

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.16.009

非小细胞肺癌 CD166+ 干细胞的分离和鉴定*

张志斌 席云峰 霍龙伟 任贺庄 蒋占鑫 席俊峰[△]

(陕西省榆林市第一医院胸心外科 陕西 榆林 719000)

摘要 目的:分选人非小细胞肺癌中的 CD166+ 细胞,并验证其肿瘤干细胞的特性。**方法:**收集手术切除的 15 例非小细胞癌组织标本以及患者的临床资料,并通过流式细胞术对组织中 CD166+ 的表达水平进行检测,对 CD166+ 细胞进行原代培养,对比 CD166+ 细胞和 CD166- 细胞的成球能力和集落形成能力;并将 CD166+ 细胞和 CD166- 细胞注射到小鼠体内,比较其体内肿瘤形成能力。**结果:**在 15 例临床样本中均检测到 CD166+ 细胞,CD166 阳性表达率最高为 12.1%,最低为 0.3%。CD166 的高表达与肿瘤 TNM 分期、肿瘤转移、以及肿瘤分型密切相关 (P 均 <0.05)。CD166+ 细胞的成球形成能力和集落形成能力显著的高于 CD166- 细胞,且 CD166+ 细胞在裸鼠体内肿瘤形成能力显著高于 CD166- 细胞(P 均 <0.05)。**结论:**非小细胞肺癌 CD166+ 细胞具有肿瘤干细胞的特征,CD166 在非小细胞肺癌的发生发展中可能具有重要的作用。

关键词:非小细胞肺癌;CD166;肿瘤干细胞

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)16-3035-04

CD166+ Isolation and Identification of Stem Cells in the Non-small Cell Lung Cancer*

ZHANG Zhi-bin, XI Yun-feng, HUO Long-wei, REN He-zhuang, JIANG Zhan-xin, XI Jun-feng[△]

(The First Affiliated Hospital Of Yulin, Yulin, Shaanxi, 719000, China)

ABSTRACT Objective: To study the separation of CD166+ cells in human non-small cell lung cancer, and verify the characteristics of cancer stem cells. **Methods:** To collect surgical removal of the 15 patients with non-small cell carcinoma tissue samples and clinical data, and by flow cytometry to detect CD166+ expression levels in the organization, on the original CD166+ cells in the original generation training, contrast and CD166+/- cells in vitro self-renewal ability; CD166+ cells and CD166- cells injected into mice, differences in the ability of tumor formation in vivo. **Results:** CD166+ cells were detected in 15 cases of clinical samples, CD166 positive expression rate was as high as 12.1%, the lowest was 0.3%. CD166 high expression was closely related to tumor TNM stage, tumor metastasis and tumor classification ($P < 0.05$). CD166+ cell clone formation ability significantly higher than that of CD166- cells, and CD166+ cells in nude mice tumor formation ability was significantly higher than that of CD166- cells in the body. **Conclusion:** Non-small cell lung cancer CD166+ cells has the characteristics of cancer stem cells, prompt CD166 in non-small cell lung cancer development may play an important role.

Key words: Non-small Cell Lung Cancer; CD166; Cancer stem cell

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)16-3035-04

前言

近些年来,肺癌在全世界的发病率逐年上升,有数据显示肺癌的发病率和死亡率都位于肿瘤之首,严重的影响人类的生活和生存。肺癌可以分为小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC),比较两种肺癌中,NSCLC 较 SCLC 的肿瘤增长速度较慢,且恶性程度也低,但在治疗方面,SCLC 对化疗敏感^[1,2]。在临床病例中发现,NSCLC 占肺癌的大部分,具有高度异质性,能够抵抗化疗药物的治疗,5 年生存率低于 20%^[3,4],但其具体

的发病机制还未研究清楚,故越来越多的学者给予 NSCLC 极大的关注。近年来,肿瘤干细胞模型同样吸引了研究者的极大关注,通过这种模型可探讨各种肿瘤的异质性、耐药性、休眠、复发和转移^[5-7]。虽然有很多学者对肿瘤干细胞进行研究,但关于肺癌肿瘤干细胞的研究非常少。目前,针对 NSCLC 干细胞的研究还尚处于起步阶段。为了研究非小细胞肺癌干细胞,本研究拟通过筛选 NSCLC 中 CD166+ 细胞,验证其肿瘤干细胞的生物学特性。

1 资料与方法

* 基金项目:陕西省科技厅科研基金项目(2012K16-09-03)

作者简介:张志斌(1983-),副主任医师,主要研究方向:肺癌及食管癌的发病及转移侵袭机制研究,

E-mail: zzbavan@163.com, 电话: 18829321617

[△] 通讯作者:席俊峰(1978-),副主任医师,主要研究方向:肺癌及食管癌的发病及转移侵袭机制研究,

E-mail: ylylwzd@163.com, 电话: 18992275239

(收稿日期:2017-02-27 接受日期:2017-03-30)

1.1 研究对象

收集 2010 年 1 月至 2015 年 6 月中 15 例来自榆林市医院的非小细胞肺癌患者经手术切除的组织样本(均经患者知情同意),其中男 8 例,女 7 例。所有病例都是确诊只患有非小细胞肺癌。NSCLC 分期和病理分级均采用国际肺癌研究会(IASLC, 2009)的标准。

1.2 筛选 CD166 阳性细胞

取新鲜的病理组织研磨,加入适量的 DMEM 清洗,加入 Accumax 1× 后,37℃ 孵化 30 min 后,过滤悬液,收集单细胞悬液。将获得的单细胞悬液在含有 1% 的 BSA 和特定抗体 (CD166-FITC) 溶液中 4℃ 中孵育 30 min 后,离心去上清,缓冲液重悬,将细胞悬液经过流式细胞仪进行细胞筛选,分选后计算每个组织样品中 CD166+ 细胞的表达率,并将 CD166- 细胞与 CD166+ 细胞收集计数后继续培养传代。

1.3 细胞的培养以及肿瘤细胞成球实验

将所筛选出的 CD166- 细胞与 CD166+ 细胞分别进行培养,经胰酶消化后,1000 r/min,离心 3 min 后去上清。加入 5 mL 的 PBS 缓冲液重悬后,再次离心,重复三次后,再加培养基制备单细胞悬液,并将细胞浓度调整为 1000 cells/mL,接种于 6 孔板内,进行肿瘤成球培养。每 3 d 更换培养基一次,14 d 后观察肿瘤成球情况。

1.4 集落形成能力检测

将 250 个流式细胞仪分选出的细胞接种于 6 孔板中,用 2 mL 的 Defined K-SFM 培养基培养,每种细胞重复两次,每 3 d 更换培养基一次,14 d 后用 2% 的结晶紫染色,冲洗后计数每孔中细胞集落的数目。

1.5 裸鼠体内移植瘤试验

选取 3-4 周龄 BALB/c 裸鼠 8 只,随机分成 2 组,每组 4 只。所有的实验小鼠按照美国卫生研究院的指导,在无特定病

原体(SPF)屏障系统中进行饲养。将分离的 CD166+ 和 CD166- 细胞离心,PBS 重悬,计数,以 PBS 调整细胞密度为 1×10^4 /mL。接种于裸鼠右侧背部的皮下,观察 35 d,从接种第 10 d 开始测量裸鼠皮下肿瘤的生长情况,直到第 35 d 处死小鼠,并对肿瘤的体积进行记录和比较。

1.6 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计进行数据分析,数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,统计学处理采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 非小细胞肺癌中 CD166 的表达及其临床病理意义

通过对 15 份临床样本进行流式细胞筛选后,可得出 15 个 NSCLC 临床样品中 CD166 阳性表达率最高为 12.1%,最低为 0.3%(图 1)。通过 CD166 的表达水平将 15 组病例分为高表达 CD166 组 (CD166^{high} > 平均表达值) 和低表达 CD166 组 (CD166^{low} < 平均表达值),随后对其临床病理学相关性进行分析。结果表明 CD166 基因的表达与 NSCLC 患者的年龄和性别无显著相关性($P > 0.05$),而与肿瘤 TNM 分期、肿瘤转移以及肿瘤分型存在显著相关性(P 均 < 0.05 , 表 1)。

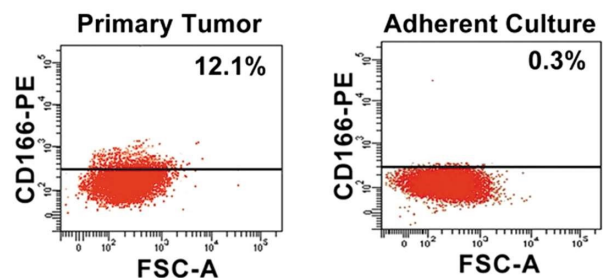


图 1 流式细胞术测定 NSCLC 样本中 CD166 的表达情况

Fig.1 The expression of CD166 by FCM in NSCLC samples

表 1 CD166+ 与 NSCLC 临床病理特征的相关性

Table 1 Correlation of CD166+ expression with the clinicopathological characteristics of NSCLC

Variables	n	CD166+		p-value
		Low	High	
Age(years)				
≤ 55	2	1(50.0%)	1(50.0%)	0.715
>55	13	6(46.2%)	7(53.8%)	
Gender				
Female	7	3(42.9%)	4(57.10%)	0.481
Male	8	4(50.0%)	4(50.0%)	
Tumor stageA				
Stages I & II	8	3(37.5%)	5(62.5%)	0.017*
Stages III&IV	7	3(42.9%)	4(57.1%)	
Metastatic				
Yes	9	2(22.2%)	7(77.8%)	0.0406*
No	6	5(83.3)	1(16.7%)	
Histology				
Squamous cell carcinoma	7	4(57.1%)	3(42.9%)	0.013*
Adenocarcinoma	7	1(14.3%)	6(85.7%)	

Note: AAJCC/UICC T staging system.

2.2 CD166 对肿瘤细胞成球的影响

通过 CD166⁻ 细胞与 CD166⁺ 细胞的细胞成球现象进行观察,CD166⁺ 细胞球形成的个数 17.6 ± 2.1 ,CD166⁻ 细胞球形成的个数为 3.2 ± 1.3 , 结果显示 CD166⁺ 细胞成球能力高于 CD166⁻ 细胞($P < 0.05$,图 2)。

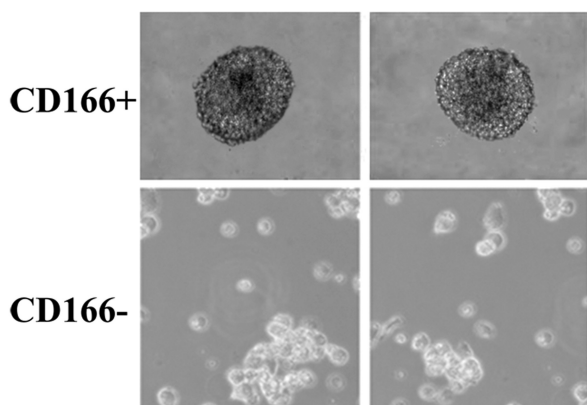


图 2 CD166⁺ 和 CD166⁻ 细胞成球的结果(100 μ m)

Fig.2 Phase-contrast images of tumor spheres seeded with CD166⁺ and CD166⁻ cells

2.3 CD166 对集落形成能力的影响

将 250 个分选出的细胞接种于 6 孔板中,CD166⁺ 细胞形成的集落数为 124 ± 9.2 ,CD166⁻ 形成的集落数为 80 ± 11.4 ,两者相比差异有统计学意义($P < 0.01$),且 CD166⁺ 细胞形成的集落直径较大,细胞排列紧密(图 3)。

2.4 CD166 对体内移植瘤的影响

CD166⁻ 细胞与 CD166⁺ 细胞悬液接种小鼠后, 分别测量

各个时间段的肿瘤大小, 结果表明接种 35 d 后,CD166⁺ 细胞的小鼠肿瘤明显大于接种 CD166⁻ 细胞的小鼠肿瘤(图 4)。

3 讨论

目前,肿瘤干细胞的分离方法有三种,分别是:从已有的稳定的肿瘤细胞系中分离,从原代的肿瘤细胞中分离和从新鲜的肿瘤组织中分离^[13,14]。三种方法各有优缺点,第一种方法虽然操作简单,取材容易,但是分离出的细胞可能发生变异,而无法真实的反映其生物学特性;第二种方法能真实的反映细胞的特性,但是原代细胞培养操作复杂,对实验者的操作水平要求高,从而限制了该方法的广泛应用;第三种能够如实的反映干细胞的生物学特性,但刚开始分离的细胞可能含有其他的细胞,部分分离出的干细胞无法在人工环境下进行培养^[15,16]。本研究选择了第三种方法,从 15 例非小细胞癌组织标本成功分离出了肿瘤干细胞,为后期对其的研究奠定一定的基础。

肿瘤干细胞和正常干细胞往往具有相同的干细胞标记^[17]。CD166 不仅是一种跨膜蛋白,还是一种常见的干细胞的标记物^[18,19]。有研究表明在大肠癌中,高表达 CD166 的肿瘤细胞更新力和增殖能力更强,用其进行小鼠的体外移植瘤试验,结果小鼠体内形成肿瘤,该肿瘤具有原有肿瘤细胞的生物学特性。但是 CD166 是否与恶性肿瘤的发生和发展存在必然联系还存在较大争议,但是体外的实验结果显示降低 CD166 的表达后,恶性肿瘤细胞的运动能力增强,可促使恶性肿瘤细胞的扩散^[20,21]。为了确定 CD166 在 NSCLC 中是否扮演着一一定的角色,本研究选择了临床的 15 例 NSCLC,采集病料后,通过流式细胞对其进行筛选,结果显示所有病例中,CD166 阳性表达率最高为 12.1%,最低为 0.3%;同时对其临床病理学相关性进行分析,

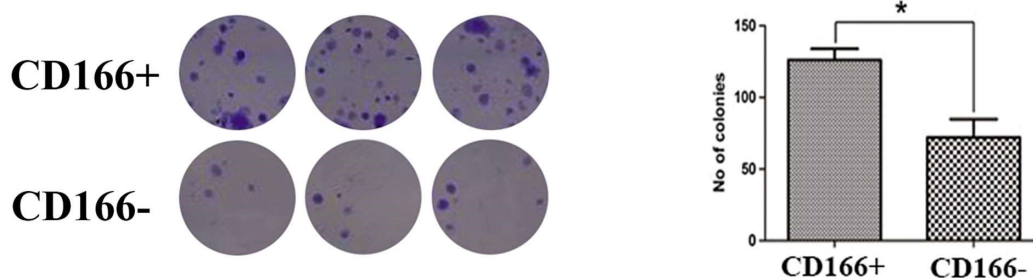
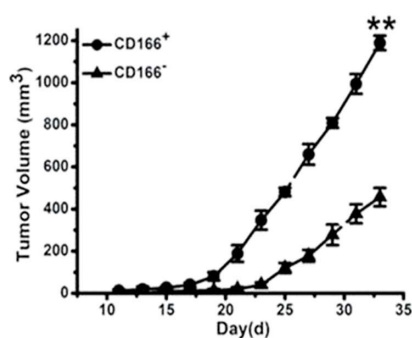


图 3 CD166⁺ 和 CD166⁻ 细胞集落形成实验结果

Fig.3 The results of CD166⁺ and CD166⁻ cell colony forming experiment



CD166⁺

CD166⁻



图 4 体内移植瘤试验

Fig.4 In vivo serial transplantation assay

结果表明 CD166 基因的表达与 NSCLC 患者的年龄和性别无显著相关性,而与肿瘤 TNM 分期、肿瘤转移以及肿瘤分型存在显著相关性,该结果暗示 CD166 可能与肺癌肿瘤发张有关系;另外为了验证 CD166+ 细胞是否具有肿瘤干细胞的特性,我们将流式细胞仪分离出的 CD166+ 和 CD166- 细胞分别进行了肿瘤细胞成球试验、平板集落试验,并将两种细胞注射到小鼠体内,观察体内肿瘤形成能力的差异。细胞成球实验和平板集落试验结果表明 CD166+ 细胞的克隆形成能力显著的高于 CD166- 细胞,体内移植瘤试验表明 CD166+ 细胞在裸鼠体内肿瘤形成能力要显著高于 CD166- 细胞,提示 CD166 与肺癌的发生发展密切相关。

总之,本研究成功分离出了 CD166 阳性表达的肿瘤细胞,并证明其具有肿瘤干细胞的特征,为寻求新的、有效的非小细胞肺癌治疗方法奠定了一定的基础。但目前 CD166 对于肿瘤干细胞的调控机制尚不明确,是否存在其他因子对非小细胞肺癌的发生和发展进行调控仍需要进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Fong D, Yeh A, Naftalovich R, et al. Curcumin inhibits the side population (SP) phenotype of the rat C6 glioma cell line: towards targeting of cancer stem cells with phytochemicals [J]. *Cancer Lett*, 2010, 293(1): 65
- [2] Bora-Singhal N, Nguyen J, Schaal C, et al. YAP1 regulates OCT4 activity and SOX2 expression to facilitate self-renewal and vascular mimicry of stem-like cells[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6): 1705-1718
- [3] Karachaliou N, Rosell R, Viteri S. The role of SOX2 in small cell lung cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2013, 2(3): 172-179
- [4] Zhang DG, Jiang AG, Lu HY, et al. Isolation, cultivation and identification of human lung adenocarcinoma stem cells [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(1): 47-54
- [5] Honing J, Pavlov KV, Mul VE, et al. CD44, SHH and SOX2 as novel biomarkers in esophageal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy[J]. *Radiother Oncol*, 2015, 117(1): 152-158
- [6] Hayashi S, Fujita K, Matsumoto S et al. Isolation and identification of cancer stem cells from a side population of a humanhepatoblastoma cell line, HuH-6 clone-5[J]. *PediatrSurgInt*, 2011, 27 (1): 9
- [7] Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 41-50
- [8] Naik R, Han S, Lee K. Chemical biology approach for the development of hypoxia inducible factor (HIF) inhibitor LW6 as a potential anticancer agent[J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(9): 1563-1574
- [9] Li S, Li Q. Cancer stem cells and tumor metastasis [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(6): 1806-1812
- [10] Zhang H, Yang N, Sun B, et al. CD133 positive cells isolated from A549 cell line exhibited high liver metastatic potential [J]. *Neoplasma*, 2014, 61(2): 153-160
- [11] Lu C, Xu F, Gu J, et al. Clinical and biological significance of stem-like CD133+ CXCR4+ cells in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2015, 150(2): 386-395
- [12] Singh S, Bora-Singhal N, Kroeger J, et al. β -Arrestin-1 and Mcl-1 modulate self-renewal growth of cancer stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer[J]. *PLOS One*, 2013, 8(2): e55982
- [13] Wang JL, Yu JP, Sun ZQ, et al. Radiobiological characteristics of cancer stem cells from esophageal cancer cell lines [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(48): 18296-18305
- [14] Na L, Yu Y, Miao D, et al. GFP stable transfection facilitated the characterization of lung cancer stem cells [J]. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(12): 1079-1088
- [15] Zhao C, Setrerrahmane S, Xu H. Enrichment and characterization of cancer stem cells from a human non-small cell lung cancer cell line [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(4): 2126-2132
- [16] Okudela K, Woo T, Mitsui H. Downregulation of ALDH1A1 expression in non-small cell lung carcinomas its clinicopathologic and biological significance[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(1): 1-12
- [17] Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: Impact, heterogeneity and uncertainty[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 283-296
- [18] Krut FA, Schuringa. Apoptosis and cancer stem cells: implications for apoptosis targeted therapy [J]. *BiochemPharmacol*, 2010, 80(4): 423-430
- [19] Groenendijk FH, Mellema WW, Eline VDB, et al. Sorafenib synergizes with metformin in NSCLC through AMPK pathway activation[J]. *Int J Cancer*, 2014, 136(6): 1434-1444
- [20] Giuffrida D, Rogers IM. Targeting cancer stem cell lines as a new treatment of human cancer [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2010, 5(3): 205-218
- [21] Ma X, Duan Y, Tschudy-Seney B, et al. Highly efficient differentiation of functional hepatocytes from human induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2: 409-419

(上接第 3015 页)

- [17] Zhang Y, Cheng Y, Ren X, et al. NAC1 modulates sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by altering the HMGB1-mediated autophagic response[J]. *Oncogene*, 2012, 31(8): 1055-1064
- [18] Zhang Y, Cheng Y, Ren X, et al. Dysfunction of nucleus accumbens-1 activates cellular senescence and inhibits tumor cell proliferation and oncogenesis[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 4262-4275
- [19] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases[J]. *J Biochem*, 2013, 153(1): 13-19
- [20] Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis [J]. *J Intern Med*, 2013, 273(2): 114-127
- [21] Przybylski M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis[J]. *J Wound Care*, 2009, 18(12): 516-519
- [22] Ahdi K S, Farajnia S, Ghiamirad M, et al. Development and evaluation of a single domain antibody against human epidermal growth factor receptor (EGFR)[J]. *Protein Expr Purif*, 2016, 120: 59-64