

文章编号:1005-6947(2008)09-0865-05

· 基础研究 ·

# 胰腺癌细胞株 PANC-1 中肿瘤干细胞生物学行为的研究

黄鹏, 王春友, 吴河水, 熊炯炘

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科, 湖北 武汉 430022)

**摘要:**目的 研究人胰腺癌细胞株 PANC-1 中肿瘤干细胞的生物学特性。方法 将 PANC-1 细胞进行培养,以 CD44 和 CD24 作为细胞表面标志。利用流式细胞仪,从该细胞株中分离出细胞亚群。将所得到的有 CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> 表面标志的 PANC-1 细胞和未分选的 PANC-1 细胞置于含有 10 ng/mL 成纤维细胞生长因子、20 ng/mL 上皮生长因子和 ITS(胰岛素、转铁蛋白和硒混合溶液)无血清 DMEM/F12(1:1)培养基中,以 MTT 法检测不同亚群细胞体外增殖活性;通过裸鼠体内接种成瘤实验,鉴定各亚群细胞体内增殖能力;通过 ABC 法检测成瘤组织和 PANC-1 细胞株中 CD44 和 CD24 的表达。结果 PANC-1 细胞系中 CD44<sup>+</sup> 和 CD24<sup>+</sup> 的表达分别为 5.1% ~ 17.5% 和 21.8% ~ 70.1%, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> 的表达为 0.9% ~ 3.5%;与 CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup> 亚群比较,CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> 亚群生长缓慢,第 7 天才出现指数生长的趋势,增殖能力较低,倍增时间更长,而前者第 5 天已出现指数生长的趋势。裸鼠皮下植入  $5 \times 10^3$  个 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> 亚群细胞,4 周即可见明显的新生肿瘤块(2/8),而植入  $1 \times 10^5$  个 CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup> 亚群细胞,12 周也难形成种植瘤。前者体外成瘤能力比后者至少强 20 ~ 50 倍( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );所形成的肿瘤和 PANC-1 细胞系无组织学差异。结论 CD44 和 CD24 可作为分选 PANC-1 中肿瘤干细胞的表面标志;分选出的 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> 亚群细胞具有肿瘤干细胞的初步特征。

[中国普通外科杂志,2008,17(9):865-869]

**关键词:** 胰腺肿瘤;干细胞;肿瘤干细胞;分离;鉴定

中图分类号:R 735.9

文献标识码:A

## Analysis of biological behavior of tumor stem cell of pancreatic adenocarcinoma cell line PANC-1

HUANG Peng, WANG Chunyou, WU Heshui, XIONG Jiangxin

(Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the method of isolation and biological analysis of tumor stem cell of pancreatic adenocarcinoma cell line PANC-1. **Methods** PANC-1 cells were cultured. Subpopulation cells which have properties of tumor stem cells were isolated according to the cell surface markers CD44 and CD24 by flow cytometry from pancreatic adenocarcinoma cell line PANC-1. The obtained CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> and unsorted PANC-1 cells were cultured in serum-free medium (SFM). The SFM was DMEM-F12 supplemented with 10 ng/mL fibroblast growth factor, 20 ng/mL epidermal growth factor, 5 kg/mL insulin, 2.75 mg/mL transferrin, 2.75 ng/mL selenium (insulin-transferrin-selenium solution), penicillin ( $1 \times 10^5$  U/L) and streptomycin (100 mg/L). Then the proliferative capability of these cells in vitro was

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30571817)。

**收稿日期:**2008-01-09; **修订日期:**2008-03-28。

**作者简介:**黄鹏,男,华中科技大学同济医学院附属协和医院主治医师,主要从事胰腺疾病基础与临床方面的研究。

**通讯作者:**王春友 E-mail:hpeng2003@sina.com

estimated by MTT method. The tumor growth from different subpopulation cells inoculated into nude mice was studied, and expression of CD44 and CD24 of the CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> cells -formed nodules and PANC-1 cells were detected by avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) immunohistochemical staining. **Results** Expressed the cell surface marker CD44, in 5.1% to 17.5% of sorted PANC-1 cells, 21.8% to 70.1% expressed CD24, and only 0.9% to 3.5% of cells were CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup>. Compared with CD44<sup>-</sup> CD24<sup>-</sup> cells, CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> cells had a lower growth rate in vitro. For the former, index growth trend appeared at 5th day, while the latter appeared at 7th day. The sorted cell population with the highest tumorigenic potential were those cells expressing CD44 and CD24. After implantation of  $1 \times 10^5$  CD44<sup>-</sup> CD24<sup>-</sup> cells in nude mice, no tumor growth was evident at 12 weeks. In contrast, nude mice implanted with  $5 \times 10^3$  CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> cells had large tumors evident at 4 weeks (2/8), and at least a 20 ~ 50-fold increase in tumorigenic potential ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). There was no obvious histological difference between the cells of the CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> cells-formed nodules and PANC-1 cells. **Conclusions** CD44 and CD24 may be used as the cell surface markers for isolation of pancreatic cancer stem cells from pancreatic adenocarcinoma cell line PANC-1. Subpopulation cells CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> have properties of tumor stem cells.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (9) : 865 - 869 ]

**Key words:** Pancreatic Neoplasm; Stem Cells; Tumor Stem Cells; Isolation; Identification

**CLC number:** R 735.9

**Document code:** A

胰腺癌是一种进展迅速,预后很差的恶性肿瘤。由于早期缺乏典型的临床表现,待明确诊断时往往已属于晚期,只有12%~15%的患者可进行根治手术<sup>[1]</sup>,术后复发率高,5年存活率仅0%~4%<sup>[2]</sup>。肿瘤干细胞理论<sup>[3]</sup>认为肿瘤是一种干细胞疾病,如果能以肿瘤中的干细胞作为治疗的靶子,肿瘤治愈将成为可能。但实体瘤中极少有细胞表面标志物可供细胞分选,给肿瘤干细胞的纯化带来了困难。笔者以CD44和CD24作为细胞表面标志,利用流式细胞仪,从人胰腺癌细胞株PANC-1中分离出具有干细胞特征的细胞亚群,并对其一般生物学行为进行初步研究,报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人胰腺癌细胞株PANC-1由本院普外科实验室提供。裸鼠,雌性,6~8周龄,体重(20±2)g,购于本校同济医学院实验动物中心。试剂及仪器:DMEM/F12培养基(1:1, Sigma公司),青霉素(哈药一厂),链霉素(华北制药股份有限公司),胎牛血清(FBS,杭州四季清公司),胰岛素、转铁蛋白和硒混合溶液(ITS, 5 kg/mL胰岛素, 2.75 mg/mL转铁蛋白和 2.75 ng/mL硒混合溶液)、胰蛋白酶(trypsin, Sigma公司),PE抗人CD44和FITC抗人CD24(美国Anccell公司),流式细胞仪(FACS,美国BD公司),倒置相差显微镜

(日本Olympus公司),低速离心机(北京医用离心机厂),二氧化碳细胞培养箱(意大利JOUAN公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 培养基由含20%胎牛血清的DMEM/F12培养基、青霉素( $1 \times 10^5$  U/L)和链霉素(100 mg/L)组成。将复苏冻存的人胰腺癌细胞株PANC-1细胞接种于培养基中,培养在5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度,恒温37℃培养箱内。

1.2.2 流式细胞仪检测及分选 细胞生长达对数生长期后,吸去培养液,PBS洗1遍,加入0.02% EDTA-2Na和0.25%胰蛋白酶混合液,37℃消化2~3 min;待细胞变圆,加入含血清培养基,吸管吹打数次;移入无菌离心管,1 000 r/min离心5 min,PBS液重悬细胞,台盼蓝染色并计数。每 $1 \times 10^6$ 个细胞加入0.625 μL PE抗人CD44和/或5 μL FITC抗人CD24,4℃孵育30 min。对照组不加抗体。应用流式细胞仪进行流式检测及分选(步骤按说明书操作)。每次细胞分选后重复上机一次,保证分选后的各亚群细胞纯度>95%。分选后不同表型的细胞及未经分选的PANC-1细胞共分为7组:A组(未分选PANC-1),B组(CD44<sup>+</sup>),C组(CD44<sup>-</sup>),D组(CD24<sup>+</sup>),E组(CD24<sup>-</sup>),F组(CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup>),G组(CD44<sup>-</sup> CD24<sup>-</sup>)。台盼蓝染色并计数。

1.2.3 MTT法检测不同亚群细胞体外增殖活性 将分选后的细胞亚群和未分选的PANC-1细胞

分别接种于96孔板内,在含有10 ng/mL成纤维细胞生长因子、20 ng/mL上皮生长因子和ITS,并在加有青霉素(1 × 10<sup>5</sup> U/L)和链霉素(100 mg/L)的无血清DMEM/F12(1:1)培养基中培养,每孔200 μL(含2 × 10<sup>3</sup>个细胞),每组设5个复孔,每2天换液1次,于490 nm处在分光光度计上测各组细胞的OD值,每24 h测定1块96孔板,取均值并绘制生长曲线。

1.2.4 裸鼠接种成瘤试验 将CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>和未分选的PANC-1细胞分别制成不同浓度(5 × 10<sup>6</sup>/mL ~ 5 × 10<sup>3</sup>/mL)的单细胞悬液,各取0.1 mL接种于裸鼠双侧腋下的皮下,每组在不同浓度下各接种1~5只(10部位),并设未接种对照组。每周观察1次,共观察12周。

1.2.5 免疫组化检测CD44和CD24的表达 从裸鼠获取长成的肿瘤后,立即置入10%的中性福尔马林液中固定24 h,然后脱水、包埋、切片,ABC(avidin-biotin-peroxidase complex)法行CD44和CD24染色(严格按说明书操作)作免疫组化检查<sup>[4]</sup>。PANC-1细胞做成细胞爬片后,行同样的操作。免疫组化结果在显微镜下进行观察,使用Adobe Photoshop 7.0和Image-Pro 6.0评定CD44和CD24表达的数量值<sup>[4]</sup>。

1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据比较采用SPSS12.0统计软件包进行 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞流式检测结果

PANC-1细胞系中CD44<sup>+</sup>和CD24<sup>+</sup>的表达分别为5.1%~17.5%和21.8%~70.1%,表型为CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>的胰腺癌细胞仅占0.9%~3.5%(图1)。

2.2 PANC-1及不同亚群细胞体外生长曲线

CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>细胞第5天呈对数生长,CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞第7天才出现指数生长,倍增时间延长,而前者第5天就出现指数生长的趋势;未分选PANC-1细胞的生长能力及倍增时间介于前两者之间(图2)。

2.3 裸鼠接种成瘤实验结果

裸鼠皮下注入5 × 10<sup>3</sup>个CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞,4周就可观察到明显的新生肿瘤块;而即使植入1 × 10<sup>5</sup>个的CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>细胞,至12周也未形成种植瘤;未分离的肿瘤细胞,至少需要植入5 × 10<sup>4</sup>个细胞,而且要在6周后才可能形成移植瘤。各阴性组和阳性组比较的统计学意义见表1。

2.4 CD44和CD24的表达

显微镜下可见PANC-1细胞爬片和移植瘤切片的CD44表达的数量、面积分别为(5.7 ± 1.2) vs. (5.6 ± 1.4)和(0.27 ± 0.04) vs. (0.28 ± 0.05);CD24的阳性表达则分别为(9.0 ± 1.6) vs. (8.9 ± 1.5)和(0.68 ± 0.11) vs. (0.65 ± 0.09),两者的CD44和CD24表达差异均无显著性(均 $P > 0.05$ )(图3)。

表1 不同表型肿瘤细胞裸鼠接种成瘤能力(成瘤数/有效接种数)

组别	接种细胞数					
	5 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>5</sup>	5 × 10 <sup>4</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	5 × 10 <sup>3</sup>	1 × 10 <sup>3</sup>
未分选 PANC-1 (A)	5/6	4/6	2/6	0/6	0/6	0/0
CD44 <sup>+</sup> (B)	0/0	8/10	6/10	2/10	0/6	0/0
CD44 <sup>-</sup> (C)	0/0	1/10 <sup>1)</sup>	0/10 <sup>2)</sup>	0/4	0/0	0/0
CD24 <sup>+</sup> (D)	0/0	6/8	4/8	1/8	0/4	0/0
CD24 <sup>-</sup> (E)	0/0	1/8 <sup>3)</sup>	0/8 <sup>3)</sup>	0/8	0/0	0/0
CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> (F)	0/0	7/8	6/8	4/8	2/8	0/8
CD44 <sup>-</sup> CD24 <sup>-</sup> (G)	1/8	0/8 <sup>4)</sup>	0/8 <sup>4)</sup>	0/8 <sup>5)</sup>	0/8	0/0

注:1)与B组比, $P < 0.01$ ; 2)与B组比, $P < 0.05$ ; 3)与D组比, $P < 0.05$ ; 4)与F组比, $P < 0.01$ ; 5)与F组比, $P < 0.05$

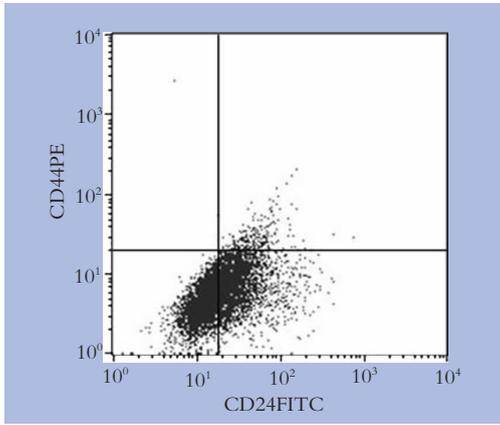


图1 细胞流式检测结果

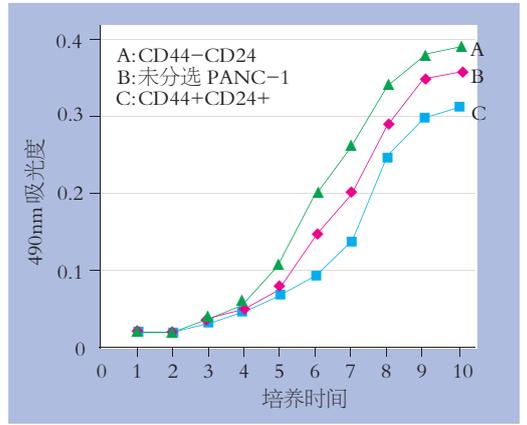
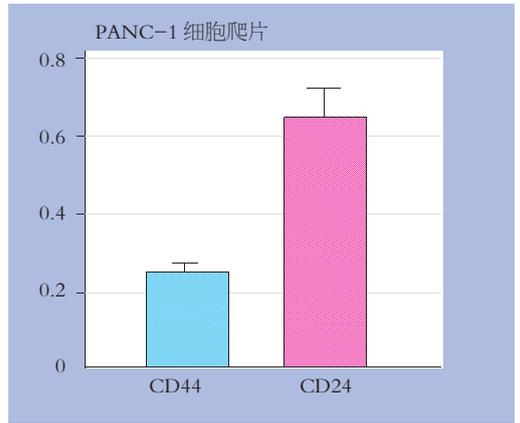
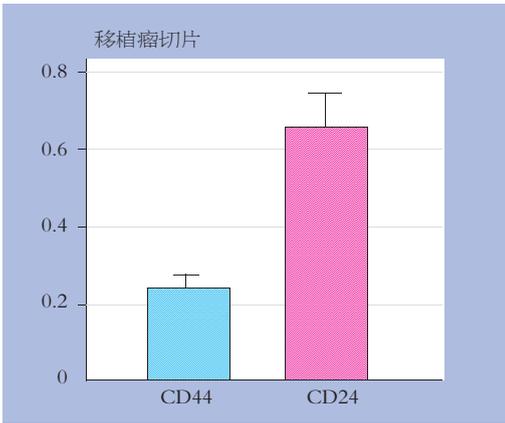
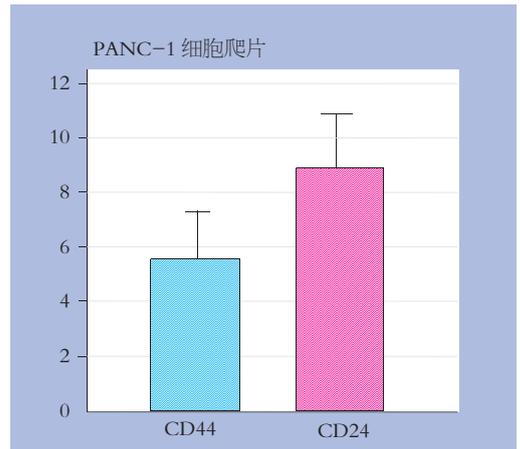
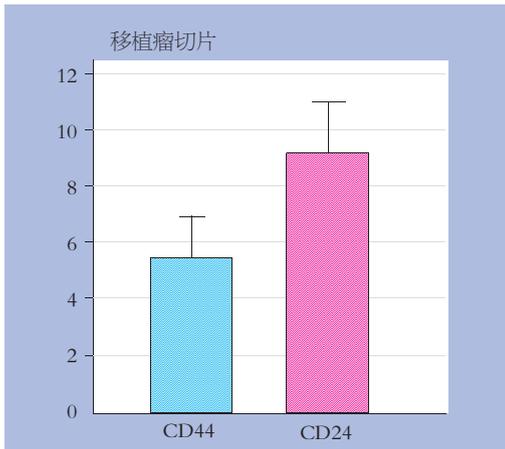


图2 PANC-1 及不同亚群细胞体外增殖生长曲线



CD44 和 CD24 表达的面积(mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>)



CD44 和 CD24 表达的数量(个/cm<sup>2</sup>)

图3 CD44 和 CD24 的阳性表达值

### 3 讨论

肿瘤干细胞理论<sup>[5-6]</sup>认为,肿瘤细胞具有异质性,即同一肿瘤中大部分细胞已失去生长潜能,而只有一小部分细胞具有无限增殖、分化和在体外形成克隆的能力。肿瘤干细胞的分离和

鉴定最初来源于血液系统的恶性肿瘤。Bonnet等<sup>[7]</sup>从急性粒细胞性白血病(AML)患者体内提取和纯化出CD34<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>表型细胞,仅占肿瘤细胞的5%;该细胞具有明显的增殖、分化和自我更新的能力。实体瘤干细胞的研究于最近才取得突破性的进展。2003年有学者利用癌细胞膜表

面抗原的差异,使用特异的抗体及流式细胞技术,将人类乳腺癌组织的细胞接种到 NOD/SCID 小鼠体内,结果证明只有一种细胞表面抗原为 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>/low 的癌细胞能在 NOD/SCID 鼠体内形成移植瘤,并且只需 100 个即可 100% 形成肿瘤<sup>[8-9]</sup>。尔后在其他肿瘤中也发现存在肿瘤干细胞,包括脑瘤<sup>[10]</sup>、前列腺癌<sup>[11]</sup>、肝癌<sup>[12-13]</sup>、肺癌<sup>[14]</sup>、黑色素瘤<sup>[15]</sup>和结肠癌<sup>[16-17]</sup>。

基于 Al-Hajj 等<sup>[9]</sup>的研究,笔者以 CD44 和 CD24 作为细胞表面标志,利用流式细胞仪,从 PANC-1 细胞株中分离出具有干细胞特征的细胞亚群,并进行了初步研究。

本研究所获得的 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞亚群比例为 0.9%~3.5%,高于 Li 报道的 0.2%~0.8%<sup>[6]</sup>。原因可能是仅仅以 CD44 和 CD24 两个分子表面标志,还不足以将 PANC-1 中的肿瘤干细胞和非肿瘤干细胞完全区分开来,或许还需要结合其他的分选标志。但从上述实验结果可以看出,所得的 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>亚群已经具有肿瘤干细胞特征。

肿瘤干细胞的鉴定主要证明它具有干细胞的自我更新,无限增殖及多向分化能力,而且不同于正常细胞的异型性。最重要的是,它是惟一能导致肿瘤发生的细胞。裸鼠肿瘤移植实验是一种较理想的鉴定肿瘤干细胞体内增殖能力的方法。本研究发现:CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞的成瘤能力>未分选的 PANC-1 细胞>CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>细胞。CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>较 CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>细胞的成瘤能力至少强 20~50 倍。但在植入 CD44<sup>-</sup>,CD24<sup>-</sup>和 CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>细胞,细胞数较多时,也有一定的成瘤能力。此现象是其本身的性质所致,还是在操作中混入了其它细胞,尚不明确。为了证明移植后裸鼠体内形成的肿瘤和 PANC-1 细胞在组织上的同源性,本研究所做免疫组化检测的结果表明,移植瘤和 PANC-1 细胞的 CD44 和 CD24 的阳性表达相近,两者组织学上差异无显著性。

肿瘤干细胞具有和干细胞相似的特性。干细胞是处于相对静止的一群细胞,在除人类以外的其他灵长类动物,干细胞池大约每年增殖 1 次。这种慢周期的特点是大多数成体干细胞的共同特征<sup>[18]</sup>。本研究也证实这一观点:相对于 CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>亚群细胞,具有肿瘤干细胞特征的 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>亚群生长缓慢,倍增时间延长。

笔者认为,以 CD44 和 CD24 作为表面标志物,从 PANC-1 人胰腺癌细胞株中分选出 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>亚群细胞已具有肿瘤干细胞的特征。将肿瘤干细胞作为靶点,可能为治疗恶性肿瘤提供广

阔的前景。对于胰腺癌干细胞的进一步纯化及其他生物学行为的研究,尚有待深入进行。

#### 参考文献:

- [1] Barkin JS, Goldstein JA. Diagnostic and therapeutic approach to pancreatic cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2000, 54 (7):400-409.
- [2] Jemal A, Thomas A, Murray T, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2002, 52(1):23-47.
- [3] Yanaihara A, Yanaihara T, Toma Y, et al. Localization and expression of steroid sulfatase in human fallopian tubes [J]. Steroids, 2001, 66(2):87-91.
- [4] Hagiwara A, Matsuda T, Tamano S, et al. Dose-related increases in quantitative values for altered hepatocytic foci and cytochrome P-450 levels in the livers of rats exposed to phenobarbital in a medium-term bioassay [J]. Cancer Lett, 1996, 110:155-62.
- [5] Bjerkvig R, Tysnes B B, Aboudy K S, et al. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(11):899-904.
- [6] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2007, 67(3):1030-1037.
- [7] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. Nat Med, 1997, 3(7):730-737.
- [8] Muhammad Al-Hajj, Max S. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. PANS, 2003, 100(7):3983-3988.
- [9] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7):3983-3988.
- [10] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. Cancer Res, 2003, 63(18):5821-5828.
- [11] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(23):10946-10951.
- [12] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J]. Hepatology, 2006, 44(1):240-251.
- [13] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, et al. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(4):820-824.
- [14] Dome B, Timar J, Dobos J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2006, 66(14):7341-7347.
- [15] Grichnik JM, Burch JA, Schulteis RD, et al. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? [J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(1):142-153.
- [16] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. Nature, 2007, 445(7123):106-110.
- [17] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. Nature, 2007, 445(7123):111-115.
- [18] Dunnwald M, Chinnathambi S, Alexandrunas D, et al. Mouse epidermal stem cells proceed through the cell cycle [J]. J Cell Physiol, 2003, 195(2):194-201.