

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.003

## TGF- $\beta$ 1 对肺癌干细胞和非干细胞增殖的影响

高全立<sup>1a</sup>, 汪萍<sup>1b,2a</sup>, Gunnar Kvalheim<sup>2a</sup>, Gustav Gaudernack<sup>2b</sup>(1. 河南省肿瘤医院 a. 生物治疗科; b. 血液科, 河南郑州 450008; 2. 奥斯陆大学国立肿瘤医院 a. 细胞治疗科; b. 免疫科, 挪威 奥斯陆 N-0310)

**[摘要]** 目的: 研究 TGF- $\beta$ 1 对肺癌干细胞和非干细胞增殖的影响, 为深入研究肺癌干细胞增殖与分化的分子调控机制奠定基础。方法: 利用无血清培养基从人大细胞肺癌组织中分离、培养肿瘤细胞, 并建立大细胞肺癌细胞系。以流式细胞术分选表达 CD44 和(或)CD90 的肺癌细胞亚群, 通过细胞球形成实验及 X 射线敏感实验鉴定分选的肺癌干细胞。用流式细胞术及细胞增殖抑制实验检测 TGF- $\beta$ 1 对肺癌干细胞生长的影响。结果: 成功地培养出高纯度的原代大细胞肺癌细胞, 其传代次数可达 30 代以上。应用 CD44 和 CD90 共同标记, 可将大细胞肺癌细胞分为 4 亚群, 分别是 CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>CD90<sup>-</sup>、CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup> 和 CD44<sup>++</sup>CD90<sup>-</sup> 细胞, 其中 CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup> 细胞比例为 0.4%。相比于其他细胞亚群, 有较多的 CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup> 细胞为间质细胞样形态, 它们形成细胞球的能力最强, 对 X 射线照射的抵抗力也最强。TGF- $\beta$ 1 能抑制肺癌细胞的增殖, 并促使它们向间质细胞样形态转化。TGF- $\beta$ 1 可抑制各亚群肺癌细胞的增殖, 但对 CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup> 细胞的抑制能力最弱, 而对 CD44<sup>+</sup>CD90<sup>-</sup> 细胞的抑制能力最强; 培养体系中加入 TGF- $\beta$ 1 后 CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup> 细胞的比例逐步升高, 去除 TGF- $\beta$ 1 后 CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup> 细胞的比例又逐渐降低。结论: CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup> 细胞可能是大细胞肺癌的干细胞, TGF- $\beta$ 1 能显著抑制肺癌非干细胞的增殖, 从而相应地富集了肺癌干细胞。

**[关键词]** 大细胞肺癌; 肿瘤干细胞; TGF- $\beta$ 1; CD44; CD90

**[中图分类号]** R734.2; Q279

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2010)04-0374-07

## Effects of TGF- $\beta$ 1 on proliferation of cancer stem cells and non-cancer stem cells of lung cancer

GAO Quan-li<sup>1a</sup>, WANG Ping<sup>1b,2b</sup>, Gunnar Kvalheim<sup>2a</sup>, Gustav Gaudernack<sup>2b</sup>(1. a. Department of Biotherapy; b. Department of Hematology, Provincial Tumor Hospital of Henan, Zhengzhou 450008, Henan, China; 2. a. Department of Cell Therapy; b. Department of Immunology, Norwegian Radium Hospital, University of Oslo, Oslo 0310, Norway)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of TGF- $\beta$ 1 on the growth of cancer stem cells and non-lung cancer stem cells of lung cancer, so as to lay a foundation for studying the molecular regulatory mechanism for proliferation and differentiation of lung cancer stem cells. **Methods:** Cancer cells were isolated and cultured from human large cell lung cancer specimens using a serum-free medium to establish large cell lung cancer cell line. Biologic characters of lung cancer stem cells were studied by cell sphere formation test and X-ray radiotherapy sensitive assay. The effects of TGF- $\beta$ 1 on the growth of cancer stem cells and non-cancer stem cells of lung cancer were analyzed by flow cytometry and cell growth inhibition test. **Results:** A large cell lung cancer cell line was established by primary culturing lung cancer tissues. TGF- $\beta$ 1 could inhibit lung cancer cell proliferation and induce them to the shape of mesenchymal cells. When CD44 and CD90 antibodies were co-stained and analyzed by flow cytometry, the lung cancer cells could be divided into 4 populations, i. e. CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>CD90<sup>-</sup>, CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup> and CD44<sup>++</sup>CD90<sup>-</sup> cells. CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup> cells had the smallest population in the cell line, accounting for 0.4%; they had the strongest cell sphere formation ability and the strongest resistant ability to X-ray radiation among all the 4 populations. TGF- $\beta$ 1 had the weakest suppression effect against CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup> cells and the strongest suppression effect against CD44<sup>+</sup>CD90<sup>-</sup> cells. TGF- $\beta$ 1 could gradually increase the ratio of CD44<sup>++</sup>CD90<sup>+</sup>

**[基金项目]** 河南省重点科技攻关资助项目(No. 0623033100); 河南省卫生厅重点资助项目(No. 200802015)。Project supported by the Key Science and Technology Foundation of Henan Province (No. 0623033100), and the Key Science Foundation of Health Bureau of Henan Province (No. 200802015)

**[作者简介]** 高全立(1969-), 男, 河南省郑州市人, 博士, 主要从事肿瘤干细胞及肿瘤免疫治疗方面的研究。E-mail: quanligao@yahoo.com

**[通信作者]** 高全立(GAO Quan-li, corresponding author), E-mail: quanligao@yahoo.com

cells when added to the culture medium. After depletion of TGF- $\beta$ 1 from the medium, the ratio of CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> cells gradually decreased again. **Conclusion:** CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> cells may be the stem cells of large cell lung cancer, and TGF- $\beta$ 1 can enrich lung cancer stem cells *in vitro* by inhibiting the non-stem cells of lung cancer.

[ **Key words** ] large cell lung cancer; cancer stem cell; TGF- $\beta$ 1; CD44; CD90

[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 374-380 ]

转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor -  $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 能诱导肿瘤细胞产生上皮间充质转变 (epithelial transformed to mesenchymal, EMT)<sup>[1]</sup>, 促进肿瘤细胞的恶性程度增加<sup>[2]</sup>, 促进肿瘤的转移<sup>[3]</sup>, 诱导肿瘤细胞对化疗药物耐药<sup>[4]</sup>; 但 TGF- $\beta$ 1 同时又能抑制肿瘤细胞的生长<sup>[5]</sup>。这是一对矛盾的现象, 目前仍得不到合理的解释<sup>[6]</sup>。近年研究<sup>[7-9]</sup>证实, 肿瘤干细胞是肿瘤转移和复发的根源, 它们对传统的治疗方法如放疗和化疗不敏感, 放疗后的肿瘤组织中肿瘤干细胞的比例明显升高。TGF- $\beta$ 1 能促进脑胶质瘤干细胞的自我复制, 抑制它们的分化<sup>[10]</sup>。肺癌组织中存在有肿瘤干细胞<sup>[11]</sup>, 推测 TGF- $\beta$ 1 可能也具有抑制肺癌干细胞分化的作用。为了验证该假设, 本实验应用无血清培养基从一新鲜切除的大细胞肺癌组织中培养了原代肺癌细胞, 并成功传代建立了细胞系; 应用流式细胞分选技术, 鉴定出 CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> 细胞可能为大细胞肺癌的干细胞样细胞<sup>[11]</sup>; 在此基础上, 进一步观察 TGF- $\beta$ 1 对肺癌干细胞和非干细胞的生长的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

Defined K-SFM 无血清培养基、RPMI 1640、PBS、II 型胶原酶、细胞消化酶 TrypLE<sup>EM</sup> 等均购自 Invitrogen 公司, 表皮细胞生长因子 (epithelial cell growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 及转化生长因子 TGF- $\beta$ 1 购自 Peprotech 公司, CD44-FITC、CD90-APC 及相应的同型对照抗体购自 BD 公司。MTS 细胞增殖检测试剂盒购自 Promega 公司。超低黏附 96 孔培养板、普通培养瓶及培养板均购自 Corning 公司。FACS Aria II 流式细胞仪 购自美国 BD 公司。

### 1.2 大细胞肺癌原代细胞的培养及建系

新鲜手术切除的大细胞肺癌组织置于 6 孔板中, 用含青霉素及链霉素的 RPMI 1640 反复冲洗并剔除坏死组织, 用无菌剪刀将其反复剪切成约 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块。收集剪切后的肿瘤组织小块置于面积为 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中, 用含有 II 型胶原酶 400 U/ml 的 Defined K-SFM 无血清培养基在 5%

CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 消化 2 h。倒置显微镜下观察大部分细胞为单个细胞时, 用 RPMI 1640 洗涤和离心 3 次, 彻底去除胶原酶。收集消化后的肺癌细胞, 用含 EGF 20 ng/ml、bFGF 10 ng/ml 的 Defined K-SFM 培养基悬浮细胞并转移到 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中, 在含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中 37 °C 培养, 每 3 d 换新鲜培养基 1 次。当细胞生长到 80% 融合时, 用 TrypLE<sup>EM</sup> 消化后传代。培养的前 3 代细胞在传代时每次都保留部分细胞冻存于液氮中。

### 1.3 流式细胞术分析及分选肿瘤干细胞样细胞

75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中呈对数生长的肺癌细胞, 用 PBS 冲洗 2 次后, 加 2 ml 的 TrypLE<sup>EM</sup> 室温消化 6 min。收集消化后的单个细胞, PBS 洗涤 2 次, 调细胞密度至 1 × 10<sup>7</sup>/ml, 分别加入 CD44-FITC 及 CD90-APC 抗体孵育 20 min, 最后用 RPMI 1640 洗涤 2 次。用 1 ml 的 RPMI 1640 悬浮细胞, 过 40  $\mu$ m 的无菌筛网, 加 PI 至终质量浓度为 1  $\mu$ g/ml, 放置冰上待分析分选。在同样的条件下标记同型对照抗体细胞。标记完的细胞样品上流式仪后, 收集 3 万 ~ 5 万个细胞, 应用 BD FACSDiva 软件分析。首先根据细胞的前向角和侧向角, 圈门有活性且为单个细胞的细胞群, 再进一步圈出 PI-细胞群; 然后对比同型对照抗体组的细胞, 依据不同抗体的荧光标记特性, 圈门所要分析的细胞; 最后将所选细胞分选到分选管中。

### 1.4 细胞球形成实验

将用流式细胞仪分选的各亚群细胞培养于超低黏附的 96 孔培养板中, 每孔 1 000 个细胞, 每种细胞设 5 个复孔, 用 200  $\mu$ l/孔的 Defined K-SFM 培养基培养。每隔 2 d 换液 1 次, 换液时小心吸取每孔中上层培养液 60  $\mu$ l, 然后再补加 60  $\mu$ l 新鲜培养液。定期用倒置显微镜观察各个孔中形成细胞球的情况并照相。大于 50 个细胞的细胞团计数为一个细胞球。培养至第 20 天时每孔中加 20  $\mu$ l MTS, 在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 培养 3 h 后, 应用酶标仪在 490 nm 波长下检测各孔的光密度值 (D 值)。

### 1.5 细胞的 X 射线照射敏感性实验

将流式术分选的各亚群细胞培养于 96 孔培养板中, 每孔 500 个细胞, 每种细胞设 10 个复孔。用 200  $\mu$ l/孔的 Defined K-SFM 培养基培养。24 h 培养

后,分别给予1、2和4 Gy剂量的X射线照射。照射后继续培养,每2 d换液1次。培养至第6天时每孔加20 μl MTS,在5% CO<sub>2</sub>培养箱中37℃培养3 h,应用酶标仪在490 nm波长下检测各孔的D值。X线对细胞抑制率的计算公式为:抑制率(%) = (1 - 实验孔D值/对照孔D值) × 100%。

1.6 TGF-β1对肺癌细胞增殖的抑制实验

将流式术分选的各亚群细胞培养于96孔培养板中,每种细胞分为两组,分别用两种培养基培养:一种为含3 ng/ml TGF-β1的Defined K-SFM培养基(实验组),另一种培养基不含TGF-β1(对照组)。每孔500个细胞,用200 μl培养基培养,每种细胞设10个复孔。每2 d换液1次。第6天时每孔加20 μl MTS,在5% CO<sub>2</sub>培养箱中37℃培养3 h,用酶标仪在490 nm波长下检测各孔的D值。TGF-β1对细胞抑制率的计算公式:抑制率(%) = (1 - 试验孔D值/对照孔D值) × 100%。

1.7 流式细胞仪分析TGF-β1对肺癌细胞的作用

将含有EGF 20 ng/ml、bFGF 10 ng/ml的Defined K-SFM培养基中加入3 ng/ml的TGF-β1,持续培养建立的肺癌细胞系。显微镜下观察细胞形态的变化,定期用流式细胞仪分析肺癌细胞CD44及CD90表达的变化。

1.8 统计学处理

应用SPSS10.0软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验,P < 0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大细胞肺癌的原代培养和传代建系

将来源于1例大细胞肺癌的肿瘤组织经II型胶原酶消化成单个细胞后,在含有EGF和bFGF的Defined K-SFM培养基中培养。培养至第5天,培养瓶中开始出现典型贴壁生长的上皮细胞。该培养体系选择性生长的上皮细胞纯度极高,看不到成纤维细胞的生长(图1A)。当细胞生长的密度达到80%融合时,经特殊的胰酶消化后细胞可成功传代并建立细胞系,将其命名为LC006。该细胞系细胞的生长速度较快,在1:8比例传代的情况下,每3 d即可传代1次。到目前为止,该细胞系已稳定传代到30代以上,且细胞的形态仍为典型的上皮细胞形态(图1C)。为了较好地反映原位肺癌细胞的生物学特性,后续实验中所选用的细胞均为细胞系中第2代或第3代的细胞。

2.2 TGF-β1促使肺癌细胞向间质细胞样形态变化

将LC006细胞传代后分为两种培养体系培养:

一种培养体系仍为原培养基,即K-SFM + EGF 20 ng/ml + bFGF 10 ng/ml;另一种培养体系为在原培养基的基础上加入3 ng/ml的TGF-β1。结果显示,用含有TGF-β1培养基培养的肺癌细胞生长速度明显变慢,在1:5比例传代的情况下,开始时需要8 d才能传代1次,同时部分细胞形态发生改变,有较多的细胞出现了成纤维细胞样的形态(图1B为加入TGF-β1培养12 d后肺癌细胞传至第3代时的细胞形态)。随着应用TGF-β1培养时间的延长,成纤维细胞样细胞逐渐增多,且肺癌细胞的体积变小,而细胞增殖速度亦有所恢复,在1:5比例传代的情况下,只需4 d即可传代1次(图1D为加入TGF-β1培养39 d后肺癌细胞传至第10代时的细胞形态)。

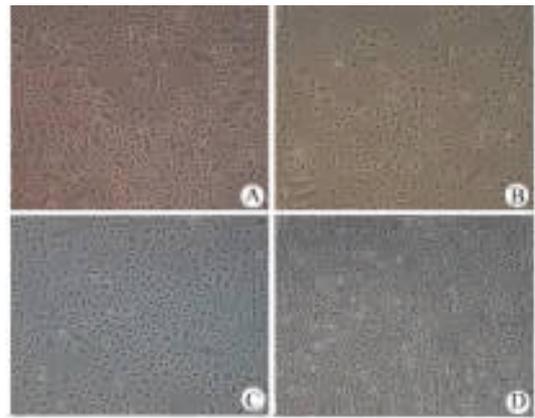


图1 Defined K-SFM培养基培养的肺癌细胞及TGF-β1对细胞生长的影响(×200)

Fig.1 Lung cancer cells cultured by Defined K-SFM medium and effect of TGF-β1 on cell growth(×200)

A: Primary cells of LC006 cultured by Defined K-SFM medium; B: Third generation cells of LC006 after 12 d culturing with TGF-β1; C: Thirtieth generation cells of LC006 cultured by Defined K-SFM medium; D: Tenth generation cells of LC006 after 39 d culturing with TGF-β1

2.3 CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>的肺癌细胞具有间质细胞的特点

用CD44-FITC和CD90-APC共同标记的肿瘤细胞进行流式细胞学分析,结果发现,肿瘤细胞可被分为4群,分别为CD44<sup>+</sup>CD90<sup>-</sup>(图2B的P5门,86.3%)、CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>(图2B的P3门,12.8%)、CD44<sup>+</sup>CD90<sup>-</sup>(图2B的P4门,0.6%)和CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>(图2B的P2门,0.4%)。应用流式细胞仪分选这4个亚群细胞,然后用Defined K-SFM培养基继续培养,结果发现,不同亚群的细胞培养时形态有较大区别:很多CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>细胞呈成纤维细胞样形态生长(图3A),CD44<sup>+</sup>CD90<sup>-</sup>细胞也有少

部分细胞呈成纤维细胞样形态(图 3B),而  $CD44^+ CD90^+$ (图 3C)和  $CD44^+ CD90^-$ (图 3D)细胞呈典型的上皮样细胞形态生长。最近研究<sup>[12]</sup>证实,肿瘤干细胞具有间质细胞的特性,肿瘤干细胞易发生 EMT。这些结果提示肺癌干细胞可能主要富集在  $CD44^+ CD90^+$  细胞群中。

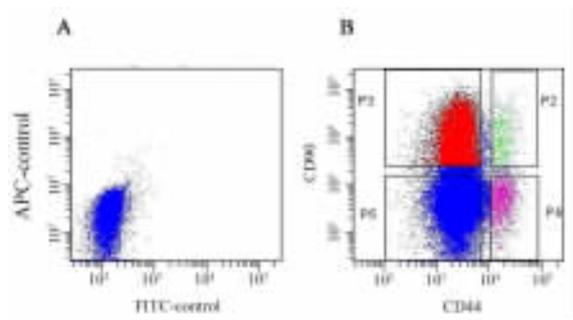


图 2 流式细胞术分析 LC006 细胞

Fig. 2 Flow cytometry analysis of LC006 cells

A: Isotype control; B: Co-stained with CD44-FITC and CD90-APC

#### 2.4 $CD44^+ CD90^+$ 肺癌细胞具有很强的细胞球形成能力和放射线抵抗能力

在超低黏附的培养板中能形成细胞球是肿瘤干细胞的重要特性之一。为了检测  $CD44^+ CD90^+$  肺癌细胞是否富集了最多的肺癌干细胞,特比较了  $CD44^+ CD90^+$ 、 $CD44^+ CD90^-$ 、 $CD44^- CD90^+$  及  $CD44^- CD90^-$  细胞的细胞球形成能力。结果显示,每孔中接种 1 000 个分选后的细胞,经过

20 d 的培养, $CD44^+ CD90^+$  和  $CD44^+ CD90^-$  细胞不能形成任何细胞球, $CD44^+ CD90^-$  细胞可形成少量的细胞球,而  $CD44^+ CD90^+$  细胞形成大量的细胞球(图 4A)。加入 MTS 后用酶标仪检测各组细胞的光密度值, $CD44^+ CD90^+$  细胞孔的光密度值远大于其他细胞孔的光密度值(图 4B)。这些结果提示, $CD44^+ CD90^+$  细胞可能富集了最多的肿瘤干细胞, $CD44^+ CD90^-$  细胞中可能也含有少量的肿瘤干细胞,而  $CD44^+ CD90^+$  和  $CD44^+ CD90^-$  细胞中没有肿瘤干细胞。

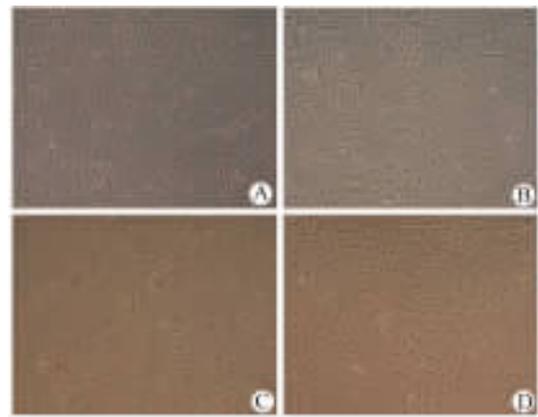


图 3 不同亚群的肺癌细胞培养 48 h 后的形态(×200)

Fig. 3 Shapes of different subsets of lung cancer cells sorted by flow cytometry after 48 h culturing(×200)

A:  $CD44^+ CD90^+$  cells; B:  $CD44^+ CD90^-$  cells;

C:  $CD44^- CD90^+$  cells; D:  $CD44^- CD90^-$  cells

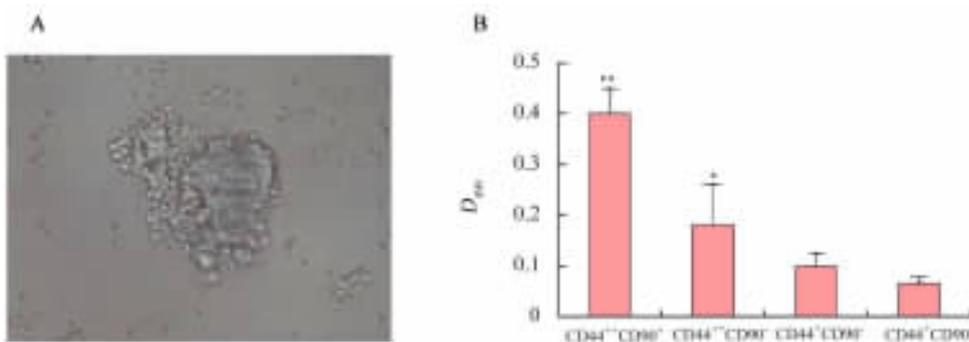


图 4  $CD44^+ CD90^+$  肺癌细胞形成的细胞球(A, ×400)及 LC006 各细胞亚群形成细胞球的光密度值(B)

Fig. 4 Cell spheres formed by  $CD44^+ CD90^+$  cells (A, ×400) and absorbance of each subsets of LC006 cells(B)

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$  vs  $CD44^+ CD90^+$  or  $CD44^+ CD90^-$

LC006 细胞的 4 个亚群细胞群对 X 射线的照射敏感性检测结果与细胞球形成相实验一致, $CD44^+ CD90^+$  细胞抵抗放射治疗的能力最强, $CD44^+ CD90^-$

$CD90^-$  细胞次之, $CD44^+ CD90^+$  和  $CD44^+ CD90^-$  细胞对放射线照射最为敏感(图 5)。

#### 2.5 TGF-β1 对 $CD44^+ CD90^+$ LC006 细胞增殖的

抑制最弱

检测了 TGF-β1 对不同亚群肺癌细胞增殖的影响,结果显示,TGF-β1 对 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞的抑制率为( 71. 02 ± 8. 1 )%,对 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的抑制率为( 57. 36 ± 3. 3 )%,对 CD44<sup>++</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞的抑制率为( 57. 88 ± 3. 7 )%,对 CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的抑制率为( 52. 46 ± 4. 6 )%。在分选的 4 个细胞亚群中,TGF-β1 对 CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的抑制作用最弱( 与占主群的 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞相比 P < 0. 05 ),而对 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞的抑制作用最强。

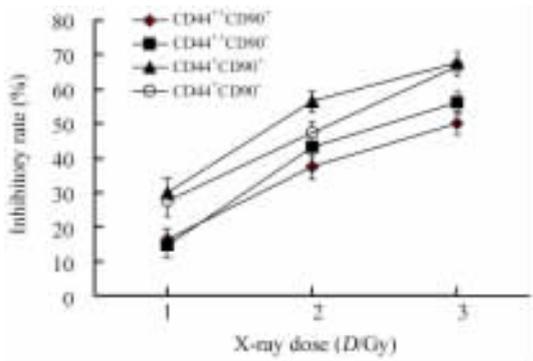


图 5 LC006 各亚群细胞对放射线照射的敏感性  
Fig. 5 X-ray radiation sensitivities of different subsets of LC006 cells

### 2.6 TGF-β1 具有选择性富集 CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 肺癌细胞的作用

应用流式细胞仪分析了不同时间 TGF-β1 作用下肺癌细胞的表型变化,结果显示,随着 TGF-β1 作用时间的延长,CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞在细胞系中所占的比例逐渐增高。如图 6 所示,A 为加入 TGF-β1 前肺癌细胞的流式细胞分析结果,CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的比例为 0. 4%; B 为经 TGF-β1 作用 13 d 后,CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的比例为 9. 5%; C 为经 TGF-β1 作用 20 d,CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的比例增至 45. 5%; D 为经 TGF-β1 作用 39 天,CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的比例增至 82. 6%。

### 2.7 撤除 TGF-β1 后肺癌 LC006 各亚群细胞可部分恢复原来的性状

当 TGF-β1 作用 39 d 时,CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的比例增加到了 82. 6% ( 图 6D ),相当比例的细胞表现为成纤维细胞形态( 图 1D )。而当把 TGF-β1 从培养体系撤出后继续培养 15 d,CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的比例降低到了 13. 5%,CD44<sup>++</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞的比例则增加到了 56. 3%,CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> 和 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞比例也有所恢复,但数量较少。与之相

对应,成纤维细胞样细胞所占的比例明显减少。

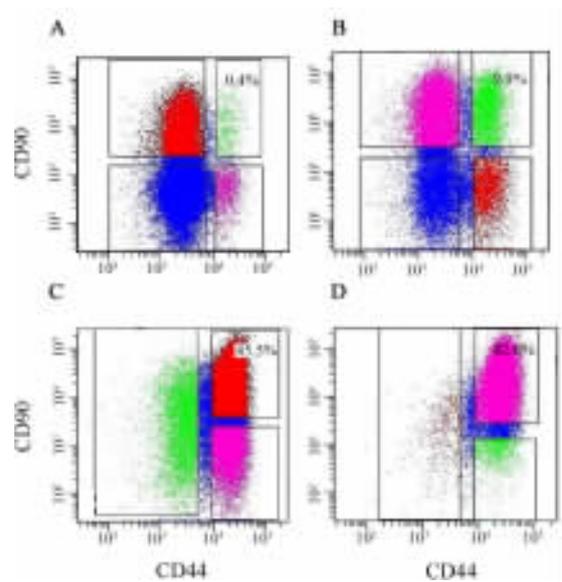


图 6 TGF-β1 选择性富集 CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> LC006 肺癌细胞  
Fig. 6 TGF-β1 selectively enriched CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> LC006 lung cancer cells

A: Rate of CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> cells was 0.4% before adding TGF-β1; B: Rate of CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> cells increased to 9.5% after adding TGF-β1 13 d; C: Rate of CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> cells increased to 45.5% after adding TGF-β1 20 d; D: Rate of CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> cells increased to 82.6% after adding TGF-β1 39 d

## 3 讨论

本研究应用一种特殊的无血清培养基,成功地从一例大细胞肺癌组织中培养出了纯度很高的原代肺癌细胞,且培养的细胞很容易传代扩增到 30 代以上。该细胞系的建立为我们后续的肿瘤干细胞研究工作打下了良好的基础。

肿瘤干细胞和正常干细胞往往具有相同的干细胞标记<sup>[12-14]</sup>。CD44 是间充质干细胞的标记<sup>[16]</sup>,也是多种肿瘤干细胞如头颈部鳞癌<sup>[17]</sup>、乳腺癌<sup>[18]</sup>、前列腺癌和胰腺癌<sup>[19-20]</sup>的干细胞标记,但 CD44 是否是肺癌干细胞的标记尚无文献报道。CD90 是间充质干细胞的表面标记<sup>[21]</sup>,也是肝癌干细胞的表面标记<sup>[22]</sup>,CD90 是否是肺癌干细胞的标记亦无文献报道。本研究发现,当用 CD44 和 CD90 共同标记大细胞肺癌细胞时,有 0.4% 的细胞表达标记为 CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup>。肿瘤干细胞的一个重要特点是它们具有形成细胞球的能力<sup>[23]</sup>。为了验证肺癌干细胞是否富集在 CD44<sup>++</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞中,重点比较了各亚群细

胞的细胞球形成能力。在细胞球形成试验中, CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞形成细胞球的能力远强于 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞, 而 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 和 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞均不能形成细胞球, 这些结果提示肺癌干细胞主要在 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞群中。肿瘤干细胞对传统的治疗方法如化疗和放疗具有抵抗性, 这也是肿瘤治疗失败的主要原因<sup>[24]</sup>。本研究检测了大细胞肺癌细胞系中不同细胞亚群对放射线照射的敏感性, 结果与细胞球形成相试验一致, CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞抵抗放射线照射的能力最强, CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞次之, CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 和 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞对放射线照射最为敏感, 进一步证实 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞富集了最多的肺癌干细胞。

肿瘤干细胞的另一重要生物学特性是它们具有较多的间质细胞特性, 易出现 EMT, 这也是肿瘤干细胞产生侵袭和转移的生物学基础之一<sup>[12-14]</sup>。本研究发现, CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞中有较多细胞表现为成纤维细胞的形状, 说明这群细胞较其他细胞群有更多的间质细胞特性。研究中还发现, 在肺癌细胞培养体系中加入 TGF- $\beta$ 1 后, 肿瘤细胞的生长速度变慢, 而具有间质细胞形态的细胞比例逐渐增多, 提示加入 TGF- $\beta$ 1 后肺癌干细胞的比例增加, 原因可能为 TGF- $\beta$ 1 选择性地抑制非肿瘤干细胞生长的结果。TGF- $\beta$ 1 对 LC006 细胞不同亚群的抑制作用是不一样的, TGF- $\beta$ 1 对拥有 86.3% 比例的 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞抑制最强, 而对 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞抑制最弱。分析加入 TGF- $\beta$ 1 后不同时间肺癌细胞的表型变化, 与 TGF- $\beta$ 1 抑制实验结果相一致。随着 TGF- $\beta$ 1 作用时间的延长, CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞在细胞系中所占的比例逐渐增多, 作用到 39 d 时, CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的比例达到了 82.6%。将 TGF- $\beta$ 1 从培养基中撤除后继续培养 15 d, CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞的比例降由 82.6% 低到了 13.5%, 而其他亚群细胞的比例增高, 说明 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 细胞具有转化为 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> 和 CD44<sup>+</sup> CD90<sup>-</sup> 细胞群的能力, 这与肿瘤干细胞具有多向分化能力的特性相一致<sup>[25]</sup>。随着 TGF- $\beta$ 1 的撤除, 成纤维细胞样细胞所占的比例也逐渐减少。这些结果提示, TGF- $\beta$ 1 对肺癌细胞的生长具有调控作用, 因它们抑制了非肿瘤干细胞的生长, 从而相应地富集了肺癌干细胞。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Araki S, Eitel JA, Batuello CN, Bijangi-Vishehsaraei K, Xie XJ, Danielpour D, et al. TGF-beta1 induced expression of human

Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer [ J ]. J Clin Invest, 2010, 120( 1 ): 290-302.

- [ 2 ] Stuelten CH, Busch JI, Tang B, Flanders KC, Oshima A, Sutton E, et al. Transient tumor-fibroblast interactions increase tumor cell malignancy by a TGF-beta mediated mechanism in a mouse xenograft model of breast cancer [ J ]. PLoS One, 2010, 5( 3 ): e9832.
- [ 3 ] Nishioka R, Itoh S, Gui T, Gai Z, Oikawa K, Kawai M, et al. SNAIL induces epithelial to mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line ( BxPC3 ) and promotes distant metastasis and invasiveness *in vivo* [ J ]. Exp Mol Pathol, [ 2010-06-01 ] [ Epub ahead of print ]
- [ 4 ] Rho JK, Choi YJ, Lee JK, Ryoo BY, Na II, Yang SH, et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line [ J ]. Lung Cancer, 2009, 63( 2 ): 219-226.
- [ 5 ] Kang Y, Prentice MA, Mariano JM, Davarya S, Linnoila RI, Moody TW, et al. Transforming growth factor-beta 1 and its receptors in human lung cancer and mouse lung carcinogenesis [ J ]. Exp Lung Res, 2000, 26( 8 ): 685-707.
- [ 6 ] Bierie B, Moses HL. Gain or loss of TGF-beta signaling in mammary carcinoma cells can promote metastasis [ J ]. Cell Cycle, 2009, 8( 20 ): 3319-3327.
- [ 7 ] Huang D, Gao Q, Guo L, Zhang C, Zhang C, Jiang J, et al. Isolation and identification of cancer stem-like cells in esophageal carcinoma cell lines [ J ]. Stem Cells Dev, 2009, 18( 3 ): 465-473.
- [ 8 ] Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept [ J ]. J Clin Invest, 2010, 120( 1 ): 41-50.
- [ 9 ] Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133<sup>+</sup> cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106( 38 ): 16281-16286.
- [ 10 ] Peñuelas S, Anido J, Prieto-Sánchez RM, Folch G, Barba I, Cuartas I, et al. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma [ J ]. Cancer Cell, 2009, 15( 4 ): 315-327.
- [ 11 ] 高全立, 汪 萍, Kvalheim G, Gaudernack G. 大细胞肺癌干细胞样细胞的分离及鉴定 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17( 3 ): 225-230.
- [ 12 ] Monteiro J, Fodde R. Cancer stemness and metastasis: Therapeutic consequences and perspectives [ J ]. Eur J Cancer, 2010, 46( 7 ): 1198-1203.
- [ 13 ] 苏 进, 许新华. 肿瘤干细胞生物学特性及相关研究进展 [ J ]. 肿瘤防治研究, 2010, 37( 4 ): 474-476.
- [ 14 ] 胡 祥, 程 勇. 肿瘤干细胞与肿瘤器官 [ J ]. 肿瘤防治研究, 2009, 36( 4 ): 346-350.
- [ 15 ] Ruiz-Vela A, Aguilar-Gallardo C, Simón C. Building a framework for embryonic microenvironments and cancer stem cells [ J ]. Stem Cell Rev, 2009, 5( 4 ): 319-327.
- [ 16 ] Valtieri M, Sorrentino A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis [ J ]. J Cell Physiol, 2008, 217( 2 ): 296-

- 300.
- [ 17 ] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104( 3 ): 973-978.
- [ 18 ] Reim F, Dombrowski Y, Ritter C, Buttman M, Häusler S, Ossadnik M, et al. Immunoselection of breast and ovarian cancer cells with trastuzumab and natural killer cells: Selective escape of CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>/HER2<sup>low</sup> breast cancer stem cells [ J ]. Cancer Res, 2009, 69( 20 ): 8058-8066.
- [ 19 ] Marhaba R, Klingbeil P, Nuebel T, Nazarenko I, Buechler MW, Zoeller M. CD44 and EpCAM: Cancer-initiating cell markers [ J ]. Curr Mol Med, 2008, 8( 8 ): 784-804.
- [ 20 ] Li C, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells [ J ]. Methods Mol Biol, 2009, 568( 1 ): 161-173.
- [ 21 ] Pasquinelli G, Pacilli A, Alviano F, Foroni L, Ricci F, Valente S, et al. Multidistrict human mesenchymal vascular cells: Pluripotency and stemness characteristics [ J ]. Cytotherapy, 2010, 12( 3 ): 275-287.
- [ 22 ] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, et al. Significance of CD90<sup>+</sup> cancer stem cells in human liver cancer [ J ]. Cancer Cell, 2008, 13( 2 ): 153-166.
- [ 23 ] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumor initiating cells [ J ]. Nature, 2004, 432( 7015 ): 396-401.
- [ 24 ] Baumann M, Krause M, Thames H, Trott K, Zips D. Cancer stem cells and radiotherapy [ J ]. Int J Radiat Biol, 2009, 85( 5 ): 391-402.
- [ 25 ] Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept [ J ]. J Clin Invest, 2010, 120( 1 ): 41-50.
- [ 收稿日期 ] 2010-05-26 [ 修回日期 ] 2010-06-25
- [ 本文编辑 ] 韩丹

## · 科技动态 ·

### 经典 DC 分泌 IL-10 减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤

Toll 样受体( Toll-like receptor, TLR )属于模式识别受体家族,可经细菌特定成分或其他特定分子激活,组成防御多种病原体的首道屏障,在天然免疫中发挥重要作用。TLRs 通过识别受损宿主细胞释放的危险信号相关模式分子,启动炎症级联反应,从而加重组织损伤。I/R 损伤是一个复杂的病理生理过程,血流的阻断及氧运输的减少导致炎症反应并最终引起器官损伤。肝脏 I/R 损伤后,释放出大量内源性危险信号,激活天然免疫系统,导致肝细胞大量死亡并最终引起肝功能衰竭。然而另一方面,TLRs 是否具有相反的调节作用减轻无菌炎症的程度尚不清楚。DC 作为天然免疫与适应性免疫的桥梁,发挥着重要的免疫调节作用,而且已证实,在小鼠肝移植模型中供者来源的肝脏 DC 可以诱导移植耐受。

美国纪念斯隆·凯特琳癌症中心的 Ronald P. DeMatteo 教授和他的研究小组发现,肝脏 I/R 后经典 DC( cDC )表达降低,而 TLR9 通过识别因 I/R 损伤导致大量死亡肝细胞释放的内源性 DNA,活化肝脏 cDC,进而分泌 IL-10,抑制因炎症招募而来的单核细胞的功能。这一工作表明了 cDC 在小鼠肝脏 I/R 中的保护作用。作者首先采用转基因 CD11c-DTR 小鼠,通过低剂量 DT 诱导 cDC 的暂时性缺失,流式检测到经低剂量 DT 诱导的小鼠肝脏 I/R 后,cDC 几乎完全缺失;进一步检测发现,肝脏谷丙转氨酶水平明显升高,病理切片见肝细胞死亡区域扩大,血清以及体外培养上清中的促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和趋化因子 MCP-1 表达显著升高,证实 cDC 在小鼠肝脏 I/R 中的保护作用。此外,在 cDC 缺失后,IL-10 分泌水平降低。作者接着用 TLR9 缺陷和 IL-10 缺陷小鼠及正常小鼠的 cDC 回输到 DT 处理的肝脏 I/R 小鼠中,检测谷丙转氨酶变化、促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和趋化因子 MCP-1 以及 IL-10 分泌的变化,证实 cDC 保护肝脏 I/R 损伤需要依赖于 TLR9 和 IL-10。用 I/R 后坏死肝细胞的上清作为体外条件培养基,并加入 DNase 和抑制性 CpG 序列等处理正常小鼠的 cDC 和 TLR9 缺陷的 cDC,证明肝脏 I/R 后,cDC 通过 TLR9 识别坏死肝细胞释放的内源性 DNA 诱导活化,进而分泌大量 IL-10。之后又通过对正常小鼠和 CCR2 缺陷小鼠的 I/R 实验,证明 I/R 后,炎症单核细胞依赖 CCR2 的参与介导从骨髓被大量招募于肝脏,加重了肝脏 I/R 损伤程度。最后对其他肝脏非实质细胞如中性粒细胞和 Kupffer 细胞中 IL-10 受体的检测,以及回输 IL-10 缺陷小鼠的 cDC 后检测 ROS 和 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的变化,发现 cDC 分泌的 IL-10 能够抑制炎症单核细胞的功能,进一步证明了 cDC 在肝脏 I/R 中的保护作用。

总之,该研究表明,小鼠肝脏 I/R 后,cDC 通过 TLR9 识别坏死的肝细胞释放的内源性 DNA 而活化,释放大量 IL-10,抑制通过 CCR2 介导招募而来的炎症单核细胞的功能,减轻 I/R 损伤。因此,对于危险信号相关模式分子,病原体相关模式分子以及免疫细胞表面的模式识别受体之间的复杂联系的研究,可为肝脏 I/R 损伤的防治提供新思路。

[ 洪善娟 摘译,王全兴 审阅. Bamboat ZM, Ocuin LM, Balachandran VP, et al. J Clin Invest, 2010, 120( 2 ): 559-569. ]