

去甲斑蝥素诱导肿瘤干细胞凋亡作用研究

颜道宇, 郑典鹏, 高维鸿, 李金龙*

南方医科大学检验与生物技术学院, 广东 广州 510515

摘要:目的 探究去甲斑蝥素(NCTD)对肿瘤干细胞促凋亡作用。方法 分别以 UMUC-3 膀胱癌和 HepG2 肝癌细胞为研究对象, 通过无血清、低吸附、单克隆的方法筛选肿瘤干细胞(CSC), 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 CSC 干性标志物表达变化, MTS 法检测 NCTD 及紫杉醇(PTX)对 CSC 的抑制作用, 流式细胞术检测细胞凋亡。结果 2 种细胞经筛选获得成球生长细胞克隆, 其干性基因 NANOG、OCT4、ABCG2、CD133、CD34 表达明显升高, 释放入含血清培养基后干性基因表达下调。经筛选所得的 CSC 对 PTX 高度耐药, 但对 NCTD 耐药性低。NCTD 可诱导 CSC 凋亡, 但对干性基因表达没有显著影响。结论 NCTD 诱导凋亡杀伤 CSC, 但对 CSC 分化没有显著影响。

关键词: 肿瘤干细胞; 去甲斑蝥素; 细胞分化; 细胞凋亡; 干性基因

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)11-2237-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.014

Induction of apoptosis of cancer stem cells by norcantharidin

YAN Dao-yu, ZHENG Dian-peng, GAO Wei-hong, LI Jin-long

School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the effects of norcantharidin (NCTD) on cancer stem cells (CSC). **Methods** CSC were screened from UMUC3 and HepG2 cancer cell lines by limiting dilution method. The expression of stemness gene was examined by qPCR. MTS method was used to detect the inhibitory effect of NCTD and paclitaxel (PTX) on CSC. FACS was used to detect the cell apoptosis. **Results** Sphere-forming cell subpopulations were obtained from two cell lines, with much higher expression of stemness genes NANOG, OCT4, ABCG2, CD133 and CD34. Serum-release led to significant down-regulation of the stemness genes. The CSC was highly resistant to PTX, but the resistance of NCTD was low. NCTD induced apoptosis of the CSC but had no significant effect on the expression of stemness genes. **Conclusion** NCTD can induce apoptosis of CSC cell, without significant effect on cell differentiation.

Key words: cancer stem cells; norcantharidin; differentiation; apoptosis; stemness genes

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)是指肿瘤组织中的一群具有无限自我更新能力的细胞, 是促使肿瘤细胞无限生长的根源。CSC 能抵抗放化疗的杀伤, 是肿瘤复发的蓄库和转移的根源^[1]。靶向 CSC 不但可以从源头阻断肿瘤的生长, 而且可能还无需考虑肿瘤中众多的“非干性”肿瘤细胞^[2], 如何抑制或清除 CSC 成为了当今抗肿瘤领域的研究热点。

去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)为斑蝥素的去甲衍生物, 是中国自主研发的抗肿瘤药物。研究表明, NCTD 可抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡, 包括肝癌^[3]、膀胱癌^[4]、前列腺癌^[5]、骨髓瘤^[6]

细胞等。但其对于 CSC 的作用鲜有报道。本实验通过有限稀释法, 无血清、低吸附培养筛选获得具有“干性”标志的 CSC, 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)、MTS、流式细胞术等方法研究 NCTD 对 CSC 的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

膀胱癌 UMUC-3 细胞和人肝癌 HepG2 细胞(美国 ATCC 细胞库); 胎牛血清、DMEM 培养基、DMEM/F12(美国 Gibco 公司); 表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)、白血病抑制因子

收稿日期: 2016-11-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81672915, 81272482)

作者简介: 颜道宇(1990—)男, 硕士在读, 研究方向为肿瘤干细胞耐药机制研究。

*通信作者 李金龙(1975—)男, 教授, 博士生导师。Tel: (020)62798135 E-mail: lijnlong@smu.edu.cn

(LIF) 购自美国 Peprotech 公司; Accutase 酶 (美国 Ebioscience 公司); 紫杉醇 (PTX)、NCTD、BSA (美国 Sigma 公司); MTS 细胞增殖试剂盒 (上海贝博生物科技有限公司); 超低吸附培养板 (美国 Corning 公司); 无血清添加剂 B27 (美国 invitrogen 公司)。

1.2 有限稀释法筛选 CSC

取对数期生长的 UMUC-3 细胞和 HepG2 细胞, DMEM/F12 无血清成球培养基 (含 20 ng/mL EGF、20 ng/mL b-FGF、20 ng/mL LIF、20 μ L/mL B27、4 μ g/mL BSA) 稀释至 5 个/mL, 以每孔 200 μ L 加入

至 96 孔超低吸附培养板, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养。定期观察细胞生长及成球情况。

1.3 qRT-PCR 检测干性分子

收集细胞提取总 RNA, 逆转录获得 cDNA, 以 cDNA 为模板对“干性”分子基因 CD133、CD44、NANOG、OCT4、ABCG2 进行定量 PCR 扩增。引物见表 1。

反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、34 s, 共 40 个循环。 β -actin 作为内参基因, 采用比较 C_t 值法计算目的基因的相对表达水平。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

目的基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
CD133	AGTCGGAAACT GGCAGATAGC	GGTAGTGTGTACTGGGCAAT
CD44	CTGCCGCTTTGCAGGTGTA	CATTGTGGCAAGGTGCTATT
NANOG	AAGGTCCCGGTCAAGAAACAG	CTTCTGCGTCACACCATTGC
OCT4	CTGGGTTGATCCTCGGACCT	CCATCGGAGTTGCTCTCCA
ABCG2	CAGGTGGAGGCAAATCTTCGT	ACCCTGTTAATCCGTTCTGTTT
β -actin	ACAGAGCCTCGCCTTTGC	GCGGCGATATCATCATCC

1.4 MTS 检测 NCTD 和 PTX 对 CSC 增殖的影响

细胞稀释后以 1×10^4 /孔接种于 96 孔培养板, 加入浓度梯度为 200、100、50、25、12.5、6.75 μ mol/L 的 NCTD 或浓度梯度为 320、160、80、40、20、10 nmol/L 的 PTX, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 24 h, 加入 10% MTS (质量浓度为 5 mg/mL) 溶液继续培养 1 h 后, 酶联免疫检测仪检测 490 nm 波长每孔吸光度 (A) 值, 每组均设 3 个平行孔。

1.5 流式细胞仪检测凋亡

CSC 细胞成球培养基培养, 加入一定量的 NCTD 培养 24 h, Accutase 酶消化 20 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 结合缓冲液重悬, 加入 Annexin V 和 PI 室温避光孵育 10 min, 流式细胞仪检测其凋亡情况。

1.6 统计学分析

实验均重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 20 软件对数据进行统计学分析, 组间数据的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 成球细胞筛选

有限稀释法获得的单克隆细胞, 在成球培养基、低吸附培养条件下可筛选出成球细胞克隆。但是细胞增殖缓慢, 生长至 30 d 时使用 Accutase 酶消化后

转入 24 孔超低吸附培养板 (图 1), 再经约 30 d 后转至 6 孔超低吸附培养板扩大培养 (图 1)。经 3 个月筛选后, 获得相当数量的 CSC 细胞用于后续实验。

2.2 CSC 标志物检测及 NCTD 对 CSC 分化的影响

为明确经上述方法筛选培养 3 个月所获细胞的“干性”特征, 采用 qRT-PCR 法检测了“干性”分子基因 CD133、CD44、NANOG、OCT4、ABCG2 的表达情况。结果显示 (图 2), 以未经筛选的 HepG2 和 UMUC-3 细胞分别作为对照组, HepG2 与

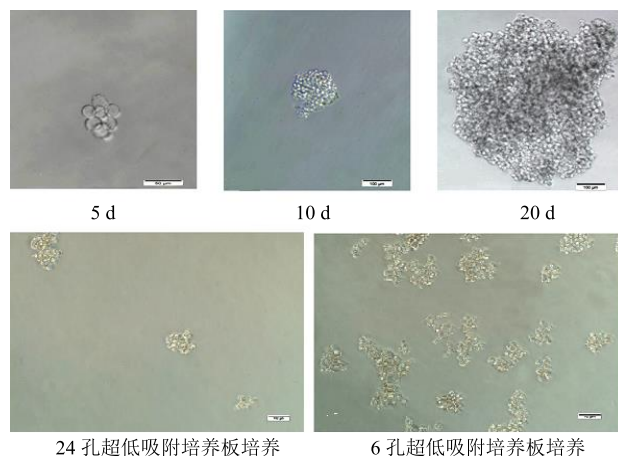


图 1 有限稀释法获取 HepG2-CSC

Fig. 1 Acquirement of CSC from HepG2 cell line by limiting dilution method

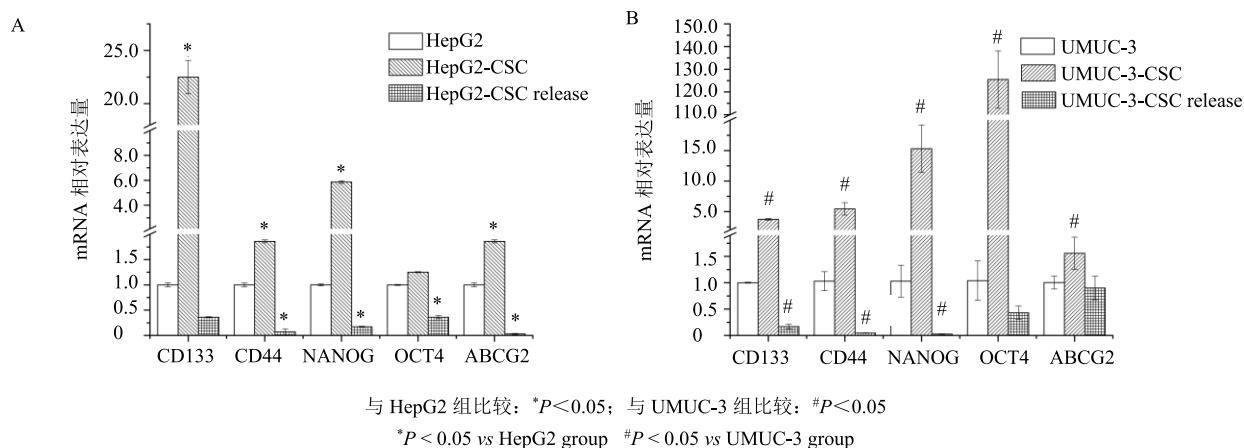


图 2 HepG2-CSC (A) 与 UMUC-3-CSC (B) 中 CD133、CD44、NANOG、OCT4、ABCG2 基因的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Expression of CD133, CD44, NANOG, OCT4, and ABCG2 genes in HepG2-CSC (A) and UMUC-3-CSC (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

UMUC-3 经有限稀释法筛选后,在成球培养条件下“干性”分子表达均显著升高,说明筛选获得的细胞具有“干性”特征,可以认为是 CSC。CSC 加入 10% FBS 释放 24 h 后 (CSC release),“干性”细胞比例显著下降,达到与筛选前母代肿瘤细胞相似甚至更低水平,说明在有血清条件下 CSC 会自行分化。

2.3 NCTD 和 PTX 对 CSC 增殖的影响

以未经筛选的 HepG2 和 UMUC-3 细胞分别作为对照组,以成球培养的 CSC 以及血清释放的 CSC (CSC release) 作为实验组,MTS 检测细胞增殖并计算其半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。结果显示 PTX 对 2 种 CSC 的 IC_{50} 显著高于 HepG2 和 UMUC-3 细胞(表 2)。说明筛选获得的 CSC 对 PTX 高度耐药。加入血清释放后,CSC 恢复对 PTX 的敏感性,其 IC_{50} 接近 HepG2 与 UMUC-3 对照组。这说明加入血清释放后,CSC 发生分化从而恢复其对 PTX 的敏感性。然而,NCTD 对 HepG2-CSC 和 UMUC-3-CSC 的 IC_{50} 显著低于 HepG2 和 UMUC-3 细胞,说明 CSC 对 NCTD 耐药程度降低。值得注意的是,加入血清释放后 CSC 对 NCTD 的耐药性升高甚至高于筛选前母代肿瘤细胞。

2.4 NCTD 对 CSC 分化的影响

为明确 NCTD 对筛选培养 3 个月所获细胞的“干性”特征的影响,以 HepG2-CSC 和 UMUC-3-CSC 中分别加入 25、50 $\mu\text{mol/L}$ NCTD 培养 24 h 后,采用 qRT-PCR 法检测了“干性”分子基因 CD133、CD44、NANOG、OCT4、ABCG2 的表达情况。结果显示(图 3),加入 NCTD 后,与 CSC 相比,仅 HepG2-CSC 的“干性”分子 CD44 和 OCT4 表达显著升高,UMUC-3-CSC 的 OCT4 表达显著降低,

表 2 NCTD 和 PTX 对 CSC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of NCTD and PTX on proliferation of CSC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IC_{50}	
	PTX/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NCTD/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
HepG2	60.9 $\pm$ 5.7	133.9 $\pm$ 15.1
HepG2-CSC	> 500*	22.2 $\pm$ 1.8*
HepG2-CSC release	86.7 $\pm$ 2.5	270.5 $\pm$ 19.7*
UMUC-3	63.0 $\pm$ 4.8	110.6 $\pm$ 3.7
UMUC-3-CSC	> 500#	78.7 $\pm$ 2.0#
UMUC-3-CSC release	113.5 $\pm$ 12.9#	> 200#

与 HepG2 组比较: * $P < 0.05$; 与 UMUC-3 组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs HepG2 group # $P < 0.05$ vs UMUC-3 group

其他“干性”分子的表达均无统计学差异,说明在 NCTD 对 CSC 分化没有直接影响。在 HepG2-CSC release 和 UMUC-3-CSC release 组分别加入 25、50 $\mu\text{mol/L}$ NCTD 后,干细胞标志物表达显著降低,但与图 2 中 CSC release 组相比不具有统计学差异,说明影响 CSC 分化的主要因素是血清释放。

2.5 NCTD 对 CSC 细胞凋亡的影响

收集 HepG2-CSC、UMUC-3-CSC 和经过含 25 $\mu\text{mol/L}$ 或 50 $\mu\text{mol/L}$ NCTD 无血清培养基培养 24 h 的 CSC (CSC+NCTD),用 Annexin V 和 PI 荧光标记,流式细胞仪检测其凋亡情况。结果显示(图 4),对照组 HepG2-CSC 和 UMUC-3-CSC 的凋亡率分别为 (35.00 $\pm$ 0.89)% 和 (15.11 $\pm$ 0.78)%, NCTD 处理后 HepG2-CSC 和 UMUC-3-CSC 的凋亡率分别为 (70.54 $\pm$ 0.26)%、(29.93 $\pm$ 1.32)%,显著高于对照组。结果表明,NCTD 能直接促使 CSC 凋亡,起到杀伤 CSC 的作用。

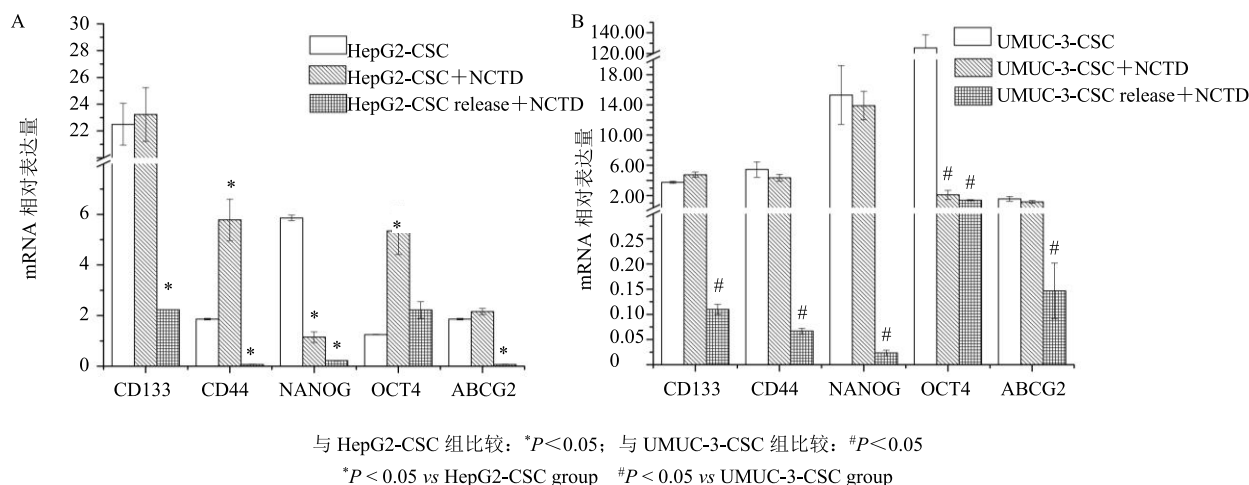


图3 NCTD 对 HepG2-CSC (A) 与 UMUC-3-CSC (B) 中 CD133、CD44、NANOG、OCT4、ABCG2 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Fig. 3 Effects of NCTD on expression of CD133, CD44, NANOG, OCT4 and ABCG2 in HepG2-CSC (A) and UMUC-3-CSC (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

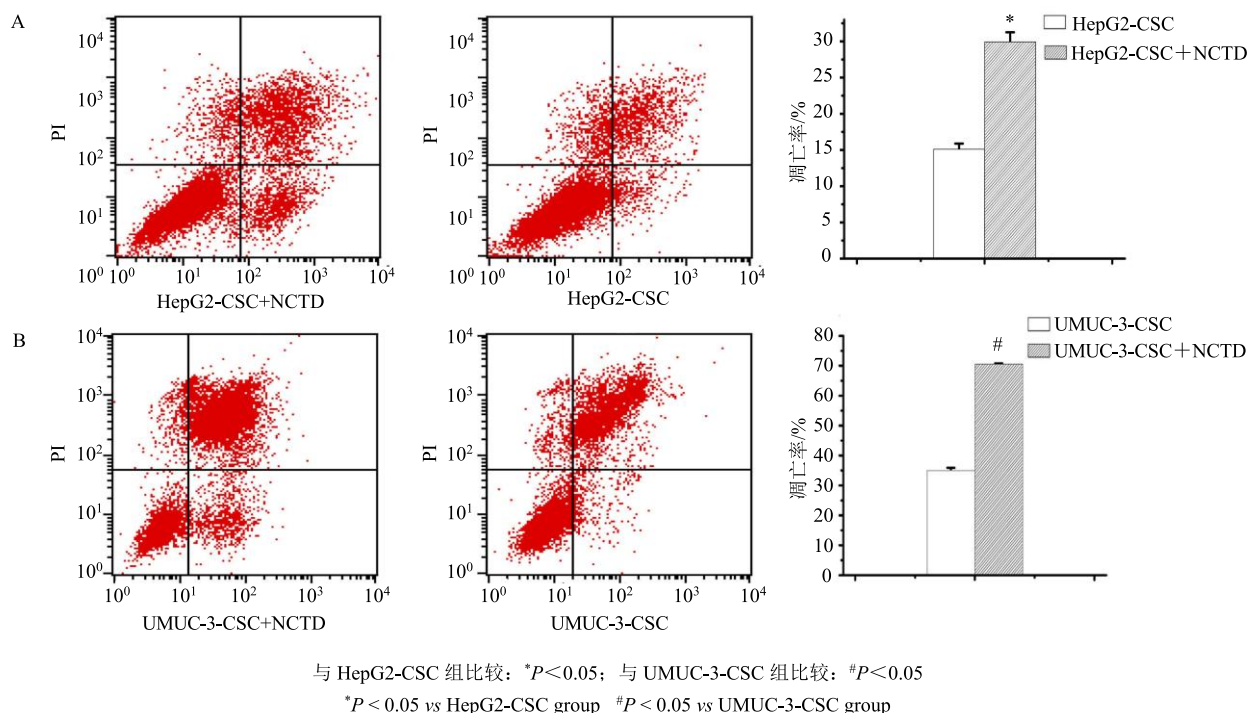


图4 NCTD 对 HepG2-CSC (A) 与 UMUC-3-CSC (B) 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Fig. 4 NCTD induces apoptosis of HepG2-CSC (A) and UMUC-3-CSC (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

CSC 可以耐受传统放化疗杀伤, 在肿瘤恶性增殖、复发、转移等多个方面中起着决定性作用^[7-9]。如何有效抑制或清除 CSC 成为了当今抗肿瘤领域的研究热点。本研究采用有限稀释法获取具有“干性”标志的 CSC。在成球培养条件下, CSC 对紫杉醇高度耐药, 而 NCTD 可诱导 CSC 凋亡, 有效杀伤 CSC。另外。本研究还证实 NCTD 对 CSC 的分

化没有显著影响, 其杀伤作用可能是药物对 CSC 的直接毒性。

如何获取 CSC 是研究 CSC 的先决条件, 获得方法主要有流式细胞术分选^[10]、化疗药物耐药株筛选^[11]、血清饥饿筛选^[12]、有限稀释法等^[13]。CSC 比例很低, 只占肿瘤细胞的 1% 左右, 使用流式分选筛选效率不高, 而且对试剂仪器都有较高要求, 不易于普遍开展; 化疗药物筛选法简单易操作, 但是

不可避免地使细胞受到化疗药物的影响。目前 CSC 大多是从原代细胞中筛选得来, 这为获得 CSC 特别是人源的 CSC 增加了难度。本研究采用有限稀释法, 从 HepG2 和 UMUC-3 细胞中筛选获得成球生长的细胞克隆。通过检测“干性”基因 CD133、CD44、NANOG、OCT4、ABCG2 的表达^[14], 鉴定了所筛选出的肿瘤细胞为具备“干性”特征的 CSC。这种方法可获取相当数量的细胞用于实验研究, 为 CSC 相关研究提供了一种简单高效的筛选方法。

NCTD 是传统抗肿瘤药物, 但其作用机制尚未明确, NCTD 对 CSC 作用的研究也鲜有报道。有研究报道称 NCTD 能提高 CSC 在完全培养基中对化疗药物的敏感性^[15]。本研究发现, NCTD 可有效杀伤 CSC, 且其毒性显著高于对“非干性”肿瘤细胞的毒性。但是 CSC 在血清中释放后, NCTD 细胞毒性降低。与之相反, 紫杉醇对 CSC 毒性显著降低, 血清释放后细胞恢复药物敏感性。PTX 是微管毒性药物, 主要作用于有丝分裂细胞。有报道称 CSC 大多处于静止休眠期^[16], 本研究中的 CSC 也呈现增殖缓慢的特性, 因此对 PTX 有较高的耐受性。这些结果说明, NCTD 可有效杀伤处于静止休眠期的 CSC。

本研究发现, CSC 血清释放后“干性”基因表达下调, 说明 CSC 可自行分化。NCTD 对 CSC 血清释放前后“干性”基因的表达均没有显著影响。说明 NCTD 不是通过诱导分化杀伤 CSC, 而是对未分化的 CSC 有较强的毒性作用。流式细胞术结果表明, 在无血清成球培养条件下, NCTD 作用于 CSC 后凋亡比例显著提高, 说明 NCTD 可诱导未分化的 CSC 凋亡。

综上所述, 通过有限稀释法有效获得 CSC, NCTD 对 CSC 有显著的杀伤作用, 对 CSC 的分化没有显著影响, 可通过诱导凋亡杀伤未分化的 CSC, 但 NCTD 杀伤 CSC 的具体分子机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Clevers H. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges [J]. *Nat Med*, 2011, 17(3): 313-319.
- [2] Enderling H. Cancer stem cells and tumor dormancy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 734: 55-71.

- [3] Zhang S, Li G, Ma X, *et al.* Norcantharidin enhances ABT-737-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by transcriptional repression of Mcl-1 [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(9): 1803-1809.
- [4] Yu C C, Ko F Y, Yu C S, *et al.* Norcantharidin triggers cell death and DNA damage through S-phase arrest and ROS-modulated apoptotic pathways in TSGH 8301 human urinary bladder carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(3): 1050-1060.
- [5] Xiao W, Dai B, Zhu Y, *et al.* Norcantharidin induces autophagy-related prostate cancer cell death through Beclin-1 upregulation by miR-129-5p suppression [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(12): 15643-15648.
- [6] 杜恒飞, 于路佳, 蒙艳凤, 等. 去甲斑蝥素抗骨髓瘤作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2479-2483.
- [7] Chan K S, Volkmer J P, Weissman I. Cancer stem cells in bladder cancer: a revisited and evolving concept [J]. *Curr Opin Urol*, 2010, 20(5): 393-397.
- [8] Bapat S A. Evolution of cancer stem cells [J]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17(3): 204-213.
- [9] Elliott A M, Adams J, Al-Hajj M. The ABCs of cancer stem cell drug resistance [J]. *Idrugs*, 2010, 13(9): 632-635.
- [10] Orecchioni S, Bertolini F. Characterization of Cancer Stem Cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1464: 49-62.
- [11] Yin H, Wang Y, Chen W, *et al.* Drug-resistant CXCR4-positive cells have the molecular characteristics of EMT in NSCLC [J]. *Gene*, 2016, 594(1): 23-29.
- [12] Gedye C, Ailles L. Isolation and characterization of cancer stem cells *in vitro* [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 946: 181-204.
- [13] Zhu Y T, Pang S Y, Luo Y, *et al.* A modified method by differential adhesion for enrichment of bladder cancer stem cells [J]. *Int Braz J Urol*, 2016, 42(4): 817-824.
- [14] Akhavan-Niaki H, Samadani A A. Molecular insight in gastric cancer induction: An overview of cancer stemness genes [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 68(3): 463-473.
- [15] Wang W J, Wu M Y, Shen M, *et al.* Cantharidin and norcantharidin impair stemness of pancreatic cancer cells by repressing the beta-catenin pathway and strengthen the cytotoxicity of gemcitabine and erlotinib [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5): 1912-1922.
- [16] Koshkin S, Danilova A, Raskin G, *et al.* Primary cultures of human colon cancer as a model to study cancer stem cells [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 12833-12842.