

肿瘤干细胞多靶点联合治疗效果分析

莫文秀, 孙立新, 王佳佳, 遇 珑, 杨治华, 冉宇靓

(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)

摘 要: [目的] 探讨有效的肿瘤生物治疗新思路, 用肝癌细胞系 Bel7402-V3 为细胞模型检测联合单克隆抗体 9A9 和 15D2 对其干性功能(自我更新、侵袭和耐药)的影响。[方法] 采用活细胞流式免疫荧光术检测单独抗体、联合抗体与肿瘤干细胞标志物 ESA 在 Bel7402-V3 亲本及 sphere 细胞中的表达; 甲基纤维素成球实验和 Transwell 小室侵袭实验分别检测抗体对 Bel7402-V3 亲本细胞成球能力和侵袭能力的影响; CCK8 法及 IC50 法检测联合抗体对 Bel7402-V3 亲本细胞耐药能力的影响。[结果] 流式荧光结果显示: 标志物 ESA、单抗 15D2、单抗 9A9 所识别的细胞比例在 Bel7402-V3 sphere 细胞中比在亲本细胞中分别富集了 2.6 倍、4.1 倍、2.0 倍; 在 Bel7402-V3 亲本和 sphere 细胞中, 联合单抗与标志物共染比例(9A9+15D2 与 ESA)大于单抗分别与标志物共染比例之和[(9A9+ESA)+(15D2+ESA)]; 单抗 9A9 与 15D2 联合时对 Bel7402-V3 亲本细胞的成球抑制率和侵袭抑制率均明显高于等浓度的单种单抗对 Bel7402-V3 亲本细胞的功能抑制; 经联合单抗处理的 Bel7402-V3 亲本细胞耐药能力较经等浓度单种单抗处理的细胞耐药能力显著降低 [9A9+15D2: IC50 为 0.32 μ g/ml, 9A9: IC50 为 0.58 μ g/ml, 15D2: IC50 为 0.56 μ g/ml]。[结论] 肿瘤干细胞中存在不同亚群, 其在不同的信号通路或基因水平上发挥了不同的作用。联合多靶点的抗体治疗能显著提高疗效。

关键词: 肿瘤干细胞; 单克隆抗体; 联合; 多靶点; 9A9; 15D2

中图分类号: R735.5; R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2014)02-0162-08

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.02.A017

The Efficacy of Combined Multi-targeted Cancer Stem Cell Therapy

MO Wen-xiu, SUN Li-xin, WANG Jia-jia, et al.

(State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the silver lining of cancer biological-therapeutic regimen. The hepatic carcinoma cell line Bel7402-V3 intervened with combination of monoclonal antibodies 15D2 and 9A9 to monitor its subsequent functions change including self-renewal, invading and drug-resistance abilities. [Methods] Hepatic carcinoma cell line Bel7402-V3 was choose as an ideal model, in which living cell flow cytometry was adopted to identify the expression of sole antibody, combination antibodies and cancer stem cell marker among parent cells and spheres. Antibodies's influence on cell self-renewal, invade ability and drug-resistance were examined by methyl cellulose spheres, Transwell invading test and CCK8 plus IC50 method respectively. [Results] The proportion of cells identified by cancer stem cell marker ESA, 9A9A and 15D2 in the sphere cells were enriched 2.6 times, 2.0 times and 4.1 times more than those in the parental cells, respectively. The co-expression antigen of combined antibodies and ESA was more than the sum of antigen located on (9A9+ESA) and (15D2+ESA). The combined antibodies have notable inhibitory ratio than sole antibody with equal concentration on spheres forming and invading ability, which is same as drug-resistance. The IC50 in combined antibodies group, 9A9 and 15D2 was 0.32 μ g/ml, 0.58 μ g/ml and 0.56 μ g/ml, respectively. [Conclusion] There are different kinds of sub-sets in cancer stem cells bearing distinct functions on many signal pathways and gene expression. Combined multi-targeted antibodies are capable of increasing efficacy of treatment.

Key words: cancer stem cell; monoclonal antibody; combination; multi-targeted; 9A9; 15D2

目前, 肝癌的发病率位居世界恶性肿瘤发病第

5 位, 居肿瘤死亡病因的第 3 位。尽管有外科手术和局部的一些治疗方法, 但肝癌细胞对于传统化疗药的高抵抗性, 以及肝癌的转移、复发, 仍使得大部分

收稿日期: 2013-10-13; 修回日期: 2013-11-15

基金项目: 国家科技重大专项(2011ZX09102-010-02)

通讯作者: 冉宇靓, E-mail: ran_yuliang@126.com

肝癌患者的预后不良^[1,2]。肿瘤干细胞是一类能够促使肿瘤发生,并且具有自我更新和分化能力的细胞。Lobo 等^[3]提出:肿瘤干细胞是肿瘤发生的源头,也是维持肿瘤生长的必要细胞,更是肿瘤转移复发的根源。近年来,肿瘤干细胞的存在被认为与肝癌的耐药性、转移及复发有着密切的关系^[4]。目前,针对肿瘤干细胞的靶向治疗已开始应用于临床研究,但均为单一靶点的治疗,针对肿瘤的异质性尚缺乏联合多靶点治疗的尝试^[5]。我们前期已筛选出多株靶向肝癌干细胞的单克隆抗体,能有效抑制肝癌干细胞的成球、侵袭和耐药等。在本研究中,我们将在一株肝癌细胞系模型中,探讨多靶点抗肝癌干细胞单抗联合治疗的疗效。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 Bel7402-V3 细胞为中国医学科学院肿瘤医院细胞及分子生物学实验室从人肝癌细胞系 Bel7402 中筛选获得的,为具有高自发性肺转移的亚株。本课题组前期实验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:15B7,15D2,9A9 和 11C9 等,均为本室保藏。常规细胞培养液、bFGF、B27、LIF 购自美国 Gibco 公司,EGF 购自 Invitrogen 公司,DAPI 购自 Sigma 公司,FITC-ESA 购自 Gentex 公司,Percp-羊抗小鼠 IgM μ chain 购自 Jackson 公司。

1.2 方法

1.2.1 Bel7402-V3 sphere 细胞的培养

文献报道,肿瘤干细胞可在无血清培养基中悬浮培养,形成由单个肿瘤干细胞分化而来的细胞球即 sphere 细胞。将处于对数生长期的 Bel7402-V3 亲本细胞消化至单细胞,制备成细胞密度为 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞悬液,以该密度接种于含 LIF(10ng/ml)、EGF(20ng/ml)、bFGF(20ng/ml)、B27(1:50)、肝素(0.6U/ml)和 L-谷氨酰胺(2mmol/L)的 DMEM-F12 无血清培养基中,于 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养 7d,用于 Bel7402-V3 sphere 细胞活细胞流式检测。

1.2.2 流式细胞术检测标志物 ESA 在 Bel7402-V3 亲本细胞及 sphere 细胞中的比例

制备 Bel7402-V3 亲本细胞及 sphere 细胞的单

细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$,PBS 洗 1 遍后,加入 FITC-ESA, 37°C 避光孵育 30min,PBS 洗 2 遍,用 1%多聚甲醛固定后上流式仪检测。

1.2.3 流式细胞术分选 Bel7402-V3 亲本中 ESA^+ 细胞并检测其成球能力

消化对数期的 Bel7402-V3 亲本细胞成单细胞悬液,1200rpm,5min 离心后用 PBS 洗 1 遍,加入 FITC-ESA,重悬细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 37°C 避光孵育 30min,PBS 洗 2 遍,用含 1%BSA 的 PBS 重悬,上机行流式细胞仪分选。将分选得到的 Bel7402-V3 ESA^+ 细胞,Bel7402-V3 亲本细胞和 Bel7402-V3 ESA^- 细胞以 500 个/孔接种于低粘附 24 孔板,进行无血清培养,每隔 2d 补液 1 次,7d 后显微镜下记录球体细胞数。

1.2.4 流式细胞术检测 Bel7402-V3 亲本和 sphere 细胞中标志物 ESA 及单抗识别抗原共表达比例

制备 Bel7402-V3 亲本细胞及 sphere 细胞的单细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$,PBS 洗 1 遍后,加入杂交瘤单抗 9A9、15D2 的上清, 37°C 孵育 1h,PBS 洗 2 遍,加入 Percp-羊抗小鼠 IgM μ chain 和 FITC-ESA, 37°C 避光孵育 30min,PBS 洗 2 遍,用 1%多聚甲醛固定后上流式仪检测。

1.2.5 无血清悬浮培养法检测单抗对细胞成球能力的影响

消化处于对数生长期的 Bel7402-V3 亲本细胞成单细胞,分别用单抗 9A9(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$,600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、15D2(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$,600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 9A9+15D2(各 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)与细胞共孵育, 37°C 孵育 2h,以 500 个细胞/孔接种于低粘附 24 孔板中,用含 0.8%甲基纤维素的无血清悬浮培养,在 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养 11d 后计算成球率。

1.2.6 Transwell 侵袭实验检测单抗对细胞侵袭能力的影响

消化处于对数生长期的 Bel7402-V3 亲本细胞成单细胞,分别用单抗 9A9(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$,600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、15D2(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$,600 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 9A9+15D2(各 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)与细胞共孵育, 37°C 孵育 2h,以 4×10^4 个细胞/孔接种于预先包被好 Matrigel 的 Transwell 上室中,在 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养 24h 后,取下底膜,DAPI 染色,封片,在荧光显微镜下观察穿膜细胞并计数。

1.2.7 CCK-8 法和 IC50 法检测单抗处理后细胞的顺铂耐药性

将消化好的 Bel7402-V3 亲本细胞以 5000 个/孔接种于 96 孔板,并分别加入抗体 9A9(300 μ g/ml, 600 μ g/ml)、15D2(300 μ g/ml, 600 μ g/ml)和 9A9+15D2 (各 300 μ g/ml) 于各孔中,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中培养 24h 后,移去含抗体的培养基,每组细胞均用含 0、0.15 μ g/ml、0.30 μ g/ml、0.45 μ g/ml、0.60 μ g/ml、0.75 μ g/ml 和 0.90 μ g/ml 共 7 个浓度顺铂的培养基培养细胞,48h 后换含顺铂的培养基,5d 后按照 CCK-8 试剂盒说明书加入 CCK-8 试剂,测定 OD450 值;用 IC50 软件计算各组 IC50 值。

1.3 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件,数据用 $\bar{x}+s$ 表示,组间差异采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Bel7402-V3 sphere 细胞中富集 ESA⁺ 细胞亚群

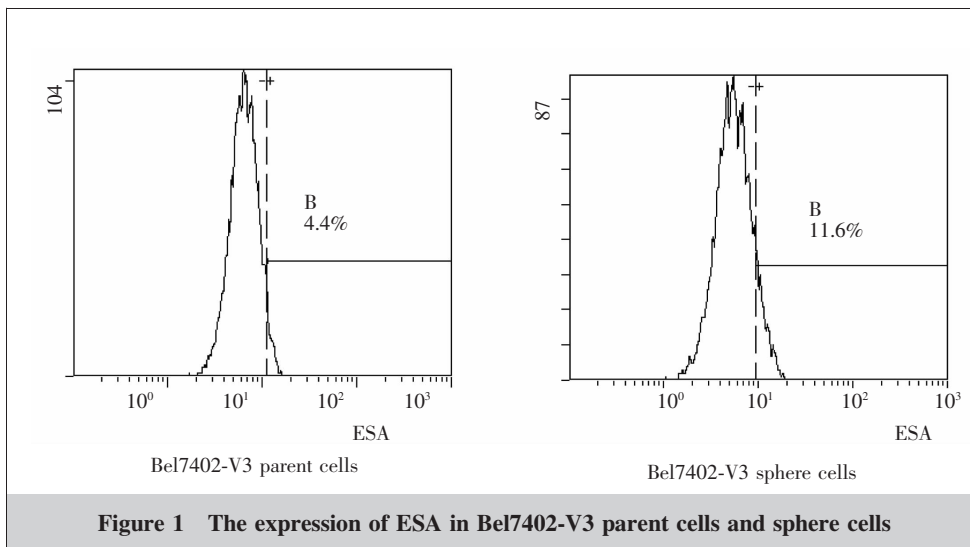


Figure 1 The expression of ESA in Bel7402-V3 parent cells and sphere cells

Table 1 Expression of ESA, 9A9, 15D2 in Bel7402-V3 parent cells and sphere cells (%)

Cell	ESA	15D2	9A9	15D2+9A9
Bel7402-V3	4.4 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 0.7
Bel7402-V3 sphere	11.6 $\pm$ 1.0	7.8 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 0.7	15.1 $\pm$ 0.9

Table 2 Co-expression of ESA, 9A9, 15D2 in Bel7402-V3 parent cells and sphere cells (%)

Cell	15D2+ESA			9A9+ESA			15D2+9A9+ESA		
	15D2	ESA	Co-exp	9A9	ESA	Co-exp	15D2+9A9	ESA	Co-exp
Bel742-V3	1.7 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.7	4.8 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.1	7.0 $\pm$ 0.9	5.2 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 0.2
Bel742-V3 sphere	5.6 $\pm$ 1.0	11.0 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.8	11.7 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 0.2	15.7 $\pm$ 1.0	11.5 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 0.4

活细胞流式荧光检测 Bel7402-V3 亲本及 sphere 细胞中 ESA⁺细胞比例发现 (Figure 1):ESA⁺细胞在 Bel7402-V3 sphere 细胞中比例为 11.6%,比其在 Bel7402-V3 亲本细胞中的比例(4.4%)富集了约 2.6 倍,即 Bel7402-V3 ESA⁺细胞经无血清悬浮培养后得到富集,提示 ESA 可能是 Bel7402-V3 细胞系的肿瘤干细胞标志物。

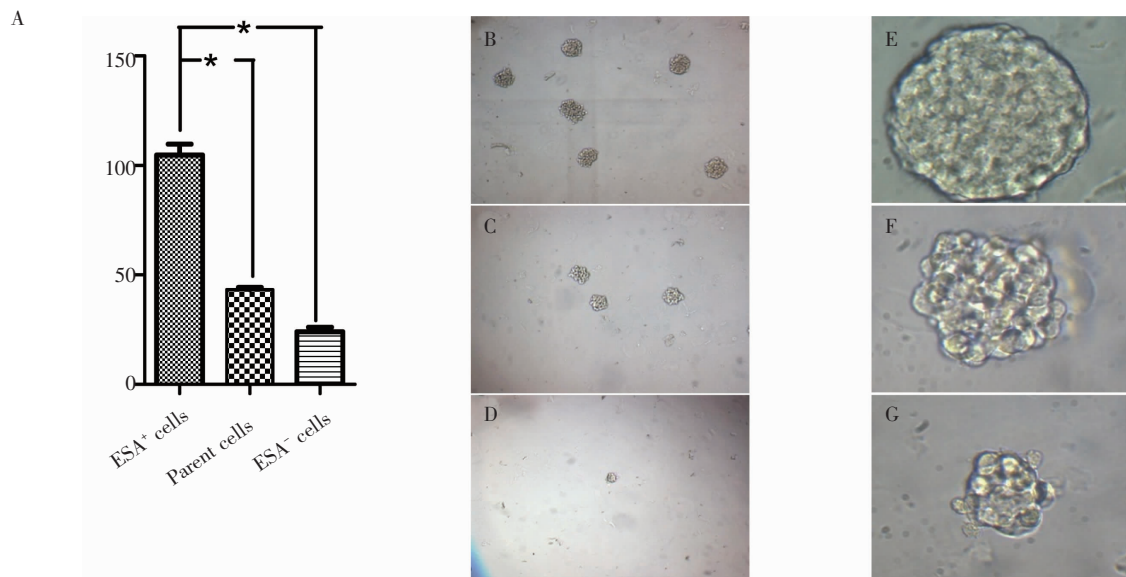
2.2 Bel7402-V3 ESA⁺细胞具有更强的自我更新能力

采用活细胞流式分选后的 Bel7402-V3 ESA⁺细胞,Bel7402-V3 ESA⁻细胞和 Bel7402-V3 亲本细胞的成球培养结果显示 (Figure 2):Bel7402-V3 ESA⁺细胞的成球率为 20.2% $\pm$ 1.6%,明显高于 Bel7402-V3 ESA⁻细胞的 4.6% $\pm$ 1.0%及 Bel7402-V3 亲本细胞的 9.6% $\pm$ 1.0% (P 均 <0.01),即 Bel7402-V3 ESA⁺细胞具有更强的成球能力,进一步提示了 ESA 是 Bel7402-V3 细胞系的肿瘤干细胞标志物。

2.3 Bel7402-V3 亲本及 sphere 细胞中 ESA 及单抗识别抗原的共表达

流式细胞术检测结果显示 (Table 1, Table 2,

Figure 3): 肝癌干细胞标志物 ESA、单抗 9A9、单抗 15D2 的比例在 Bel7402-V3 sphere 细胞中较在 Bel7402-V3 亲本细胞中均明显提升,其比例分别是后者的 2.6 倍、2.0 倍、4.1 倍;在 sphere 细胞中,9A9 + 15D2 两种单抗双染的比例为 15.1%,约等于单抗 9A9 单染比例(6.3%)与单抗 15D2 单染比例(7.8%)之和,在 Bel7402-V3 亲本细胞中也如此,提示 9A9 与 15D2 可能识别的是两个不同分子表型的亚



A: The spheres of ESA⁺, parent and ESA⁻ cells (* $P < 0.01$);
 B: ESA⁺ cells (×100); C: parent cells (×100); D: ESA⁻ cells (×100);
 E: ESA⁺ cells (×400); F: parent cells (×400); G: ESA⁻ cells (×400).

Figure 2 Self-renewal assay of ESA⁺, parent and ESA⁻ cells

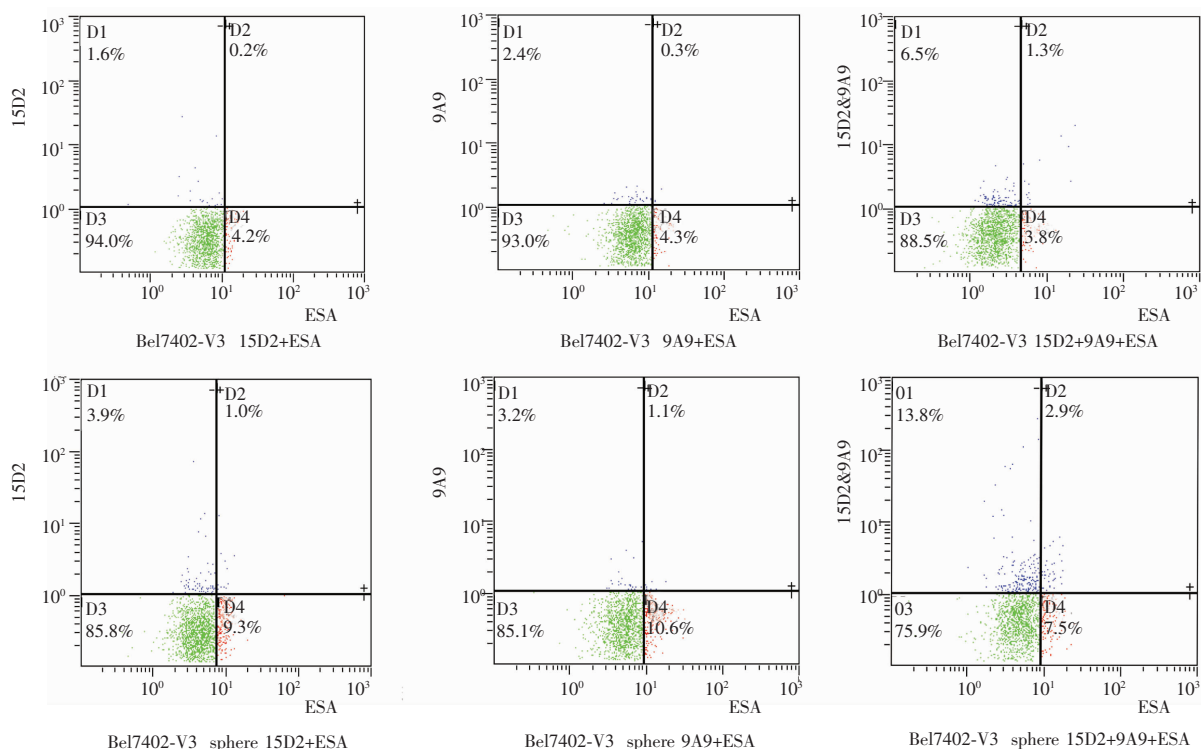


Figure 3 The co-expression of ESA, 9A9, 15D2 in Bel7402-V3 parent cells and sphere cells

群；且在 sphere 细胞中,9A9+15D2+ESA 共染的比例 (2.9%) 略大于 9A9+ESA 共染比例 (1.3%) 与 15D2+ESA 共染比例 (1.1%) 之和,Bel7402-V3 亲本细胞中也是如此,更进一步提示两种单抗可能识别了不同的 ESA 分子表型。

2.4 联合抗体作用具有更强的抑制成球能力

抗体抑制 Bel7402-V3 亲本细胞成球能力的结果显示 (Figure 4): 当单种抗体浓度由 300 μ g/ml 提升一倍至 600 μ g/ml 时,单抗 15D2 对细胞的成球抑制率从 21.7% $\pm$ 4.6% 增加至 26.9% $\pm$ 1.2% ($P>0.05$);

单抗 9A9 对细胞的成球抑制率从 46.9% $\pm$ 3.7% 上升为 49.1% $\pm$ 3.9% ($P>0.05$), 均无统计学差异; 而联合两种单抗 15D2+9A9, 使其浓度分别达 300 μ g/ml 时, 成球抑制率达到 80.5% $\pm$ 3.5%, 显著高于等浓度 (600 μ g/ml) 单种单抗 15D2 的成球抑制率 26.9% $\pm$ 1.2% 和 9A9 的成球抑制率 49.1% $\pm$ 3.9% ($P<0.05$)。

2.5 联合抗体作用具有更强的抑制侵袭能力

抗体抑制 Bel7402-V3 亲本细胞侵袭能力的结果显示 (Figure 5): 当单种抗体浓度由 300 μ g/ml 提升一倍至 600 μ g/ml 时, 单抗 15D2 对细胞的侵袭抑

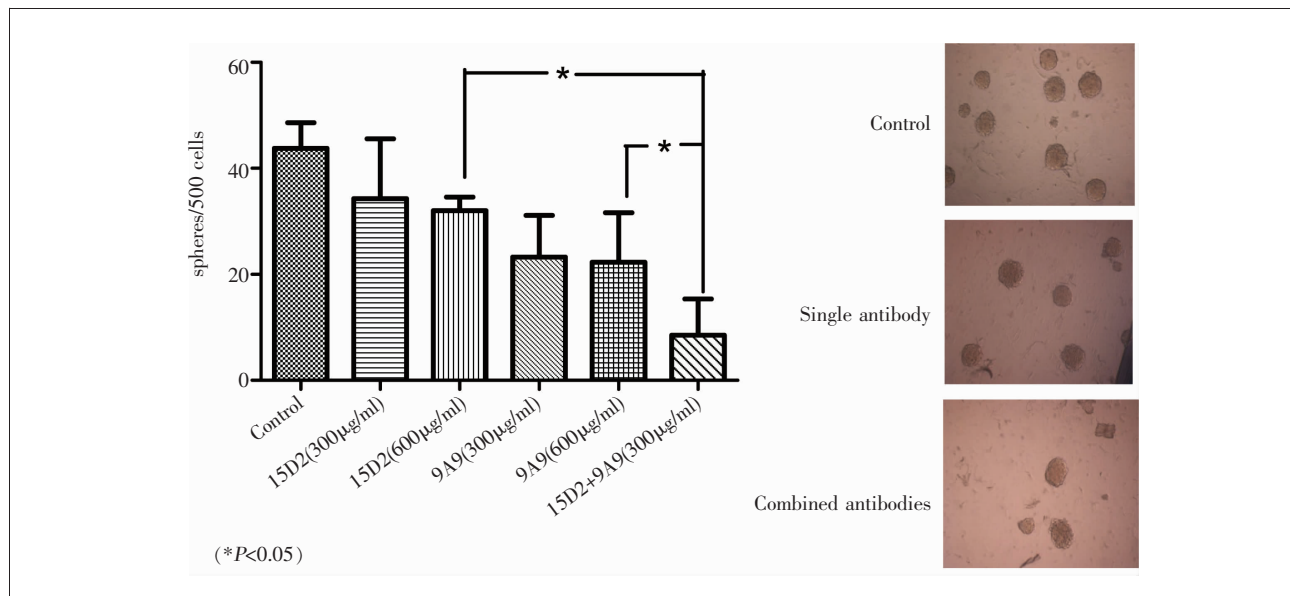


Figure 4 Sphere inhibition assay of single antibody and combined antibodies

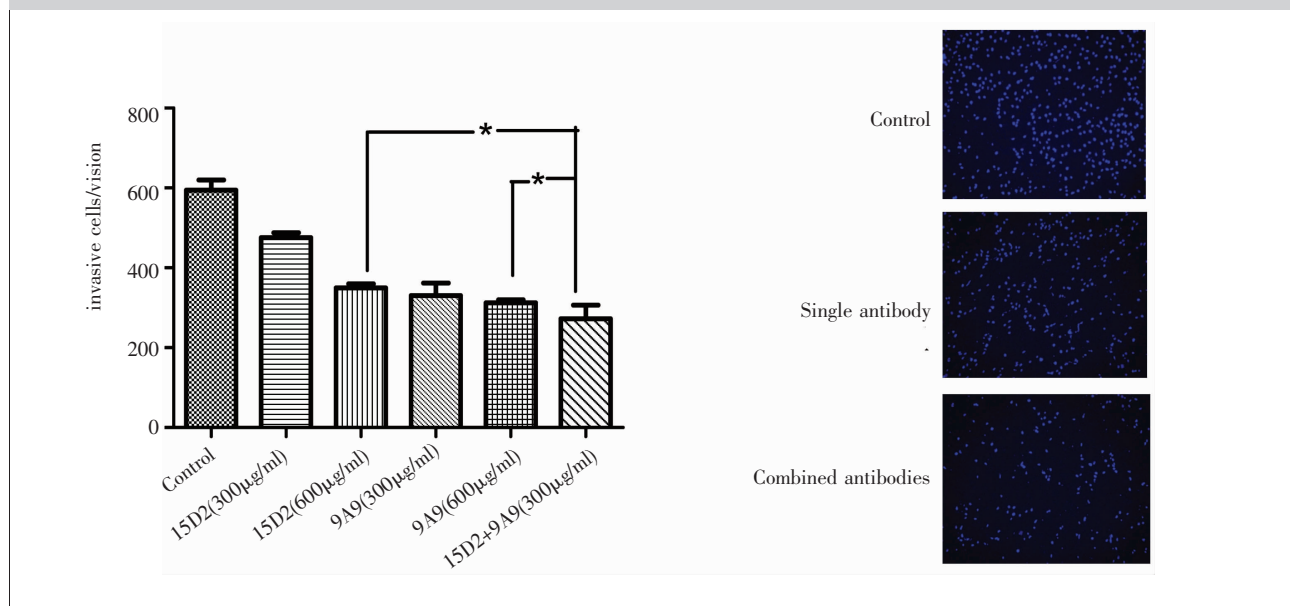


Figure 5 Invasion inhibition assay of single antibody and combined antibodies

制率从 $20.0\% \pm 0.7\%$ 增加至 $41.2\% \pm 0.5\%$ ($P < 0.05$); 9A9 对细胞的侵袭抑制率从 $44.5\% \pm 1.2\%$ 上升为 $47.1\% \pm 1.0\%$ ($P > 0.05$); 而联合两种单抗 (15D2+9A9), 使其浓度分别达 $300\mu\text{g/ml}$ 时, 侵袭抑制率达到 $57.1\% \pm 1.2\%$, 高于等浓度 ($600\mu\text{g/ml}$) 单种单抗 15D2 的侵袭抑制率 $41.2\% \pm 0.5\%$ 和 9A9 的侵袭抑制率 $47.1\% \pm 1.0\%$ ($P < 0.05$)。

2.6 联合抗体作用更有助于降低细胞的耐药性

抗体处理后对 Bel7402-V3 亲本细胞耐药能力的影响结果显示 (Figure 6): 当单抗 15D2 浓度由 $300\mu\text{g/ml}$ 提升一倍至 $600\mu\text{g/ml}$ 时, 其处理后的细胞 IC50 值由 $0.59\mu\text{g/ml}$ 降低至 $0.56\mu\text{g/ml}$ ($P > 0.05$); 当单抗 9A9 浓度由 $300\mu\text{g/ml}$ 提升一倍至 $600\mu\text{g/ml}$ 时, 其处理后的细胞 IC50 值由 $0.6\mu\text{g/ml}$ 降低至 $0.58\mu\text{g/ml}$ ($P > 0.05$); 而联合两种单抗 (15D2+9A9), 使其浓度分别达 $300\mu\text{g/ml}$ 时, 其处理后的细胞 IC50 值为 $0.32\mu\text{g/ml}$, 明显低于等浓度 ($600\mu\text{g/ml}$) 单种单抗 15D2 处理后的 IC50 值 ($0.56\mu\text{g/ml}$) 和 9A9 处理后的 IC50 值 ($0.58\mu\text{g/ml}$) ($P < 0.05$)。同时, 耐药曲线图显示: 对照组和单独抗体处理组在低化疗剂量的情况下, 细胞的死亡并不明显, 只有在高剂量

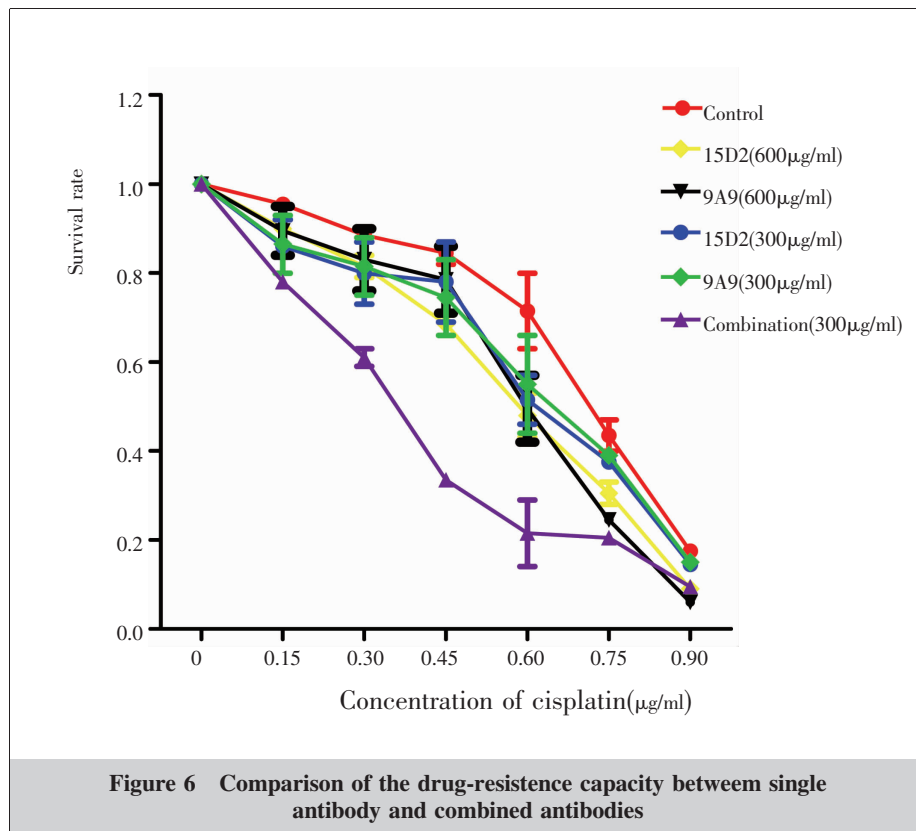
化疗药剂量范围时细胞才显著随剂量增加而加速死亡; 而联合抗体处理组则在较低的化疗药剂量范围时就观察到随化疗药剂量增加, 死亡的细胞显著增加的现象, 提示联合多靶点抗体治疗可以在相当低的化疗药物浓度下就获得较满意的疗效。

3 讨论

肿瘤干细胞是一类促使肿瘤发生、发展、复发, 且具有不定向分化能力和自我更新能力的细胞, 而对于肿瘤干细胞的各种体内外功能鉴定就依赖于特异性的肿瘤干细胞标志物, 如细胞膜蛋白和细胞内酶^[6]。肿瘤的异质性也同样适用于肿瘤干细胞。近年来, 对于肿瘤干细胞的亚群鉴定观点不一。2013 年 9 月, Meacham 等^[7]提出: 在同一肿瘤的不同患者中, 存在表达不同标志物的干细胞亚群。乳腺癌是第一个报道的被发现存在有肿瘤干细胞的实体瘤, 其干细胞在 $\text{CD44}^+\text{CD24}^{-/\text{lo}}$ 、SP、ALDH⁺ 等不同亚群中均存在^[8]。Tang 等^[9]在文献中提出: 在肿瘤中存在着各种不同来源的干细胞亚群, 这些干细胞亚群在基因水平上已有明显差异, 可能行使着不同的功能; 我们的

结果也提示了肿瘤干细胞不同亚群的存在。

在本研究中, 我们观察到: 在肝癌细胞系 Bel7402-V3 中, Bel7402-V3 ESA^+ 细胞比例在 Bel7402-V3 sphere 中比在亲本细胞中富集了 2.6 倍; 经分选得到的 Bel7402-V3 ESA^+ 细胞展示出比 Bel7402-V3 ESA^- 细胞和 Bel7402-V3 亲本细胞更强自我更新能力, 这些都提示 ESA 为此细胞系的干细胞标志物。流式结果显示: 在 Bel7402-V3 亲本和 sphere 细胞中, 两种单抗 9A9 和 15D2 单染比例之和约等于其双染比例, 表明两种单抗分别识别了该细胞系中完全不同的两群细胞, 且相互之间没有



交叉,说明这两群细胞至少是表达不同分子表型的亚群;两种单抗均能单独与ESA共染,且在Bel7402-V3 sphere细胞中得到富集,说明两种单抗均能识别部分ESA⁺的肿瘤干细胞;9A9和15D2联合与ESA的共染比例大于其分别与ESA共染的比例之和,提示了9A9和15D2分别识别了Bel7402-V3 ESA⁺肿瘤干细胞中的不同分子表型的亚群。

Tang等曾提出:肿瘤干细胞作为肿瘤发生的起始细胞,存在异质性。在首个被发现肿瘤干细胞存在的白血病中,就发现了CD34⁺CD38⁻,Lin⁺,CD45RA⁺等多个肿瘤干细胞亚群^[10,11]。由于肿瘤干细胞的异质性,可能会导致靶向药物在抑制或杀死一种亚群的同时,使得另一种亚群成优势生长,从而导致肿瘤的转移复发^[12,13]。因此,多靶点联合治疗可针对更多的肿瘤干细胞亚群,有望显著提高治疗效果^[14]。

研究中,我们设置了2个浓度的抗体(300μg/ml,600μg/ml),并分别从体外功能实验中观察到,浓度为600μg/ml的抗体对Bel7402-V3肿瘤干细胞的各种功能抑制率只稍强于浓度为300μg/ml的抗体,即增加一倍浓度的抗体时并没有明显提高抗体的作用,提示了单纯依靠提高单一靶点治疗药物的浓度对于提高疗效来说是没有多大帮助的;而联合9A9和15D2两种单抗,其浓度分别为300μg/ml时,对Bel7402-V3肿瘤干细胞的功能抑制率明显增强:15D2+9A9各300μg/ml时,成球抑制率为80.5%±3.5%,约为15D2单独作用的4倍,为9A9单独作用的2倍;15D2+9A9各300μg/ml时,侵袭抑制率为57.1%±1.2%,约为15D2和9A9单独作用的1.3倍;15D2+9A9各300μg/ml处理过的Bel7402-V3亲本细胞耐药的IC₅₀值为0.32,耐药性明显低于15D2单独作用(IC₅₀:0.56)和9A9单独作用(IC₅₀:0.58)后的耐药性。结果显示联合2株针对不同分子表型肿瘤干细胞亚群抗体对肿瘤干细胞的侵袭抑制和成球抑制均优于等浓度的单个抗体作用。这不仅证实了肿瘤干细胞亚群的存在,还提示了多靶点联合治疗有可能提高疗效。

有趣的是,在耐药实验中,我们发现对照组和单独抗体处理组耐药曲线呈上凸型,而联合抗体处理组耐药曲线呈下凹型。这意味着对照组和单独抗体处理组必须在高剂量化疗药浓度范围时细胞才显著随剂量增加而加速死亡;而联合抗体处理组则能在

较低的化疗药剂量范围时就观察到随化疗药剂量增加,肿瘤细胞显著加速死亡,即只需要较低剂量的化疗药即可达到非常好的效果。联合抗体组对细胞的耐药影响不仅呈现出两种单抗作用的叠加效应,而更像是一种协同效应。推测这可能是因为肿瘤干细胞中,由于存在有表达不同分子表型的亚群,并在不同的信号通路或基因水平上发挥了不同的作用。单一靶点抗体治疗时,其他的亚群成优势生长,从而导致治疗效果降低;但在联合使用多靶点治疗时,即便针对单一靶点的疗效受限,也有望通过多靶点治疗得以弥补。目前在临床工作中,正是由于化疗药物的毒副作用,常使肿瘤患者不能耐受有效杀伤剂量的化疗药,导致治疗疗效受限^[15]。而我们的结果提示:经联合多靶点肿瘤干细胞治疗后,将使得化疗药物更容易在低剂量时达到高疗效,这将提高化疗药在安全剂量内的疗效,降低毒副作用,多靶点联合+化疗方案可能会让肿瘤患者获益。综合以上结果说明,在提高一种靶向肿瘤干细胞药物剂量已不足以提高疗效的情况下,联合多靶点的治疗能够获得更好的疗效,使得化疗药物在较低剂量时就可获得令人满意的疗效。

靶向治疗已成为治疗中晚期肿瘤的重要手段^[16],靶向治疗后患者发生转移或复发是否与肿瘤的异质性有着重要的关系还需要进一步研究。而联合多靶点治疗可能会抑制多个具有不同生物学功能的亚群,从不同通路和基因水平阻断了肿瘤的耐药、自我更新等能力,进而有可能有效阻断肿瘤的复发。

本研究为肿瘤干细胞存在异质性,且不同亚群在不同的信号通路或基因水平发挥了不同的作用提供了间接证据,并进而为临床治疗肿瘤提供了新思路——针对肿瘤干细胞的多靶点联合治疗能显著提高疗效。

参考文献:

- [1] Wysocki PJ.Targeted therapy of hepatocellular cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs,2010,19(2):265-274.
- [2] Gomes MA,Priolli DG,Tralhão JG,et al.Hepatocellular carcinoma:epidemiology,biology, diagnosis,and therapies [J]. Rev Assoc Med Bras,2013. [Epub ahead of print]
- [3] Lobo NA,Shimono Y,Qian D,et al. The biology of cancer stem cells [J]. Annu Rev Cell Dev Biol,2007,23(3):675-699.
- [4] Yamashita T,Wang XW.Cancer stem cells in the develop-

- ment of liver cancer [J].J Clin Invest,2013,123(5):1911-1918.
- [5] Shinagare AB,Jagannathan JP,Krajewski KM,et al. Liver metastases in the era of molecular targeted therapy:new faces of treatment response [J].AJR Am J Roentgenol,2013,201(1):W15-W28.
- [6] Wiczorek K,Niewiarowska J.Cancer stem cells [J].Postepy Hig Med Dosw,2012,66:629-636.
- [7] Meacham CE,Morrison SJ. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity[J].Nature,2013,501(2):328-336.
- [8] Mannello F.Understanding breast cancer stem cell heterogeneity;time to move on to a new research paradigm[J].BMC Med,2013,11:169.
- [9] Tang DG.Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity[J].Cell Res,2012,22(3):457-472
- [10] O'Brien JA,Rizzieri DA.Leukemic stem cells:a review [J].Cancer Invest,2013,31(4):215-220.
- [11] Guzman ML,Allan JN.Leukemia stem cells in personalized medicine[J].Stem Cells,2013.[Epub ahead of print]
- [12] Wong RS,Cheong SK.Leukaemic stem cells:drug resistance,metastasis and therapeutic implications [J].Malays J Pathol,2012,34(2):77-88.
- [13] Crea F,Duhagon MA,Farrar WL,et al.Pharmacogenomics and cancer stem cells;a changing landscape? [J].Trends Pharmacol Sci,2011,32(8):487-494.
- [14] Ibrahim N,Yu Y,Walsh WR,et al.Molecular targeted therapies for cancer:sorafenib mono-therapy and its combination with other therapies [J].Oncol Rep,2012,27(5):1303-1311.
- [15] Conklin KA.Dietary antioxidants during cancer chemotherapy:impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects[J].Nutr Cancer,2000,37(1):1-18.
- [16] Dietel M,Jöhrens K,Laffert M,et al.Predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy:a review focussing on clinical relevance [J].Cancer Gene Ther,2013,20(4):211-221.

《胸部肿瘤放射治疗策略》出版启事

肺癌、食管癌和乳腺癌是我国常见的胸部恶性肿瘤,也是全球范围内发病率和死亡率较高的恶性肿瘤,不但给患者及其家属带来巨大的痛苦,也给社会带来了沉重的负担。

由毛伟敏教授和许亚萍教授组织浙江省肿瘤医院/浙江省胸部肿瘤研究指导中心的青年骨干编写的《胸部肿瘤放射治疗策略》,是一本系统介绍胸部恶性肿瘤诊断以及放射治疗规范和进展的学术专著。

全书内容主要针对临床一线的放射治疗工作者,以循证医学为基础,并结合目前国内外的临床指南,重点介绍了肺癌、食管癌、乳腺癌等常见胸部恶性肿瘤近年来的放射治疗新技术、新进展,放射治疗与化疗、靶向治疗、内分泌治疗、手术治疗等手段的联合应用,并对肿瘤的疗效评价、放射治疗并发症的处理做了较为详细的阐述。大量引用了近年来国内外的最新资料,并参考了美国国立综合癌症网络(NCCN)发布的2013指南中的诊治规范。

体现综合治疗的原则是该书的另一特点。在胸部恶性肿瘤中有较多争议的部分,如局部晚期非小细胞肺癌的多学科综合治疗,由多个科室的专家联合执笔,以两个章节的篇幅详细阐述;在以手术为基础的食管癌多学科综合治疗部分,全面地讨论了手术与术前新辅助放化疗联合以及与术后辅助放化疗联合的意义。

该书由中国抗癌协会副理事长、山东省肿瘤医院院长、中国工程院院士于金明教授作序,由美国 Georgia Regents University 的Feng-Ming (Spring) Kong教授和浙江省肿瘤医院陈明教授担任主审,由军事医学科学出版社出版发行。