

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.018

人胃癌 CD90⁺ 干细胞可能影响胃癌的转移和患者的预后

王佳佳¹, 孙立新¹, 孙力超¹, 莫文秀¹, 遇琰¹, 杨治华¹, 刘骞^{2△}, 冉宇靓¹(1. 北京协和医学院 中国医学科学院 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. 中国医学科学院 肿瘤医院 腹部外科, 北京 100021)

[摘要] **目的:**分离并鉴定人胃癌细胞系 SNU-5 中的肿瘤干细胞,探讨人胃癌 CD90⁺ 干细胞对胃癌转移和预后的影响。**方法:**无血清悬浮培养及 PKH26 染色确定 SNU-5 细胞系中是否存在肿瘤干细胞,流式细胞术分析 SNU-5 亲本及球体细胞中肿瘤干细胞标志物的表达,分选 CD90⁺ SNU-5 细胞并进行体外生物学特征研究及 SCID 鼠致瘤实验。收集肿瘤医院腹部外科 95 例胃癌患者肿瘤病理标本,免疫组化方法检测胃癌组织中 CD90 的表达。**结果:**SNU-5 细胞无血清悬浮培养 11 d 后形成的细胞球体中存在单个 PKH26 阳性细胞。无血清悬浮培养可将 CD90⁺ SNU-5 细胞富集 6.1 倍,且 CD90 可在球体细胞中与标示干细胞的 PKH26 共染。CD90⁺ SNU-5 细胞较 CD90⁻ SNU-5 细胞和亲本 SNU-5 细胞具有更高的自我更新能力[成球率(7.7 ± 1.1)% vs (1.3 ± 0.4)%、(1.8 ± 0.3)%],均 $P < 0.01$]和侵袭能力[侵袭细胞数(283.3 ± 30.2) vs (48.0 ± 7.5)、(156.7 ± 7.2)个,均 $P < 0.01$]。CD90⁺ SNU-5 细胞在重症联合免疫缺陷(severe combined immune deficiency, SCID)小鼠皮下接种 2×10^2 个细胞 6 周即可致瘤(1/6),而接种 2×10^4 个 CD90⁻ SNU-5 细胞 10 周才能致瘤(1/6)。95 例胃癌患者组织中 CD90 的表达与胃癌的远处转移显著相关($P < 0.01$),且 CD90 阳性胃癌患者的生存期明显短于 CD90 阴性的患者($P < 0.01$)。**结论:**人胃癌细胞系 SNU-5 中存在具有更强自我更新及侵袭能力的 CD90⁺ 干细胞,人胃癌组织中 CD90⁺ 干细胞数量与肿瘤的转移与患者生存期明显相关。

[关键词] 胃癌;肿瘤干细胞;CD90;转移;预后

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)02-0230-07

CD90⁺ cancer stem cells may influence metastasis and prognosis of gastric cancer

Wang Jiajia¹, Sun Lixin¹, Sun Lichao¹, Mo Wenxiu¹, Yu Long¹, Yang Zhihua¹, Liu Qian^{2△}, Ran Yuliang¹(1. State Key Laboratory of Molecular Oncology, cancer Institute, cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 2. Department of Abdominal Surgery, cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:**To isolate and identify the cancer stem cells from gastric cancer cell line SNU-5, and investigate the influence of CD90⁺ cancer stem cells on the metastasis and prognosis of gastric cancer. **Methods:** Non-adherent culture and PKH26 staining was used to determine whether there were cancer stem cells in human gastric cancer cell line SNU-5; Flow cytometry analysis was performed for identification of positive cells with stem cell markers within parent SNU-5 cells and sphere cells; CD90⁺ SNU-5 cells were sorted to identify its biological characteristics *in vivo* and tumorigenicity *in vitro*. Ninety-five cases with gastric cancer selected from cancer Hospital, immunohistochemistry was applied to detect CD90 expression in human gastric cancer. **Results:** The single PKH26 positive cell was observed in spheroids after SNU-5 cells were cultured for 11 days and CD90 could be co-stained with PKH26 in the spheroid cells, a dye indicating the characterization of stem cells. Serum sphere culture can enrich CD90⁺ SNU-5 cells by 6.1 times. The sorted CD90⁺

[基金项目] 国家科技重大专项课题资助(No. 2011ZX09102-010-02)。Project supported by the Major National Science and Technology Project of China (No. 2011ZX09102-010-02)。

[作者简介] 王佳佳(1988-),女,汉族,山东省聊城市人,硕士生,主要从事肿瘤干细胞靶向治疗研究。E-mail:wangjiajia52100@163.com

[通信作者] 冉宇靓(Ran Yuliang, corresponding author), E-mail:ran_yuliang@126.com; 刘骞(Liu Qian, co-corresponding author), E-mail: few1973@yahoo.com.cn。△为共同通讯作者

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130424.1310.009.html>

SNU-5 cells presented higher self-renewal ability (sphere formation rate: [7.7 ± 1.1]% vs [1.3 ± 0.4]%, [1.8 ± 0.3]% , $P < 0.01$), higher invasion (the number of invasive cells [283.3 ± 30.2] vs [48.0 ± 7.5], [156.7 ± 7.2], $P < 0.01$) than CD90⁻ SNU-5 cells and parent SNU-5 cells. Only 2×10^2 CD90⁺ SNU-5 cells can form tumors at 6 weeks (4/6) in severe combined immune deficiency (SCID) mice, whereas at least 2×10^4 CD90⁻ SNU-5 cells were needed to form tumors at 10 weeks (1/6). Immunohistochemical results showed that CD90 expression was significantly associated with distant metastasis of gastric cancer ($P < 0.01$). The survival rate of CD90 positive gastric cancer patients is obviously lower than that of CD90 negative patients ($P < 0.01$). **Conclusion:** CD90⁺ cancer stem cells in human gastric cancer cell line SNU-5 show increased self-renewal and invasion abilities, which are related to metastasis and prognosis of gastric cancer.

[**Key words**] gastric cancer; cancer stem cell; CD90; metastasis; prognosis

[Chin J cancer Biother, 2013, 20(2): 230-236]

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率在世界范围内分别居第四位和第二位^[1]。我国是胃癌高发地区,其发病率和死亡率均居第二位,每年约有 45 万人死于胃癌。导致胃癌死亡率居高不下的主要原因是胃癌细胞能发生深部侵袭和淋巴、肝及腹腔的转移。传统的治疗手段,如手术、放化疗等对胃癌转移的疗效差,因此,胃癌的 5 年生存率近 30 年来一直徘徊在 20% ~ 30%。已有研究发现,在乳腺癌^[2]、前列腺癌^[3]、结肠癌^[4]、肝癌^[5-6]、胰腺癌^[7]、头颈癌^[8]等实体瘤中存在肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)。最近研究表明, CSC 具有促进转移、复发^[9-10]和抵抗放化疗的特性^[11-12]。关于胃癌干细胞的研究尚处于探索阶段,本研究从胃癌细胞系 SNU-5 出发,分离并鉴定 SNU-5 中的干细胞,进一步探讨人胃癌 CD90⁺ 干细胞对胃癌转移和预后的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人胃癌细胞株 SNU-5 由中国医学科学院肿瘤医院研究所细胞及分子生物学实验室保存。常规细胞培养液、B27、bFGF 购自美国 Gibco 公司, FITC-CD90 购自 eBioscience 公司, FITC-羊抗小鼠 IgG/IgM 购自 Jackson 公司, EGF 购自 Invitrogen 公司, DAPI、PKH26 试剂盒购自 Sigma 公司,即用型免疫组化 UltraSensitive™ S-P 超敏试剂盒(KIT-9730)购自福州迈新生物技术开发有限公司。NOD/SCID 小鼠购自维通利华生物公司[动物合格证号 SCXK(京) 2012-0001], 4 ~ 5 周龄, 雌性 27 只。

1.2 胃癌患者的临床资料

95 例胃癌患者病理标本收集于中国医学科学院肿瘤医院腹部外科 2000 年 1 月至 2005 年 10 月期间的手术切除病例, 男性 70 例, 女性 25 例, 年龄

29 ~ 88 岁, 平均年龄 63.8 ± 13.3 岁。按世界卫生组织(WHO)病理分型标准, 其中低分化腺癌 80 例, 中分化腺癌 12 例, 高分化腺癌 2 例, 中分化腺鳞癌 1 例, 术前均未行放、化学治疗。20 例癌旁组织取自距肿瘤外缘 1cm 左右的胃组织。

1.3 SNU-5 细胞株的成球培养及 PKH26 染色

文献^[13]报道, 肿瘤干细胞可在无血清培养基中悬浮生长, 形成由单个干细胞分化而来的球体细胞(Sphere cell)。而 PKH26 作为一种亲脂质体红色荧光染料, 可特异性地标记肿瘤干细胞。将 SNU-5 对数生长期的细胞消化为单个细胞后, 按 PKH26 染料试剂盒说明书将细胞标记 PKH26, 以 1×10^4 /ml 的细胞密度置于含白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)(10 ng/ml)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(20 ng/ml)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(20 ng/ml)、B27 添加物(1:50)、肝素(40 U/ml)和 L-谷氨酰胺(2 mmol/L)的 DMEM-F12 无血清培养基中, 以 500 个/孔接种于低黏附 24 孔板, 细胞呈单个悬浮状态, 于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 11 d, 荧光显微镜观察或用于球体细胞免疫荧光。

1.4 流式细胞术分析及分选 CD90⁺ 细胞

消化对数期生长的 SNU-5 细胞为单细胞悬液, PBS 洗两次, 加入 FITC-CD90, 细胞密度为 1×10^7 /ml, 室温孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 用含 1% BSA 的 PBS 重悬, 流式细胞仪分选并检测 CD90⁺ 阳性细胞比例。

1.5 SNU-5 球体细胞的免疫荧光检测

将无血清悬浮培养得到的球体细胞(已被 PKH26 染料标记)用 PBS 洗一次, 含 4% 多聚甲醛和 1% Triton X-100 的 PBS 固定 4 h, PBST(含 0.1% Triton X-100 和 3% BSA)封闭过夜, PBST(0.1% Triton X-100)洗涤 3 次, 加入 FITC 标记的 CD90 抗

体孵育 48 h, PBST 洗 3 次(以上所有操作均在 4 ℃ 下进行), 用含 1 μg/ml DAPI、50% 甘油的 PBS 封片, 荧光显微镜下拍照。

1.6 细胞自我更新能力的检测

将分选得到的 CD90⁺ 细胞、亲本细胞、CD90⁻ 细胞以 500/孔接种于低黏附 24 孔板, 进行无血清悬浮培养, 每隔 2 d 补液一次, 10 d 后显微镜下计球体细胞数。

1.7 Transwell 侵袭实验

Transwell 小室预先包被 matrigel 基质, 将流式分选得到的 CD90⁺ 细胞、CD90⁻ 细胞、亲本细胞以 4 × 10⁴/孔接种到 Transwell 小室的上室, 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后取下底膜, DAPI 染色、封片, 荧光显微镜下观察穿膜细胞并计数。

1.8 CD90⁺ 细胞对 SCID 鼠的致瘤实验

将从 SNU-5 细胞中分选出的 CD90⁺ 细胞和 CD90⁻ 细胞及亲本细胞接种 SCID 鼠皮下, 观察各细胞亚群的成瘤时间及成瘤率。

1.9 免疫组化检测人胃癌组织中 CD90 的表达

使用常规免疫组化检测方法检测 95 例人胃癌组织及 20 例癌旁组织中 CD90 的表达。组织经脱蜡、抗原修复、封闭后, 加入 CD90 一抗(1: 100 稀释) 4 ℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 依次加入 100 μl 试剂盒中的二抗(生物素标记的羊抗鼠/兔 IgG)、三抗(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶), 室温反应 10 min, DAB 显色, 苏木精复染, 1% 盐酸-75% 酒精分色, 1% 氨水返蓝, 脱水后固定。评分标准: 组织未见染色或染色较浅且在肿瘤细胞中所占比例小于 5% 的为 0 分, 染色比例大于 5% 或染色程度较深的都评为 1 分。

1.10 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件, 组间比较采用 *t* 检验, CD90 的表达与临床参数相关性分析采用 χ^2 检验, 应用 Kaplan-Meier 方法分析总生存期, 并用 Log-Rank 方法分析不同组间生存差异。以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNU-5 球体细胞的成功获得

SNU-5 细胞经无血清悬浮培养(图 1)显示, 随时间延长, 细胞数目增多, 逐渐形成一个致密的细胞球体; 培养至 11 d, 细胞球中间只有单个细胞呈现 PKH26 阳性。细胞成球培养结果证明, 在人胃癌细胞系 SNU-5 中存在肿瘤干细胞。

2.2 SNU-5 细胞中 CD90 可与标记干细胞的 PKH26 共染

SNU-5 细胞标记 PKH26 染料后, 无血清悬浮培养 7 d, 取球体细胞经固定并细胞免疫荧光染色后发现, CD90 可与 PKH26 染料共染(图 2)。实验结果表明, SNU-5 细胞系的 CSC 表达 CD90。

2.3 SNU-5 球体细胞中富集 CD90⁺ 细胞亚群

流式细胞术检测结果如表 1、图 3 所示, 亲本细胞中 CD90⁺ 细胞的比例为(1.3 ± 0.3)%, 而球体细胞中 CD90⁺ 细胞比例为(7.9 ± 0.8)%, 与亲本细胞相比, CD90⁺ 细胞的比例增加了 6.1 倍, CD90⁺ 细胞在无血清悬浮培养后被明显富集, 提示 CD90 可能是 SNU-5 细胞的干细胞标志物。

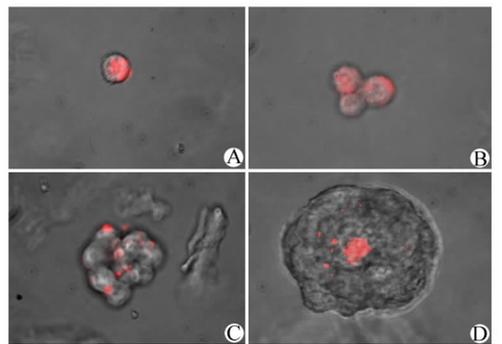


图 1 PKH26 标记的 SNU-5 细胞无血清悬浮成球培养(×400)

Fig. 1 Sphere formation of PKH26-labeled SNU-5 cells in serum-free suspension medium(×400)

A: 1 d, a single PKH26-labeled SNU-5 cell; B: 3 d, cell division; C: 6 d, sphere formation; D: 11 d, a mammosphere derived from one PKH26-labeled SNU-5 cell

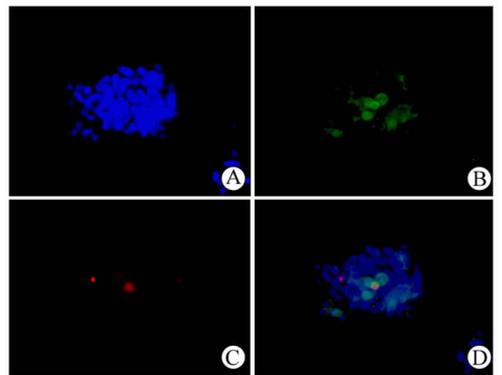


图 2 免疫荧光检测球体细胞中 CD90 与 PKH26 共染情况(×200)

Fig. 2 Co-staining of CD90 and PKH26 in sphere cells detected by immunofluorescence(×200)

A: Nucleus stained with DAPI (blue); B: Cell spheres stained with CD90 antibody (green); C: Cell spheres stained with PKH26 (red); D: Merge

2.4 CD90⁺SNU-5 细胞具有更高的自我更新能力
分选后的 CD90⁺ SNU-5 细胞、CD90⁻ SNU-5 细胞及亲本 SNU-5 细胞的成球培养结果(图 4)显示,

CD90⁺SNU-5 细胞的成球率为(7.7 ± 1.1)% ,明显高于 CD90⁻ SNU-5(1.3 ± 0.4)% 及亲本 SNU-5 细胞(1.8 ± 0.3)% ($t = 9.747, P < 0.01$)。

表 1 流式细胞术检测 SNU-5 亲本及球体细胞中干细胞标志物的表达 (%)

Tab. 1 Expression of cancer stem cell markers in SNU-5 cells and sphere cells detected by flow cytometry (%)

Cell	CD44	ESA	CD90	CD133	CD24	OCT-4
SNU-5	98.9 ± 0.9	98.1 ± 1.4	1.3 ± 0.3	0.3 ± 0.2	35.2 ± 1.7	4.8 ± 1.2
SNU-5 sphere	99.2 ± 0.7	96.3 ± 1.9	7.9 ± 0.8*	0.5 ± 0.2	1.3 ± 0.6	3.3 ± 1.1

* $P < 0.05$ vs SNU-5 group

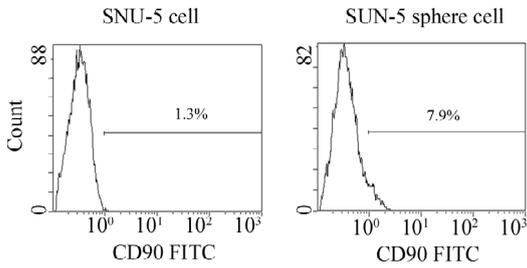


图 3 流式细胞术检测 CD90 在 SNU-5 亲本细胞及球体细胞中的表达

Fig. 3 Expression of CD90 in SNU-5 cells and sphere cells detected by flow cytometry

2.5 CD90⁺SNU-5 细胞具有更强的侵袭能力

Transwell 侵袭结果(图 5)显示,CD90⁺ 细胞侵袭细胞数为(283.3 ± 30.2)个,CD90⁻ 细胞及亲本细胞侵袭细胞数分别为(48.0 ± 7.5)、(156.7 ± 7.2)个。CD90⁺ 细胞的侵袭能力明显强于亲本细胞,CD90⁻ 细胞的侵袭能力明显低于亲本细胞,且 CD90⁺ 细胞侵袭能力与 CD90⁻ 细胞的差异具有明显统计学意义($t = 8.557, P < 0.01$)。

2.6 CD90⁺SNU-5 细胞对 SCID 鼠有高致瘤能力

分选 SNU-5 细胞中的 CD90⁺ 细胞和 CD90⁻ 细胞及亲本细胞接种 SCID 鼠皮下,结果(表 2)显示,CD90⁺ 细胞接种 2×10^2 个细胞在 6 周时即可形成肿瘤(1/6);接种 2×10^4 个在 6 周时成瘤率为 50% (3/6),10 周时成瘤率为 66.7% (4/6)。CD90⁻ 细胞接种 2×10^4 个在 6 周时未见有肿瘤形成,10 周时仅有 16.7% (1/6)成瘤,表明 CD90⁺ 细胞具有肿瘤干细胞的高致瘤能力。

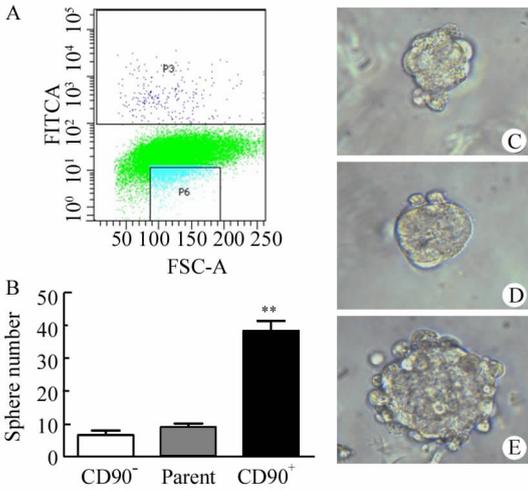


图 4 CD90⁺SNU-5 细胞、CD90⁻ SNU-5 细胞、亲本 SNU-5 细胞自我更新能力比较(×400)

Fig. 4 Comparison of self-renewal in CD90⁻, CD90⁺ and parent SNU-5 cells(×400)

A: FACS sorting scatter plot; B: Comparison of sphere number in CD90⁻, CD90⁺ and parent SNU-5 cells; C: CD90⁻ SNU-5 cells sphere; D: Parent SNU-5 cells sphere; E: CD90⁺ SNU-5 cells sphere
** $P < 0.01$ vs CD90⁻ and parent SNU-5 cell groups

表 2 CD90⁺ SNU-5、CD90⁻ SNU-5、亲本 SNU-5 细胞接种 SCID 鼠的致瘤性 (n)

Tab. 2 Tumorigenicity of CD90⁺, CD90⁻ and parent SNU-5 cells injected subcutaneously into SCID mice (n)

Group	Injected cells	Time after injection (t/week)			
		4	6	8	10
CD90 ⁺ cells	2×10^2	0/6	1/6	1/6	2/6
	2×10^3	0/6	1/6	1/6	2/6
	2×10^4	0/6	3/6	3/6	4/6
CD90 ⁻ cells	2×10^2	0/6	0/6	0/6	0/6
	2×10^3	0/6	0/6	0/6	0/6
	2×10^4	0/6	0/6	0/6	1/6
Parent cells	2×10^2	0/6	0/6	0/6	0/6
	2×10^3	0/6	0/6	0/6	0/6
	2×10^4	0/6	0/6	1/6	3/6

2.7 人胃癌组织细胞中 CD90 的表达水平

免疫组化检测结果如图 6 所示, CD90 在人胃癌组织中的阳性染色以细胞质呈黄色至棕黄色为主。在检测的 95 例患者胃癌组织中, CD90 阳性患者的比例为 37. 9% (36/95), 且在高、中、低分化的腺癌中均有表达。20 例癌旁组织中均未见 CD90 表达。

2.8 人胃癌组织 CD90 的表达与肿瘤转移和患者预后明显相关

统计学分析结果(表 3)显示, 胃癌组织 CD90 的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、淋巴结转移及分化程度无明显相关性, 而与肿瘤的远处转移显著相关($\chi^2 = 6. 414, P < 0. 05$)。采用 Kaplan-Meier 分析(图 7)发现, CD90⁺ 组的患者的生存期明显低于 CD90⁻ 组($P < 0. 01$), 40 个月时, CD90⁺ 组的患者已经全部死亡, 而 CD90⁻ 组的患者仍有约 10% 的存活率。结果提示, CD90 与患者的预后密切相关。

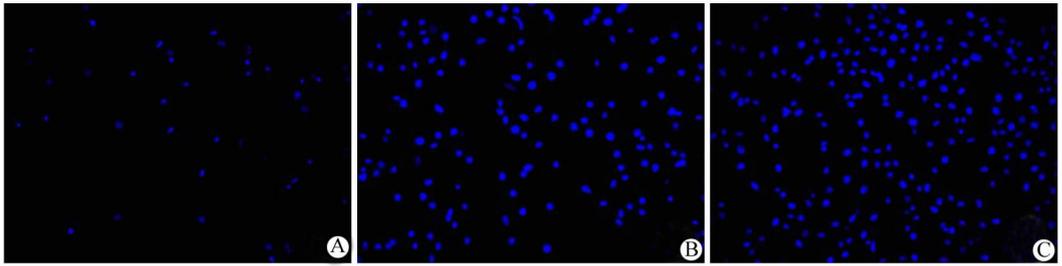


图 5 CD90⁺ SNU-5 细胞、CD90⁻ SNU-5 细胞、亲本 SNU-5 细胞侵袭能力比较(×200)
Fig. 5 Comparison of invasion capacity of CD90⁻, CD90⁺ and parent SNU-5 cells (×200)
A: CD90⁻ SNU-5 cells; B: Parent SNU-5 cells; C: CD90⁺ SNU-5 cells

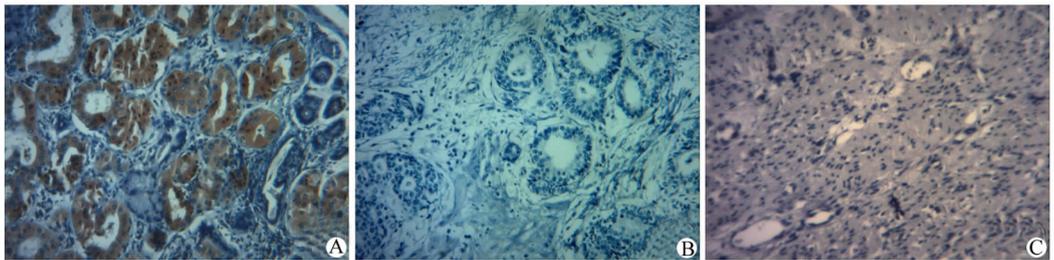


图 6 免疫组化检测 CD90 在人胃癌组织中的表达(×400)
Fig. 6 Expression of CD90 in gastric cancer tissues detected by immunohisto chemistry(×400)
A: Positive expression of CD90 in gastric cancer tissues; B: Negative expression of CD90 in gastric cancer tissues;
C: Negative expression of CD90 in gastric adjacent cancer tissues

3 讨论

自我更新、多向分化及致瘤性是日前公认的 CSC 的特性。自 2003 年美国密歇根大学^[2]首次报道从人乳腺癌组织中分离鉴定 CSC 以来, 现已在多种实体肿瘤^[14-15]中证实 CSC 的存在。对多种实体肿瘤 CSC 的研究表明, CSC 多处于 G₀ 期, 除具有高致瘤性外, 还具有抗凋亡、高 DNA 修复、强侵袭迁移能力和抵抗放化疗等特性, 因此 CSC 在肿瘤转移、复发、耐药及预后中起重要作用。临床上, 经放化疗治疗后, 肿瘤的生长可明显得到抑制, 但是肿瘤常复发^[16], 而且往往伴随

着耐药和转移, 这些复发通常是不可治愈的^[17]。目前关于胃癌干细胞的研究尚处于探索阶段, 这些报道主要集中在胃癌干细胞标志物^[18]及干性基因^[19]的寻找上, 而与临床相关性的报道较少。2009 年, Fukuda 等^[20]采用流式细胞术对人胃癌细胞系 MKN45 中的 SP 细胞进行了分离, 发现 SP 细胞较非 SP 细胞高表达 ABC 转运蛋白基因(*MDR1* 和 *BCP1*), 并有较高的化疗耐药性和体内致瘤性, 100 个 SP 细胞即可 SCID 鼠成瘤。随后, 又有报道从人胃癌组织中分离出 CD90⁺ 胃癌干细胞^[21]及 ESA⁺/CD44⁺ 胃癌干细胞^[22], 这些细胞均有较高的体内致瘤性。

表 3 CD90 在 95 例胃癌组织中的表达及其与胃癌临床参数的相关性(*n*)

Tab. 3 Expression of CD90 in 95 gastric cancer tissues and its correlation with clinical pathological parameters of gastric cancer(*n*)

Parameter	Case	Score of CD90 expression		<i>P</i>
		0	1	
Gender				0.479
Male	70	42	28	
Female	25	17	8	
Primary tumor (pT)				0.590
pT1	1	1	0	
pT2	30	21	9	
pT3	47	27	20	
pT4	17	10	7	
Lymph metastasis(pN)				0.899
pN0	11	7	4	
pN1	23	15	8	
pN2	35	20	15	
pN3	26	17	9	
Distant metastasis(pM)				0.011
pM0	84	56	28	
pM1	11	3	8	
Differentiation				0.475
High	2	1	1	
Moderate	13	10	3	
Low	80	48	32	

本研究从人胃癌细胞系 SNU-5 出发,寻找胃癌干细胞标志物,并进一步探讨人胃癌 CD90⁺ 干细胞的表达与胃癌临床参数的相关性。实验发现, SNU-5 细胞无血清悬浮培养可形成细胞球体;用亲脂染料 PKH26 染色追踪发现,在培养 11 d 形成的细胞球体中,仅存在单个细胞 PKH26 阳性的现象,说明该球体由单个细胞分化增殖而来,且存在不对称分裂的现象,从而证明了 SNU-5 细胞系中存在 G₀ 期的肿瘤干细胞。由于放化疗主要对增殖分裂旺盛的细胞有杀伤作用,因此处于 G₀ 期的 CSCs 对放化疗不敏感,这也是造成肿瘤患者放化疗后复发概率增高的主要原因。有研究^[21-22]报道,无血清悬浮培养可富集肿瘤干细胞。本实验结果发现, SNU-5 细胞系中 CD90 的表达可通过无血清悬浮培养的方法被富集,且在形成的细胞球体中, CD90 可与标识干细胞的 PKH26 染料共染。分选后的 CD90⁺ 细胞的自我更新、侵袭能力均远高于 CD90⁻ 细胞,且 200 个 CD90⁺ 细胞即能在 SCID 鼠体内致瘤,结果充分证明了 CD90 可作为 SNU-5 细胞系的干细胞标志物。

本研究采用免疫组化方法检测了 95 例患者胃癌组织中 CD90 的表达,统计学显示, CD90⁺ 细胞比例与临床胃癌的远处转移及患者生存期密切相关 (*P* < 0.01)。在检测的 95 例样本中,有 11 例样本发生了远处转移,其中有 8 例表达 CD90⁺,结果提示, CD90⁺ 肿瘤干细胞在胃癌的远处转移中发挥了重要的作用。从生存曲线中可以看出, CD90⁺ 组的患者生存期明显低于 CD90⁻ 组,随访 40 个月时, CD90⁺ 组的患者已经全部死亡,而 CD90⁻ 组的患者仍有约 10% 的存活率。结果提示, CSC 在肿瘤的转移、复发及预后中起重要作用。目前,肿瘤的靶向治疗在临床上已经取得了显著的疗效,相对于传统的肿瘤治疗方式来说,靶向治疗具有低毒性、高特异性等优点,肿瘤干细胞的发现为肿瘤的靶向治疗提供了新的治疗策略——靶向肿瘤干细胞。根据已有报道^[6,23]显示,靶向肿瘤干细胞的治疗有更大的应用潜力^[22-23]。本研究发现的 CD90⁺ 胃癌干细胞为靶向胃癌干细胞的治疗提供了新的治疗靶点,靶向干细胞联合化疗能有效改善患者的预后^[21],能在根本上解决肿瘤的转移、复发问题,在改善肿瘤患者的预后中也发挥着重要的作用。

[参 考 文 献]

[1] Parkin DM. International variation [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (38): 6329-6340.

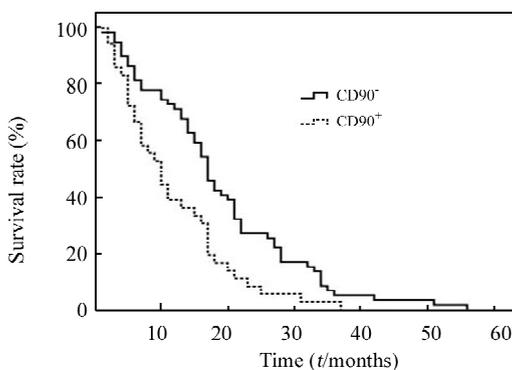


图 7 Kaplan-Meier 分析 CD90 的表达与胃癌患者预后的关系

Fig. 7 Relationship between prognosis of patients with gastric cancer and CD90 expression analyzed by Kaplan-Meier

[2] 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.

[3] Collins A T, Berry P A, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. cancer Res. 2005, 65(23): 10946-10951.

[4] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. Nature, 2007, 445(7123): 111-115.

[5] 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.

[6] 王云霞, 容雁, 张晓艳, 等. 杂交瘤单抗 4F11 识别 CD90⁺ 肝癌干细胞并抑制其侵袭 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(2): 122-127.

[7] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. cancer Res, 2007, 67(3): 1030-1037.

[8] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(3): 973-978.

[9] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.

[10] Couzin J. Medicine. Tracing the steps of metastasis, cancer's menacing ballet [J]. Science, 2003, 299(5609): 1002-1006.

[11] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response [J]. Nature, 2006, 444(7120): 756-760.

[12] Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(25): 16220-16225.

[13] 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.

[14] Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, et al. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular cancer [J]. Hepatology, 2013, 57(4): 1484-1497.

[15] Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells [J]. J Clin Invest, 2010, 120(9): 3326-3339.

[16] Balic M, Lin H, Young L, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype [J]. Clin cancer Res, 2006, 12(19): 5615-5621.

[17] Saini V, Shoemaker RH. Potential for therapeutic targeting of tumor stem cells [J]. cancer Sci, 2010, 101(1): 16-21.

[18] Xue Z, Yan H, Li J, et al. Identification of cancer stem cells in vincristine preconditioned SGC7901 gastric cancer cell line [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(1): 302-312.

[19] 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): 453-459.

[20] Fukuda K, Saikawa Y, Ohashi M, et al. Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer [J]. Int J Oncol, 2009, 34(5): 1201-1207.

[21] Jiang J, Zhang Y, Chuai S, et al. Trastuzumab (herceptin) targets gastric cancer stem cells characterized by CD90 phenotype [J]. Oncogene, 2012, 31(6): 671-682.

[22] Han ME, Jeon TY, Hwang SH, et al. cancer spheres from gastric cancer patients provide an ideal model system for cancer stem cell research [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(21): 3589-3605.

[23] 孙力超, 赵璇, 遇珑, 等. 抗肝癌干细胞功能性单克隆抗体的研制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(2): 121-127.

[收稿日期] 2012 - 11 - 12 [修回日期] 2013 - 02 - 20

[本文编辑] 王莹, 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来少数科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至我们国家带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明。

2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”,通过大量国内外学术文献的全文比对,对稿件进行学术不端行为的检查。

3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》删除学术不端文献系统”,该系统协助本刊对已发表论文的学术不端行为进行全面复核。

4. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重给该文作者以下处理:书面警告,通知作者所在单位,在本领域相关期刊间通报,2年内本刊不刊登有其署名的稿件,相关学术责任人(通讯作者)署名的其他稿件延缓审稿和刊登等。

(本刊编辑部)