

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.22.001

文章编号: 1005-8982 (2018) 22-0001-06

基础研究 · 论著

胃癌细胞表面 ALDH1 表达及 ALDH1⁺ 细胞的“干性”鉴定*

王一¹, 刘丹丹¹, 向勇平², 刘理金², 姜伟¹, 李锦毅¹

(武警总医院 1. 临床教研室, 2. 医学实验中心, 北京 100039)

摘要: **目的** 检测胃癌细胞系的乙醛脱氢酶 1 (ALDH1) 表达, 鉴定 ALDH1⁺ 细胞生物学特性。**方法** 采用 Aldefluor 实验方法, 通过流式细胞仪检测胃癌细胞系 MGC-803、BGC-823 及 MKN-45 中 ALDH1 的活性表达; 选取 MGC-803 细胞系, 分选出 ALDH1⁺ 和 ALDH1⁻ 细胞, 进行分化潜能、平板克隆、耐药性、干性相关基因检测及裸鼠成瘤实验。**结果** MGC-803、BGC-823 及 MKN-45 中 ALDH1 的表达比例为 (13.00 ± 1.34) %、(5.80 ± 2.15) % 及 (36.5 ± 5.4) %; 分选出 ALDH1⁺、ALDH1⁻ 细胞组, 含血清培养 1 周后, ALDH1⁺ 的表达比例为 21.2% 和 3.9%, ALDH1⁺ 细胞具有不对称分裂能力; ALDH1⁺ 细胞组克隆形成率为 (42.63 ± 0.63) %, 高于 ALDH1⁻ 细胞组 (18.5 ± 2.04) %, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 相同氟尿嘧啶浓度下, ALDH1⁺ 组生长抑制率均低于 ALDH1⁻ 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 接种 5×10^3 个 ALDH1⁺ 及 ALDH1⁻ 细胞于小鼠皮下成瘤, 与 ALDH1⁻ 细胞比较, ALDH1⁺ 细胞成瘤率高。两组肿瘤体积比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 胃癌细胞系普遍存在 ALDH1 的活性表达, ALDH1⁺ 细胞具有干细胞生物学特性, 可能提供胃癌新的诊断和治疗途径。

关键词: 胃癌细胞系; ALDH1; ALDH1⁺ 细胞; ALDH1⁻ 细胞

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Expression of ALDH1 on surface of gastric cancer cells and identification of stem cell characteristics of ALDH1⁺ cells*

Yi Wang¹, Dan-dan Liu¹, Yong-ping Xiang², Li-jin Liu², Wei Jiang¹, Jin-yi Li¹

(1. Clinical Teaching and Research Section, 2. Medical Experimental Center, the General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To detect the expression of ALDH1 in gastric cancer cell lines and to identify the biological characteristics of ALDH1⁺ cells. **Methods** Aldefluor assay was used to detect the expression of ALDH1 in gastric cancer cell lines MGC-803, BGC-823 and MKN-45 by flow cytometry. MGC-803 cell line was selected to isolate ALDH1⁺ and ALDH1⁻ cells, then the differentiation potential, plate cloning, drug resistance, stemness genes and tumorigenicity of the cells were studied. **Results** The positive expression ratio of ALDH1 in MGC-803, BGC-823 and MKN-45 cells was (13.00 ± 1.34)%, (5.80 ± 2.15)% and (36.50 ± 5.40)% respectively. ALDH1⁺ and ALDH1⁻ cells were sorted and cultured for 1 week, the positive expression ratio of ALDH1 was 21.2% and 3.9% respectively. The colony formation rate was (42.63 ± 0.63)% in the ALDH1⁺ cell group, which was significantly higher than (18.50 ± 2.04)% in the ALDH1⁻ cell group ($P < 0.05$). Under the same 5-FU concentration, the growth inhibition rate of the ALDH1⁺ cell group was lower than that of ALDH1⁻ cell group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). With subcutaneous inoculation of 5×10^3 ALDH1⁺ and ALDH1⁻ cells in mice, ALDH1⁺ cells had a higher rate of tumor formation than ALDH1⁻ cells, the difference of the tumor volume between the two groups was

收稿日期: 2017-12-15

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81273980)

[通信作者] 李锦毅, E-mail: linjinyi.li@vip.sina.com

statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** ALDH1 is actively expressed in gastric cancer cell lines. ALDH1⁺ cells have stem cell properties, which may provide a new diagnostic and therapeutic approach for gastric cancer.

Keywords: gastric cancer cell line, ALDH1, ALDH1⁺ cell, ALDH1⁻ cell

ALDH1 属于乙醛脱氢酶 (ALDH) 家族, 是催化细胞内乙醛氧化为乙酸、视黄醇氧化为视黄酸的细胞溶质酶^[1]。ALDH1 是 19 种 ALDH 同型异构体中较重要的 1 个亚型。肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 是肿瘤中一小部分具有自我更新和分化潜能的细胞, 具备干细胞和肿瘤细胞的特征^[2], 肿瘤干细胞在急性髓性白血病中首次被发现^[3], 之后在神经系统肿瘤、结肠癌、前列腺癌、肝癌、乳腺癌、黑色素瘤、肺癌、胃癌等肿瘤中发现肿瘤干细胞存在^[4]。ALDH1 高表达是 CSC 及正常干细胞的共同特征, 2007 年, GINESTIER 等^[5]首次利用 ALDH1 在乳腺癌组织中发现乳腺癌干细胞, 之后 ALDH1 也被证明在其他实体瘤, 如肺癌^[6]、头颈部肿瘤^[7]、膀胱癌^[8]、卵巢癌^[9]、结肠癌^[10]中可用于肿瘤干细胞的分离和鉴定。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

细胞系: MGC-803 和 MKN-45 由中国协和医科大学细胞中心提供, BGC-823 由中国人民解放军军事医学科学院提供。实验动物: BALB/c-nu 小鼠, 雌性, 4 周龄, 购自中国医学科学院实验动物研究所。主要试剂: DMEM、RPMI 1640、DMEM/F12 培养基、N2、B27 购自美国 Gibco 公司, 重组人表皮细胞生长因子 (recombinant human epidermal growth factor, EGF)、重组人碱性成纤维生长因子 (recombinant human basic fibroblast growth factor, bFGF) 购自美国 Peprotech 公司, 胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司, 胰酶、四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自美国 Amresco 公司, 青霉素、链霉素购自山东鲁抗医药股份有限公司, 二甲基亚砷 (DMSO)、氟尿嘧啶购自美国 Sigma 公司, 结晶紫购自上海碧云天生物技术有限公司, Aldefluor 试剂盒购自加拿大 Stem Cell 公司, 普通和倒置光学显微镜 (日本 Nikon 公司), 酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Rad 公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及 ALDH1 表达检测 MGC-803 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, BGC-823 和 MKN-45 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 以上细胞

置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。MGC-803 和 BGC-823 用 0.25% 胰酶消化传代, MKN-45 用 0.05% 胰酶加 0.02% EDTA 消化传代。分选后的 ALDH1⁺、ALDH1⁻ 细胞用无血清培养液 (含 0.5% N2、1% B27、20 ng/ml EGF 及 10 ng/ml bFGF 的 DMEM/F12 培养基), 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。

选取对数生长期细胞, 制备浓度为 1×10^6 个/ml 单细胞悬液, 实验组加入活化的 Aldefluor 试剂 5 μl/ml, ALDH 能将 BAAA 转化为绿色发光物 BAA, 通过专用通道分选带绿色荧光 BAA 细胞^[11]; 对照组加入特殊抑制剂 DEAB 50 μl/ml, DEAB 能抑制 ALDH 把 BAAA 转化为 BAA, 作为阴性对照。反应 30 min。1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, Aldefluor 缓冲液重悬, 上机检测, 检测前加碘化丙啶 (PI) 染色标记死亡细胞。

1.2.2 ALDH1⁺ 细胞分化 (不对称分裂) 能力检测

MGC-803 及分选得到 ALDH1⁺ 细胞和 ALDH1⁻ 细胞, 以 5×10^4 个/ml 接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。1 周后流式细胞仪检测 ALDH1⁺ 所占比例情况。

1.2.3 平板克隆实验

ALDH1⁺ 和 ALDH1⁻ 细胞分别以 200 个细胞/孔接种于 6 孔板, 用无血清培养液, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 10 ~ 14 d, 至细胞克隆超过 50 个细胞时结束培养, 100% 甲醇室温固定, 结晶紫室温染色后流水冲洗染料, 计数每孔克隆形成数。克隆形成率 = 每孔克隆形成数 / 每孔接种细胞数 × 100%。

1.2.4 耐药实验

分选获得的 ALDH1⁺ 及 ALDH1⁻ 细胞分为两组, 两组分别以 3×10^3 个细胞/孔接种于 96 孔板, 无血清培养液培养 24 h 后分别加入 1 μg/ml、2、5、15 和 25 μg/ml 的氟尿嘧啶, 每个浓度设 3 ~ 5 个复孔, 以不加药物的复孔为对照组, 培养 24 h 后, MTT 法检测各组 OD 值, 以只加 DMSO 孔为调零孔。细胞生长抑制率 = $[1 - (\text{实验组平均 OD 值} - \text{调零孔 OD 值}) / (\text{对照组平均 OD 值} - \text{调零孔 OD 值})] \times 100\%$ 。

1.2.5 致瘤实验

ALDH1⁺ 及 ALDH1⁻ 细胞, 悬浮于 PBS 缓冲液与基质胶 (1 : 1) 混合液中, 5×10^3 细胞数量级的 ALDH1⁺ 细胞及 ALDH1⁻ 细胞皮下接种于 BALB/c-nu 小鼠, 每组 4 只小鼠。观察出瘤情况, 测

量瘤体长短径, 记录瘤体出现时间及个数。待瘤体直径超过 1 cm 时处死小鼠, 取出瘤体测量体积, 瘤体体积 = 1/2 长径 × 短径 × 短径。取肿瘤组织进行病理学检查。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 组间比较用 *t* 检验, 计数资料以频数 (%) 表示, 率的比较用 χ^2 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌细胞系 ALDH1⁺ 表达

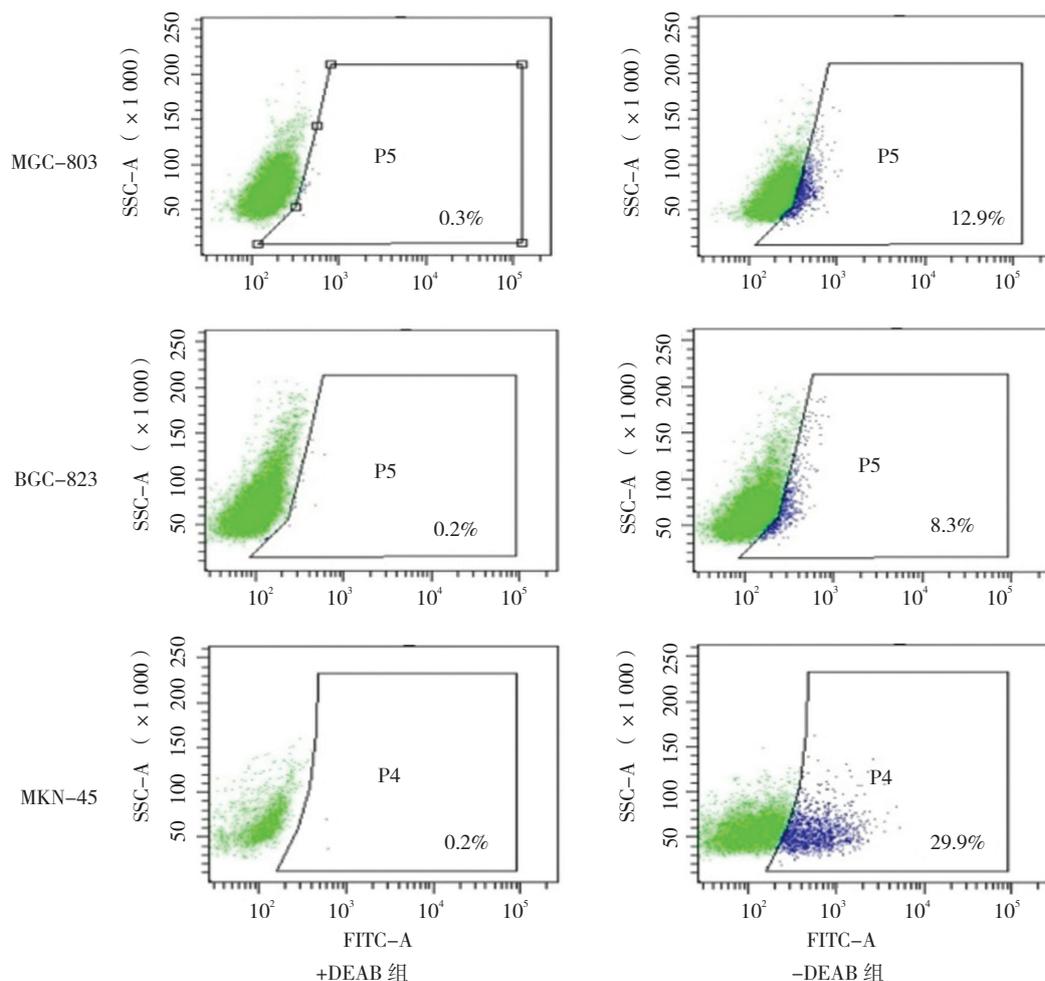
流式细胞仪检测结果显示, 胃癌细胞系 MGC-803、BGC-823、MKN-45 中 ALDH1⁺ 表达比例为 (13.00 ± 1.34) %、(5.80 ± 2.15) % 及 (36.5 ± 5.4) %, 见图 1。

2.2 ALDH1⁺ 细胞不对称分裂能力

MGC-803 细胞 ALDH1⁺ 表达率为 11.5%, 分选出的 ALDH1⁺、ALDH1⁻ 细胞培养 1 周后, ALDH1⁺ 表达率分别为 21.2% 和 3.9%。ALDH1⁺ 细胞组培养后 ALDH1⁺ 表达率下降至 21.2%, 表明 ALDH1⁺ 细胞在生长过程中, 通过不对称分裂分化 ALDH1⁻ 细胞, 形成异质性。ALDH1⁻ 细胞组也检测 ALDH1⁺ 表达, 可能是由于细胞的不均一性、培养条件和处于不同细胞周期等因素, 所以 ALDH1 不可能一次就把所有干细胞都标记出来, 分选后的细胞再次检测依然会有阳性细胞。见图 2。

2.3 ALDH1⁺ 细胞体外克隆形成能力

平板克隆实验结果见图 3, ALDH1⁺ 组克隆形成率为 (42.63 ± 0.63) %, ALDH1⁻ 组克隆形成率为 (18.50 ± 2.04) %, 两组比较差异有统计学意义 (*t* = 33.597, *P* = 0.000)。培养 14 d 后, ALDH1⁺ 组克隆形成



+DEAB 组均为对照组; -DEAB 组均为实验组

图 1 胃癌细胞系 ALDH1⁺ 活性表达

数比 ALDH1⁻ 组多；染色前分别在显微镜下观察到的 ALDH1⁺ 和 ALDH1⁻ 组的克隆球，ALDH1⁺ 组克隆球大于 ALDH1⁻ 组，且前者的克隆球内细胞排列紧密，中心处尤为突出，后者细胞间排列疏松。见图 4。

2.4 ALDH1⁺ 细胞耐药性

检测氟尿嘧啶对 ALDH1⁺ 及 ALDH1⁻ 细胞的生长

抑制率，以生长抑制率反应细胞对药物的耐受性，即生长抑制率越低耐药性越强。氟尿嘧啶作用细胞，每种药物浓度下 ALDH1⁺ 组与 ALDH1⁻ 组，1 μg/ml : (6.12 ± 4.19) % vs (14.74 ± 7.51) %、2 μg/ml (16.4 ± 2.89) % vs (34.95 ± 9.7) %、5 μg/ml : (30.06 ± 6.96) % vs (48.57 ± 5.8) %、15 μg/ml :

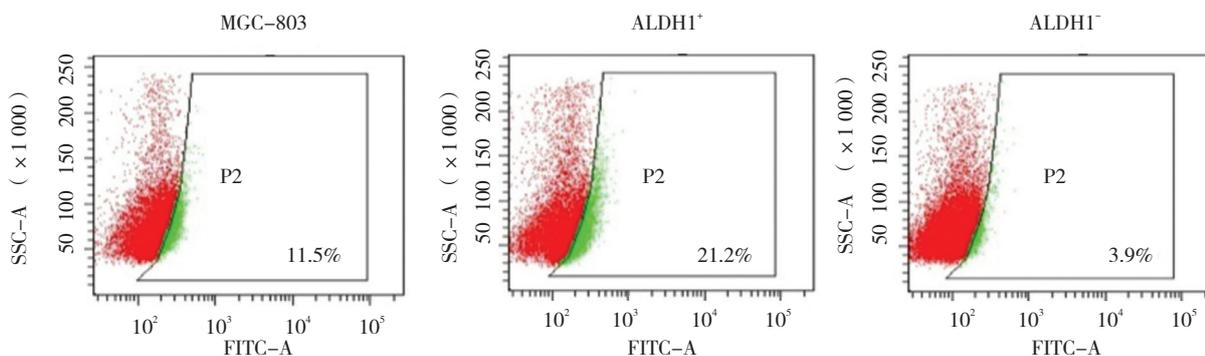


图 2 MGC-803 及 ALDH1⁺、ALDH1⁻ 细胞培养后 ALDH1⁺ 表达比例

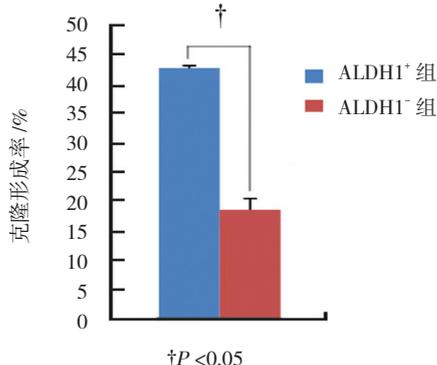
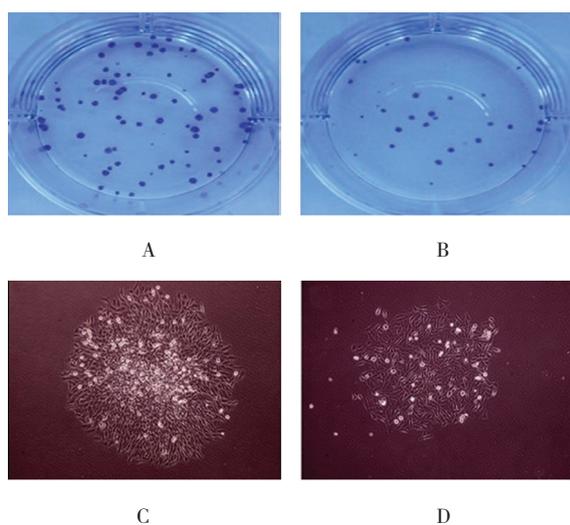


图 3 ALDH1⁺ 组及 ALDH1⁻ 组克隆形成率



A: 染色后 ALDH1⁺ 组克隆形成数; B: 染色后 ALDH1⁻ 组克隆形成数; C: 镜下 ALDH1⁺ 组形成的克隆球; D: 镜下 ALDH1⁻ 组形成的克隆球

图 4 平板克隆形成及克隆形态

(48.25 ± 4.35) % vs (60.15 ± 9.45) %、25 μg/ml : (56.81 ± 16.39) % vs (70.18 ± 12.4) %，ALDH1⁺ 组生长抑制率均低于 ALDH1⁻ 组，差异有统计学意义 (P < 0.05)。见图 5。

2.5 ALDH1⁺ 细胞致瘤能力

致瘤实验结果见附表，接种 5 × 10³ 细胞，第 10 天 ALDH1⁺ 组全部致瘤，致瘤率为 100%，ALDH1⁻ 组致瘤率为 25%，至实验结束时的致瘤率为 50%；见图 6。5 × 10³ ALDH1⁺ 细胞组肿瘤体积为 (112.90 ± 72.20) mm³，与 ALDH1⁻ 细胞组 (20.80 ± 26.70) mm³ 比较，差异有统计学意义 (P < 0.05)。肿瘤经中国医学科学院肿瘤医院病理科鉴定为肿瘤组织，见图 7。

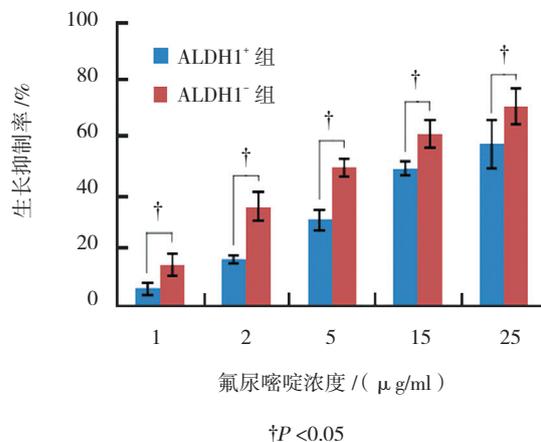


图 5 两组生长抑制率比较

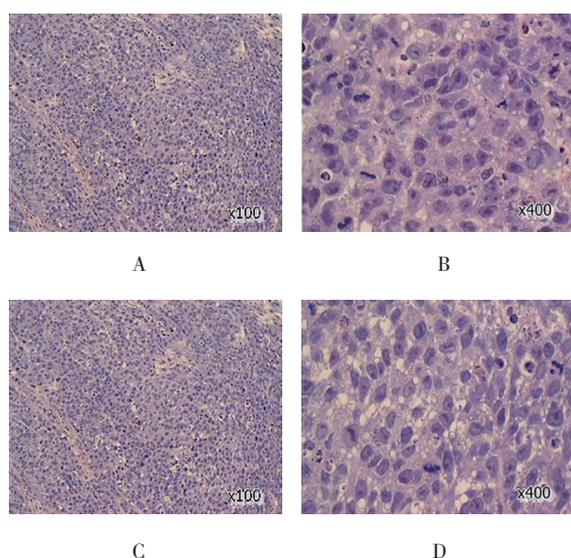
附表 接种 5×10^3 个细胞数 ALDH1⁺ 组和 ALDH1⁻ 组小鼠成瘤数

组别	接种细胞数 / 个	接种后时间 / d				
		10	12	15	24	30
ALDH1 ⁺ 组	5×10^3	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
ALDH1 ⁻ 组	5×10^3	1/4	2/4	2/4	2/4	2/4



第 1 排: ALDH1⁺ 细胞所形成的肿瘤; 第 2 排: ALDH1⁻ 细胞所形成的肿瘤

图 6 实验结束时瘤块



A: ALDH1⁺ 组 ($\times 100$); B: ALDH1⁺ 组 ($\times 400$); C: ALDH1⁻ 组 ($\times 100$); D: ALDH1⁻ 组 ($\times 400$)

图 7 肿瘤病理图 (HE 染色)

3 讨论

CSC 被认为是肿瘤发生、演变、转移、复发的“种子”, 大量研究证实 CSC 与放化疗耐受及患者预后差密切相关^[12-13]。因此能否精确分离出肿瘤干细胞, 用于肿瘤诊断和靶向治疗成为研究的热点和难点。目前常用肿瘤干细胞表面标志物来分离 CSC, 分为表面标志物和功能标志物^[14-15], 如胃癌干细胞表面标志物有 CD44^[16]、CD133^[17]、OCT4 等^[18]。本实验验证 ALDH1 在胃癌细胞中的表达及是否可作为胃癌干细

胞标志物。

本实验检测到胃癌细胞系 MGC-803、BGC-823 及 MKN-45 中有 ALDH1⁺ 的活性表达。选取 BGC-823 分选出 ALDH1⁺ 和 ALDH1⁻ 细胞进行生物学特性观察。由 ALDH1⁺ 组和 ALDH1⁻ 组细胞含血清培养 1 周后 ALDH1⁺ 的活性表达比例发现, ALDH1⁺ 组中 ALDH1⁺ 细胞分化出 ALDH1⁻ 细胞, 分裂后的细胞中 ALDH1⁺ 表达比例接近 BGC-823 亲本细胞。说明 ALDH1⁺ 细胞具有不对称分裂能力。ALDH1⁻ 组细胞培养后也出现小部分 ALDH1⁺ 细胞。考虑是由于细胞的不均一性、培养条件或处于不同细胞周期等因素, 所以 ALDH1 不能一次就把 ALDH1⁺ 细胞分选彻底。平板克隆实验结果表明 ALDH1⁺ 细胞体外克隆能力强于 ALDH1⁻ 细胞, 表现出更强的自我更新能力。对化疗药物的耐药性是肿瘤干细胞的另一生物学特性, 本实验通过经典化疗药氟尿嘧啶来体现对细胞的生长抑制率, 不同药物浓度下, ALDH1⁺ 组生长抑制率均低于 ALDH1⁻ 组, 表明 ALDH1⁺ 细胞的耐药性强于 ALDH1⁻ 细胞。体外成瘤实验是验证肿瘤干细胞的金标准^[2]。结果显示与 ALDH1⁻ 细胞比较, ALDH1⁺ 细胞致瘤率高、出瘤时间早、瘤体大、生长速度快。

从分化潜能、克隆形成能力、耐药性及致瘤能力方面证实胃癌细胞系中 ALDH1⁺ 细胞具有干细胞特性, 可将 ALDH1 作为分选胃癌干细胞的标志物。研究发现^[12], 肿瘤干细胞在肿瘤中占一小部分, 仅占 0.1% ~ 1.0%。实验中 3 种胃癌细胞系 ALDH1⁺ 表达均不低, 尤其 MKN-45。说明 ALDH1 作为标志物的特异性不强, 可能存在与胃癌细胞共表达。提示需要对 ALDH1⁺ 细胞进一步研究。本实验表明, ALDH1⁺ 在胃癌细胞中的表达及 ALDH1⁺ 细胞的干细胞样特性。对胃癌干细胞的分选及基础研究有重大意义, 对胃癌的诊断及靶向治疗提供新的思路和理论基础。

参考文献:

- [1] CLARK, DAVID W, PALLE K. Aldehyde dehydrogenases in cancer stem cells: potential as therapeutic targets[J]. Ann Transl Med, 2016, 4(24): 518.

- [2] CIUREA M E, GEORGESCU A M, PURCARU S O, et al. Cancer stem cells: biological functions and therapeutically targeting[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(5): 8169-8185.
- [3] LANGENKAMP U, SIEGLER U, JÖRGER S, et al. Human acute myeloid leukemia CD34⁺ CD38⁻ stem cells are susceptible to allorecognition and lysis by single KIR-expressing natural killer cells[J]. *Haematologica*, 2009, 94(11): 1590-1594.
- [4] 孟雪萍, 王玉平, 郭庆红, 等. 胃癌干细胞研究进展 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2015, 24(10): 1166-1170.
- [5] GINESTIER C, MIN H H, CHARAFEJAUFFRET E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 555-567.
- [6] SERRANO D, BLEAU A M, FERNANDEZ-GARCIA I, et al. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10(1): 96.
- [7] CLAY M, TABOR M, OWEN J, et al. Single marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase[J]. *Head Neck*, 2010, 32(9): 1195.
- [8] SU Y, QIU Q, ZHANG X Q, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 a1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(2): 327-337.
- [9] LANDEN C N J R, GOODMAN B, KATRE A A, et al. Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(12): 3186.
- [10] HUANG E H, HYNES M J, ZHANG T, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3382.
- [11] MOREB J S, UCAR D, HAN S, et al. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH12) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance[J]. *Chem Biol Interact*, 2012, 195(1): 52-60.
- [12] CRUCERU M L, NEAGU M, DEMOULIN J B, et al. Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms[J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(10): 1218-1235.
- [13] MUMMERY C, WILMUT S I, STOLPE A V D, et al. Stem Cells in Cancer and Cancer Stem Cells, Stem Cells[M]. Elsevier Inc, 2011: 237-256.
- [14] 李霞, 徐桂芳, 张伟杰, 等. 胃癌干细胞的分离鉴定以及干细胞特性研究 [J]. *胃肠病学*, 2014, 19(9): 517-522.
- [15] 杜华, 师迎旭. 胃癌干细胞表面标记物的研究与最新进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(41): 6225-6232.
- [16] TAKAISHI S, OKUMURA T, TU S, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(5): 1006-1020.
- [17] NOSRATI A, NAGHSHVAR F, KHANARI S. Cancer stem cell markers CD44, CD133 in primary gastric adenocarcinoma[J]. *Int J Mol Cell Med*, 2014, 3(4): 279-286.
- [18] LIU J, MA L, XU J, et al. Spheroid body-forming cells in the human gastric cancer cell line MKN-45 possess cancer stem cell properties[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(2): 453.

(张蕾 编辑)