

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.002

· 研究快报 ·

¹³¹I 标记 CD133 单链抗体对人肝癌 CD133⁺ HepG2 干细胞的抑制作用

侯妍利, 陈兴月, 段丽群, 唐敏, 康强强, 舒锦, 李少林(重庆医科大学放射医学教研室, 重庆 400016)

[摘要] 目的: 研究¹³¹I 标记 CD133 单链抗体(single chain variable fragment, ScFv)在体外对人肝癌 CD133⁺ HepG2 干细胞的抑制作用。方法: 免疫磁珠分选 HepG2 细胞, 流式细胞术检测分选前后 HepG2 细胞的 CD133 表达率, 克隆形成实验及体内成瘤实验验证 CD133⁺ HepG2 细胞的“干性”。氯胺 T 法¹³¹I 标记 CD133 ScFv 并测定标记率、比活度、放射性浓度。将分选出的 CD133⁺ HepG2 细胞分为¹³¹I-CD133 抗体治疗组、¹³¹I 治疗组、CD133 抗体治疗组和¹³¹I + CD133 抗体治疗组, MTT 法检测各组中对 CD133⁺ HepG2 细胞生长抑制的最适剂量和不同药物在 12、48、72 h 三个时间点对 CD133⁺ HepG2 干细胞的生长抑制作用, 流式细胞术检测各组细胞周期的变化。结果: 分选的 HepG2 细胞的 CD133 表达率显著高于未分选细胞[(97.71 ± 1.13)% vs (1.52 ± 0.78)% , $t = 1.13, P = 0.000$]。CD133⁺ HepG2 细胞相对于 CD133⁻ HepG2 细胞具有更强的体外成球、克隆形成能力[(45.03 ± 1.35)% vs (7.4 ± 0.54)% ; $t = 3.92, P = 0.000$]和体内成瘤能力。¹³¹I-CD133 ScFv 的标记率为 88.92% , 放射化学纯度为 98.63% 。当¹³¹I 为 3.7 MBq/100 μl、CD133 抗体为 1 μg/100 μl 时, 对 CD133⁺ HepG2 细胞的抑制率最高, 达 (89.58 ± 0.74)% ; 在此剂量下¹³¹I-CD133 ScFv 治疗组对 CD133⁺ HepG2 细胞生长抑制率显著高于其余各实验组, 且呈时间依赖性。¹³¹I-CD133 ScFv 治疗组 G₀/G₁ 期细胞比例为 (27.50 ± 1.12)% , 较其余各组均明显减少 ($P < 0.05$) 。结论: 成功制备的¹³¹I-CD133 ScFv 在体外能有效抑制人肝癌 CD133⁺ HepG2 干细胞的生长。

[关键词] 肝癌干细胞; CD133; ¹³¹I; 单克隆抗体; 单链抗体

[中图分类号] R735.1; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)01-007-07

Inhibitory effect of ¹³¹I-labeled anti-CD133 ScFv on CD133⁺ human hepatocellular carcinoma cells

Hou Yanli, Chen Xingyue, Duan Liqun, Tang Min, Kang Qiangqiang, Shu Jin, Li Shaolin (Department of Radiation Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of the anti-CD133 single chain variable fragment (ScFv) labeled with ¹³¹I on CD133⁺ cancer stem cells (CSCs) sorted from human hepatocellular liver carcinoma HepG2 cells *in vitro*. **Methods:** CD133⁺ and CD133⁻ CSCs were isolated from HepG2 cells through magnetic-activated cell sorting (MACS). CD133 expression in both sorted and unsorted cells was analyzed by flow cytometry (FCM). The property of CD133⁺ CSCs was validated by sphere-forming assay and colony formation assay *in vitro* and tumor formation assay in nude BALB/c mice *in vivo*. The monoclonal antibody CD133 was labeled with ¹³¹I using the chloramines T method and the labeling rate, specific activity and radioactivity were evaluated. CD133⁺ CSCs were treated with ¹³¹I, CD133 ScFv, ¹³¹I-CD133 ScFv, and ¹³¹I + CD133 ScFv. At 12, 24 and 48 hours after treatment, cell proliferation and cell cycle progression were assessed by MTT assay and FCM respectively. **Results:** CD133 was detected in (97.71 ± 1.13)% of the sorted CD133⁺ HepG2 cells but in only (1.52 ± 0.78)% of unsorted HepG2 cells ($P = 0.0001$). As compared with CD133⁻ HepG2 cells, CD133⁺ HepG2 cells showed a higher tumor sphere formation ability ([45.03 ± 1.35]% vs [7.4 ± 0.54]%, $P < 0.001$). The ¹³¹I labeling rate of CD133 ScFv was 88.92%, and the radiochemical-purity was 98.63%. A maximal CD133⁺ cell growth inhibition of (89.58 ± 0.74)% was observed ($P < 0.05$) when ¹³¹I was used at 3.7 MBq/100 μl

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30370422, No. 81171365)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30370422, No. 81171365)

[作者简介] 侯妍利(1986-),女,四川南充人,硕士生,主要从事肝癌干细胞体内外靶向治疗研究。E-mail: dan861218@163.com

[通信作者] 李少林(Li Shaolin corresponding author), E-mail: lishaolin@cqmu.edu.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140218.1056.002.html>

and CD133 ScFv was used at 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, significantly higher than other doses ($P < 0.05$). The proportion of G_0/G_1 phase arrest in cells treated with ^{131}I -CD133 ScFv was significantly reduced as compared with treatments ($P < 0.05$).

Conclusion: Radioisotope ^{131}I labeled CD133 ScFv may effectively inhibit growth of CD133-positive human hepatocellular carcinoma cells *in vitro*.

[**Key words**] liver cancer stem cell; CD133; ^{131}I ; monoclonal antibody; single chain variable fragment(ScFv)

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(1): 7-13]

全世界每年新发现的 26 万例肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中, 42.5% 发生在中国, 被称之为“癌中之王”, 与肺癌、胃癌一起被称为病死率最高的三大癌症^[1]。HCC 总体疗效不理想, 主要原因是由于肿瘤细胞对放化疗的抵抗^[2]。随着对肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)的深入研究, Chiba 等^[3-8]发现, 肝癌中也存在这类具有自我更新、无限增殖和多向分化潜能的干细胞; 其与肝癌细胞比较, 具有高致瘤性, 在放化疗中表现出更强的抵抗性能^[9-10]。人 CD133 是由 *PROM1* 基因编码的 5 次穿膜糖蛋白, 其基因定位于人类的 4 号和 2 号染色体上^[11], 它作为肝癌干细胞的表面标志物已逐渐被实验所证实^[12]。基于前期研究成果, 本课题组选用 CD133 为肝癌干细胞的分选标志物, 采用免疫放射治疗(radioimmunotherapy, RIT)手段, 分析 ^{131}I 标记 CD133 单链抗体(single chain variable fragment, ScFv)在体外对肝癌 CD133⁺ HepG2 干细胞的生长抑制作用, 探讨其使用于肝癌放射免疫治疗的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

人肝癌 HepG2 细胞由本实验室保存。BALB/c 裸鼠, SPF 级, 雌雄各半, 质量 20 ~ 26 g, 4 ~ 6 周龄, 购自重庆医科大学实验动物中心, 饲养于恒温(25 $^{\circ}\text{C}$)、恒湿(45%)的 SPF 级层流架中[动物合格证号: SCXK(京)2009-2007]。Na ^{131}I 由重庆医科大学第一附属医院核医学科提供。新生胎牛血清、DMEM 及 DMEM/F12(1:1)培养基均购自 Gibco 公司, MACS 系统、CD133 MicroBead Kit 分离抗体、CD133/2-PE 流式抗体、CD133/1-pure Western blotting 抗体、FcR 阻断剂均购自德国 MiltenyiBiotec 公司, CD133 ScFv 购自 Immunoway 公司, 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、人白蛋白抗原(B27)及人白血病抑制因子(LIF)均购自美国 PeproTech 公司, MTT 粉购自碧云天生物技术研究所, 吉姆萨染液购自北京索莱宝公司, 氯胺-T 购自天津天台精细化学品公司, 偏重亚硫酸钠购自

温州东升化工试剂厂。

1.2 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞以含 10% 新生胎牛血清的 DMEM 培养基置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养, 待细胞覆盖率达 80% ~ 90% 时按 1:2 或 1:3 传代, 取对数生长期细胞进行磁珠分选。

1.3 免疫磁珠分选 CD133⁺ HepG2 细胞

取对数生长期细胞 1×10^8 个, PBS 洗涤, 胰酶消化, 缓冲液洗涤、调整, $300 \times g$ 离心 10 min, 弃上清。300 μl 缓冲液重悬细胞, 加入 100 μl FcR 阻断剂, 加入 100 μl CD133 免疫磁珠(MicroBeads), 充分混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min。加入 1 ~ 2 ml 缓冲液清洗细胞, $300 \times g$ 离心 10 min, 充分去除上清液, 用缓冲液重悬细胞至 500 μl 。放置好分选架、分选器、MS 柱及滤器, 向滤器中加入 500 μl 缓冲液润洗分选柱。将先前准备好的细胞过柱, 分别收集 CD133⁻ 细胞与 CD133⁺ 细胞并计数。将分选得到的 CD133⁺ HepG2 细胞在含有 20 ng/ml EGF、10 ng/ml FGF、10 ng/ml LIF、2% B27 的 DMEM/F12 培养基中培养。

1.4 流式细胞术检测分选前后 HepG2 细胞的 CD133 表达率

取分选前的 HepG2 细胞、分选后的 CD133⁺ HepG2 细胞, 调整细胞密度至 $1 \times 10^7/80 \mu\text{l}$ 。分别加入 20 μl FcR 阻断剂、10 μl CD133/2 抗体, 充分混匀, 避光冷藏 20 min(4 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$)。加入 1 ~ 2 ml 缓冲液, $300 \times g$ 离心 10 min, 用适量缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪检测磁珠分选前后 HepG2 细胞 CD133 的表达。

1.5 克隆形成实验对比 CD133⁺ 与 CD133⁻ HepG2 细胞克隆形成能力

采用梯度倍数稀释法分别将 CD133⁺ 与 CD133⁻ HepG2 细胞稀释至 $1 \times 10^4/\text{ml}$, 接种 6 孔板, $1 \times 10^3/\text{孔}$, 每 3 d 换液, 10 ~ 14 d 后终止培养。弃去上清液, 用 PBS 小心浸洗 2 次。用甲醇固定 2 ~ 3 min 后, 加入提前配置好的吉姆萨染液(A: B = 1: 9) 1.5 ml/孔, 染色 30 min, 用流水缓慢洗去染液, 空气干燥。普通光学显微镜下计数 ≥ 50 个细胞的集落, 计算克隆形成率(plating efficiency, PE), $\text{PE}(\%) =$

集落数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 BALB/c 裸鼠成瘤实验检验 CD133⁺ HepG2 细胞的体内致癌性

将分选后的 CD133⁺、CD133⁻ HepG2 细胞调整至 $1 \times 10^2/200 \mu\text{l}$ 、 $1 \times 10^3/200 \mu\text{l}$ 、 $1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$, 分别接种到 12 只 BALB/c 裸鼠两侧前臂皮下, 每种浓度 4 只, 左侧 CD133⁻ HepG2 细胞, 右侧 CD133⁺ HepG2 细胞。观察 4 周, 每周观察两组裸鼠的成瘤和生长情况, 测量肿瘤长径, 以长径 $> 0.5 \text{ cm}$ 为种植瘤成功。如果小鼠死亡或肿瘤长径 $< 0.5 \text{ cm}$ 则认为种植失败。

1.7 CD133 ScFv 的 ^{131}I 标记和鉴定

采用氯胺 T 法将放射性核素 Na^{131}I 标记 CD133 ScFv 并纯化。以 $48.84 \text{ MBq Na}^{131}\text{I} : 50 \mu\text{g CD133 ScFv}$ 的比例标记, 在 SN-684 型放射免疫计数仪上测量放射性计数, 并采用纸层析法计算 CD133 ScFv 的标记率、放射性化学纯度、放射性浓度, 比活度。标记率(%) = 第一峰(^{131}I -CD133 ScFv)的放射性测量值/所有洗脱液的放射性测量值。放射化学纯度(%) = 纸层析中 ^{131}I -CD133 ScFv 的放射性计数/所有纸段的放射性计数之和。放射性浓度 = 放射性活度(Bq)/样品体积(ml)。比活度 = 投入的 Na^{131}I 总量 \times 标记率/投入的 CD133 ScFv 量。将 ^{131}I -CD133 ScFv 置于室温 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 于第 24、48、72 h 测定放射化学纯度, 评价其体外稳定性。

1.8 ^{131}I -CD133 ScFv 免疫结合活性的测定

取 CD133⁺ HepG2 细胞, 用干细胞培养液制备细胞悬液, 调至 $1 \times 10^4/\text{ml}$, 分至 8 个离心管中, 每个管中分别加 1 ml 细胞悬液, 加入 ^{131}I -CD133 ScFv ($1.5 \times 10^6 \text{ cpm}/1 \times 10^4$ 细胞), 摇匀, 取其中 4 管置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱培养 30、60、90、120 min, 另外 4 管放至 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养作为对照。培养结束后, 分别于 $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清液, 沉淀细胞用 PBS 洗涤 3 次, 最后在 γ 放射免疫计数仪上测定每管沉淀细胞的总放射性。结合率(%) = 离心后试管中 cpm/总 cpm $\times 100\%$ 。实验重复 4 次。

1.9 MTT 法检测 ^{131}I -CD133 ScFv 对 CD133⁺ HepG2 细胞增殖的影响

1.9.1 剂量筛选 设立 ^{131}I -CD133 ScFv 组、 ^{131}I 组、CD133 ScFv 组、空白对照组, 每组 3 个复孔、5 个浓度梯度。将 CD133⁺ HepG2 细胞以 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 密度接种 96 孔板($100 \mu\text{l}/\text{孔}$), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养过夜, 用完全培养基将 ^{131}I -CD133 ScFv、 ^{131}I 、CD133 ScFv 分别调整至 $74 \text{ MBq}/100 \mu\text{l}$ (CD133 约 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$)、 $74 \text{ MBq}/100 \mu\text{l}$ 和 CD133 ScFv $2 \mu\text{g}/100$

μl , 依次倍比稀释 8 个浓度梯度, 分别加 $100 \mu\text{l}$ 至各组细胞孔内。细胞移入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 加 $20 \mu\text{l}/\text{孔}$ MTT ($5 \text{ mg}/\text{ml}$) 染液, 继续培养 6 h 后, 弃上清, 每孔加 $100 \mu\text{l}$ DMSO, 避光震荡 10 min 使结晶物充分溶解。酶标仪测定各孔在 570 nm 波长处的光密度(D)值, 计算增殖抑制率。增殖抑制率(%) = $(1 - \text{实验组 } D \text{ 值}/\text{对照组 } D \text{ 值}) \times 100\%$ 。绘制抑制曲线, 取三线差距最大的作用剂量进一步实验。

1.9.2 ^{131}I -CD133 ScFv 对 CD133⁺ HepG2 细胞增殖的抑制作用 设立 ^{131}I -CD133 ScFv 组、 ^{131}I 组、CD133 ScFv 组、 ^{131}I + CD133 ScFv 组、空白对照组, 每组 3 个复孔。将 CD133⁺ HepG2 细胞接种至 96 孔板, 方法同前。用干细胞培养基将 ^{131}I -CD133 ScFv、 ^{131}I 、CD133 ScFv 分别调整至 $37 \text{ MBq}/\text{ml}$ 、 $37 \text{ MBq}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, ^{131}I + CD133 ScFv 组中 ^{131}I 放射性浓度为 $37 \text{ MBq}/\text{ml}$ 、CD133 ScFv 质量浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$; 对照组为单纯干细胞培养基培养的 CD133⁺ HepG2 细胞。分别在培养 24、48、72 h 3 个时间点检测, 上述各组培养 3 h 后, ^{131}I -CD133 ScFv 组、CD133 ScFv 组、 ^{131}I + CD133 ScFv 组换液移去未结合抗体, ^{131}I 组加含同样浓度 ^{131}I 的完全培养基 $100 \mu\text{l}$, 继续培养后酶标仪上波长为 560 nm 时检测 D 值, MTT 和 DMSO 加样和处理同前。计算各实验组的细胞增殖抑制率。

1.10 流式检测治疗后细胞周期

实验分组及处理方法同上, 各组分别作用 12 h 后换液, PBS 洗 3 遍, 移去未结合抗体和游离的 ^{131}I , 继续培养, 分别于 24、48、72 h 后收集细胞约 1×10^6 个, $1000 \times g$ 离心 5 min, 75% 乙醇重悬, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 流式细胞仪检测。

1.11 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 统计软件, 多个样本均数比较采用重复测量方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HepG2 细胞分选前后的 CD133 的表达情况

流式检测结果(图 1)显示, 未分选的 HepG2 细胞中 CD133 的表达率为 $(1.52 \pm 0.78)\%$, 分选后的 HepG2 细胞中的 CD133 表达率则为 $(97.71 \pm 1.13)\%$, 两者差异有统计学意义, ($t = 1.13$, $P = 0.000$)。

2.2 CD133⁺ HepG2 细胞成球培养

分选得到的 CD133⁺ HepG2 细胞、CD133⁻

HepG2 细胞分别接种于含细胞生长因子的无血清培养基中, 细胞均呈悬浮状态。培养 24 ~ 48 h 后, CD133⁺ HepG2 细胞组培养基中开始出现悬浮生长的细胞球, 此时细胞球较小, 细胞呈圆形, 大小一致, 折光性强, 立体饱满。至第 4 天时, 大量悬浮细胞聚团, 呈立体球状, 而 CD133⁻ HepG2 细胞在相同条件下出现形态异常最后逐渐死亡 (图 2)。

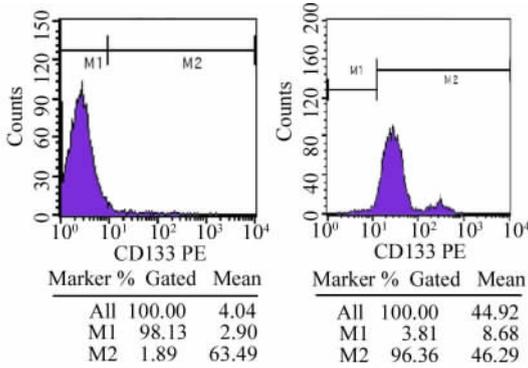


图 1 流式术检测分选前后 HepG2 细胞 CD133 的表达
Fig. 1 CD133 expression of HepG2 cells before and after sorting detected by FCM

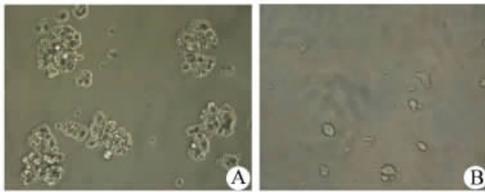


图 2 体外无血清培养观察 CD133⁺ HepG2 的成球情况 (×200)

Fig. 2 Tumor sphere formation of the CD133⁺ HepG2 cells cultured in serum-free medium (×200)

A: CD133⁺ HepG2 cells; B: CD133⁻ HepG2 cells

2.3 CD133⁺ 与 CD133⁻ HepG2 细胞克隆形成能力的对比

将 CD133⁺ 与 CD133⁻ HepG2 细胞培养 14 d 后观察两组细胞的克隆形成情况 (图 3), CD133⁺ 细胞的克隆形成率显著高于 CD133⁻ 细胞 [(45.03 ± 1.35)% vs (7.4 ± 0.54)% ; t = 3.92, P = 0.000] CD133⁺ HepG2 细胞比 CD133⁻ HepG2 细胞具有更强的克隆形成能力。

2.4 CD133⁺ HepG2 细胞在裸鼠体内成瘤能力强于 CD133⁻ HepG2 细胞

接种瘤细胞 4 周后观察两组裸鼠成瘤情况, 结果 (图 4) 显示, 1 × 10³/ml 组的 CD133⁺ HepG2 细胞有 2 只鼠形成皮下移植瘤, 而 1 × 10⁴/ml 细胞组的

3 只裸鼠全形成肿瘤, 最大径均超过 0.5 cm。相同条件下, CD133⁻ HepG2 细胞均未形成移植瘤。H-E 染色显示, CD133⁺ HepG2 细胞形成的肿瘤组织中肿瘤细胞排列紧密, 细胞核清晰可见。

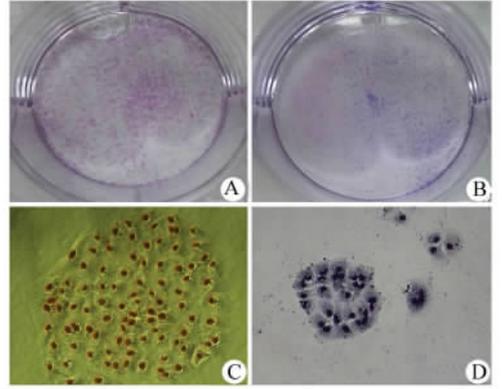


图 3 克隆形成实验检测 CD133⁺ 与 CD133⁻ HepG2 细胞的增殖能力 (C 和 D ×200)

Fig. 3 Analysis of cell proliferation abilities of CD133⁺ HepG2 and CD133⁻ HepG2 cells by colony formation assay (C, D, ×200)

A: CD133⁺ HepG2 cells; B: CD133⁻ HepG2 cells; C: CD133⁺ HepG2 cells under a microscope (×200); D: CD133⁻ HepG2 cells under a microscope (×200)

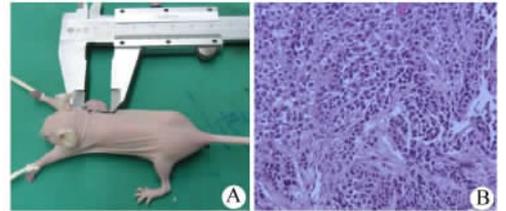


图 4 BALB/c 裸鼠体内成瘤

Fig. 4 Tumorigenicity in BALB/c nude mice

A: Tumorigenicity of CD133⁺ and CD133⁻ cell; B: H-E staining of the tumor tissue (×200)

2.5 成功制备的¹³¹I-CD133 ScFv 具有良好的免疫结合活性

氯胺 T 法标记 CD133 ScFv, 测定其标记率为 88.92%, 纯化后的放射化学纯度为 98.63%, 放射性比活度为 0.87 MBq/μg。24、48、72 h 测得的放射性化学纯度依次为 96.63%、95.16% 和 92.57%, 说明标记产物在体外具有较好稳定性。¹³¹I-CD133 ScFv 与 CD133⁺ HepG2 细胞共同培养 90 min 后, 结合率为 (65.50 ± 0.93)%, 120 min 后为 (61.17 ± 0.89)%, 说明标记抗体具有很好的免疫结合活性。

2.6 ^{131}I -CD133 ScFv 对 CD133⁺ HepG2 细胞的体外抑制作用

(1) 5 个不同的放射剂量和 CD133 抗体浓度分别作用于空白组、 ^{131}I -CD133 ScFv 组、 ^{131}I 组和 CD133 ScFv 组的 CD133⁺ HepG2 细胞,抑制率见表 1。结果显示,当 ^{131}I 活度为 3.7 MBq/100 μl 、CD133 ScFv 质量浓度为 1 μg /100 μl 时(即表中 C2),三组细胞增殖抑制率之间的两两差距最大, ^{131}I -CD133 ScFv 组细胞增殖的抑制率明显高于 ^{131}I 组和 CD133 ScFv 组($t = 1.08, P < 0.01$; $t = 1.04, P < 0.01$),故采用此作用剂量进行下一步的实验。

(2) 以上一步筛选实验得到的最佳作用剂量进行肿瘤细胞抑制实验,结果(表 2)显示,在 24、48、和 72 h 三个时间点上, ^{131}I -CD133 ScFv(3.7 MBq/100 μl)组 CD133⁺ HepG2 细胞增殖的抑制率均分

别明显高于 ^{131}I (3.7 MBq/100 μl)组、CD133 ScFv(1 μg /100 μl)组和 ^{131}I +CD133 ScFv(3.7 MBq/100 μl +1 μg /100 μl)组。在 ^{131}I -CD133 ScFv 组中,随着作用时间的延长,CD133⁺ HepG2 细胞增殖的抑制率随之增加($F = 828.218, P = 0.000$),72 h 时的瘤细胞增殖抑制率高达(87.59 \pm 0.85)%。

2.7 ^{131}I -CD133 ScFv 对 CD133⁺ HepG2 细胞周期的影响

流式细胞仪检测各实验组细胞的周期,结果(表 3,图 5)显示,四个治疗组的 G_0/G_1 期细胞在 24、48、72 h 三个时间点较空白对照组均明显减少,而 ^{131}I -CD133 ScFv 组减少最为明显。而随着时间的增长, ^{131}I -CD133 ScFv 组 G_0/G_1 期细胞减少程度明显高于其余三组,从(60.29 \pm 0.86)% 减少到(27.50 \pm 1.12)%($F = 51.03, P = 0.000$)。

表 1 不同组不同剂量作用下 ^{131}I -CD133 ScFv 对 CD133⁺ HepG2 细胞的抑制率 [$n = 3, (\bar{x} \pm s)\%$]

Tab. 1 The inhibitory rate of CD133⁺ HepG2 cells induced by different doses at different groups [$n = 3, (\bar{x} \pm s)\%$]

Drug	C1	C2	C3	C4	C5
^{131}I -CD133 ScFv	94 \pm 1.2	89.58 \pm 0.74	72.69 \pm 0.16	40.39 \pm 2.10	33.86 \pm 1.63
^{131}I	90 \pm 0.8	73.23 \pm 0.56	55.41 \pm 1.93	36.98 \pm 0.47	35.10 \pm 1.82
CD133 ScFv	90 \pm 1.4	82.24 \pm 1.78	59.41 \pm 1.27	40.76 \pm 2.29	32.15 \pm 3.95
<i>F</i>	9.66	149.733	137.654	3.955	11.843
<i>P</i>	0.013	0.000	0.000	0.080	0.008

C1: 7.4 MBq/100 μl ^{131}I and/or 2 μg /100 μl CD133 ScFv; C2: 3.7 MBq/100 μl ^{131}I and/or 1 μg /100 μl CD133 ScFv; C3: 1.85 MBq/100 μl ^{131}I and/or 0.5 μg /100 μl CD133 ScFv; C4: 0.925 MBq/100 μl ^{131}I and/or 0.25 μg /100 μl CD133 ScFv; C5: 0.4625 MBq/100 μl ^{131}I and/or 0.125 μg /100 μl CD133 ScFv

表 2 相同剂量不同作用时间下 ^{131}I -CD133 ScFv 对 CD133⁺ HepG2 细胞的抑制率 [$n = 3, (\bar{x} \pm s)\%$]

Tab. 2 The inhibitory rate of CD133⁺ HepG2 cell induced by the same dose at different time points [$n = 3, (\bar{x} \pm s)\%$]

Drug	24 h	48 h	72 h	<i>F</i>	<i>P</i>
^{131}I -CD133 ScFv	45.75 \pm 2.00	58.00 \pm 0.54	87.59 \pm 0.85	828.218	0.000
^{131}I	30.94 \pm 0.29	41.10 \pm 0.56	71.57 \pm 0.87	462.698	0.000
CD133 ScFv	22.07 \pm 0.86	46.76 \pm 0.42	77.14 \pm 0.49	561.445	0.012
^{131}I +CD133 ScFv	26.47 \pm 0.42	44.14 \pm 0.52	74.28 \pm 0.21	560.976	0.000
<i>F</i>	252.756	613.890	62.903		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000		

3 讨论

放射免疫治疗是将针对肿瘤相关抗原的特异性抗体作为核素载体,用放射性核素对其进行标记,注入体内与肿瘤细胞相应抗体特异性结合,使肿瘤组织内长时间积聚大量的放射性核素,实现对瘤体组织的内照射,从而杀伤肿瘤细胞的一种肿瘤治疗模式^[13]。近 20 年来该模式在肿瘤治疗方面取得了显著进展,已成功应用于血液系统恶性肿瘤的治疗,但对肝癌、肺癌等实体肿瘤的治疗尚有待突破。本实验选用¹³¹I 标记 CD133 单克隆抗体治疗肝癌有以下特点:(1)肝癌细胞中存在一小部分具有较高增殖能力及放化疗抵抗性的肝癌干细胞^[3-8]。Pallini 等^[14]证实,CD133⁺ HepG2 细胞比 CD133⁻ HepG2 细胞更具有干细胞的特征,可作为肝癌干细胞的表面标志物。故利用磁珠分选技术将肝癌 HepG2 细胞系中的干细胞分选出来,进行下一步实验使用。(2)¹³¹I 可同时发射 β 和 γ 两种射线,β 射线在组织中射程仅 2~3 mm,既保证了能在局部产生足够的电离辐射生物学效应,充分抑制及破坏病变组织,又

避免了对邻近正常组织造成不必要的损伤。(3)目前蛋白标记技术成熟,¹³¹I-CD133 ScFv 能够作为一种放射免疫靶向治疗药物,和 CD133⁺ HepG2 细胞特异性结合后进行内照射,能够靶向抑制 CD133⁺ HepG2 细胞的生长、促进凋亡。

表 3 ¹³¹I-CD133 ScFv 作用不同时间后 CD133⁺ HepG2 细胞周期的分布(%)

Tab.3 Cell cycle distribution of CD133⁺ HepG2 cells in different time points after treated with ¹³¹I-CD133 ScFv (%)

Time (t/h)	G ₀ /G ₁	S	G ₂
24	60.29 ± 0.86	35.42 ± 6.36	5.29 ± 3.97
48	47.64 ± 0.70	39.73 ± 2.84	12.63 ± 2.14
72	27.50 ± 1.12	43.98 ± 4.25	28.19 ± 5.73
<i>F</i>	51.03	15.763	79.375
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

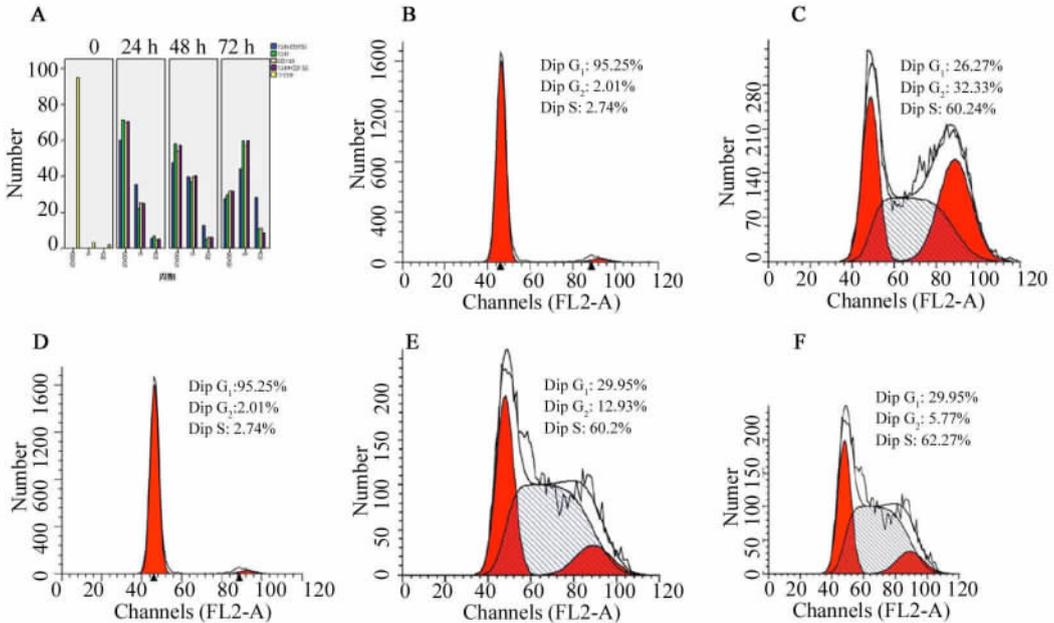


图 5 流式术检测药物作用 72 h 时各组 CD133⁺ HepG2 细胞周期的分布

Fig.5 The cell cycle distribution of CD133⁺ HepG2 cells induced by drug treatment at 72 h by flow cytometry

A: The histogram of CD133⁺ HepG2 cell cycle induced by different drug groups; B: Control group; C: ¹³¹I-CD133 ScFv group; D: ¹³¹I group; E: CD133 ScFv group; F: ¹³¹I + CD133 ScFv group

本实验通过免疫磁珠分选技术从 HepG2 细胞中得到 CD133⁺ HepG2 细胞,流式细胞术鉴定其阳性表达率为(97.71 ± 1.13)%。随后,在体外成球

实验中,CD133⁺ HepG2 细胞在无血清培养基中第 4 天可以见到立体的球体,随着时间的延长,逐渐增大;相反 CD133⁻ HepG2 细胞则逐渐死亡。在克隆形成

实验中 CD133⁺ HepG2 细胞的克隆形成率为 $(45.03 \pm 1.35)\%$, 而 CD133⁻ HepG2 细胞仅为 $(7.4 \pm 0.54)\%$, 由此看出, CD133⁺ HepG2 细胞的自我更新及增殖能力明显强于 CD133⁻ HepG2 细胞。体内 BALB/c 裸鼠成瘤实验中, $1 \times 10^3/\text{ml}$ CD133⁺ HepG2 细胞即可形成移植瘤, 而相同条件下 CD133⁻ HepG2 细胞均未能形成移植瘤, 从而证明了 CD133⁺ HepG2 细胞相对于 CD133⁻ HepG2 细胞更具有致瘤性, 这与 Shibahara 等^[15] 的研究结果一致。之后采用氯胺 T 法将 ^{131}I 标记 CD133 ScFv, 以 $48.84 \text{ MBq}: 50 \mu\text{g}$ 的比例标记, 获得比较稳定的 ^{131}I -CD133 ScFv。随后, MTT 法先筛选当 ^{131}I 的放射性浓度为 $3.7 \text{ MBq}/100 \mu\text{l}$ 、CD133 抗体为 $1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 时对 CD133⁺ HepG2 细胞的抑制率最高, 为 $(89.58 \pm 0.74)\%$; 再取 24、48 和 72 h 3 个时间点观察细胞增殖抑制率, 可以看出 ^{131}I -CD133 ScFv 在不同时间段的抑制率均高于 ^{131}I 组、CD133 ScFv 组和 $^{131}\text{I} + \text{CD133 ScFv}$ 组; 而随着时间的延长, 抑制率也在不断增加, 在 72 h 时对细胞的抑制作用最强, 其抑制率达 $(87.59 \pm 0.85)\%$ 。HO 等^[16] 研究证实, 大部分干细胞的周期处于 G_0 期。收集 4 组治疗后的细胞在流式细胞仪上检测, 4 个治疗组细胞在 3 个时间点的 G_0/G_1 期细胞较空白对照组明显减少, 而 ^{131}I -CD133 ScFv 组减少最为明显。体外抑制实验结果证实, ^{131}I -CD133 ScFv、 ^{131}I 、CD133 ScFv 均对 CD133⁺ HepG2 细胞有抑制作用, 但 ^{131}I -CD133 ScFv 的抑制作用最为明显, 说明虽然单纯的 ^{131}I 和 CD133 ScFv 对 CD133⁺ HepG2 细胞有一定的抑制作用, 但两者结合后靶向性放射免疫治疗对肿瘤细胞有持久强大的抑制作用。

综上所述, ^{131}I -CD133 ScFv 在体外能高效地抑制 CD133⁺ HepG2 细胞的生长, 为 ^{131}I -CD133 ScFv 应用于肝癌的治疗提供了一定的实验依据, 同时也证实了作为肝癌干细胞表面标志物之一的 CD133 可作为肝癌干细胞放射免疫治疗的有效靶点。

[参考文献]

[1] Sherman M. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors, and screening [J]. *Semin Liver Dis*, 2005, 25 (2): 143-154.
 [2] Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (19): 8980-8984.

[3] Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, et al. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective [J]. *Cancer Lett*, 2009, 286 (2): 145-153.
 [4] Yin T, Wei H, Gou S, et al. Cancer stem-like cells enriched in panc-1 spheres possess increased migration ability and resistance to gemcitabine [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12 (3): 1595-1604.
 [5] Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity [J]. *Int J Cancer*, 120 (7): 1444-1450.
 [6] Zhang Q, Shi S, Yen Y, et al. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2010, 289 (2): 151-160.
 [7] Yang W, Yan HX, Chen L, et al. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (11): 4287-4295.
 [8] 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.
 [9] 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.
 [10] Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8 (7): 545-554.
 [11] Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, et al. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133 [J]. *Blood*, 2004, 103 (6): 2055-2061.
 [12] 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.
 [13] 夏伟, 吕中伟, 袁雪宇, 等. 基于外标记的图像配准在放射免疫显像图像融合中的应用 [J]. *肿瘤*, 2008, 28 (12): 1099-1101.
 [14] Pallini R, Ricci-Vitiani L, Montano N, et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis [J]. *Cancer*, 2011, 117 (1): 162-174.
 [15] Shibahara I, Sonoda Y, Saito R, et al. The expression status of CD133 is associated with the pattern and timing of primary glioblastoma recurrence [J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15 (9): 1151-1159.
 [16] Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (10): 4827-4833.

[收稿日期] 2013 - 10 - 30

[修回日期] 2013 - 12 - 15

[本文编辑] 黄静怡