

细胞密度对卵巢癌干细胞悬浮球诱导的影响*

陈勉之^{1,2}, 钟兰^{1,2}, 魏冬梅^{1,2}, 牛晓宇^{1,2}△

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041)

【摘要】 目的 研究细胞密度是否会对从人卵巢透明细胞癌系 ES-2 和卵巢腺癌细胞 A2780 中分离的癌干细胞产生影响。方法 将 ES-2、A2780 细胞置于含生长因子、牛血清白蛋白和人胰岛素的无血清培养基中培养,采用连续传代诱导培养癌干细胞。观察不同细胞密度下 ES-2、A2780 细胞形态变化,流式细胞术分别检测含血清培养基(SSM)组、无血清培养基(SFM)组细胞诱导前后细胞表面标志 CD133、CD44 表达的改变。软琼脂克隆形成实验检测不同诱导条件下 ES-2 癌干细胞球生长速度和成瘤能力。结果 2×10^4 mL⁻¹ 密度下,ES-2 细胞能在 SFM 中存活,但不能形成癌干细胞球; 5×10^4 、 1×10^5 mL⁻¹ ES-2 细胞能在 SFM 中存活,增殖并形成癌干细胞球。与贴壁的细胞及诱导前相比,诱导后形成的癌干细胞球(1×10^5 mL⁻¹ 组、 5×10^5 mL⁻¹ 组)高表达 CD133⁺、CD44⁺ ($P < 0.05$),传代后具有更高的增殖能力和克隆形成能力,且 5×10^4 mL⁻¹ 密度下,癌干细胞球成瘤能力更强。A2780 细胞分别以 1×10^4 、 3×10^4 、 5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种于 SFM 中,10 d 后, 1×10^4 、 3×10^4 mL⁻¹ 组中形成细胞团,但 3×10^4 mL⁻¹ 组中形成的细胞团更大,透光性更强,细胞更致密, 5×10^4 mL⁻¹ 组未形成细胞悬浮球。流式细胞术发现 A2780 细胞 3×10^4 mL⁻¹ 组中细胞与 1×10^4 mL⁻¹ 组相比,CD133⁺ 细胞阳性率更高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。 3×10^4 mL⁻¹ 组的细胞生长速度最快。结论 细胞密度 5×10^4 mL⁻¹ 和 3×10^4 mL⁻¹ 分别是诱导 ES-2、A2780 细胞株卵巢肿瘤干细胞的合适条件。

【关键词】 卵巢腺癌 卵巢透明细胞癌 癌干细胞 悬浮球 诱导

Effects of Cellular Density on the Induction of Suspension Globe of Ovarian Cancer Stem Cells CHEN Mian-zhi^{1,2}, ZHONG Lan^{1,2}, WEI Dong-mei^{1,2}, NIU Xiao-yu^{1,2}△. 1. Department of Gynaecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: xiaoyuniu72@163.com

【Abstracts】 Objective To determine the effect of cellular density on the separation and identification of cancer stem cells from human ovarian clear cell carcinoma cell line ES-2 and adenocarcinoma cell line A2780. **Methods** ES-2 and A2780 cells were cultured with human recombinant epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) and bovine serum albumin and insulin in serum free medium. The cancer stem cells were obtained through serial passages. Changes in cell morphology, expressions of surface marker CD133 and CD44, and soft AGAR clone forming in the stem cells were examined under different cell density, either in serum-supplemented medium (SSM group) or in serum free medium (SFM group). **Results** Under the density of 2×10^4 mL⁻¹, ES-2 cells survived in SFM, but did not form stem cells. When the density increased to 5×10^4 mL⁻¹ or 1×10^5 mL⁻¹, ES-2 cells survived in SFM, proliferated and formed stem cells. Compared with adherent cells, the suspension globe of stem cells expressed high levels of CD133 and CD44 ($P < 0.05$), with proliferation and clone forming ability after serial passages. The stem cell balls under the density of 5×10^4 mL⁻¹ had stronger ability of tumor formation. A2780 cells formed suspension globe under the density of 1×10^4 mL⁻¹ and 3×10^4 mL⁻¹, but larger and more transparent balls were observed under the density of 3×10^4 mL⁻¹ density. No suspension globe was formed under the density of 5×10^4 mL⁻¹. More CD133⁺/CD44⁺ cells were detected by flow cytometry under the density of 3×10^4 mL⁻¹, compared with that under the density of 1×10^4 mL⁻¹ ($P < 0.05$). Tumor stem cells grew faster under the density of 3×10^4 mL⁻¹. **Conclusion** The optimal density for identifying stem cells from human ovarian cancer is 5×10^4 mL⁻¹ for ES-2 and 3×10^4 mL⁻¹ for A2780, respectively.

【Key words】 Ovarian adenocarcinoma Ovarian clear cell carcinoma Tumor stem cell Suspension globe Induction

* 四川省学术带头人培养基金(No. 2012DTPY0028, No. 2013RST004),四川省卫计委基金(No. 130113)和四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2014KJT057-2014SZ)资助

△ 通信作者, E-mail: xiaoyuniu72@163.com

上皮性卵巢癌是女性生殖道恶性肿瘤中死亡率第一位的疾病,70%以上的患者首次就诊即为晚期,尽管采用了手术、化疗、免疫疗法等综合治疗,但是大部分患者会复发,只有10%~30%患者可以获得长期生存^[1]。癌症复发转移与肿瘤内的癌干细胞具有巨大的增殖潜力和自我更新能力有关,目前卵巢癌干细胞也成为了研究的热点^[2-5]。但是在研究卵巢癌的起源和发病机理的过程中,最大的困难就是它的异源性,仅仅上皮性肿瘤组织学上就表现为多种亚型,如浆液性、黏液性、透明细胞型等,而每一种类型都有其独特的临床病理特点。因此,很可能每一种类型都有其不同的细胞起源或者癌干细胞。

卵巢透明细胞癌是一种恶性度很高的卵巢上皮性肿瘤,发病率占上皮性卵巢癌的5%~13%^[2]。其预后差、复发率高、对化疗药物高度耐受,是临床治疗中的难点。因此我们也高度怀疑卵巢透明细胞癌中存在肿瘤干细胞的可能。目前为止,尚未有研究卵巢透明细胞癌系中肿瘤干细胞的报道。本研究探索了不同细胞密度下,卵巢透明细胞癌细胞系ES-2的癌干细胞球形成过程,同时对比了卵巢腺癌细胞系A2780癌干细胞球的形成,为建立可靠高效的卵巢癌干细胞研究模型合适的细胞密度条件,希望为卵巢透明细胞癌干细胞研究及卵巢透明细胞癌治疗提供初步的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

人卵巢透明细胞癌ES-2、卵巢腺癌A2780细胞为本实验室保存,购于ATCC细胞库。DNEM/F12培养基、RPMI-1640培养基(Gibco公司),表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)(Sigma公司),Anti-CD44-FITC、Anti-CD133-PE(优宁维公司),DAPI(Sigma公司),0.05%胰酶、胎牛血清(Gibco公司),低熔点琼脂糖(Invitrogen)。含血清培养基(serum-supplemented medium, SSM)为含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,无血清培养基(serum-free medium, SFM)由DMEM/F12、EGF、bFGF和L-谷氨酰胺组成。

1.2 方法

1.2.1 从细胞系ES-2、细胞系A2780中诱导癌干细胞 将卵巢癌ES-2、A2780细胞分别接种于SSM中,传代培养。待细胞处于对数增长期,留取其中一部分细胞,继续在SSM中培养,作为同代对照(普通肿瘤细胞),用于1.2.3流式细胞检测和1.2.4

A2780癌干细胞球生长曲线测定;另一部分细胞用PBS液清洗,胰酶消化,重悬于SFM中(诱导后形成的肿瘤干细胞)。台盼蓝染色计数活细胞后,分别将 1×10^5 、 5×10^4 、 2×10^4 mL⁻¹密度的ES-2细胞和 1×10^4 /mL、 3×10^4 /mL、 5×10^4 /mL密度的A2780细胞于SFM中进行传代培养,显微镜下观察ES-2、A2780细胞在SFM中形成肿瘤干细胞球的过程并摄片。

1.2.2 软琼脂克隆形成实验检测不同ES-2癌干细胞密度下生长速度和成瘤能力 取诱导后第5代ES-2肿瘤干细胞,在6孔板中灌制终浓度为0.6%的琼脂胶(1.2%的琼脂糖胶与2×培养基1:1混合,每孔2 mL,室温放置直至凝固),将0.7%的琼脂糖胶与2×RIPA-1640培养基1:1混合,放入温度40℃的水浴锅备用;收集SSM组和SFM组肿瘤干细胞诱导前后的ES-2细胞,胰酶消化、漂洗并离心后,重悬于PBS中,台盼蓝染色后计数细胞,接种于0.35%的上层胶中混合均匀,6孔板中每孔接种2 000细胞,每种细胞设置3个平行孔;培养3周后结晶紫染色观察细胞克隆形成情况。

1.2.3 流式细胞仪检测ES-2、A2780癌干细胞表面抗原 CD133⁺和CD44⁺高低是肿瘤细胞恶性化程度的标志物。将 5×10^4 mL⁻¹密度的ES-2、 3×10^4 mL⁻¹密度的A2780细胞分别在SSM组(同代对照)和SFM组传代培养,在SFM组诱导形成肿瘤干细胞球后,收集第一代肿瘤干细胞球,消化后调整细胞密度为 1×10^7 mL⁻¹,进行Anti-CD44、Anti-CD133标记,流式细胞仪检测SFM组诱导前后和SSM组CD133⁺、CD44⁺细胞的比例。流式检测均重复3次。

1.2.4 不同细胞密度诱导后A2780癌干细胞球生长曲线测定 取1.2.1中的 1×10^4 mL⁻¹组, 3×10^4 mL⁻¹组, 5×10^4 mL⁻¹组A2780细胞,经过SFM培养基诱导10 d后取肿瘤干细胞球,和处于对数生长期原始未诱导的A2780细胞,各自用SSM培养基培养,隔天台盼蓝染色计数细胞,以检测细胞生长速率变化。SSM是A2780细胞的通用培养基。如果诱导后的肿瘤干细胞仅在SFM培养基中表现出生长速度快等性状,在SSM培养基中未表现出同样的性状,说明其并非肿瘤干细胞。

1.2.5 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。均数之间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同细胞密度下卵巢透明癌ES-2细胞肿瘤干

细胞球形成的差异

ES-2 细胞分别以 2×10^4 、 5×10^4 和 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于 SFM 中, 2 d 可见 3 组细胞中大多数细胞呈悬浮状生长, 少数细胞贴壁, 细胞形态变圆。 $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组细胞慢慢皱缩, 7 d 出现成团的死细胞, 没有形成饱满的有规则形状的肿瘤干细胞球。 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组的细胞, 2 d 后可以看到正在分裂的细胞, 有多个二细胞团和四细胞团, 接种 5 d 后形成饱

满有折射光的细胞球, 细胞间结合紧密; 7 d 后可见致密的葡萄状细胞球, 球体折光性更强。 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 组细胞, 接种 2 d 后绝大多数细胞悬浮生长, 有少量皱缩的贴壁细胞; 接种 5 d 后形成的细胞球球体直径偏小, 且形态略欠规则, 7 d 后细胞球球体直径增加, 但细胞间界限不是很分明, 折光性略低于 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组(图 1)。细胞球传代后, $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组传代第 2 天即可看到明显的细胞分裂, 与 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$

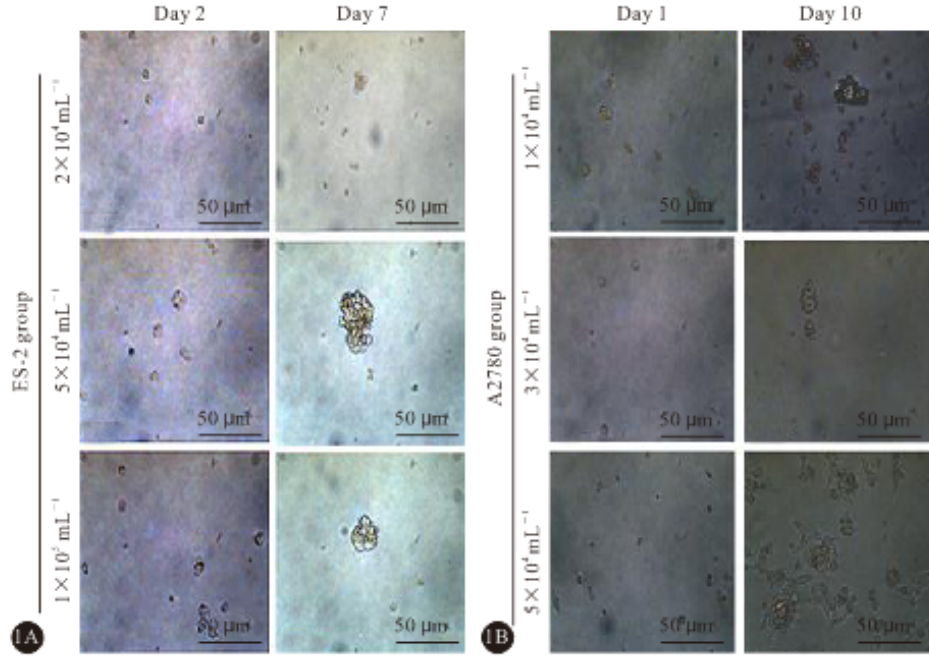


图 1 倒置显微镜下观察不同密度 ES-2 细胞(A)、A2780 细胞(B)诱导后肿瘤干细胞球形成连续传代 5 次后肿瘤干细胞球成瘤能力

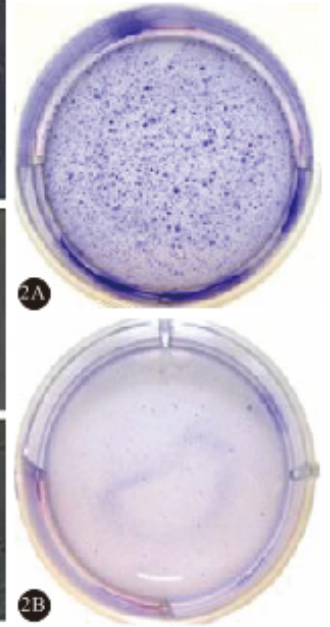
图 2 ES-2 细胞软琼脂克隆形成实验检测

Fig 1 Cell morphology of ES-2 (A) and A2780 (B) observed from microscope after cell induction under different density

Fig 2 Using soft

agar experiment to test the ability of clone formation after 5-time passage

2A: $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ group; 2B: $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ group



组相比, 细胞更致密, 形状更规则。

2.2 软琼脂克隆形成实验检测不同细胞密度下 ES-2 肿瘤干细胞球成瘤能力

$5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组和 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 组中诱导形成的癌干细胞球均能传代, 传代 5 次后, 将两组细胞分别等量接种于软琼脂上, 观察克隆形成的时间。 14 d 后 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组已经形成大量肉眼可见的克隆, $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 组仅可隐约看到零星克隆, 说明 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组密度下诱导的干细胞球具有更强的增殖能力和致瘤性, 见图 2。

2.3 流式细胞术检测 ES-2 在不同细胞密度下诱导可后 CD44 和 CD133 的表达

流式细胞术分析发现, 诱导后的 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组和 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 组都可检测到 CD44^+ 、 CD133^+ 表达的细胞, 且阳性表达率均显著高于正常贴壁细胞

和本组诱导前的细胞 ($P < 0.05$), $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组中细胞与 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 组相比, CD133^+ 和 CD44^+ 细胞阳性表达率更高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 不同细胞密度下 A2780 形成癌干细胞能力的比较

A2780 细胞分别以 1×10^4 、 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 和 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 接种于 SFM 中, 1 d 后可见细胞中大多数细胞呈悬浮状生长, 少数细胞贴壁, 细胞形态变圆; 5 d 后, 1×10^4 、 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组中有部分细胞慢慢皱缩, 少部分细胞形成有透光性的细胞团, $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组中细胞慢慢开始贴壁, 虽有少量变圆, 但是圆形细胞紧贴贴壁细胞生长(图未示); 10 d 后, 1×10^4 、 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组中形成紧密的有透光性的细胞团, 但 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组中形成的细胞团更大,

透光性更强,细胞更致密, $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组细胞呈梭形,没有形成成团的细胞球。见图 1B。

2.5 流式细胞术检测 A2780 细胞不同细胞密度细诱导前后 CD44 和 CD133 的表达

流式细胞术检测发现,诱导后 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组和 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组都可检测到 CD44^+ 、 CD133^+ 表达的细胞,且阳性表达率均显著高于正常贴壁细胞,

$3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组与 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组相比, CD133^+ 细胞阳性表达率更高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 A2780 细胞中,不同细胞密度对 CD44^+ 细胞的阳性表达率没有显著影响 ($P > 0.05$)。见图 4。

2.6 不同细胞密度诱导后 A2780 癌干细胞球生长速率的比较

细胞计数结果显示, $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组、 $3 \times$

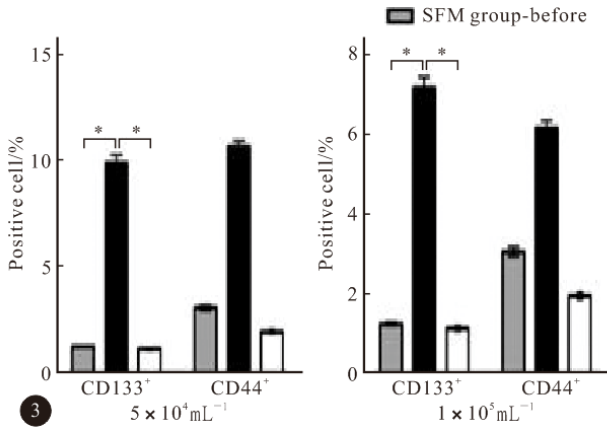


图 3 ES-2 细胞 CD133 和 CD44 在 SFM 组分化前后和 SSM 组的表达情况

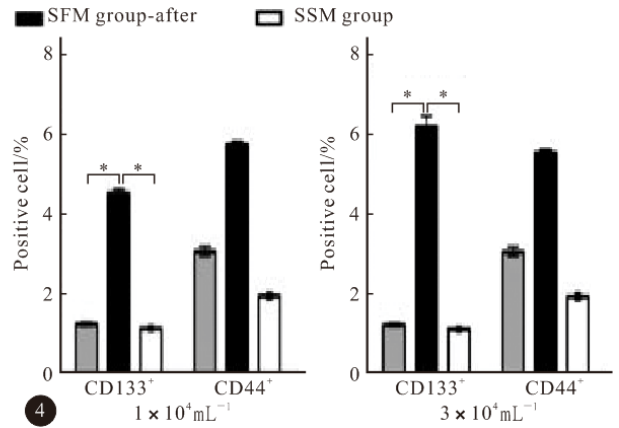


图 4 A2780 细胞 CD133 和 CD44 在 SFM 组分化前后和 SSM 组的表达情况

Fig 3 The expression levels of CD133 and CD44 in ES-2 cells cultured in SFM and SSM before and after cell induction

Fig 4 The expression levels of CD133 and CD44 in A2780 cells cultured in SFM and SSM before and after cell induction

* $P < 0.05$

10^4 mL^{-1} 组的 A2780 细胞生长速度快于未诱导的细胞, $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 组的 A2780 细胞生长速度慢于未诱导的细胞,该密度下 A2780 细胞不能形成癌干细胞。见图 5。

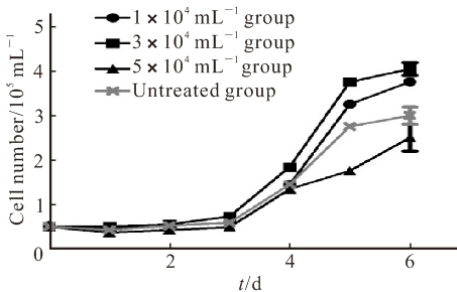


图 5 A2780 细胞不同密度下的干细胞球生长曲线

Fig 5 Growth curves of A2780 under different density after cell induction

3 讨论

目前体外分选和富集肿瘤干细胞的方法主要有以下方式:①表面标记分子筛选法,肿瘤干细胞有阳性表面抗原,通过流式或免疫磁珠分选^[6];②功能分选,肿瘤干细胞高表达耐药蛋白而将核染料 Hoechst33342 排除出细胞外,可用流式筛选^[6-7];

③药物分选,肿瘤干细胞药物耐受,可利用药物压力筛选出^[5];④在加了生长因子的无血清培养基中培养形成细胞球^[6,8]。第 1 种方法最大的技术瓶颈在于卵巢癌缺乏特异性的细胞标记物。第 2 种方法和第 3 种方法最大的技术瓶颈是 Hoechst33342 染料以及一些药物对细胞具有一定的毒性,后续实验困难。更重要的是肿瘤干细胞在肿瘤组织中稀少,根据估算,大鼠 C6 胶质瘤细胞系中侧群细胞仅占细胞总数的 0.4%^[6],上述方法应用前景不是非常广阔,最终我们选择在加了生长因子的无血清培养基中诱导肿瘤干细胞球的方法。

目前对卵巢透明细胞癌干细胞的研究文献相对较少,我们尚未找到从 ES-2 细胞中诱导肿瘤干细胞球的文献。KRYCZEK 和 WANG 等^[9-10]综述了各种肿瘤干细胞表达的不同抗原标记,认为 CD44 和 CD133 是卵巢癌细胞较特异性的表面抗原。因此我们选择了 CD44 和 CD133 为 Marker 进行鉴定。结果发现与贴壁细胞和 SFM 中未分化的细胞(诱导前的细胞)相比,ES-2 肿瘤干细胞球 CD44 和 CD133 的阳性率更高。为了检测不同密度下培养得到的细胞球可否传代增殖,是否有成瘤性,是否具

有肿瘤干细胞特性,在传代5次后,我们利用软琼脂克隆形成实验检测不同密度下诱导得到的细胞形成克隆数目。发现在 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 密度下诱导的ES-2细胞具有更强的成瘤能力。为了确认细胞密度对肿瘤细胞球诱导的影响,我们又在A2780细胞系中进行验证。但因A2780经诱导后形成的癌干细胞生长速度快,普通A2780细胞生长速度慢,经过2代后已经形成代差,同时获得传代5次的A2780和A2780癌干细胞很困难,因此用了测定生长曲线的方法替代软琼脂克隆形成实验。实验结果显示,诱导后A2780形成的癌干细胞生长速度远高于诱导前。

目前对卵巢癌干细胞形成的机制尚不明确。卵巢癌干细胞与卵巢癌的形成、发展、复发、转移和耐药等密切相关,它们之间的具体作用机制,如何高效地从卵巢癌中分离和纯化卵巢癌干细胞仍须进一步改进和完善。我们在实际操作中发现能影响诱导的因素还有很多,未来会继续摸索和优化其他影响卵巢癌肿瘤干细胞形成的条件,以期成功获得卵巢透明细胞癌干细胞做好基础工作,利于将来更好的完成后续靶向研究和治疗探索。

参 考 文 献

- [1] BLAGDEN SP. Harnessing pandemonium: the clinical implications of tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Front Oncol*, 2015, 5:149 [2016-07-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC26175968>. doi: 10.3389/fonc.2015.00149.
- [2] DZOBO K, SENTHEBANE DA, ROWE A, *et al.* Cancer stem cell hypothesis for therapeutic innovation in clinical oncology? Taking the root out. Not chopping the leaf. *OMICS*, 2016, 20(12):681-691.
- [3] GURUNATHAN S, CHOI YJ, PARK JH, *et al.* Differential cytotoxic potential of silver nanoparticles in

human ovarian cancer cells and ovarian cancer stem cells. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12):2077 [2017-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187877>. doi: 10.3390/ijms17122077.

- [4] IQBAL W, ALKARIM S, ALHEJIN A, *et al.* Targeting signal transduction pathways of cancer stem cells for therapeutic opportunities of metastasis. *Oncotarget*, 2016, 7:76337-76353 [2017-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5342819>. doi: 10.18632/oncotarget.10942.
- [5] VIDAL SJ, RODRIGUEZ-BRAVO V, GALSKEY M, *et al.* Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene*, 2014, 33:4451-4463 [2017-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24096485>. doi: 10.1038/onc.2013.411.
- [6] SHAH MM, LANDEN CN. Ovarian cancer stem cells: are they real and why are they important? *Gynecol Oncol*, 2014, 132:483-489 [2017-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4316675>. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.12.001.
- [7] VISVADER JE. Cells of origin in cancer. *Nature*, 2011, 469(7330):314-322.
- [8] KRESO A, DICK JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 2014, 14:275-291 [2017-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24607403>. doi: 10.1016/j.stem.2014.02.006.
- [9] KRYCZEK I, LIU SL, ROH M, *et al.* Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *Int J Cancer*, 2012, 130:29-39 [2017-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3164893>. doi: 10.1002/ijc.25967.
- [10] WANG YC, YO YT, LEE HY, *et al.* ALDH1-bright epithelial ovarian cancer cells are associated with CD44, drug resistance, and poor clinical outcome. *Am J Pathol*, 2012, 180(3):1159-1169.

(2017-03-17 收稿, 2017-07-12 修回)

编辑 吕 熙