

# K562细胞株侧群细胞分离及耐药蛋白和细胞周期的表达\*

范瑞华<sup>1</sup>, 李惠民<sup>2</sup>, 郭殿选<sup>3</sup>, 高勇<sup>1</sup>, 陈小飞<sup>1</sup>

## Isolation of side population cells in leukemia K562 cell lines and the expression of resistance protein and cell cycle in two subpopulations

Fan Rui-hua<sup>1</sup>, Li Hui-min<sup>2</sup>, Guo Dian-xuan<sup>3</sup>, Gao Yong<sup>1</sup>, Chen Xiao-fei<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** It is possible that leukemia relapse is related with side population (SP) cells, which can escape cell cycles phase specific chemotherapeutic drugs.

**OBJECTIVE:** To isolate and preliminarily identify whether the human chronic myeloid leukemia cell line-K562 contains SP cells or not, and to further research K562 SP cells and study the expression of multidrug resistance proteins and DNA content in two subpopulations.

**METHODS:** Flow cytometry with UV excitation light was used to detect the percentage of SP cells in logarithmic growth period K562, which were then sorted by the fluorescence activating cell sorter, and then SP and non-SP subpopulations were collected. The expression of multidrug resistance proteins were examined by flow cytometry technique in two subpopulations. DNA content of two subpopulations was examined by flow cytometry.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The K562 cell line contained SP cells, and the proportion of SP cells was much lower. Although there were no differences between these two subpopulations in P-gp expression, ABCG2<sup>+</sup> cells expression in the SP subpopulation was significant higher than that in the non-SP subpopulation ( $P < 0.05$ ). The G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells in the K562 SP subpopulation accounted for about 80% of the total cells. According to the significant differences in the expression of MDR proteins between the SP subpopulation and the non-SP subpopulation, and the majority in a quiescent period, it is possible that leukemia stem cells are enriched in SP cells.

Fan RH, Li HM, Guo DX, Gao Y, Chen XF. Isolation of side population cells in leukemia K562 cell lines and the expression of resistance protein and cell cycle in two subpopulations. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(45): 8479-8482. [http://www.crter.cn http://en.zgclck.com]

### 摘要

**背景:** 血液肿瘤细胞中的侧群细胞能够逃避细胞周期化疗药物的作用,可能与白血病复发有关。

**目的:** 鉴定人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 中是否存在侧群细胞,并观察侧群细胞亚群与非侧群细胞亚群耐药蛋白、细胞周期表达的差异。

**方法:** 采用流式细胞术检测 K562 细胞株中是否存在侧群细胞;并分析 K562 侧群细胞和非侧群细胞两亚群间耐药蛋白 P-gp、ABCG2 以及细胞周期的表达情况。

**结果与结论:** K562 细胞株中均存在侧群细胞,这群细胞比例均少。侧群细胞亚群耐药蛋白 ABCG2 表达高于非侧群细胞亚群( $P < 0.05$ ),两亚群耐药蛋白 P-gp 中表达差异无显著性意义;侧群细胞亚群中 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞占 80%,非侧群细胞亚群中 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞占 43.7%。证实 K562 细胞株中确实存在较少比例的侧群细胞,其和主群细胞在耐药蛋白表达上有异质性,大部分处于静止期,可能富含和肿瘤耐药有关的白血病干细胞。

**关键词:** 白血病干细胞;侧群细胞;流式细胞术;耐药蛋白;细胞周期

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.45.026

范瑞华, 李惠民, 郭殿选, 高勇, 陈小飞. K562 细胞株侧群细胞分离及耐药蛋白和细胞周期的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(45):8479-8482. [http://www.crter.org http://cn.zgclck.com]

## 0 引言

近年来对干细胞和肿瘤研究的深入,已表明干细胞自我更新和肿瘤生成有惊人的相似之处,而且肿瘤中某些数量极少的细胞具有干细胞特性,提出了肿瘤干细胞学说<sup>[1-2]</sup>,认为肿瘤干细胞是肿瘤转移、复发和耐药的根源。越来越多的证据表明,在白血病中有一群可以逃避正常自我更新控制的白血病干细胞,它们不仅有和造血干细胞相似自我更新和分化潜能特点,还有高致瘤性、耐药性的特点<sup>[3]</sup>。

Setoguchi等<sup>[4-5]</sup>研究发现侧群细胞富含肿瘤干细胞,但将侧群细胞分选应用在血液系统肿瘤干细胞中的相关研究少,实验应用这种方法在分选出K562细胞株侧群细胞亚群和非侧群细胞亚群,再检测其耐药蛋白p-gp、ABCG2以及细胞周期等方面的差异,探讨侧群细胞和白血病耐药关系。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外对比观察。

**时间及地点:** 于2008-08/2010-08在云南

<sup>1</sup>Department of Oncology, First People's Hospital of Huaian, Huaian 223300, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Department of Hematology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650021, Yunnan Province, China; <sup>3</sup>Department of Gerontology, Second People's Hospital, Huaian 223300, Jiangsu Province, China

Fan Rui-hua★, Master, Attending physician, Department of Oncology, First People's Hospital of Huaian, Huaian 223300, Jiangsu Province, China fanruihuabaobao@163.com

Received: 2011-07-16  
Accepted: 2011-08-17

<sup>1</sup> 淮安市第一人民医院肿瘤内科, 江苏省淮安市 223300; <sup>2</sup> 昆明医学院第一附属医院血液内科, 云南省昆明市 650031; <sup>3</sup> 淮安市第二人民医院老年病科, 江苏省淮安市 223300

范瑞华★, 女, 1977年生, 山西省左权县人, 汉族; 2009年昆明医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事血液肿瘤的诊断和治疗研究。fanruihuabaobao@163.com

中图分类号:R394.2  
文献标识码:B  
文章编号:1673-8225 (2011)45-08479-04

收稿日期: 2011-07-16  
修回日期: 2011-08-17  
(20110713015/GW-W)

省肿瘤医院肿瘤研究所和淮安市第一人民医院中心实验室完成。

**材料:** 人慢性粒细胞白血病细胞株K562购自中科院上海细胞库。

**试剂与仪器:**

试剂及仪器	来源
胎牛血清	天津灏洋生物制品公司
RPMI-1640, 青、链霉素	Gibco 公司
Hoechst33342、二甲亚砜 (DMSO)、Verapamil	Sigma 公司
流式细胞仪 EPICS-ALTRA、EPICS-XL、无菌流式管和	Beckman Coulter 公司
抗体: P-gp、ABCG2、碘化丙啶	
医用无菌超净台、恒温水箱	苏州净化设备公司
二氧化碳恒温培养箱、-80 °C超低温冰箱、高速低温离心机	Thermo 公司
倒置相差显微镜、微量移液器	Olympus 公司
细胞计数板	上海求精生化试剂仪器有限公司
培养皿、培养瓶	江门生物技术有限公司
漩涡混合器	江苏海门麒麟医用仪器厂

**实验方法:**

**主要溶液的配制:** RPMI-1640培养基: RPMI-1640、胎牛血清、青、链霉素(1:100)临用时配置, 4 °C保存; PBS液: NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.448 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g溶于800 mL蒸馏水, HCl调节pH值至7.4, 定容至1 000 mL, 高压灭菌备用; 细胞冻存液: 将过滤后DMSO与胎牛血清按比例混合, 现配现用; Hoechst33342溶液(1 g/L): 为现配现用, Hoechst33342干粉2.5 mg+蒸馏水2.5 mL, 轻吹打, 充分溶解; Verapamil溶液(1 mol/mL): 为现配现用, Verapamil 2.5 mg+蒸馏水5 mL, 轻吹打, 充分溶解。

**侧群细胞预制和分选:** 将K562细胞培养于含体积分数10%胎牛血清, 0.2%谷氨酰胺的RPMI1640培养基, 常规条件孵育; 细胞预制和分选参照文末文献[4]的方法进行, 将K562分为2个细胞亚群, 分别称为K562侧群细胞及K562非侧群细胞。

**流式细胞仪检测K562侧群细胞及非侧群细胞耐药蛋白表达:** 荧光素FITC标记的anti-P-gp, PE标记的anti-ABCG2鼠抗人单克隆抗体, 抗体加样, 室温孵育20min, 10g/L多聚甲醛固定30 min, 上流式细胞仪EPICS-XL检测, 激发光波长为488 nm, 标记PE、FITC荧光素的检测波长分别为576 nm、520 nm。以不加任何抗体, 作为荧光表达阴性对照, 记录各样本阳性细胞表达率, 统计学分析K562细胞株各亚群细胞耐药蛋白P-gp、ABCG2的表达差异。

**流式细胞仪检测K562侧群细胞及非侧群细胞细胞周期:** 取单细胞悬液, 同时加入PI及透膜剂, 室温孵育20 min。10 g/L多聚甲醛固定, 上机检测。激发光波长为488 nm,

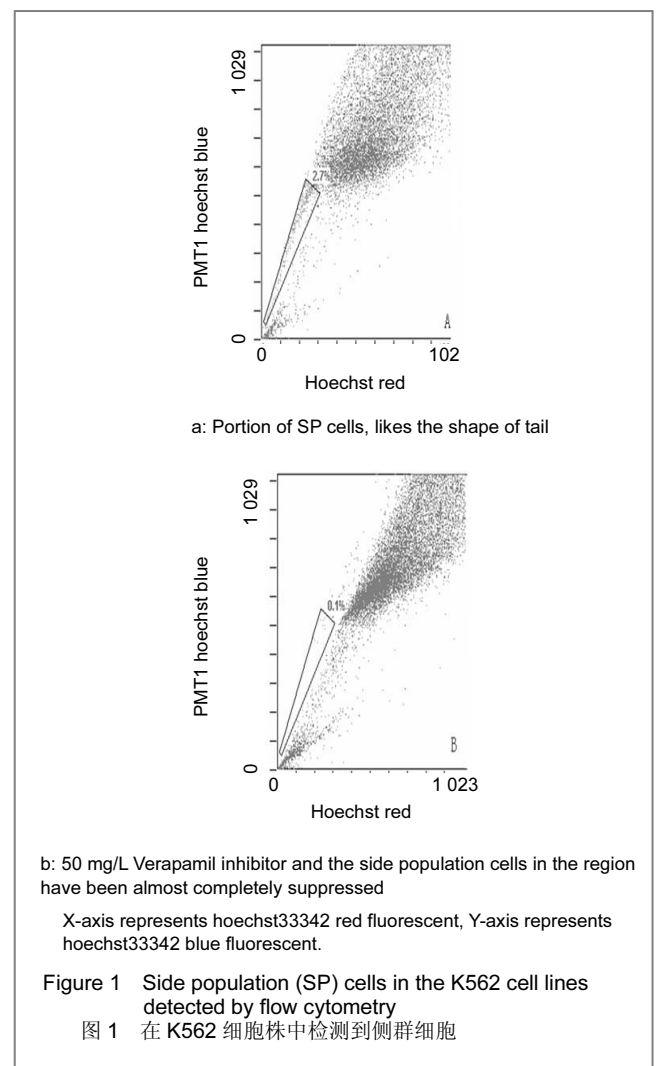
检测光波长为635~670 nm观察二倍体、四倍体峰, 记录并分析K562细胞株各样本亚群细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S和G<sub>2</sub>/M期比例的差异。

**主要观察指标:** K562细胞株侧群细胞的比例, 侧群细胞与非侧群细胞两亚群耐药蛋白和细胞周期的差异。

**统计学分析:** 正态分布计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用成组t检验, 采用SPSS 13.0统计软件进行数据的统计处理均以P < 0.05为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 K562细胞株中存在侧群细胞** 流式细胞仪检测在K562细胞株中存在侧群细胞, 这群细胞数量少, 比例为(2.7±0.5)%, 见图1。

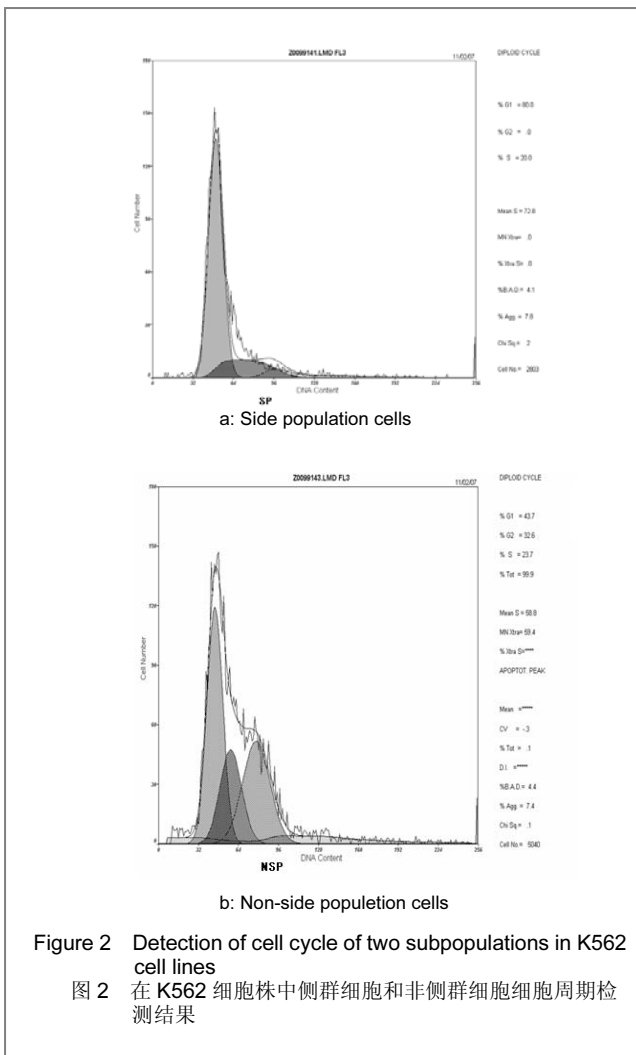


**2.2 K562细胞株中侧群细胞和非侧群细胞耐药蛋白的表达差异** P-gp在两细胞亚群中均为极低表达, 统计学分析在两亚群细胞中P-gp<sup>+</sup>细胞表达差异无显著性意义, 而侧群亚群中耐药蛋白ABCG2<sup>+</sup>细胞表达要明显高于非侧群亚群, 见表1。

表 1 K562 细胞株中侧群细胞和非侧群细胞耐药蛋白阳性表达率  
Table 1 Expression of multidrug resistance proteins of two subpopulations in K562 cell lines (x±s, n=3, %)

Cell subpopulations	P-gp	ABCG2
Side population	7.93±2.40	23.83±1.59
Non-side population	8.53±2.34	3.63±1.41
P	0.772	0.001

2.3 K562细胞株中侧群细胞和非侧群细胞细胞周期的表达差异 流式细胞仪检测两群细胞的细胞周期, 分析可见在侧群细胞亚群中G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>: 80.0%, S: 20.0%, G<sub>2</sub>/M: 0; 非侧群细胞亚群分别为G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>: 43.7%, S: 23.7%, G<sub>2</sub>/M: 32.6%, 可以看出大部分的K562侧群细胞处于静止期, 见图2。



### 3 讨论

近年来, 在血液系统肿瘤也开始侧群细胞的研究, 但发现并不是所有的细胞株中都可以检测到侧群细胞。

Patrawala等<sup>[6]</sup>在急性白血病细胞株HL-60的检测中未发现侧群细胞, 但是在HL-60中加了低浓度阿霉素后可以检测到侧群细胞, 并且随着阿霉素浓度的增加, HL-60细胞中侧群细胞比例也随着增加; 在急性早幼粒细胞白血病细胞株NB4中侧群细胞比例<1%<sup>[7]</sup>; 在多发骨髓瘤细胞株RPMI8226和NCI-H929中侧群细胞比例在0.8%~1.9%<sup>[8]</sup>; 在成人T细胞白血病/淋巴瘤12株细胞系中, 发现不是所有的成人T细胞白血病/淋巴瘤细胞株都能检测到侧群细胞, 其中有4个细胞株检测到侧群细胞存在, 分别是HUT-102(0.47%)、ATL-2(5.5%)、ATL-16T(0.93%)和ATL-43Tb(3.0%), 剩余的8个细胞株SezM3、ATL-35T、Sez627C、ED-40515、MT-1、SLB-1、MT-2以及MT-4中未检测到侧群细胞存在<sup>[9]</sup>。前期研究发现在4个细胞株NB4、Raji、K562/ADM和K562中存在侧群细胞, 这部分细胞确实比例少<sup>[10]</sup>。为了进一步认识K562细胞株侧群细胞, 实验分选K562两亚群细胞进行耐药初步研究。

Wulf等<sup>[11]</sup>在急性髓系白血病的研究中发现, 急性髓系白血病患者的侧群细胞对柔红霉素和米托蒽醌的泵出明显强于非侧群细胞, 说明侧群细胞可以逃避细胞周期化疗药物的作用, 可能和白血病复发有关。房伯俊等<sup>[12]</sup>发现, 与K562/VP16非侧群细胞比较, K562/VP16侧群细胞对伊马替尼的耐药性更强, 并且这种抗性几乎不能被多种多药耐药逆转剂逆转。本实验K562侧群细胞亚群中耐药蛋白ABCG2表达确实要高于非侧群细胞亚群。正常成体干细胞(包括造血干细胞)在通常情况下均处于细胞周期的静止状态(G<sub>0</sub>期), 只有当机体组织受损时, 干细胞迅速进入细胞增殖周期, 通过增殖细胞分化参与组织损伤的修复, 上述过程结束后, 干细胞又再次回到静止细胞状态, 因此干细胞DNA含量大多数时候为二倍体, 而慢性粒细胞白血病干细胞也同样具有相似的特点, 能避免细胞周期性化疗药物的杀伤, 和肿瘤的耐药联系到了一起<sup>[13]</sup>。侧群细胞也是多数处于静止期的细胞, Benchaouir等<sup>[14]</sup>在对侧群细胞的细胞周期研究中发现, 多数侧群细胞是处于G<sub>0</sub>期的静止细胞, 用电镜观察侧群细胞超微结构, 发现细胞内大多是滑面内质网, 缺少粗面内质网和核糖体, 对这些特征的转录情况进行分析, 发现侧群细胞的转录能力与主群细胞相比大幅度降低, 细胞内与细胞周期停滞相关的基因表达上调, 而与细胞周期运行的相关基因表达下调, 符合G<sub>0</sub>期细胞的慢周期性特征。有研究人员发现, 95%以上的白血病干细胞处于G<sub>0</sub>期静止状态<sup>[15-16]</sup>, 肿瘤干细胞处于静止期, 才可以避免细胞周期化疗药物的杀伤, 在本实验中K562侧群细胞亚群中静止期细胞比例达到80%, 明显要高于K562非侧群细胞亚群中的静止期细胞比例。

在小鼠造血干细胞研究中关于侧群细胞和造血干细胞的关系, 就有学者提出侧群细胞表型不是所有造血干细

胞特有的表型, 不能用此来观察造血干细胞的功能<sup>[17]</sup>, 还有学者在小鼠中联合免疫表型和侧群细胞分选的方法来分离造血干细胞<sup>[18]</sup>。同时关于侧群细胞和白血病干细胞的研究也一直都在进行, 多数是在体内外实验来证明侧群细胞的增殖能力等生物学特性, Moshaver等<sup>[19]</sup>通过流式细胞仪把急性髓系白血病患者的侧群细胞分为HSSC和LSSC侧群亚群, 通过体外克隆形成实验证实, LSSC侧群细胞的克隆形成能力明显强于HSSC侧群细胞, LSSC侧群细胞有很低的CD38<sup>+</sup>细胞表达, 这两群细胞在CLL-1和其他免疫标记CD7、CD19表达有明显差异, 认为数量极少的LSSC侧群细胞是富含白血病干细胞的。本实验初步发现K562细胞株侧群细胞数量少, 大部分处于静止期, 高表达耐药蛋白, 推测其可能为主群肿瘤细胞的前体细胞或者是富集了肿瘤干细胞, 尚需进一步行动物成瘤实验来证实。

#### 4 参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. cancer Statistics. CA Cancer J Clin. 2008;58(2):71-96.
- [2] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001;414(6859):105-111.
- [3] Jørgensen HG, Holyoake TL. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukemia. biochem Soc Trans. 2007;35(pt5):1347-1351.
- [4] Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. Cell Cycle. 2004;3(4):414-415.
- [5] Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. Cancer Res. 2007;67(8): 3716-3724.
- [6] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. Cancer Res. 2005;65(14):6207-6219.
- [7] Zheng X, Seshire A, Rüster B, et al. Arsenic but not all-trans retinoic acid overcomes the aberrant stem cell capacity of PML/RARalpha-positive leukemic stem cells. Haematologica. 2007; 92(3):323-331.
- [8] Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. Cancer Res. 2008;68(1):190-197.
- [9] Kayo H, Yamazaki H, Nishida H, et al. Stem cell properties and the side population cells as a target for interferon-alpha in adult T-cell leukemia/lymphoma. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 364(4): 808-814.
- [10] Fan RH, Li HM, Li XJ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010, 14(10):1821-1824. 范瑞华, 李惠民, 李晓进, 等. 血液肿瘤细胞株侧群细胞检测和分选[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1821-1824.
- [11] Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, et al. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. Blood. 2001;98(4):1166-1173.
- [12] Fang BJ, Song YP, Wang P, et al. Baixuebing. Linbaliiu. 2006;15(5): 333-337. 房佰俊, 宋永平, 汪萍, 等. K562多药耐药细胞系中肿瘤干细胞样细胞对伊马替尼耐药机制的初步研究[J]. 白血病·淋巴瘤, 2006, 15(5): 333-337.
- [13] Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to ST1571 in vitro. Blood. 2002;99(1): 319-325.
- [14] Benchaouir R, Rameau P, Decraene C, et al. Evidence for a resident subset of cells with SP phenotype in the C2C12 myogenic line: a tool to explore muscle stem cell biology. Exp Cell Res. 2004; 294(1): 254-268.
- [15] Guan Y, Gerhard B, Hogge DE. Detection, isolation and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells with acute myeloid leukemia (AML). Blood. 2003;101(8):142-3149.
- [16] Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. Blood. 2001;98(8):2301-2307.
- [17] Morita Y, Ema H, Yamazaki S, et al. Non-side-population hematopoietic stem cells in mouse bone marrow. Blood. 2006, 108(8):2850-2856.
- [18] Weksberg DC, Chambers SM, Boles NC, et al. CD150<sup>+</sup> side population cells represent a functionally distinct population of long-term hematopoietic stem cells. Blood. 2008;111(4): 2444-2451.
- [19] Moshaver B, van Rhenen A, Kelder A, et al. Identification of a small subpopulation of candidate leukemia-initiating cells in the side population of patients with acute myeloid leukemia. Stem Cells. 2008;26(12):3059-3067.

#### 来自本文课题的更多信息—

**作者贡献:** 范瑞华、李惠民、郭殿选进行实验设计, 实验实施为范瑞华, 实验评估为高勇、陈小飞, 资料收集为范瑞华, 范瑞华成文, 李惠民审核, 范瑞华对文章负责。

**致谢:** 感谢云南省肿瘤医院肿瘤研究所和淮安市第一人民医院中心实验室在流式细胞技术上的支持。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**本文创新性:** 多年前在流式细胞仪研究中早有根据Hoechst33342 系出而定义的侧群细胞, 侧群细胞仅代表了整个细胞群的一小部分。干细胞中富含侧群细胞, 这些细胞在正常发育和肿瘤生物学方面起重要作用。但这些细胞无明确定义, 特别它们的细胞数量极少, 在分离和鉴定方面面临挑战, 由于国内条件的限制, 近年来才逐渐开展这项工作, 实验目的在于分选侧群细胞, 并进一步认识血液肿瘤的侧群细胞, 探讨它的特性, 为理解肿瘤干细胞甚至肿瘤的耐药一个可行的靶点。