

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.016

吉西他滨联合 YH-16 对肝癌干细胞样细胞的影响

Effect of gemcitabine combined with YH-16 on liver cancer stem-like cells

易善永^{1,2}, 南克俊², 陈静², 姜丽丽² (1. 郑州市中心医院 肿瘤科, 河南 郑州 450007; 2. 西安交通大学医学院 第一附属医院 肿瘤中心, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的: 探讨吉西他滨联合重组人血管内皮抑制素 YH-16 对裸鼠 CD133⁺ MHCC97H 肝癌移植瘤中肝癌干细胞样细胞的影响。方法: 用免疫磁珠分选 MHCC97H 中肝癌干细胞样细胞, 将其接种到 20 只裸鼠皮下, 建立移植瘤模型。治疗组给予吉西他滨和 YH-16, 对照组给予等量生理盐水, 比较两组移植瘤大小变化及原代培养细胞球形成情况, 流式细胞术检测原代培养中 CD133⁺ 细胞百分率。结果: 治疗组的移植瘤明显缩小, 治疗组和对照组细胞球形成数目分别为 (7.5 ± 2.4) 个 vs (16.0 ± 3.5) 个, 细胞球直径分别为 (178.30 ± 19.21) μm vs (131.06 ± 20.96) μm ($P < 0.05$); 治疗组和对照组原代培养中 CD133⁺ 细胞百分率分别为 (6.24 ± 0.96)% vs (18.26 ± 1.76)% ($P < 0.05$)。结论: 低剂量吉西他滨联合 YH-16 可抑制血管内皮细胞破坏肝癌干细胞样细胞的血管巢, 进而选择性清除肝癌干细胞样细胞。

[关键词] 肝癌干细胞样细胞; 吉西他滨; YH-16

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0562-03

研究^[1-3]发现, 肿瘤是在一小部分具有无限增殖、自我更新和多向分化潜能的肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)驱动下发生的。CSC 不仅是肿瘤发生、发展的关键, 而且还是肿瘤复发和转移的根源。针对 CSC 治疗, 可更有效地抑制肿瘤发生、发展、转移及复发的根源, 进而有可能治愈肿瘤^[4,6]。目前大部分研究都是直接针对 CSC 进行干预。本研究试图用低剂量吉西他滨联合重组人血管内皮抑制素 YH-16 来抑制血管内皮细胞, 进而破坏肝癌干细胞样细胞的血管巢, 探讨其是否可以选择性地清除肝癌干细胞样细胞。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与药品

吉西他滨为江苏豪森药业产品, YH-16 购自烟台麦得津生物工程股份有限公司。RPMI 1640 培养基、胶原酶 IV 购自美国 Sigma 公司, 鼠抗人 CD133 抗体购自美国 R&D 公司。

1.2 CD133⁺ MHCC97H 肝癌干细胞样细胞的分选

取对数生长期的肝癌 MHCC97H 细胞, 胰酶消化, 0.4% 锥虫兰染色, 计数活细胞。取上述的 MHCC97H 细胞, 按 100 μl/10⁸ 的比例加入 FcR 阻断试剂, 5 min 后按 1 × 10⁸: 100 μl 的比例加入抗-CD133 抗体磁珠, 标记 MHCC97H 细胞。充分混匀后在 4 ~ 8 °C 冰箱内孵育 25 min, 然后加入缓冲液, 离心弃上清, 制备 1 × 10⁸ 的 MHCC97H 细胞悬液; 过 MACS 分离柱分选 CD133⁺ MHCC97H 细胞。

1.3 荷瘤小鼠模型的建立及吉西他滨和 YH-16 联合治疗下 CD133⁺ MHCC97H 移植瘤的原代培养

裸鼠接种 CD133⁺ MHCC97H 细胞后 11 d, 移植瘤体达到 0.5 cm 左右。将荷瘤小鼠随机分为 2 组 ($n = 10$), 治疗组给予吉西他滨 1 mg/kg 腹腔注射化疗 (1 ~ 21 d), 同时给予 YH-16 5 mg/kg, 腹腔注射治疗 (1 ~ 14 d); 对照组在相同的时间内给予等量生理盐水腹腔注射。治疗结束后切下移植瘤, 置于培养皿中剪碎, 加入 0.1% 胶原酶 IV 消化, 纱布过滤后裂解红细胞, 制备细胞悬液。将上述细胞悬液加入 96 孔板的中间 30 个孔中, 每孔 100 μl, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 观察细胞球生长情况。2 周后镜下计数含 50 个细胞以上的细胞球数量, 并测量细胞球的大小。

1.4 流式细胞仪检测移植瘤原代培养中 CD133⁺ 细胞的表达

分别取上述原代培养的各組细胞, 用 0.25% 的胰酶消化, 0.01% PBS 缓冲液洗涤、重悬、计数, 制备成单细胞悬液。将细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 PBS 洗涤, 取 1 × 10⁶ 个细胞重悬于 100 μl 的 0.01% PBS 液中。加入 PE-CD133 抗体 5 μl, 室温暗处孵育 30 min。用 3 ml 的 0.01% PBS

[作者简介] 易善永 (1970 -), 男, 河南省郑州市人, 博士, 主要从事肿瘤综合治疗及个体化治疗工作

[通信作者] 南克俊 (NAN Ke-Jun, corresponding author), E-mail: nankij@163.com

液洗涤细胞 1 次,0.5% 甲醛固定,常温暗处孵育 10 min。0.01% PBS 液洗 3 次,去除未结合的抗体。细胞重悬于 1 ml 的 0.01% PBS 液中,上流式细胞仪检测 CD133⁺ 细胞。

1.5 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较应用 *t* 检验。采用 SPSS17.0 统计软件进行分析处理。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吉西他滨联合 YH-16 治疗后裸鼠移植瘤的生长变化

接种 CD133⁺ MHCC97H 细胞后 3 ~ 5 d,全部裸鼠均长出肉眼可见的肿瘤,移植瘤突出皮肤,呈不规则性生长,边界清楚,活动度差,质地较韧。治疗结束后继续喂养观察 7 d,将裸鼠脱颈处死,切下皮下移植瘤。移植瘤为淡红色,多呈椭圆形或圆形,部分呈分叶状,表面偶有突起结节,质脆,部分中心有坏死。治疗组和对照组移植瘤的大小和重量分别为 $(470.52 \pm 41.20) \text{ mm}^3$ vs $(1310.83 \pm 174.01) \text{ mm}^3$; $(0.46 \pm 0.04) \text{ g}$ vs $(1.30 \pm 0.17) \text{ g}$ (均 $P < 0.05$),表明吉西他滨联合 YH-16 对移植瘤有明显抑制作用。

2.2 原代培养移植瘤细胞球的形成

在无血清培养基中,接种移植瘤细胞后 12 h 左右可观察到大部分细胞呈贴壁生长,此部分细胞主要为分化成熟的肿瘤细胞、成纤维细胞、残存的红细胞或者粒细胞等。由于无血清培养基主要适宜肿瘤干细胞样细胞的悬浮生长,其余的细胞则呈贴壁生长,在传代时逐渐将其清除;24 ~ 48 h 可看到少数细胞呈分裂状态;48 ~ 72 h 部分细胞相互聚集并迅速增殖,形成数目不等的球形多细胞聚集体,称之为肿瘤细胞球。这些细胞球呈半悬浮或悬浮状态生长,卵圆形或圆形,由几个到几十个不等的细胞组成。随着培养时间的延长,可见肿瘤细胞球体积也逐渐增大,数目也逐渐增多。肿瘤细胞球周边细胞较亮,折光性较强,中心区细胞密度高,透光度较差(图 1)。治疗组和对照组细胞球的数量和直径分别为: $(7.5 \pm 2.4) \text{ 个}$ vs $(16.0 \pm 3.5) \text{ 个}$, $(178.30 \pm 19.21) \mu\text{m}$ vs $(131.06 \pm 20.96) \mu\text{m}$ (均 $P < 0.05$)。

2.3 吉西他滨联合 YH-16 治疗后 CD133⁺ 细胞的变化

本实验采用流式细胞仪检测 2 组移植瘤原代细胞培养中的 CD133⁺ 细胞所占的百分比。治疗组和

对照组中 CD133⁺ 细胞所占的百分比分别为 $(6.24 \pm 0.96)\%$ vs $(18.26 \pm 1.76)\%$ (图 2, $P < 0.05$)。

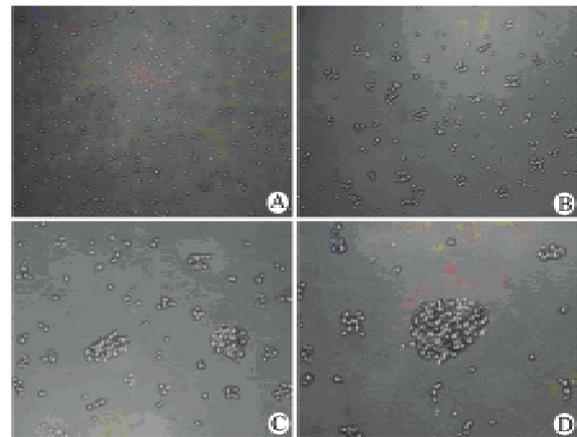


图 1 肿瘤细胞原代培养形成细胞球的过程(×100)

A: 0 h; B: 48 h; C: 7 d; D: 14 d

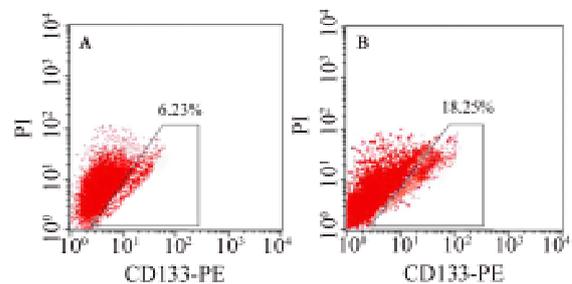


图 2 流式细胞仪检测原代培养移植瘤细胞 CD133⁺ 细胞的百分比

A: 治疗组; B: 对照组

3 讨论

随着对干细胞研究的不断深入,人们逐渐认识到肿瘤不仅是一种基因病,而且还是一种干细胞病^[1-3]。肿瘤是由为数不多的肿瘤干细胞和大多数分化相对成熟的肿瘤细胞构成的异质性细胞团。CSC 具有自我更新、无限增殖和多向分化潜能,它是形成不同分化程度肿瘤以及肿瘤不断生长的源泉,也是肿瘤发生、发展、复发及转移等过程中的“动力细胞”或者“起始细胞”。CSC 假说的提出为肿瘤研究开辟了一个新的思路,使人们能够从另一个视角更好地了解肿瘤的本质,为全面阐明肿瘤发生、发展、转移、复发和多药耐药机制,以及肿瘤治疗提供新的途径和方法^[4]。传统的抗肿瘤治疗主要是针对快速增殖的普通肿

瘤细胞,而忽视了 CSC 的存在。由于 CSC 常常处于相对静止状态,因此,它们一般不会被针对快速分裂增殖细胞的传统化疗所根除。针对 CSC 的抗肿瘤治疗可能成为未来有效抗肿瘤治疗的一种主要策略^[5-6]。

近年来研究^[7-8]发现,CSC 与其血管巢相互依赖,使得血管巢成为抗肿瘤治疗的一个重要靶点。由于血管内皮细胞是 CSC 血管巢的重要组成部分,抑制血管内皮细胞可破坏 CSC 的血管巢,使 CSC 失巢凋亡,进而抑制肿瘤的生长。本研究以常用的 CD133 作为肝癌干细胞样细胞的表面标志^[9],并以此来对人肝癌细胞株 MH-CC97H 进行分选,建立裸鼠移植瘤模型,然后进行低剂量吉西他滨联合 YH-16 治疗。其中,YH-16 是我国近几年研发的一种新型重组人血管内皮抑制素。低剂量节拍性化疗是不间断持续性给予低剂量细胞毒性药物,以肿瘤组织中活化的血管内皮细胞为治疗靶点的一种新型抗肿瘤血管生成治疗方法^[10-11]。

本研究结果显示,低剂量吉西他滨联合 YH-16 治疗不仅能够使肝癌干细胞样细胞移植瘤体积缩小,而且从原代培养肿瘤细胞球的形成和流式细胞仪检测的结果来看,均提示移植瘤中肝癌干细胞样细胞成分也明显减少。因此,可以认为低剂量吉西他滨联合 YH-16 治疗对肝癌干细胞样细胞有杀伤作用。其可能机制是:抗血管生成治疗破坏了肝癌干细胞样细胞的血管巢,继而肝癌干细胞样细胞与其血管巢失去了相互作用,引起肝癌干细胞样细胞某些干细胞特性的减少或者丧失,导致肝癌干细胞样细胞增殖率的提高,DNA 损伤修复能力的降低等^[12]。这些改变使肝癌干细胞样细胞对的细胞毒性作用更加敏感,因而联合治疗可选择性清除肝癌干细胞样细胞。吉西他滨联合重组人血管内皮抑制素可抑制肝癌干细胞样细胞的生长,靶向清除肝癌干细胞样细胞,是一种切实可行的肝癌治疗策略。

[参 考 文 献]

[1] Marx J. Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer [J]. Science, 2003, 301(5638): 1308-1310.

[2] Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells [J]. N Engl J Med, 2006, 355(12): 1253-1261.

[3] O' Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer stem cells in solid tumors: An overview [J]. Semin Radiat Oncol, 2009, 19(2): 71-77.

[4] Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF. Therapeutic implications of cancer stem cells [J]. Curr Opin Genet Dev, 2004, 14(1): 43-47.

[5] Elyer CE, Rich JN. Survival of the Fittest: Cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(17): 2839-2845.

[6] Winquist RJ, Boucher DM, Wood M, Furey BF. Targeting cancer stem cells for more effective therapies: Taking out cancer's locomotive engine [J]. Biochem Pharm, 2009, 78(2): 326-334.

[7] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells [J]. Cancer Cell, 2007, 11(1): 69-82.

[8] Yang ZJ, Wechsler-Reya RJ. Hit 'em where they live: Targeting the cancer stem cell niche [J]. Cancer Cell, 2007, 11(1): 3-5.

[9] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(4): 820-824.

[10] Kamat AA, Kim T J, Landen CN, Lu C, Han LY, Lin YG, et al. Metronomic chemotherapy enhances the efficacy of antivascular therapy in ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 281-288.

[11] Laquente B, Lacasa C, Ginesà MM, Casanovas O, Figueras A, Galan M, et al. Antiangiogenic effect of gemcitabine following metronomic administration in a pancreas cancer model [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(3): 638-647.

[12] Blansfield JA, Caragacianu D, Alexander HR, Tangrea MA, Morita SY, Lorang D, et al. Combining agents that target the tumor microenvironment improves the efficacy of anticancer therapy [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(1): 270-280.

[收稿日期] 2010 - 05 - 28 [修回日期] 2010 - 07 - 12
 [本文编辑] 韩 丹

