

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.005

高转移胃癌细胞株的建立及其肿瘤干细胞的生物学特征

遇珑,舒雄,刘辉琦,刘军,孙力超,孙立新,杨治华,冉宇靓(国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院,细胞及分子生物学实验室,北京 100021)

[摘要] **目的:**建立高转移胃癌细胞株并研究其肿瘤干细胞生物学特征。**方法:**将胃癌细胞株 SNU-5 接种至裸鼠皮下成瘤后,取肺部转移灶,通过机械分离法并反复接种裸鼠,获取细胞株 SNU-5-V12,采用无血清悬浮培养及 PKH26 染色确定 SNU-5-V12 细胞中存在肿瘤干细胞。流式细胞术分析 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞中 CD44 肿瘤干细胞标志物表达情况,分选 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞中 CD44⁺ 细胞并进行体外生物学特征研究及裸鼠致瘤实验。**结果:**建立高转移 SNU-5-V12 细胞株,SNU-5-V12 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。流式分析显示高转移 SNU-5-V12 细胞中干细胞标志物 CD44 比例显著高于 SNU-5 细胞[(72.9 ± 1.5)% vs (8.96 ± 1.2)%],且 SNU-5-V12 的 CD44⁺ 细胞比 SNU-5 的 CD44⁺ 细胞具有更强的自我更新能力[成球率(27.8 ± 1.7)% vs (20.4 ± 1.0)% ,*P* < 0.01],转移细胞数增加 1.64 倍[(329.5 ± 7.5) vs (200 ± 2.0)个,*P* < 0.01],耐药能力也显著增强 IC₅₀:(0.286 vs 0.196) μg/ml,*P* < 0.01],裸鼠皮下接种 2 × 10² 个 CD44⁺ SNU-5-V12 细胞 2 个月 2/6 裸鼠可致瘤,而 CD44⁺ SNU-5 细胞需要接种 2 × 10⁴ 个细胞 2 个月时仅 1/6 裸鼠致瘤。**结论:**获得高转移胃癌细胞株 SNU-5-V12,其 CD44⁺ 细胞体内外功能显著增强,为胃癌干细胞的靶向治疗提供有价值的细胞模型。

[关键词] 胃癌;肿瘤干细胞;转移;CD44

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)04-0486-06

Establishment of a gastric cancer cell line with high metastasis and biological characteristics of cancer stem cell of the cell line

YU Long, SHU Xiong, LIU Huiqi, LIU Jun, SUN Lichao, SUN Lixin, YANG Zhihua, RAN Yuliang (Laboratory of Cell and Molecular Biology, National Cancer Center/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a gastric cancer cell line with high metastasis and explore biological characteristics of cancer stem cell for the cell line. **Methods:** The gastric cancer SNU-5 line cells were subcutaneously injected into nude mice. After a xenotransplanted tumor was formed, pulmonary metastasis of the tumor was taken out and repeatedly injected into nude mice by mechanical separation method, as well as the SNU-5-V12 cell line was achieved. Serum free suspension culture and PKH26 staining were used to confirm that there are cancer stem cells in the SNU-5-V12 cells. Expressions of cancer stem cell marker CD44 in the SNU-5 and the SNU-5-V12 cell lines were analyzed with flow cytometry assay. CD44⁺ cells in the SNU-5 and the SNU-5-V12 cell lines were separated and research in vitro of biological characteristics and tumorigenic experiments in nude mice were performed with the CD44⁺ cells. **Results:** The SNU-5-V12 cell line with high metastasis was established. There was a single PKH26 positive cell in spheroids formed by the SNU-5-V12 cells after serum free suspension culture for 11 days. Analysis of flow cytometry shown that ratio of cancer stem cell marker CD44 in SNU-5-V12 cell with high metastasis was significantly higher than that in the SNU-5 cell ([72.9 ± 1.5]% vs [8.96 ± 1.2]%), and self-renewal capacity of the CD44⁺ cells in the SNU-5-V12 cells was obviously stronger than that in the SNU-5 cells (forming spheroid rate: [27.8 ± 1.7]% vs [20.4 ± 1.0]% , *P* < 0.01), as well as invasion ability of the SNU-5-V12 cells increased 1.6 times ([329.5 ± 7.5] vs [200 ± 2.0] , *P* < 0.01), its drug resistant ability also enhanced significantly (IC₅₀: [0.286 vs 0.196] μg/ml , *P* < 0.01). At two months of the injection, third one nude mice (2/6) that injected with 2 × 10² the SNU-5-

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 31371445);国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2014AA020537)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31371445), and the National High-tech R & D Program of China (863 Program)(No. 2014AA020537)

[作者简介] 遇珑(1965-),男,北京市人,主管技师,主要从事肿瘤细胞生物及分子生物学研究,E-mail: yulong65@126.com

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

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160711.1031.010.html>

V12 cells formed xenotransplanted tumor, but only minority nude mice (1/6) that injected with 2×10^4 the SNU-5 cells formed xenotransplanted tumor. **Conclusion:** A gastric cancer the SNU-5-V12 cell line with high metastasis was obtained. *In vivo* and *in vitro* functions of CD44⁺ cell in the SNU-5-V12 cell line significantly increased. It could provide a valuable cell model for target therapy of gastric cancer stem cell.

[**Key words**] gastric cancer; cancer stem cell; metastasis; CD44

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(4): 486-491. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.005]

胃癌(gastric cancer, GC)是最常见的恶性肿瘤之一,约占消化道恶性肿瘤的半数;胃癌是我国高发的消化道恶性肿瘤,我国胃癌的发病率占全世界42%左右,每年发病40万例,病死人数超过三分之二,5年生存率很低^[1],大多数病例发生转移和复发,预后不理想。近年来,认为肿瘤干细胞与胃癌的耐药性、转移及复发有着密切的关系^[2-4]。本研究以胃癌SNU-5细胞株建立高转移SNU-5-V12细胞株,并初步证实CD44为其干细胞标志物,同时研究其体内外生物学功能,以期胃癌靶向干细胞治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和胃癌细胞培养

BALB/c裸鼠(4~5周龄,雌性)购自维通利华生物公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。人胃癌SNU-5细胞株由北京肿瘤医院吕有勇教授惠赠,本实验室保存,用RPMI 1640培养基加10%小牛血清,在37℃、5% CO₂培养箱中培养。

1.2 主要试剂

常规细胞培养液、EGF、bFGF、白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor LIF)和B27购自美国Gibco公司;氢化可的松购自天津金耀氨基酸有限公司;FBS购自美国Hyclone公司;PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit购自美国Sigma公司;FITC-CD44购自美国BD公司;孔径为8 μm的Transwells小室购自美国Millipore公司;PE-CD90购自美国eBioscience公司。

1.3 高转移细胞株的选育

消化SNU-5细胞制成单细胞悬液,右腋窝皮下接种10只裸鼠(5×10^6 细胞/0.2 ml),观察90 d成瘤潜伏期及皮下瘤生长情况。待皮下瘤增大至直径约1 cm时,无菌取裸鼠肺转移灶,在无血清培养基中剪碎,过100目筛网,细胞悬液在离心管中洗涤,120 × g离心5 min。弃掉洗液,用6 ml细胞生长液重悬细胞,移至T25培养瓶中体外培养。待细胞数量足够时,按上述方法接种下一批裸鼠,反复接种12次,依次命名为SNU-5-V3、SNU-5-V5、SNU-5-V7、SNU-5-V9、SNU-5-V11和SNU-5-V12。

1.4 高转移细胞的形态学观察

消化亲本SNU-5和高转移SNU-5-Vn细胞株细胞制成单细胞悬液(5×10^3 细胞/ml),接种24孔板,光学显微镜高倍(×100)观察亲本SNU-5和高转移SNU-5-V3、SNU-5-V5、SNU-5-V7、SNU-5-V9、SNU-5-V11和SNU-5-V12细胞的形态学变化。

1.5 球体细胞培养及PKH26染色SNU-5-V12细胞

文献^[5]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形成的球体细胞(spheroid cells)。接种SNU-5和SNU-5-V12单细胞悬液于低黏附24孔板(500细胞/孔),0.8%甲基纤维素固体无血清悬浮培养,7~10 d后显微镜下计成球数。而PKH26作为亲脂质体红色荧光染料,可特异性标记肿瘤干细胞。将SNU-5-V12消化为单个细胞后,按PKH26染料试剂盒说明书操作染色。

1.6 流式细胞术分选SNU-5和SNU-5-V12细胞株CD44⁺和CD90⁺细胞

消化细胞为单细胞悬液,PBS洗两次,加入流式标记CD44和CD90抗体,细胞孵育密度为 1×10^7 /ml,室温孵育1 h,PBS洗3次,室温孵育60 min,再用PBS洗3次,最后用含1% BSA的PBS重悬,流式分选仪检测阳性细胞比例或分选。

1.7 Transwell侵袭试验检测SNU-5和SNU-5-V12细胞株CD44⁺细胞侵袭能力

分选SNU-5和SNU-5-V12细胞株CD44⁺细胞、CD44⁻细胞和亲本细胞,37℃孵育2 h,接种于预先包被Matrigel的Transwell上室(4×10^4 个细胞/孔),37℃、5% CO₂孵箱培养24 h后,取下底膜,DAPI染色,封片,在荧光显微镜下观察穿膜细胞数。

1.8 CCK-8法检测SNU-5和SNU-5-V12细胞株CD44⁺顺铂耐药性

分选获得SNU-5和SNU-5-V12细胞株CD44⁺细胞、CD44⁻细胞和亲本细胞,接种96孔板(5 000细胞/孔),48 h后换含顺铂的培养基,每组细胞用0.003 125、0.006 25、0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.2和0.4 μg/ml 9个质量浓度顺铂培养基,5 d后按照CCK-8试剂盒说明书操作,检测波长450 nm处各孔光密度(D)值。存活率计算公式:存活率

(%) = (实验组平均 D 值 - 空白组平均 D 值) / (对照组平均 D 值 - 空白组平均 D 值) × 100%。

1.9 BALB/c 裸鼠致瘤实验检测 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞致瘤性

实验前一天裸鼠称质量,按鼠体质量分组,每组 6 只裸鼠,各组裸鼠体质量分布平均。SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株细胞流式分选细胞亚群(亲本细胞、CD44⁺ 细胞和 CD44⁻ 细胞),各亚群按每只裸鼠接种细胞数量分为 3 组:2 × 10²/0.2 ml 组,2 × 10³/0.2 ml 组和 2 × 10⁴/0.2 ml 组,共 18 组。分选计数后接种于裸鼠右侧腋下,以亲本细胞组作为对照,每周观察裸鼠成瘤情况,3 ~ 4 个月后引颈法处死动物,统计各组裸鼠致瘤数量。

1.10 统计学处理

使用 SPSS13.0 统计学软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验,以 P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立了高转移细胞株 SNU-5-V12

裸鼠胃癌细胞肺部转移灶接种至裸鼠皮下成瘤后,通过机械分离法,获取细胞株 SNU-5、SNU-5-V3、SNU-5-V5、SNU-5-V7、SNU-5-V9、SNU-5-V11 和 SNU-5-V12,各代细胞生长稳定。初步建立了胃癌 SNU-5 细胞株的第十二代高转移细胞株,命名为 SNU-5-V12。随着胃癌细胞转移能力不断增强,细胞形态由梭形转变成多边形和上皮状(图 1)。

2.2 PKH26 染色证明 SNU-5-V12 细胞株存在肿瘤干细胞

PKH26 可作为干细胞的一个标志,阳性细胞可视为干细胞。PKH26 染色 SNU-5-V12 细胞株的细胞球体(培养 11 d)观察结果表明(图 2),仅有单个细胞呈现 PKH26 阳性,其他细胞为阴性或非常弱阳性。验证干细胞是处于 G₀ 期细胞的理论,同时也证明 SNU-5-V12 细胞株存在肿瘤干细胞。

2.3 高转移细胞株的肿瘤干细胞标志物 CD44 比例升高

流式细胞术检测 SNU-5 亲本及高转移细胞株的胃癌干细胞标志物 CD44 结果(表 1、图 3)显示, SNU-5 高转移细胞株的 CD44 表达比例逐渐升高,其中 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 比 SNU-5 株亲本细胞提高 8.14 倍[(72.9 ± 1.5)% vs (8.96 ± 1.2)%],而 SNU-5-V12 细胞株 CD90⁺ 比 SNU-5 细胞株降低 26.4 倍[(0.2 ± 0.1)% vs (5.28 ± 2.0)%],CD90⁺ 在 SNU-5-V12 细胞株几乎不表达。

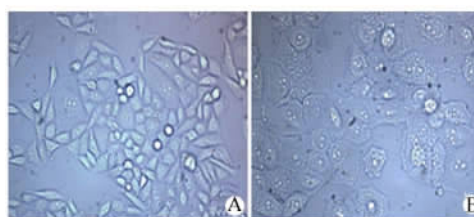


图 1 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株胃癌细胞形态(×200)
Fig. 1 Morphology of gastric carcinoma SNU-5 and SNU-5-V12 cell lines (×200)
A: SNU-5 cell line; B: SNU-5-V12 cell line

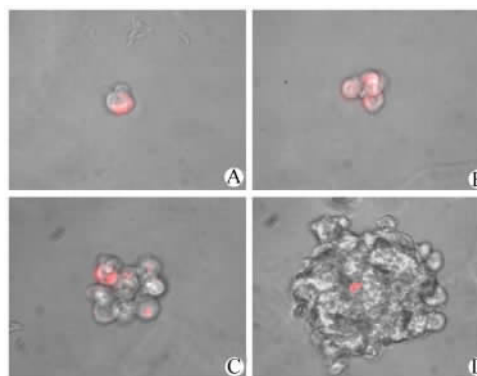


图 2 免疫荧光检测 PKH26 染色 SNU-5-V12 细胞株球体细胞(×400)
Fig. 2 Spheroid cells of SNU-5-V12 cell line stained with PKH26 detected by immunofluorescence (×400)
A: 1 d; B: 3 d; C: 6 d; D: 11 d

表 1 流式细胞术检测 CD44 和 CD90 在 SNU-5 和 SNU-5-Vn 细胞株的表达(%)

Tab. 1 Expressions of CD44 and CD90 in SNU-5 and SNU-5-Vn cell lines detected by flow cytometry assay (%)

	SNU-5	SNU-5-V3	SNU-5-V5	SNU-5-V7	SNU-5-V9	SNU-5-V12
CD44	8.96 ± 1.2	36.4 ± 2.0	40.5 ± 0.5	64.5 ± 1.5	68.6 ± 2.4	72.9 ± 1.5
CD90	5.28 ± 2.0	3.50 ± 0.5	1.45 ± 2.5	0.56 ± 0.4	0.32 ± 0.2	0.2 ± 0.1

2.4 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞具有更强的自我更新能力

SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺、CD44⁻ 和亲本细胞 Spheroid 培养结果(表 2,图 4)显示,SNU-5-

V12 细胞株 CD44⁺ 细胞成球数显著高于亲本细胞和 CD44⁻ 细胞 ($P < 0.01$), SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞成球率较 SNU-5 细胞株 CD44⁺ 细胞高约 1.36 倍 $[(27.8 \pm 1.7)\% \text{ vs } (20.4 \pm 1.0)\%]$ 。表明 CD44 在 SNU-5-V12 细胞株较亲本细胞具有更强的自我更新能力, 肿瘤干细胞特征更加显著。

2.5 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞有更强的侵袭能力

比较 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株分离出的 CD44⁺ 细胞、亲本细胞和 CD44⁻ 细胞的侵袭能力。结果(表 3)显示, SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞的侵袭能力显著高于亲本细胞和 CD44⁻ 细胞 ($P < 0.01$), SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞的侵袭数较 SNU-5 细胞株 CD44⁺ 细胞高约 1.64 倍 $[(329.5 \pm 7.5) \text{ vs } (200 \pm 2.0) \text{ 个}]$ 。表明 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞具有更强的侵袭能力。

2.6 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞具有更高的顺铂耐药性

CCK-8 法检测不同顺铂浓度下 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞、亲本细胞和 CD44⁻ 细胞存活率, 结果(表 4)显示 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞耐药性较强, 亲本细胞次之, CD44⁻ 细胞耐药性更弱。SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞比 SNU-5 细胞株 CD44⁺ 细胞耐药性更强, IC₅₀ 值高 1.46 倍 $(0.286 \text{ vs } 0.196 \mu\text{g/ml})$ 。证明 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞具有肿瘤干细胞抵抗化疗药物的特性。

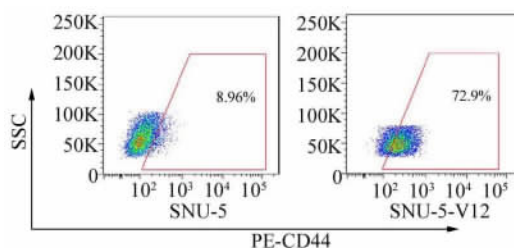


图 3 流式细胞术检测 CD44 在 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株的表达
Fig. 3 Expressions of CD44 in SNU-5 and SNU-5-V12 cell lines detected by flow cytometry assay

表 2 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞、CD44⁻ 细胞和亲本细胞的成球细胞数 (n)

Tab. 2 Numbers of CD44⁺, CD44⁻ and parent cells formed spheroid in SNU-5 and SNU-5-V12 cell lines (n)

Cell line	SNU-5			SNU-5-V12		
	CD44 ⁺ cells	Parent cells	CD44 ⁻ cells	CD44 ⁺ cells	Parent cells	CD44 ⁻ cells
Spheroids/500 cells	102 ± 5.0	98.5 ± 3.5	35 ± 4.0	139.5 ± 8.5	86 ± 4.0	58.5 ± 2.5

表 3 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株的 CD44⁺ 细胞、CD44⁻ 细胞和亲本细胞侵袭能力分析 (n)

Tab. 3 Invasion abilities of CD44⁺, CD44⁻ and parent cells in SNU-5 and SNU-5-V12 cell lines (n)

Cell line	SNU-5			SNU-5-V12		
	CD44 ⁺ cells	Parent cells	CD44 ⁻ cells	CD44 ⁺ cells	Parent cells	CD44 ⁻ cells
Invasion cell	200 ± 2.0	80.6 ± 4.5	129 ± 3.0	329.5 ± 7.5	215 ± 5.0	184.3 ± 4.5

表 4 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株的 CD44⁺ 细胞、CD44⁻ 细胞和亲本细胞对顺铂的耐药性

Tab. 4 Drug-resistance against cisplatin for CD44⁺, CD44⁻ and parent cells of SNU-5 and SNU-5-V12 cell lines

Cell	Concentration of cisplatin [$\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$]				IC ₅₀
	0.05	0.1	0.2	0.4	
SNU-5					
CD44 ⁺ cell	84.5 ± 0.035	76.5 ± 2.5	71.5 ± 1.5	26.0 ± 2.0	0.196
Parent cell	81.0 ± 6.0	50.0 ± 1.0	19.5 ± 1.5	2.1 ± 0.1	0.098
CD44 ⁻ cell	67.5 ± 2.5	45.0 ± 3.0	12.5 ± 1.5	1.0 ± 1.0	0.070
SNU-5-V12					
CD44 ⁺ cell	88.0 ± 2.5	79.0 ± 1.8	75.5 ± 3.8	20.1 ± 1.1	0.286
Parent cell	73.5 ± 1.5	52.8 ± 3.7	12.4 ± 1.5	3.1 ± 1.9	0.125
CD44 ⁻ cell	67.5 ± 2.6	43.9 ± 0.7	9.8 ± 1.2	1.3 ± 1.6	0.068

2.7 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞具有更强的致瘤性

裸鼠体内致瘤性实验结果(表5)显示, SNU-5-V12 细胞株 CD44⁻ 细胞在观察过程中始终没有致瘤。接种 2×10^2 个 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞, 2 个月时有 2/6 裸鼠致瘤, 3 个月时, 则有半数裸鼠致瘤。而 SNU-5 细胞株 CD44⁺ 细胞则需要接种 2×10^4 个细胞才能在 2 个月时有 1/6 裸鼠致瘤, 结果说明, SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞致瘤性较 SNU-5 细胞株 CD44⁺ 细胞强 100 余倍。提示 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞因富含肿瘤干细胞而表现强致瘤性, 亲本细胞含较低比例的肿瘤干细胞表现较弱的致瘤性, CD44⁻ 组则因缺乏肿瘤干细胞而无致瘤性表现。CD44⁺ 细胞的强致瘤性符合肿瘤干细胞判定的“金标准”。因此认为 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞为肿瘤干细胞。

表5 接种 SNU-5 和 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺、CD44⁻ 和亲本细胞裸鼠的致瘤鼠数(n)

Tab.5 Number of tumor-bearing nude mice injected with CD44⁺, CD44⁻ and parent cells of SNU-5 and SNU-5-V12 cell lines (n)

Cell lines	Injected cells (n)	Time after injection(t/month)		
		1	2	3
SNU-5				
CD44 ⁺ cells	2×10^2	0/6	1/6	1/6
	2×10^3	0/6	0/6	2/6
	2×10^4	0/6	1/6	1/6
CD44 ⁻ cells	2×10^2	0/6	0/6	0/6
	2×10^3	0/6	0/6	0/6
	2×10^4	0/6	0/6	0/6
Parent cells	2×10^2	0/6	0/6	0/6
	2×10^3	0/6	0/6	0/6
	2×10^4	1/6	2/6	2/6
SNU-5-V12				
CD44 ⁺ cells	2×10^2	0/6	2/6	3/6
	2×10^3	0/6	2/6	3/6
	2×10^4	1/6	4/6	4/6
CD44 ⁻ cells	2×10^2	0/6	0/6	0/6
	2×10^3	0/6	0/6	0/6
	2×10^4	0/6	0/6	0/6
Parent cells	2×10^2	0/6	0/6	0/6
	2×10^3	0/6	1/6	1/6
	2×10^4	2/6	3/6	3/6

3 讨论

目前关于胃癌干细胞研究报道较少, 主要集中在寻找胃癌干细胞表面标志物和确定人胃癌组织中干细胞的存在及分离等方面。胃癌干细胞在胃癌转移、复发、耐药中的作用逐渐被人们所认识。肿瘤干细胞理论认为肿瘤组织是由异质性的细胞群体组成, 肿瘤组织中存在一小部分干细胞群体, 具有自我更新和无限增殖潜力, 是肿瘤复发和转移的根源^[6]。多个实验室依据 SP^[7], CD90^[8], CD44^[9], CD133^[10], CD44⁺ ESA⁺^[11] 和 CD44⁺ CD24⁺^[12] 等干细胞标志物, 从胃癌细胞株中成功分离获得胃癌干细胞, 具有较高的自我更新、耐药及分化能力, 且少量细胞可在 SCID 小鼠体内致瘤^[13]。

谱系追踪和分子标记技术初步确定胃癌干细胞在胃癌转移和表达中呈上调现象^[14]。虽然靶向胃癌干细胞标志物治疗肿瘤的研究才刚刚起步, 但对于导致死亡的难治性转移、复发有巨大的临床应用潜力, 因此已成为目前肿瘤研究的新热点。

本研究从肿瘤干细胞生物学特性出发, 鉴定胃癌高转移 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞体内外生物学功能, 并进一步探讨胃癌干细胞标志物 CD44 与胃癌转移和复发的相关性。PKH26 是一种亲脂染料, 可与细胞膜上的脂类稳定结合, 并随细胞分裂。由于肿瘤干细胞存在不对称分裂, 分裂出一个子代细胞后进入 G₀ 期, 膜上的染料可长期保留, 并随子代细胞不断分裂, 分配给新生细胞, 而子代细胞膜上的染料不断减少直至探测不到^[15], 因此 PKH26 可用于肿瘤干细胞的标记。结果显示, SNU-5-V12 细胞株 CD44 识别的细胞经 spheroids 培养后可显著富集, 同时 CD44 标志物可与干细胞染料 PKH26 共染。为进一步证明 CD44 可特异性识别高转移胃癌干细胞, 本研究采用流式细胞术分选出 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞与 SNU-5 细胞株 CD44⁺ 细胞, 并进行体内、外功能比较试验。结果显示 SNU-5-V12 细胞株干细胞标志物 CD44 比例显著高于 SNU-5 细胞株。体内、外功能显示, SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞具有更强的自我更新能力, 侵袭能力提高 1.64 倍, 耐药能力也显著增强; 裸鼠皮下接种 2×10^2 个 SNU-5-V12 细胞株 CD44⁺ 细胞, 3 个月半数裸鼠可致瘤(3/6), 而接种 2×10^2 个 SNU-5 细胞株 CD44⁺ 细胞 3 个月只有少数裸鼠致瘤(1/6)。以上结果表明, 通过连续不断筛选建立的高转移胃癌 SNU-5-V12 细胞株, CD44 的表达富集且体内、外功能不断加强。综合这些实验结果推测, 胃癌的复发、

转移和耐药与肿瘤干细胞 CD44 有紧密联系。但是胃癌干细胞标志物 CD90 在高转移 SNU-5-V12 细胞株几乎不表达,提示在胃癌细胞株中各肿瘤标志物亚群随着高转移细胞株的建立,其干细胞的表达比例动态变化,干细胞标志物 CD44 占主导地位。

本研究发现 CD44⁺ 细胞代表胃癌转移干细胞,为靶向胃癌干细胞治疗提供新的候选治疗靶点,能在改善肿瘤患者的预后中发挥一定的重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] SAIKAWA Y, FUKUDA K, TAKAHASHI T, et al. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis [J]. *Gastric Cancer*, 2010, 13(1): 11-24. DOI: 10.1007/s10120-009-0537-4.
- [2] SAMADANI A A, AKHAVAN-NIAKI H. Interaction of sonic hedgehog (SHH) pathway with cancer stem cell genes in gastric cancer [J/OL]. *Medical oncology*, 2015, 32(3): 48[2015-12-29]. <http://link.springer.com/article/10.1007/s12032-015-0492-3>. DOI: 10.1007/s12032-015-0492-3.
- [3] YANG L, PING Y F, YU X, et al. Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype [J]. *Cancer letters*, 2011, 310(1): 46-52. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.06.003.
- [4] MAO J, FAN S, MA W, et al. Roles of Wnt/[beta]-catenin signaling in the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(e1039)[2015-12-29]. <http://www.nature.com/cddis/journal/v5/n1/full/cddis2013515a.html>. DOI: 10.1038/cddis.2013.515.
- [5] 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. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.007.
- [6] STOJNEV S, KRSTIC M, RISTIC-PETROVIC A, et al. Gastric cancer stem cells: therapeutic targets [J]. *Gastric Cancer*, 2014, 17(1):13-25. DOI: 10.1007/s10120-013-0254-x
- [7] 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. DOI: 10.3892/ijo.2012.1720.
- [8] 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. DOI: 10.1038/onc.2011.282.
- [9] TAKAISHI S, OKUMURA T, TU S, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44 [J]. *Stem cells*, 2009, 27(5): 1006-1020. DOI: 10.1002/stem.30.
- [10] WEN L, CHEN X Z, YANG K, et al. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in gastric cancer: a systematic review [J/OL]. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e59154[2015-12-29]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059154>. DOI: 10.1371/journal.pone.0059154.
- [11] HAN M E, JEON T Y, HWANG S H, 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. DOI: 10.1007/s00018-011-0672-z.
- [12] ZHANG C, LI C, HE F, et al. Identification of CD44⁺ CD24⁺ gastric cancer stem cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(11): 1679-1686. DOI: 10.1007/s00432-011-1038-5.
- [13] SINGH S R. Gastric cancer stem cells: A novel therapeutic target [J]. *Cancer letters*, 2013, 338(1): 110-119. DOI:10.1016/j.canlet.2013.03.035.
- [14] WANG Z, LIU C. Lgr5-positive cells are cancer-stem-cell-like cells in gastric cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(6): 2447-2455. DOI: 10.1159/000430205.
- [15] AL-HAJJ M, CLARKE M F. Self-renewal and solid tumor stem cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23(43): 7274-7282. DOI: 10.1038/sj.onc.1207947.

[收稿日期] 2016 - 02 - 03

[修回日期] 2016 - 05 - 04

[本文编辑] 宋关鸿

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》,文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。(1)公历世纪、年代、年、月、日和时、分、秒必须使用阿拉伯数字,如 20 世纪 90 年代、2006 - 02 - 15、5 h、30 min、30 s、14:36:08 等;年份不能用简称,“1998 年”不能写作“98 年”。(2)物理量量值必须使用阿拉伯数字。(3)非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字,如 3 支、5 根等。(4)数值范围的表达要求:5 万至 10 万应写成 5 万 ~ 10 万,不能写成 5 ~ 10 万; 3×10^9 至 5×10^9 应写成 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$, 或 $(3 \sim 5) \times 10^9$, 不能写成 $3 \sim 5 \times 10^9$; 60% 至 70% 不能写成 60 ~ 70%, 应写成 60% ~ 70%; 25.5 ± 0.5 mg 应写成 (25.5 ± 0.5) mg。(5)带单位的量值相乘时,每个数值后单位不能省略,如 $4 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$, 不能写成 $4 \times 2 \times 3 \text{ mm}$ 或 $4 \times 2 \times 3 \text{ mm}^3$ 。

(本刊编辑部)