

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01366

# 不同肿瘤细胞株 CD133 抗体的筛查

## Screening of 42 cancer cell lines with CD133 antibody

周育宏<sup>1</sup>, 方国恩<sup>1\*</sup>, 薛绪潮<sup>1</sup>, 钱其军<sup>2</sup>, 姜梨华<sup>2</sup>

1. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 对 42 个常见的肿瘤细胞株进行筛选, 明确细胞株中是否存在 CD133<sup>+</sup> 可能的肿瘤干细胞。**方法** 取对数生长期的肿瘤细胞株, CD133 抗体标记后用流式细胞仪检测, 观察 CD133<sup>+</sup> 细胞的比例。**结果** 42 个肿瘤细胞株中, 肝癌细胞株 SK-HEP-1、HepG2、Hep3B、L2-2-15、PLC/PRF5, 胰腺癌细胞株 PANC-1、BXPC-1, 结肠癌细胞株 SW620、HT29, 鼻咽癌细胞株 CNE-2, 共 10 个细胞株 CD133<sup>+</sup> 细胞数与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。**结论** 42 个肿瘤细胞株中检出 10 个细胞株存在 CD133<sup>+</sup> 可能的肿瘤干细胞亚群。

**[关键词]** 肿瘤细胞系; CD133; 筛选; 肿瘤干细胞**[中图分类号]** R 730.231**[文献标志码]** B**[文章编号]** 0258-879X(2010)12-1366-02

大多数肿瘤细胞群中存在肿瘤干细胞, 在肿瘤发生、发展、转移及复发中起关键作用<sup>[1]</sup>。肿瘤干细胞的概念从根本上改变了人们对肿瘤的认识, 是肿瘤治疗可能的新靶标, 但一直没有找到特异的肿瘤干细胞标志物。CD133 是人类干/祖细胞膜上发现的一种跨膜糖蛋白抗原, 常表达于神经原始细胞、上皮/内皮祖细胞谱系、造血干/祖细胞等, 是目前用来标记或分选干/祖细胞的最常用的膜表面标志, 采用 CD133 抗体可以部分分离和鉴定肿瘤干细胞<sup>[1-5]</sup>。本研究采用 CD133 抗体标记的流式细胞术, 对常见的一些肿瘤细胞株进行筛选, 旨在明确这些细胞株是否存在 CD133<sup>+</sup> 细胞, 为后续研究奠定基础。

### 1 材料和方法

**1.1 细胞株来源及培养** 细胞株: 人胃癌细胞株 BGC823、MKN45、MKN28、SH288、SGC-7901, 人肺癌细胞株 H460、H446、ASPC-1、H1299、A549, 人肝癌细胞株 SK-HEP-1、Hep3B、HepG2、PLC/PRF5、7701, 人乳腺癌细胞株 MBD-231、MCF-7、BT549、BT483、B-Cap37、SK-BR-3、MDA-MB-453, 人卵巢癌细胞株 SK-OV-3, 人胰腺癌细胞株 PANC-1, 人结肠癌细胞株 HT29、SW620, 人鼻咽癌细胞株 CNE-1、CNE-2, 人黑色素瘤细胞株 A375, 人骨肉瘤细胞株 MG-63、U2-OS, 人膀胱癌细胞株 T24、253J, 人肾癌细胞株 786-0, 人宫颈癌细胞株 HeLa, 均购于美国 ATCC 公司。人肝癌细胞株 SMMC-7721、7402、7404、L2-2-15、人胃癌细胞株 HGC-27、人胰腺癌细胞株 BXPC-1 购于中国科学院上海细胞生物学研究所。

所有细胞株均在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的条件下贴壁培养, 培养液中含 100 μg/ml 庆大霉素、10% 胎牛血清 (FBS), 0.25% 胰酶消化细胞传代。收集对数生长期肿瘤细胞, 以 EDTA-

Hanks 液消化、吹打收集, PBS 洗涤后离心 (125 × g, 5 min) 2 次后备用。调整细胞密度为 10<sup>6</sup> 个/ml。

**1.2 主要试剂** CD133-PE 购于德国 Milteny 公司; DMEM、RPMI-1640、MEM、M5AM 培养液、FBS、新生牛血清 (NCS) 均购于美国 Gibco 公司。

**1.3 流式细胞计量仪检测** 取收集的肿瘤细胞 (每个细胞株各 5 组, 每组细胞数为 10<sup>6</sup>), 每组各加入 100 μl PBS 重悬, 再加入 10 μl CD133-PE (11 : 1), 4℃ 避光反应 15 min。PBS 洗涤后离心 (125 × g, 10 min) 1 次, PBS 调整细胞密度为 10<sup>6</sup> 个/ml, 每个离心管共 500 μl 细胞悬液, 上机检测。对照组为同样方法处理的不加 CD133-PE 的细胞悬液。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 10.0 统计软件, 组间比较采用单因素方差分析, 检验水平 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

### 2 结果

在 42 个肿瘤细胞株中, 发现肝癌细胞株 SK-HEP-1、HepG2、Hep3B、L2-2-15、PLC/PRF5 中 CD133<sup>+</sup> 细胞分别约为 3.24%、10.0%、60.10%、75.80%、45.80%; 胰腺癌细胞株 PANC-1、BXPC-1 中 CD133<sup>+</sup> 细胞约为 1.10%; 结肠癌细胞株 SW620、HT29 中 CD133<sup>+</sup> 细胞分别约为 32.8%、31.64%; 鼻咽癌细胞株 CNE-2 中 CD133<sup>+</sup> 细胞约 0.90%, 与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 表 1)。

### 3 讨论

人实体肿瘤中是否存在肿瘤干细胞, 是近年来肿瘤研究的热点<sup>[1]</sup>。Setoguchi 等<sup>[2]</sup>发现, 很多肿瘤细胞系中持续存在肿瘤干细胞; Patrawala 等<sup>[3]</sup>也证实人类多种肿瘤细胞系中存在干细胞样细胞。大多数肿瘤细胞群中的确存在肿瘤干细胞, 这为肿瘤的基础和临床研究开辟了一条新的途径。

**[收稿日期]** 2010-04-07**[接受日期]** 2010-11-10**[作者简介]** 周育宏, 博士生, 主治医师. E-mail: zhoyuhong0928@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81873339, E-mail: fanguoen@yahoo.com.cn

但肿瘤干细胞的研究仍处于起步阶段, 尚有许多问题有待探索 and 解决。其中, 如何分离肿瘤中存在的肿瘤干细胞依然缺乏有效的手段。

表 1 CD133 抗体对肿瘤细胞株的筛选结果

( $n=5, \bar{x} \pm s, \%$ )

细胞株	对照组	实验组
肝癌		
HepG2	0.10±0.00	10.00±0.16**
Hep3B	0.20±0.00	60.10±2.13**
L2-2-15	0.20±0.07	75.80±0.61**
PLC/PRF5	0.20±0.00	45.80±0.12**
SK-HEP-1	0.40±0.15	3.24±0.19**
胰腺癌		
PANC-1	0.08±0.08	1.10±0.12**
BXPC-1	0.08±0.13	1.10±0.07**
结肠癌		
SW620	0.12±0.08	32.80±2.77**
HT29	0.04±0.05	31.64±3.31**
鼻咽癌		
CNE-2	0.08±0.08	0.90±0.07**

\*\*  $P < 0.01$  与对照组相比

目前分离肿瘤干细胞主要采用荧光激活细胞分选术 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 和磁珠分离技术 (magnetic activated cell sorting, MACS)。这 2 种分离技术均有赖于肿瘤干细胞表面标志物的识别。由于细胞所表达的表面分子众多, 并因细胞种类不同而各有特点, 特异性的肿瘤干细胞分子标志比较匮乏。要确定用哪几种特异的表面分子进行肿瘤干细胞的筛选, 目前存在相当难度。现行技术常借助于正常干细胞的相关方法来筛选肿瘤干细胞。因此, 要使肿瘤干细胞得到有效分离和鉴定, 还有赖于更有效的分子标志的出现及对干细胞研究的进一步发展。

CD133 是人类干/祖细胞膜上发现的一种抗原, 为跨膜糖蛋白, 表达于神经原始细胞、上皮/内皮祖细胞谱系、造血干/祖细胞<sup>[5]</sup>, 是公认的一种干/祖细胞表面抗原标志。近年对多种类型的肿瘤细胞株研究发现, CD133 还是一种新的肿瘤干细胞的表面标志<sup>[6-11]</sup>。已有不少研究将 CD133 抗体作为肿瘤干细胞初筛的标志<sup>[12-13]</sup>, 所筛选出的 CD133<sup>+</sup> 细胞均表现出具有自我更新能力、高致瘤潜能、多向分化能力的干细胞特性。本实验用 CD133 抗体筛选了 42 种常见肿瘤细胞株, 发现其中 10 种细胞株表达高水平的 CD133, 以肝癌细胞株系 HepG2、Hep3B、L2-2-15、PLC/PRF5 和结肠癌细胞株 SW620、HT29 表达水平最明显。虽然在肝癌细胞株 SK-HEP-1、胰腺癌细胞株 PANC-1、BXPC-1 及鼻咽癌细胞株 CNE-2 检出的 CD133<sup>+</sup> 肿瘤细胞比例偏低, 但经过统计学分析也存在显著性差异。值得注意的是, 在被筛选的 10 种肝癌细胞株中, Hep3B、L2-2-15、PLC/PRF5 三种细胞株 CD133<sup>+</sup> 细胞分别为 60.1%、75.8%、45.8%, 其 CD133<sup>+</sup> 细胞比例处于较高水平, 与文献<sup>[9]</sup>报道的结果类似。在被筛选的 2 种结肠癌细胞株 SW620 和 HT29 中, CD133<sup>+</sup> 细胞分别为 32.8%、31.64%, 与 O'Brien 等<sup>[12]</sup>对结肠癌新鲜标本检

测的水平一致。

根据肿瘤干细胞理论, 肿瘤干细胞在细胞群中应该是数量较少的一个亚群, 因此, 目前还不能认定本实验所筛选的所有 CD133<sup>+</sup> 肿瘤细胞都是肿瘤干细胞, 仍需对各种肿瘤中分选出来的 CD133<sup>+</sup> 细胞进行干细胞特性的检测, 以进一步确定其是否属于肿瘤干细胞亚群。

## [参考文献]

- [1] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, Weissman I L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414: 105-111.
- [2] Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines[J]. *Cell Cycle*, 2004, 3: 414-415.
- [3] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang D G. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2<sup>+</sup> and ABCG2<sup>-</sup> cancer cells are similarly tumorigenic[J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 6207-6219.
- [4] Miraglia S, Godfrey W, Yin A H, Atkins K, Warnke R, Holden J T, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning [J]. *Blood*, 1997, 90: 5013-5021.
- [5] Uchida N, Buck D W, He D, Reitsma M J, Masek M, Phan T V, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 14720-14725.
- [6] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, Bonn V E, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 5821-5828.
- [7] Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, Russo A, Calatuzzolo C, Ciusani E, et al. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype[J]. *Glia*, 2006, 54: 850-860.
- [8] Richardson G D, Robson C N, Lang S H, Neal D E, Maitland N J, Collins A T. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 16): 3539-3545.
- [9] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriawaki H. Characterization of CD133<sup>+</sup> hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351: 820-824.
- [10] Olempska M, Eisenach P A, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F, Kalthoff H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6: 92-97.
- [11] Zhou L, Wei X, Cheng L, Tian J, Jiang J J. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line[J]. *Laryngoscope*, 2007, 117: 455-460.
- [12] O'Brien C A, Pollett A, Gallinger S, Dick J E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. *Nature*, 2007, 445: 106-110.
- [13] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells[J]. *Nature*, 2007, 445: 111-115.

[本文编辑] 贾泽军