl ,混匀,4℃避光孵育 30 min,PBS 漂洗后,上流式细胞分选仪分选 AC133⁺EpCAM⁺细胞,即人肺腺癌干细胞,收集待用;采用 WinMDI 2.9 软件分析流式细胞仪数据。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件包对数据进行统计学分析,两组间比较采用 *t* 检验,结果均以双侧 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 人肺腺癌组织标本 H-E 染色结果 肺腺癌手术切除标本组织切片的 H-E 染色结果(图 1)显示,细胞多成团,有的呈乳头状或腺腔样排列、边界较清楚,核大较为圆形或月牙形、染色质成颗粒状,核仁明显,符合肺腺癌的 H-E 染色特点。

2.2 细胞免疫荧光染色结果 AC133、EpCAM 在人肺腺癌组织存在表达,主要表现为于肺癌组织细胞膜、胞质色素颗粒沉积,以肿瘤细胞游离缘明显(图 2)。

2.3 双阳性细胞在肺腺癌组织中的分布 肺腺癌中双阳性细胞胞核 DAPI 染色浓集,胞膜分别被 AC133 和 EpCAM 染成红色和绿色,位置不固定(图 3),肺泡腔和支气管肺泡连接区均可见;细胞数量少,每个视野只有 1~2 个。

2.4 流式细胞仪分选双阳性细胞的结果 进行电压调节和荧光补偿后开始分选细胞,通过前向角和侧向角射门选定待研究细胞群 R1,再从 R1 细胞群中设定 AC133⁺EpCAM⁺细胞群为 R2、AC133⁻EpCAM⁻细胞群为 R3。分别把分选出来的

AC133⁺EpCAM⁺ 和 AC133⁻EpCAM⁻ 收集待用。独立 3 次重复实验后结果均相似, 在肺腺癌单细胞

悬液中 AC133⁺EpCAM⁺ 细胞占肺细胞总数的 0.7%~1.1%(图 4)。

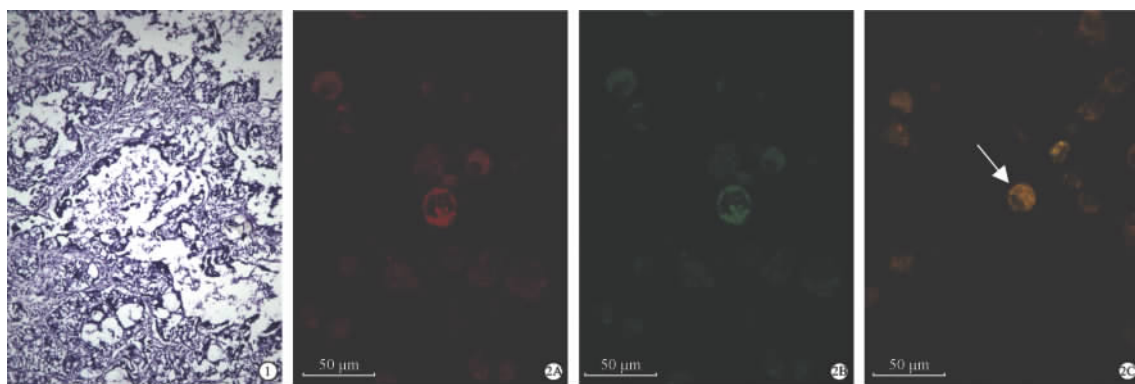


图 1 肺腺癌 H-E 染色结果

Fig 1 H-E staining of pulmonary adenocarcinoma

Original magnification: ×100

图 2 激光共聚焦显微镜显示人肺组织单细胞 AC133 和 EpCAM 的表达

Fig 2 Expression of AC133 and EpCAM in human pulmonary adenocarcinoma cells as detected by laser confocal microscopy

A: Red fluorescence represents expression of AC133; B: Green fluorescence represents expression of EpCAM; C: The white arrow indicates the double positive cell

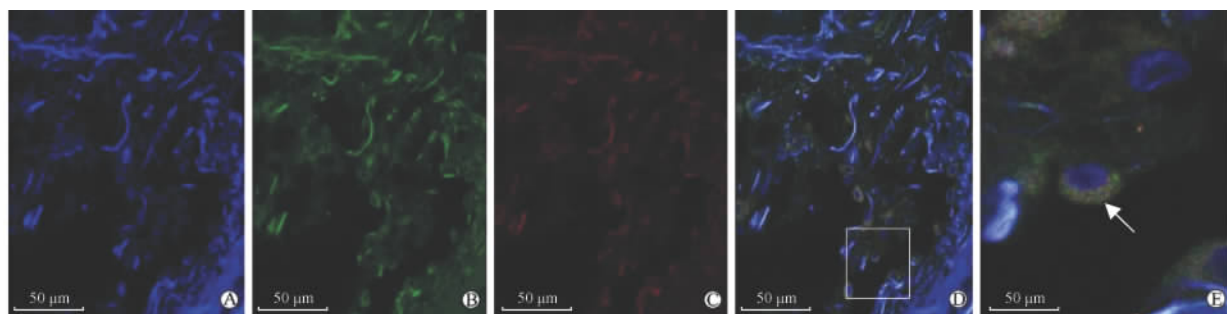


图 3 激光共聚焦显微镜显示肺腺癌组织中双阳性细胞的分布

Fig 3 Location of double positive cells in human pulmonary adenocarcinoma tissues by laser confocal microscopy

A: Nuclei are stained blue fluorescence by DAPI; B: Green fluorescence represents expression of EpCAM; C: Red fluorescence represents expression of AC133; D-E: Double positive cells. The location of double positive cells (white arrow) is not immobile

3 讨论

制备人肺腺癌单细胞悬液时, 我们采用了分散酶和胶原酶混合消化的方式。分散酶具有纤维结合素酶和 IV 型胶原酶的活性, 是一种可快速、温和、有效分离上皮和上皮组织的中性蛋白酶; 胶原酶对细胞间质有很好的消化作用, 可使上皮细胞与胶原分离而不受损伤。因此, 通过分散酶和胶原酶混合消化的方式, 能够得到活性好且纯度高的肺腺癌单细胞^[6]。

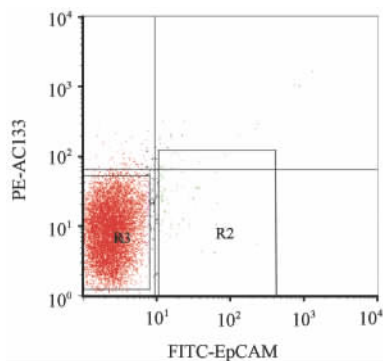


图 4 流式细胞仪分选双阳性细胞结果

Fig 4 Isolation of double positive cells with FACS

肺腺癌是常见的恶性疾病,其发病率呈逐年上升趋势。由于早期不易发现、对传统治疗反应差、术后易转移等因素的存在,肺腺癌的预后很差。基于肿瘤干细胞的相关研究有望为肺癌的早期诊断和治疗带来新的突破。以往认为肿瘤细胞具有功能同质性,传统的肿瘤治疗方法针对的是所有的肿瘤细胞。如果肿瘤是源于肿瘤干细胞的一种干细胞疾病,我们先诸多关于肿瘤发生发展机制、细胞信号途径等的研究成果可能需要重新评价。肿瘤干细胞的生物学行为与其他肿瘤细胞可能存在质的差别,以肺癌为例,传统治疗虽能使肿瘤体积缩小甚至消失,但肺癌干细胞比普通肺癌细胞更能耐受放疗和化疗,使得肺癌干细胞的残存成为复发和转移的根源。因此,针对肺癌干细胞的治疗可能使治疗效果更持久,同时可阻止肿瘤的转移,这对于肺癌的治疗具有深远的意义。AC133 是乳腺癌、脑胶质瘤、肝癌、结肠癌、前列腺癌等多种实体瘤的肿瘤干细胞标记物^[7-8]。Eramo 等^[5]报道在不同类型人非小细胞肺癌组织中存在数量极少(约 0.32%~1.13%)的 CD133⁺(AC133⁺)细胞。在此基础上,他们还成功实现了 CD133⁺肺癌细胞的分选和体外扩增,体外扩增的 CD133⁺肺癌细胞具有类似神经干细胞球的生长特性、多向分化及自我更新能力;更为重要的是 AC133⁺肺癌细胞较 AC133⁻肺癌细胞具有更强的致瘤能力。该研究为 AC133 作为肺癌干细胞标记物提供了实验依据。为了使分选的肺腺癌干细胞更加纯净,我们在实验中增加了特异性的内皮细胞

EpCAM 分子作为分选标记,而且在实验中验证了 AC133 阳性细胞也同时表达 EpCAM 分子。

通过本研究不仅对人肺腺癌干细胞的鉴定和流式分选建立了技术平台,更重要的是为后续研究人肺癌干细胞的相关生物学特性提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] Zhang M, Rosen J M. Stem cells in the etiology and treatment of cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16: 60-64.
- [2] Griffiths M J, Bonnet D, Janes S M. Stem cells of the alveolar epithelium[J]. *Lancet*, 2005, 366: 249-260.
- [3] Kim C F, Jackson E L, Woolfenden A E, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer[J]. *Cell*, 2005, 121: 823-835.
- [4] Dong J, Kislinger T, Jurisica I, Wigle D A. Lung cancer: developmental networks gone awry[J]? *Cancer Biol Ther*, 2009, 8: 312-318.
- [5] Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 504-514.
- [6] Costea D E, Johannessen A C, Vintermyr O K. Fibroblast control on epithelial differentiation is gradually lost during *in vitro* tumor progression[J]. *Differentiation*, 2005, 73: 134-141.
- [7] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozi E, Biffoni M, Todaro M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells[J]. *Nature*, 2007, 445: 111-115.
- [8] Singh S K, Hawkins C, Clarke I D, Squire J A, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. *Nature*, 2004, 432: 396-401.

[本文编辑] 商素芳,邓晓群

· 书 讯 ·

《现代临床骨科学》丛书已出版

由刘尚礼教授任总主编的《现代临床骨科学》丛书,分为骨科学总论(刘尚礼、勘武生等主编,ISBN 978-7-81060-892-3,16开,定价:80.00元)、创伤骨科学(张铁良、马金柱等主编,ISBN 978-7-81060-893-0,16开,定价:85.00元)、关节外科学(刘尚礼、马少方等主编,ISBN 978-7-81060-897-8,16开,定价:55.00元)、骨病与骨肿瘤(林建华、杨迪生等主编,ISBN 978-7-81060-894-7,16开,定价:118.00元)、脊柱外科学(贾连顺、李健等主编,ISBN 978-7-81060-895-4,16开,定价:98.00元)以及小儿骨科学(贾卫斗、程开明等主编,ISBN 978-7-81060-896-1,16开,定价:65.00元)6个分册。全书系统地介绍了骨科发展的概况,骨科疾病的分类、流行病学、解剖学、临床表现、影像学诊断与鉴别诊断、病理学检查、临床分期、各种治疗方法与进展、骨科康复等。这套丛书是将骨科学基础理论与临床实践相结合的专业性学术著作,详细地阐述了近年来在骨科基础和临床研究方面的新进展、新理论、新方法和新技术,在某种程度上填补了我国骨科基础紧密结合临床著述的空白。

《现代临床骨科学》丛书内容紧紧围绕临床诊断与治疗编写,使之贴近临床而更具实用价值。资料来源于长期从事骨科基础研究与临床工作者,理论紧密结合临床实际是本书的特点,尤其是书中展示了大量的临床病例及图片,对初级骨科医师的临床实践更具指导意义。丛书内容新颖、翔实、条理清晰、图文并茂,为各级骨科医师提供了一本实用性和综合性都很强的参考书。

本书由第二军医大学出版社出版发行,全国各地新华书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595

<http://www.smmup.com>