

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.003

杂交瘤单抗 4F11 识别 CD90⁺ 肝癌干细胞并抑制其侵袭

王云霞¹, 容雁², 张晓艳², 孙立新¹, 杨治华¹, 孙力超¹, 冉宇靓¹ (1. 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院, 广西南宁 530021)

创新点评: 靶向 CD90⁺ 肿瘤干细胞可能治疗肝癌转移

肝癌是我国病死率较高的恶性肿瘤, 虽然目前临床上治疗肝癌已有手术、化疗、介入治疗等多种治疗手段, 但肝癌患者的 5 年生存率仍低于 20%, 复发和转移, 尤其是转移是肝癌患者预后差、病死率高的主要原因。近年来, 肿瘤干细胞概念的提出为重新认识肿瘤的发生、生长、转移和治疗后的复发提供了新的视角。现有的研究已经提示了肝癌干细胞在肝癌血循环转移中起着关键作用, 研究靶向肝癌干细胞的治疗策略和药物, 尤其是针对目前临床难以解决的肝癌转移, 将有可能发展一种能有效治疗肝癌的新策略。

本期杂志刊登了王云霞等的论文, 该研究小组在前期已通过独特的技术制备了大容量的单克隆抗体库, 并初筛出多株靶向肝癌干细胞样细胞的单克隆抗体。在此基础上, 该文选取了一株高转移的人肝癌细胞系 MHCC97H 为模型, 结合文献验证了 MHCC97H 中存在 CD90⁺ 肿瘤干细胞。作者通过双染色的流式荧光实验发现 5 株待选的单克隆抗体中单抗 4F11 可识别约 47% 的 MHCC97H 中的 CD90⁺ 肝癌干细胞, 提示了单抗 4F11 是一株可靶向 MHCC97H 中 CD90⁺ 肝癌干细胞的单抗。进一步通过抑制增殖、抑制侵袭和迁移等体外功能性实验, 该文作者意外地发现单抗 4F11 虽能非常显著抑制 MHCC97H 肝癌干细胞的自我更新能力(成球率下降近 60%), 但对于亲本 MHCC97H 细胞的增殖影响甚微(抑制率仅约 12%), 这为最近国际上所报道的肿瘤干细胞自我更新能力与肿瘤的增殖、成瘤能力不一定紧密相关的观点提供了新的证据。更令人感兴趣的是, 作者还发现单抗 4F11 虽然仅仅识别极少数的 MHCC97H 细胞(约 2.7%), 但却可以强烈地抑制高转移性的 MHCC97H 肝癌细胞的体外侵袭和迁移(抑制率近 50%)。该研究结果不仅提示了今后采用特异作用于 CD90⁺ 肝癌干细胞的药物将能有效地治疗肝癌转移的可能, 同时还提示相对于肝癌的生长, CD90⁺ 肝癌干细胞可能与肝癌转移的相关性更为紧密。该文研究结果为肝癌转移的治疗提供了新的观点、思路和策略, 以及新的候选靶标的研究线索。

中国科学院院士

陆士华

[摘要] **目的:** 筛选识别肝癌干细胞的单克隆抗体并研究其体外的抗肿瘤作用, 为肝癌干细胞靶向治疗提供候选抗体药物。**方法:** 无血清悬浮培养及 PKH26 染色分析人肝癌细胞株 MHCC97H 中是否存在肝癌干细胞。流式细胞术检测 MHCC97H 细胞及其成球细胞中 7 种肿瘤干细胞标志物的表达, 以及 MHCC97H 细胞中肝癌干细胞标志物 CD90 和不同杂交瘤单抗 3G7、4F11、11C9、15B7、15D2 识别抗原的共表达情况。无血清悬浮培养法和 CCK8 法检测单抗 4F11 对 MHCC97H 细胞及其成球细胞自我更新和增殖的影响, Transwell 实验检测单抗 4F11 对 MHCC97H 细胞体外侵袭和迁移的影响。**结果:** PKH26 染色实验显示, MHCC97H 细胞球体由单个肝癌干细胞增殖分化形成。MHCC97H 细胞球中 CD90⁺ MHCC97H 细胞比例较亲本 MHCC97H 细胞显著增加[(18.0 ± 7.5)% vs (2.3 ± 1.0)% , P < 0.05]。杂交瘤单抗 4F11、3G7、11C9、15B7、15D2 均能识别 MHCC97H 细胞中 CD90⁺ MHCC97H 细胞, 其中单抗 4F11 对 CD90⁺ MHCC97H 细胞的识别比例为(47.2 ± 4.4)% , 其对

[基金项目] 国家科技重大专项课题资助(No. 2011ZX09102-010-02, No. 2011ZX09401-030-4); 国家重点基础研究发展计划(973 计划) 课题资助(No. 2009CB521804)。Project supported by the National Science and Technology Major Project of China (No. 2011ZX09102-010-02, No. 2011ZX09401-030-4), and the National Key Basic Research Development Program (973 Program) of China (No. 2009CB521804)

[作者简介] 王云霞(1988 -), 女, 安徽省南陵县人, 硕士生, 主要从事肿瘤干细胞靶向治疗研究。E-mail: andy1988wang@gmail.com

[通信作者] 冉宇靓(RAN Yu-liang, corresponding author), E-mail: ran_yuliang@126.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120328.1613.008.html>

MHCC97H成球细胞增殖的抑制率远大于对亲本 MHCC97H 细胞增殖的抑制率[(29.4 ± 3.8)% vs (12.0 ± 2.2)% , $P < 0.05$]。单抗 4F11 抑制 MHCC97H 细胞成球,抑制率达(58.0 ± 20.8)%。单抗 4F11 能显著抑制 MHCC97H 细胞体外侵袭和迁移,抑制率分别为(48.6 ± 5.1)%和(47.6 ± 3.6)%。**结论:**杂交瘤单抗 4F11 能特异性识别 CD90⁺ 肝癌干细胞,抑制肝癌细胞的侵袭和迁移,可作为肝癌干细胞靶向治疗的候选抗体药物。

[关键词] 肝肿瘤;肝癌干细胞;单抗;4F11;靶向治疗;增殖;侵袭;迁移

[中图分类号] R735.7; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)02-0122-06

Hybridoma monoclonal antibody 4F11 recognizes CD90⁺ liver cancer stem cells and inhibits their invasion

WANG Yun-xia¹, RONG Yan², ZHANG Xiao-yan², SUN Li-xin¹, YANG Zhi-hua¹, SUN Li-chao¹, Ran Yu-liang¹
(1. State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 2. Affiliated Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the monoclonal antibody (McAb) recognizing liver cancer stem cells and study its anticancer effects *in vitro* so as to provide antibody drug candidates for liver cancer stem cell-targeted therapy. **Methods:** Serum-free suspension culture and PKH26 staining was used to determine whether there were liver cancer stem cells in human hepatoma cell line MHCC97H. Expressions of 7 cancer stem cell biomarkers in MHCC97H cells and MHCC97H sphere cells, and co-expressions of antigens recognized by CD90 and different McAbs (3G7, 4F11, 11C9, 15B7, 15D2) in MHCC97H cells were examined by flow cytometry assay. The effects of McAb 4F11 on self-renewal and proliferation of MHCC97H cells and MHCC97H sphere cells were identified by serum-free suspension culture and CCK-8 assay. The effects of McAb 4F11 on *in vitro* invasion and migration of MHCC97 cells was examined by Transwell assay. **Results:** PKH26 staining results demonstrated that each MHCC97H sphere cell was proliferated and differentiated from one single liver cancer stem cell. The positive rate of CD90 in MHCC97H sphere cells were significantly higher than that in parent MHCC97H cells([18.0 ± 7.5]% vs [2.3 ± 1.0]%, $P < 0.05$). McAbs 3G7, 4F11, 11C9, 15B7 and 15D2 all CD90⁺ MHCC97H cells in MHCC97H cells with the recognition rate of McAb 4F11 in CD90⁺ MHCC97H cells was (47.2 ± 4.4)%. The inhibitory rate of McAb 4F11 on MHCC97H sphere cells was significantly higher than that on MHCC97H cells([29.4 ± 3.8]% vs [12.0 ± 2.2]%, $P < 0.05$), and McAb 4F11 extremely suppressed the sphere formation ability of MHCC97H cells and inhibitory rate was (58.0 ± 20.8)%. McAb 4F11 also significantly inhibited invasion and migration of MHCC97H cells *in vitro* (inhibitory rate: [48.6 ± 5.1]% and [47.6 ± 3.6]%). **Conclusion:** Hybridoma McAb 4F11 can specifically recognize CD90⁺ liver cancer stem cells, and inhibit invasion and migration of liver cancer cells. McAb 4F11 could be a antibody drug candidate for liver cancer stem cell targeted therapy.

[Key words] liver neoplasm; liver cancer stem cell; monoclonal antibody; 4F11; targeted therapy; proliferation; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(2): 122-127]

包括肝癌在内的多种实体肿瘤中存在肿瘤干细胞^[14]。肝癌是我国病死率前3位的恶性肿瘤^[5],复发和转移是肝癌预后差的主要原因。全身化疗及靶向治疗主要针对快速增殖和高度分化的肝癌细胞^[6],对肝癌干细胞无作用^[7]。胃癌的转移与CD44⁺胃癌干细胞密切相关^[8],肝癌干细胞也可能是造成肝癌复发和转移的原因,靶向肝癌干细胞的治疗策略可作为一种新的治疗手段,降低肝癌的转移和复发,改善肝癌患者预后^[6-10]。肿瘤干细胞可

以通过细胞表面标志物分选获得,目前已报道的肝癌干细胞标志物有上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)^[11]、CD133^[12]、CD90^[13]等。Yang等^[13]证明,在人肝癌细胞株MHCC97H中CD90⁺细胞具有自我更新能力及高致瘤性,是肝癌干细胞。本课题组前期初筛出多株靶向肿瘤干细胞样细胞的单抗^[14],这些单抗能够有效抑制肝癌干细胞样细胞的增殖和自我更新,其中单抗15B7能有效抑制肝癌细胞株Bel7402移植瘤的生长、转移,延

长荷瘤小鼠的生存期^[15],提示靶向肝癌干细胞可能有效治疗肝癌。本研究拟通过体外功能实验,寻找靶向 CD90⁺ MHCC97H 肝癌干细胞并且抑制其功能的单抗,以期获得治疗肝癌的潜在药物和靶标。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人高转移性肝癌细胞株 MHCC97H 购自上海拜力生物科技有限公司。本课题组前期实验^[14]筛出多株特异性识别肝癌干细胞样细胞的杂交瘤单抗,包括 4F11、3G7、11C9、15B7、15D2,均为本室保藏。常规细胞培养液购自美国 Gibco 公司,DAPI、PKH26 染料试剂盒购自 Sigma 公司, FITC-羊抗小鼠 IgG/IgM、Pe-Cy5-羊抗兔 IgG/IgM 购自 Jackson 公司, bFGF、B27 购自 Gibco 公司, EGF 购自 Invitrogen 公司。流式细胞术检测用抗体 CD24、CD44、CD90、CD133、EpCAM、OCT-4 购自 eBioscience 公司,流式细胞术检测用抗体 CD56 购自 Eptomics 公司。

1.2 MHCC97H 细胞的培养和 PKH26 染色

研究^[16-17]认为,无血清悬浮培养时肿瘤干细胞能够成球生长,形成细胞球。另有文献^[18]报道,亲脂性染料 PKH26 能够标记成球细胞中的肿瘤干细胞。按照 PKH26 染料试剂盒说明书将 MHCC97H 细胞标记 PKH26 后,用含白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF; 10 ng/ml)、EGF(20 ng/ml)、bFGF(20 ng/ml)、B27 添加剂(1:50)、肝素(40 U/ml)和 L-谷氨酰胺(L-glutamine, LG; 2 mmol/L)的 DEME-F12 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 7~10 d,观察 MHCC97H 细胞成球及细胞球 PKH26 的染色情况。

1.3 流式细胞术检测 MHCC97H 细胞及其细胞球中肝癌干细胞标志物的表达

分别制备 MHCC97H 细胞及其细胞球的单细胞悬液,调整密度至 1×10^6 /ml, PBS 洗涤 2 次,按照流式抗体说明书加入流式抗体 CD24、CD44、CD56、CD90、CD133、EpCAM、OCT-4、AFP,室温孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次,加入二抗(FITC-羊抗小鼠 IgG/IgM、Pe-Cy5-羊抗兔 IgG/IgM),室温避光孵育 1 h,再用 PBS 洗涤 3 次,流式细胞仪检测其中阳性细胞的比例。

1.4 流式细胞术检测 MHCC97H 细胞及其细胞球中 CD90 和各种杂交瘤单抗识别抗原共表达的情况

制备 MHCC97H 细胞及其细胞球的单细胞悬液,调整密度至 1×10^6 /ml, PBS 洗涤 2 次后同时加入 CD90 和各种不同的杂交瘤单抗 4F11、3G7、11C9、15B7、15D2,室温共孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次,同时加入二抗(FITC-羊抗小鼠 IgG/IgM、Pe-Cy5-羊抗兔 IgG/IgM),

室温避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次后,流式细胞术检测不同杂交瘤单抗的识别抗原在 MHCC97H 细胞及 CD90⁺ MHCC97H 细胞中的表达情况。

1.5 CCK8 法检测单抗 4F11 对 MHCC97H 细胞及其成球细胞增殖的影响

采用 Southern Biotech 公司生产的单抗类型检测试剂盒检测单抗 4F11 的类型为 IgG1k 链。取对数期 MHCC97H 细胞及其成球细胞按 4×10^3 个/孔接种到 96 孔板,实验组加入含单抗 4F11 的培养基,单抗 4F11 终质量浓度为 40 μg/ml。2 d 后补加相同质量浓度的抗体培养基,5 d 后按照 CCK8 试剂盒说明书加入 CCK8 试剂,测定 D_{450} 值。实验以商品化抗体鼠 IgG 为阴性对照。按照以下公式计算抑制率:抑制率(%) = (对照组 D_{450} - 实验组 D_{450}) / 对照组 D_{450} × 100%。

1.6 无血清悬浮培养检测单抗 4F11 对 MHCC97H 细胞成球能力的影响

取对数生长期 MHCC97H 细胞,与单抗 4F11 共孵育 2 h 后,接种到低黏附 24 孔板中,接种细胞密度为 500 个/孔,无血清悬浮培养,在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 7 d 后计算成球率。单抗 4F11 终质量浓度 150 μg/ml。以商品化抗体鼠 IgG 为阴性对照。按照以下公式计算抑制率:抑制率(%) = (对照组成球率 - 实验组成球率) / 对照组成球率 × 100%

1.7 Transwell 实验检测单抗 4F11 对 MHCC97H 细胞侵袭和迁移能力的影响

取对数生长期 MHCC97H 细胞制备单细胞悬液,与单抗 4F11 共孵育 2 h 后,以 4×10^5 个/孔接种到 Transwell 上层小室(已包被 matrigel 基质),在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后取下 Transwell 底膜,DAPI 染色、封片,在荧光显微镜下观察。随机选择 5 个视野计数,计算单抗 4F11 对 MHCC97H 细胞侵袭的抑制率。抑制率(%) = (对照组细胞数 - 实验组细胞数) / 对照组细胞数 × 100%。

Transwell 上层小室不包被 matrigel 基质,与侵袭实验同样操作,计算单抗 4F11 对 MHCC97H 细胞迁移的抑制率。4F11 终质量浓度为 150 μg/ml,以商品化抗体鼠 IgG 为阴性对照。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,应用 SPSS13.0 软件,组间差异采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 时表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MHCC97H 细胞球的成功获取

Vermeulen 等^[17]发现肿瘤干细胞经无血清培养能

成球生长。Pece 等^[18]发现亲脂性染料 PKH26 能够标记成球细胞中的肿瘤干细胞。将 MHCC97H 细胞经 PKH26 标记后无血清悬浮培养,结果显示,MHCC97H 细胞在培养 8 d 后能够形成细胞球,成球率为(5.7 ± 0.7)% ;荧光显微镜下观察发现,培养 8 d 的每个细胞球体中只有单个细胞着色(图 1)。以上结果提示,人肝癌细胞株 MHCC97H 中存在肝癌干细胞。

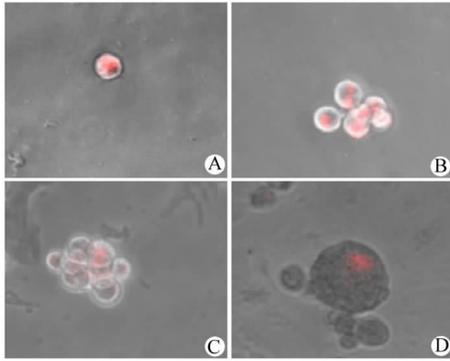


图 1 MHCC97H 细胞无血清悬浮培养成球(×400)

Fig. 1 MHCC97H sphere formation in serum-free medium(×400)
A: 1 d; B: 3 d; C: 5 d; D: 8 d

2.2 无血清悬浮培养富集 MHCC97H 细胞中肝癌干细胞

已有文献报道, OCT-4^[19]、ESA^[11]、CD133^[12]、CD90^[13]、CD56^[20]、CD44^[21]、CD24^[22]是肿瘤干细胞相关的标志物。流式细胞术检测 MHCC97H 细胞及其细胞球中肿瘤干细胞相关标志物的表达情况,结果(图 2,表 1)显示,与亲本 MHCC97H 细胞相比,细胞球中 CD90⁺ 细胞比例显著上调[(18.0 ± 7.5)% vs (2.3 ± 1.0)% , *P* < 0.05]。提示 CD90 是 MHCC97H

细胞中肝癌干细胞标志物,无血清悬浮培养能富集 CD90⁺ MHCC97H 肝癌干细胞。

2.3 MHCC97H 细胞及其细胞球中 CD90 和不同杂交瘤单抗识别抗原的共表达情况

为了进一步鉴定各种杂交瘤单抗 4F11、3G7、11C9、15B7、15D2 能够识别肝癌干细胞,采用流式双色荧光检测不同单抗识别的抗原分子以及干细胞标志物 CD90 在 MHCC97H 细胞中的共表达情况。结果(表 2,图 3)显示,MHCC97H 细胞中各种杂交瘤单抗识别比例为 0.7% ~ 3.7%,而 CD90⁺ MHCC97H 细胞中各种杂交瘤单抗识别比例均超过 20%。结果说明,这 5 株单抗均能较特异性地识别 CD90⁺ MHCC97H 细胞,其中单抗 4F11 对 CD90⁺ MHCC97H 细胞的识别比例达到(47.2 ± 4.4)% ,而 CD90 是人肝癌细胞株 MHCC97H 中的肝癌干细胞标志物,故结果提示单抗 4F11 很可能是靶向 CD90⁺ 肝癌干细胞的单抗。

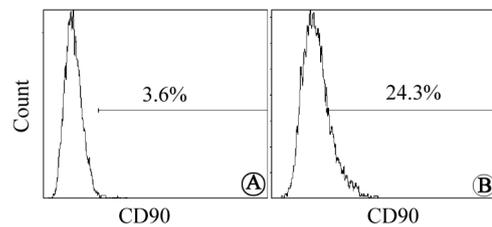


图 2 流式细胞术检测 MHCC97H 细胞及其细胞球中 CD90 的表达

Fig. 2 Expression of CD90 in MHCC97H cells and sphere cells detected by flow cytometry
A: MHCC97H cells; B: MHCC97H sphere cells

表 1 流式细胞术检测 MHCC97H 细胞及其细胞球中肿瘤干细胞标志物的表达(%)

Tab. 1 Expressions of cancer stem cell markers in MHCC97H cells and sphere cells detected by flow cytometry (%)

Group	OCT-4	ESA	CD133	CD90	CD56	CD44	CD24
MHCC97H cell	1.2 ± 0.5	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1	2.3 ± 1.0	2.1 ± 0.6	99 ± 0.1	21.1 ± 0.2
MHCC97H sphere cell	0.9 ± 0.9	0.5 ± 0.2	0.1 ± 0.1	18.0 ± 7.5*	1.3 ± 1.0	99 ± 0.1	3.3 ± 0.2

* *P* < 0.05 vs MHCC97H cell group

表 2 MHCC97H 细胞及其细胞球中 CD90 和不同单抗识别抗原分子的共表达情况(%)

Tab. 2 Co-expressions of antigens recognized by CD90 and different McAbs on MHCC97H cells and sphere cells detected by flow cytometry(%)

Group	3G7	4F11	11C9	15B7	15D2
MHCC97H cell	2.4 ± 1.6	2.7 ± 1.2	3.0 ± 0.8	1.8 ± 0.1	1.2 ± 0.6
CD90 ⁺ MHCC97H cell	31.8 ± 19.7	47.2 ± 4.4*	21.9 ± 0.3	37.9 ± 3.0	43.9 ± 25.0

* *P* < 0.05 vs MHCC97H cell group

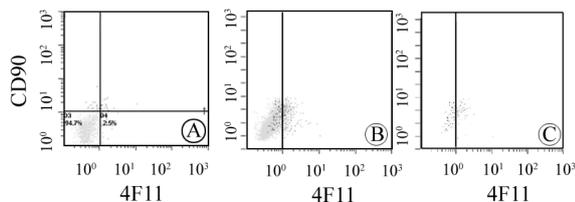


图3 流式细胞术检测 MHCC97H 细胞中 CD90 与 4F11 共表达

Fig. 3 Co-expressions of CD90 and 4F11 in MHCC97H cells as detected by flow cytometry

A: CD90 and 4F11 expressions in MHCC97H cells;

B: 4F11 expression in MHCC97H cells;

C: 4F11 expression in CD90⁺ MHCC97H cells

2.4 单抗 4F11 抑制 MHCC97H 细胞及其成球细胞的增殖

CCK8 法检测杂交瘤单抗 4F11 对 MHCC97H 细胞及其成球细胞增殖的影响,结果显示,单抗 4F11 (40 μg/ml)能明显抑制 MHCC97H 细胞及其成球细胞的增殖,对成球细胞增殖的抑制率达到(29.4 ± 3.8)%,而对其亲本 MHCC97H 细胞的抑制率仅为(12.0 ± 2.2)%。无血清悬浮培养时,单抗 4F11 (150 μg/ml)显著抑制 MHCC97H 细胞球的形成,抑制率达到(58.0 ± 20.8)%。以上结果说明,单抗 4F11 能够影响肝癌干细胞的自我更新,可能是靶向肝癌干细胞的功能性抗体。

2.5 单抗 4F11 抑制 MHCC97H 细胞的侵袭和迁移

文献^[6]报道,肿瘤的转移同肿瘤干细胞密切相关。MHCC97H 细胞是高转移肝癌细胞^[23],其高转移能力可能与肝癌干细胞相关。Transwell 实验结果(图 4、5)显示,单抗 4F11 对 MHCC97H 细胞体外侵袭的抑制率达(48.6 ± 5.1)%,体外迁移的抑制率达(47.6 ± 3.6)%。结果提示,单抗 4F11 能抑制 MHCC97H 细胞的侵袭和迁移。

3 讨论

肝癌是肝脏原发恶性肿瘤,是世界 5 大高发癌症之一。在中国,肝癌是病死率居第 3 位的恶性肿瘤,而转移和复发是肝癌患者预后较差的主要原因^[3]。有研究^[3-5]认为,肿瘤的转移和复发可能与肿瘤干细胞相关。目前的放化疗只能杀伤敏感的癌细胞,对处于 G₀ 期的肿瘤干细胞无效。肿瘤的靶向治疗同传统放化疗相比,具有高选择性、低毒性、不易耐药等优势,具有良好的临床应用前景。在肝癌靶向治疗研究领域,肝癌生长信号通路相关分子、内皮生长因子的分子靶向治疗在临床得到验证^[24]。

但是这种靶向治疗针对的是快速繁殖、终末分化的癌细胞。近年来发现,实体瘤中存在肿瘤干细胞,这为靶向治疗提供了新的方向,靶向肝癌干细胞的治疗可能解决肝癌的转移和复发,改善肝癌患者的预后情况。

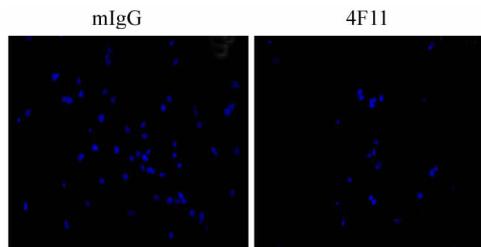


图4 单抗 4F11 抑制 MHCC97H 细胞的侵袭(×200)

Fig. 4 McAb 4F11 inhibited invasion of MHCC97H cells (×200)

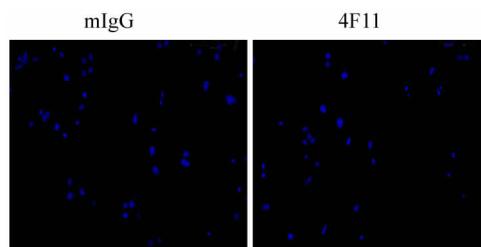


图5 单抗 4F11 抑制 MHCC97H 细胞迁移(×200)

Fig. 5 McAb 4F11 inhibited migration of MHCC97H cells (×200)

人肝癌细胞株 MHCC97H 是高转移肝癌细胞株^[23]。Yang 等^[13]研究证明, MHCC97H 细胞中肝癌干细胞标志物为 CD90,成瘤实验证明 CD90⁺ 细胞具有强致瘤性。研究^[24-25]认为,无血清悬浮培养能够体外培养多种肿瘤干细胞,肿瘤细胞无血清悬浮培养形成的细胞球体结构可以作为肿瘤干细胞的研究模型^[14]。本研究发现,同亲本 MHCC97H 细胞相比,细胞球中 CD90⁺ MHCC97H 细胞比例显著上升,提示人肝癌细胞株 MHCC97H 细胞中 CD90⁺ MHCC97H 细胞是肝癌干细胞。

本课题组前期初筛出多株靶向肝癌干细胞的单抗,流式细胞术检测其中 5 株单抗 4F11、3G7、11C9、15B7、15D2 在 MHCC97H 细胞以及 CD90⁺ MHCC97H 细胞中的识别比例,结果显示,5 株单抗均能较特异性地识别 CD90⁺ MHCC97H 细胞,其中 4F11 单抗对 MHCC97H 细胞的识别比例为(2.7 ± 1.2)%,而对 CD90⁺ MHCC97H 细胞的识别比例高达(47.2 ± 4.4)%。体外功能实验显示,单抗 4F11

对成球细胞的增殖抑制作用明显大于对亲本 MHCC97H 细胞的抑制作用,并且能够强烈抑制 MHCC97H 细胞球的形成,其抑制率高达(58.0 ± 20.8)%。上述结果说明,单抗 4F11 能够较特异性地作用于肝癌干细胞,抑制肝癌干细胞的增殖及自我更新,而对于非肝癌干细胞增殖的抑制作用较小。文献^[8]报道,肿瘤转移与肿瘤干细胞相关。本研究中,虽然单抗 4F11 对 MHCC97H 细胞的识别比例仅为(2.7 ± 1.2)%,但 4F11 对 MHCC97H 细胞体外侵袭和迁移的抑制率高达(48.6 ± 5.1)%和(47.6 ± 3.6)%,结合单抗 4F11 特异性识别和作用于 CD90⁺ 肝癌干细胞,提示肝癌的转移可能同 CD90⁺ 肝癌干细胞密切相关。

本研究将无血清悬浮培养富集肝癌干细胞作为研究模型,在体外实验中证明了单抗 4F11 是靶向 CD90⁺ 肝癌干细胞的功能性单抗,并且证明 4F11 可抑制肝癌 MHCC97H 细胞的侵袭和迁移,说明肝癌的转移同 CD90⁺ 肝癌干细胞相关,为肝癌的靶向治疗提供了新的思路。在此基础上,本课题组还将进行单抗 4F11 体内功能研究,以及 4F11 与肿瘤发生、发展、分期、复发、转移及预后相关性的研究,最终希望能够将单抗 4F11 作为肝癌干细胞靶向治疗药物应用于临床。本研究也为其他肝癌干细胞功能性抗体筛选和研究模型奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [2] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10946-10951.
- [3] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445(7123): 106-110.
- [4] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1030-1037.
- [5] Zhao P, Dai M, Chen W, et al. Cancer trends in China [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40(4): 281-285.
- [6] Lee TK, Castilho A, Ma S, et al. Liver cancer stem cells: Implications for a new therapeutic target [J]. *Liver Int*, 2009, 29(7): 955-965.
- [7] Zou GM. Liver cancer stem cells as an important target in liver cancer therapies [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2010, 10(2): 172-175.
- [8] Chen T, Yang K, Yu J, et al. Identification and expansion of cancer stem cells in tumor tissues and peripheral blood derived from gastric adenocarcinoma patients [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 248-258.
- [9] Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, et al. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(1): 100-109.
- [10] 向俊宇, 李楠. 肿瘤干细胞的临床意义 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(5): 571-575.
- [11] Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012-1024.
- [12] Song W, Li H, Tao K, et al. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Pract*, 2008, 62(8): 1212-1218.
- [13] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2): 153-166.
- [14] 孙力超, 赵璇, 遇珑, 等. 抗肝癌干细胞功能性单抗的研制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(2): 121-127.
- [15] 孙力超, 赵璇, 孙立新, 等. 肝癌干细胞抗体靶向治疗的实验 [J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(6): 609-614.
- [16] Peng HM, Chen GA. Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(1): 217-222.
- [17] Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(36): 13427-13432.
- [18] Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content [J]. *Cell*, 2010, 140(1): 62-73.
- [19] Yuan F, Zhou W, Zou C, et al. Expression of Oct4 in HCC and modulation to wnt/ β -catenin and TGF- β signal pathways [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 343(1/2): 155-162.
- [20] Colombo F, Baldan F, Mazzucchelli S, et al. Evidence of distinct tumour-propagating cell populations with different properties in primary human hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21369.
- [21] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-928.
- [22] Li C, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 568: 161-173.
- [23] Li Y, Tang ZY, Ye SL, et al. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97 [J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(5): 630-636.
- [24] Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(25): 15178-15183.

[收稿日期] 2012 - 01 - 17

[修回日期] 2012 - 02 - 25

[本文编辑] 王莹