

# SP细胞分选与肿瘤干细胞关系的研究进展

王宁, 陈凇

王宁, 陈凇, 中国人民解放军总医院普通外科 北京市 100853  
国家自然科学基金资助项目, No. 30570522  
作者贡献分布: 王宁与陈凇对此文所作贡献均等; 此课题由陈凇设计; 写作由王宁完成; 陈凇负责校对。  
通讯作者: 陈凇, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院普通外科, aning0516@hotmail.com  
电话: 010-68217460 传真: 010-68219860  
收稿日期: 2007-04-03 修回日期: 2007-12-20

## Advances in the relationship between side population analysis and cancer stem cells

Ning Wang, Lin Chen

Ning Wang, Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570522  
Correspondence to: Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. aning0516@hotmail.com  
Received: 2007-04-03 Revised: 2007-12-20

### Abstract

Cancer stem cells have become one of the hot spots in cancer research. The major difficulty in research of cancer stem cells is their isolation and purification because of lack of universally accepted markers of these cells. Side population (SP) analysis has been used as a useful tool in stem cell research as SP, a cell population enriched in stem cells, has more phenotypic markers and can be isolated with specific methods.

**Key Words:** Side population; Tumor; Tumor stem cells

Wang N, Chen L. Advances in the relationship between side population analysis and cancer stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 199-202

### 摘要

肿瘤干细胞已成为肿瘤研究的热点之一,但是由于缺乏特异的表面标记,肿瘤干细胞的分离纯化一直是亟待解决的难题。由于SP(side population)细胞富含干细胞样细胞,并且SP细胞具有较明确的表型标记和分离方法,近年

来,通过流式细胞仪分选SP细胞的方法越来越多地应用在肿瘤干细胞的研究中。

**关键词:** SP细胞; 肿瘤; 肿瘤干细胞

王宁, 陈凇. SP细胞分选与肿瘤干细胞关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(2): 199-202  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/199.asp>

### 0 引言

肿瘤干细胞学说认为肿瘤组织中存在极少量肿瘤细胞,具有自我更新能力和分化潜能,是肿瘤增殖生长、转移和复发的根源,肿瘤干细胞已成为肿瘤研究的热点<sup>[1]</sup>。肿瘤干细胞研究的首要问题就是分离鉴定,但是由于缺乏特异的表面标记,肿瘤干细胞的分离纯化一直是长久以来各国科学家亟待解决的难题之一。近年来,通过流式细胞仪分选SP(side population)细胞的方法,在肿瘤干细胞研究中越来越受到重视。本文主要综述了SP细胞分选与肿瘤干细胞的研究进展。

### 1 SP(side population)细胞

1996年, Goodell *et al*<sup>[2]</sup>在用Hoechst33342荧光染色对小鼠骨髓造血干细胞进行检测时,通过紫外激发检测双波长分别为450 nm的蓝色荧光和675 nm的红色荧光,发现不到0.1%的细胞发出极弱的蓝光和红光,在流式二维分析点阵图上,这一小群细胞呈彗星状分布在细胞主群的一侧,他们将这群细胞称为SP(side population)细胞。Goodell *et al*研究发现ABC转运蛋白家族中多药耐药基因1即MDR1与细胞泵出荧光染料Hoechst33342有关,利用MDR1抑制剂维拉帕米(verapamil)阻断MDR1泵后SP细胞数量显著下降。但是,维拉帕米对于MDR1没有特异性,并且MDR1在65%的骨髓细胞中都有表达,而SP细胞却只占骨髓细胞总量的0.1%,所以MDR1不能作为分离鉴定SP细胞的唯一标记,应该进一步分析决定SP表型的标志。

2001年, Zhou *et al*<sup>[3]</sup>通过一系列研究发现不

### ■背景资料

肿瘤干细胞已成为肿瘤研究的热点之一,其首要问题就是肿瘤干细胞的分离和鉴定。SP(side population)细胞分选是研究肿瘤干细胞的重要方法。

### ■同行评议者

王振宁, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

## ■应用要点

本文利用流式细胞仪分选SP细胞的方法在肿瘤干细胞研究中越来越受到重视。这种方法确实、方便和经济,具有普遍适用性。

同组织来源的SP细胞均表达ABC转运蛋白家族中多药耐药基因ABCG2/BCRP1,他们利用逆转录病毒载体进行了ABCG2/BCRP1基因转染试验,探讨ABCG2/BCRP1基因表达与SP细胞表型特征的关系,结果证实ABCG2/BCRP1的表达与SP细胞表型呈强相关,是SP细胞表型特征的决定因素。

近年来在成体多种组织、胚胎甚至肿瘤细胞中都发现了SP细胞,他们同源性高,具有自我更新和多向分化潜能,在体内能够分化产生不同组织类型的细胞,因此很多学者认为SP细胞中富含干细胞,SP细胞可以作为干细胞研究的重要资源,尤其是对于那些不知道干细胞表面分子标记的细胞<sup>[4]</sup>。但是也有学者质疑SP细胞中存在干细胞,Truel *et al*<sup>[5]</sup>的实验表明并非从所有组织分离出来的SP细胞都具有干细胞的特性。他们从人和小鼠的表皮中分离了SP细胞,对这群细胞进行了表型和基因型的鉴定,结果显示这是一群分化的细胞而非干细胞。

## 2 细胞与ABCG2/BCRP1

SP细胞具有快速泵出荧光染料Hoechst的特性,研究显示,这种特性与ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)家族成员ABCG2/BCRP1的表达密切相关,提示ABCG2/BCRP1可作为SP细胞的表型标记而用于分离鉴定。三磷酸腺苷(ATP)结合转运蛋白G超家族成员2(ABCG2)首先在乳腺癌细胞中被发现,其功能是参与肿瘤细胞的多药耐药性<sup>[6-7]</sup>,但长期以来有关其在正常生理状态下的功能并不十分清楚。Zhou *et al*<sup>[3]</sup>利用逆转录病毒将ABCG2/BCRP1基因导入正常小鼠骨髓细胞,培养12 d以后,SP细胞数量明显增加,约占细胞总数的60%。而ABCG2/BCRP1基因敲除的小鼠,骨髓和骨骼肌的SP细胞都显著减少。利用抗ABCG2的单抗结合流式细胞技术分析表明,ABCG2/BCRP1的表达与SP细胞表型呈强相关,ABCG2/BCRP1的表达是SP细胞能泵出Hoechst荧光染料的一保守特性。

## 3 SP细胞与正常组织

SP细胞最初是在分离纯化小鼠骨髓造血干细胞时被分离和鉴定的<sup>[2]</sup>,近年来大量研究显示,SP细胞在人和动物的许多重要组织器官,如骨髓、骨骼肌<sup>[8-9]</sup>、皮肤<sup>[5,10]</sup>、角膜<sup>[11]</sup>、肺<sup>[12]</sup>、心肌<sup>[13]</sup>、气管等均有广泛分布,其功能除了参与造血系统的重建外,还与相应组织的更新与再

生、器官系统的自我重建以及成体干细胞的多器官可塑性有关<sup>[8-15]</sup>。有报道骨髓来源的SP细胞移植mdx小鼠后可以使肌肉再生<sup>[14]</sup>,也可以使心肌缺损的小鼠心肌再生<sup>[13]</sup>。

SP细胞在不同成体组织的含量不尽相同,已有的实验数据显示,骨髓中的SP细胞占总骨髓细胞量的0.05%,占骨髓总有核细胞量的0.79%;而脾、肺组织中的SP细胞含量较高,分别占该两种组织中有核细胞的0.96%和0.98%;骨骼肌、肝、肾、心脏和小肠中SP细胞比例更高,可以达到3.1%-9.1%;而SP细胞最高的是脑组织,占总核细胞的15.1%<sup>[16]</sup>。

## 4 SP细胞与肿瘤

由于肿瘤细胞与干细胞之间存在着许多相似性,近年提出了肿瘤干细胞学说,认为肿瘤组织中存在极少量肿瘤细胞在肿瘤中充当干细胞角色,具有无限的自我更新能力,能够产生与上一代完全相同的子代细胞;并有多分化潜能和高度增值能力,产生不同表型的肿瘤细胞,使肿瘤在体内不断扩大,或形成新的肿瘤。已经有越来越多的证据表明,至少一些肿瘤中存在肿瘤干细胞,肿瘤干细胞是肿瘤生长、侵袭、转移和复发的根源,而肿瘤干细胞可能起源于机体的正常干细胞或其前体细胞。Bonnet *et al*<sup>[17]</sup>分离出人急性髓系白血病(AML)中的肿瘤干细胞为CD34+ CD38-细胞。尽管这些细胞只占有AML细胞的0.2%,但是他们是唯一能在NOD/DCID鼠内形成AML移植瘤的细胞。这就排除了所有AML细胞都能形成克隆的可能性,而能形成克隆的只是少数细胞亚群,并且能在动物体内形成移植瘤。Al-Hajj *et al*<sup>[18]</sup>建立了严重联合免疫缺陷小鼠模型,用于肿瘤干细胞的鉴定,并利用细胞表面标志物分离出了人乳腺癌肿瘤干细胞,这些肿瘤干细胞表面抗原为ESA+、Lin-、CD44+、CD24-/low。

肿瘤干细胞的研究,首要的工作是分离出具有肿瘤源性的细胞,与造血系统肿瘤相比,实体瘤干细胞难以分离。主要的原因有二:一是在肿瘤组织制成单细胞悬液的过程中,蛋白水解酶对细胞表面抗原的破坏,会影响干细胞的鉴别;二是许多实体组织自身的干细胞表面标志物尚未确定。由于SP细胞分选具有普遍适用性,因此利用细胞高效外排DNA荧光染料Hoechst33342的特性,通过流式细胞仪分选SP细胞的方法在肿瘤干细胞研究中越来越受到重视。

表 1 关于肿瘤SP细胞与肿瘤干细胞的主要文章

肿瘤类别	报道年度	报道者
急性髓细胞白血病	2001	Wulf <i>et al</i> <sup>[23]</sup>
胶质瘤、乳腺癌、神经母细胞瘤、宫颈癌	2004	Setoguchi <i>et al</i> <sup>[19]</sup>
神经胶质瘤	2004	Kondo <i>et al</i> <sup>[20]</sup>
神经母细胞瘤	2004	Hirschmann <i>et al</i> <sup>[24]</sup>
视网膜母细胞瘤	2005	Seigel <i>et al</i> <sup>[25]</sup>
乳腺癌、胶质瘤、前列腺癌	2005	Patrawala <i>et al</i> <sup>[22]</sup>
消化道肿瘤(食道癌、胃癌、肝癌、结直肠癌)	2006	Haraguchi <i>et al</i> <sup>[26]</sup>
肝癌	2006	Chiba <i>et al</i> <sup>[21]</sup>
卵巢癌	2006	Szotek <i>et al</i> <sup>[27]</sup>
甲状腺癌	2007	Mitsutake <i>et al</i> <sup>[28]</sup>

Setoguchi *et al*<sup>[19]</sup>发现C6胶质瘤细胞、MCF-7乳腺癌细胞、B104神经母细胞瘤和HeLa细胞内含有0.4%、2.0%、0.4%和1.2%的SP细胞,但是在人骨肉瘤U-20S和SaOS-2细胞内没有检测到SP细胞,表明并不是所有的肿瘤细胞系内都存在SP细胞. Kondo *et al*<sup>[20]</sup>从大鼠胶质瘤细胞系C6中分离出占0.4%的SP细胞, SP细胞在合适培养条件下可重新形成SP和non-SP细胞亚群, SP细胞可分化为神经元细胞和胶质细胞,提示C6中SP细胞是典型的干细胞样细胞,也就是肿瘤干细胞. Chiba *et al*<sup>[21]</sup>在肝癌细胞系Huh7和PLC/PRE/5中分选出SP细胞,分别占了0.80%和0.25%,并证实SP细胞具有肿瘤干细胞样的特性.近年来利用分选SP细胞的方法来研究肿瘤干细胞的主要文献见表1.但也有报道认为SP细胞的肿瘤细胞群中存在非干细胞<sup>[22]</sup>,因此肿瘤SP细胞的特征还不能完全等同于肿瘤干细胞.

## 5 结论

SP细胞分选具有普遍适用性,是肿瘤干细胞研究中的一种有效方法.然而,在干细胞研究中SP细胞分选还有其自身局限性,主要表现在两个方面<sup>[29]</sup>:一、SP细胞不能完全体现干细胞的特性.虽然大量研究证据表明SP细胞与干细胞的分子表型和特性具有一致性,但另外一些试验也存在不同观点,如Triel *et al*<sup>[5]</sup>的实验表明并非从所有组织分离出来的SP细胞都具有干细胞的特性.因此,干细胞特异性分子标记物的研究是今后要着重解决的关键问题之一,他可以与SP细胞的研究互为完善和补充.二、SP细胞分选过程中所使用荧光染料Hoechst33342的毒性问题.荧光染料Hoechst33342是一种脂溶性

DNA结合染料,可以穿过细胞膜而与DNA结合,因为这种荧光染料对许多细胞都具有毒性作用,所以分选出来的SP细胞和non-SP细胞难于比较各自的生物学特性.因此,为了使荧光染料Hoechst33342的毒性对实验影响最小,还必须进一步优化SP分选方法.为了减少染料Hoechst的毒性, Montanaro *et al*<sup>[30]</sup>探讨了适合不同组织染色的Hoechst染料最佳浓度.

目前,肿瘤干细胞已成为肿瘤研究的热点,但是由于缺乏特异的表面标记,肿瘤干细胞的分离纯化一直是亟待解决的难题.由于SP细胞富含干细胞样细胞,并且SP细胞具有较明确的表型标记和分离方法,所以较好地解决了其来源问题,这对推动肿瘤干细胞的研究与发展具有重要的意义,也为肿瘤治疗提供了新思路.

## 6 参考文献

- 1 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- 2 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-1806
- 3 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7: 1028-1034
- 4 Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 2006; 24: 3-12
- 5 Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, Jensen TG, Jensen UB. Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res* 2004; 295: 79-90
- 6 Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15665-15670
- 7 Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 1998; 58: 5337-5339
- 8 Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12339-12344
- 9 Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, Jiang N, Elterman J, Hutcheson K, Dimaio JM, Gallardo TD, Garry DJ. Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells* 2004; 22: 1305-1320
- 10 Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells* 2005; 23:

## ■名词解释

SP(side population)细胞:某些癌细胞和干细胞可以将荧光染料Hoechst33342排出细胞,表现为细胞核不着色或者很低程度的着色.利用流式细胞仪可以将这些不着色细胞加以分离,人们将这种可以排出Hoechst33342的特性称为SP表型,将利用该特性分离的这部分细胞称为SP细胞.

## ■同行评价

本文选题方向准确,内容全面,层次清楚,文字流畅,是一篇较好的综述。

- 834-841
- 11 De Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem Cells* 2006; 24: 368-375
- 12 Summer R, Kotton DN, Sun X, Ma B, Fitzsimmons K, Fine A. Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L97-104
- 13 Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402
- 14 Bhattacharya S, Jackson JD, Das AV, Thoreson WB, Kuszynski C, James J, Joshi S, Ahmad I. Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2764-2773
- 15 Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390-394
- 16 Asakura A, Rudnicki MA. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol* 2002; 30: 1339-1345
- 17 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 18 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-3988
- 19 Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle* 2004; 3: 414-415
- 20 Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 781-786
- 21 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- 22 Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 2005; 65: 6207-6219
- 23 Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98: 1166-1173
- 24 Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14228-14233
- 25 Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis* 2005; 11: 729-737
- 26 Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006; 24: 506-513
- 27 Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, Dombkowski D, Preffer F, Maclaughlin DT, Donahoe PK. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 11154-11159
- 28 Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, Namba H, Ohtsuru A, Saenko V, Yamashita S. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* 2007; 148: 1797-1803
- 29 Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3701-3710
- 30 Montanaro F, Liadaki K, Schiend J, Flint A, Gussoni E, Kunkel LM. Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp Cell Res* 2004; 298: 144-154

编辑 程剑侠 电编 郭海丽