

一株胃癌干细胞功能性单克隆抗体的鉴定及功能研究

矫 婕¹, 舒 雄², 刘辉琦², 孙力超², 冉宇靛², 遇 珑², 孙立新², 杨治华¹
(1. 广西医科大学, 广西南宁 530021; 2. 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

摘要: [目的] 从人胃癌干细胞单克隆抗体杂交瘤库中筛选鉴定识别胃癌干细胞的单克隆抗体, 并证明其具有抑制胃癌干细胞自我更新能力和侵袭功能的功能性单抗, 为靶向人胃癌干细胞治疗胃癌提供有治疗潜力的单抗候选药物。 [方法] 采用无血清培养、PKH26 染色及流式细胞术等方法确定人胃癌细胞系 SNU-5 中存在肿瘤干细胞, 可作为研究人胃癌干细胞单抗的细胞模型。应用双色免疫荧光、流式细胞分选等技术分析鉴定单克隆抗体 25G5 是识别胃癌干细胞的单克隆抗体。用肿瘤干细胞的成球生长实验、Transwell 侵袭实验及耐药性实验研究分析 25G5 单抗对胃癌干细胞功能的影响。 [结果] SNU-5 细胞在无血清培养基中存活并增殖成球形生长, SNU-5 球体细胞中表达胃癌干细胞标志物 CD44⁺ 和 CD90⁺ 的细胞比例分别为 72.4% 和 8.55%, 较亲本细胞分别提高了 21.3 倍和 2.4 倍, 表明 SNU-5 中存在有 CD44⁺、CD90⁺ 的胃癌干细胞。细胞免疫荧光结果显示 25G5 单抗识别的抗原分子与 CD44、CD90 胃癌干细胞标志物共染表达于胃癌干细胞膜上。流式细胞术分选的 25G5⁺ 细胞的成球率为 (21.4±0.3)%, 显著高于 25G5⁻ 细胞 (12.3±0.7)% 和亲本细胞 (16.1±1.0)%。Transwell 侵袭实验、细胞耐药性实验和动物体内致瘤实验结果显示 25G5⁺ 细胞的侵袭能力和耐药能力也显著高于 25G5⁻ 细胞和亲本细胞, 表明 25G5 单抗识别的细胞是具有自我更新、高侵袭、高耐药性特征的肿瘤干细胞。体外功能研究发现, 单抗 25G5 能显著抑制 SNU-5 胃癌细胞在无血清培养液中的成球生长, 抑制率可达 46.4%, 也能显著地抑制 SNU-5 成球细胞 (Sphere 细胞) 的侵袭, 抑制率达 58.4%。单抗 25G5 是一株能显著抑制 SNU-5 中肿瘤干细胞自我更新和侵袭能力的功能性抗人胃癌干细胞单抗。 [结论] 单克隆抗体 25G5 是一株抗胃癌干细胞的功能性单抗, 为胃癌干细胞靶向治疗的候选抗体药物。

关键词: 人胃癌细胞; 肿瘤干细胞; 单克隆抗体; CD44; CD90

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)04-0284-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.04.B007

Identification and Functional Study of a Functional Monoclonal Antibody Against Gastric Cancer Stem Cells

JIAO Jie¹, SHU Xiong², LIU Hui-qi², et al.

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. State Key Laboratory of Molecular Oncology, Institute of Oncology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: [Objective] To screen and identify monoclonal antibody (mAb) which recognize gastric cancer stem cells from mAb hybridoma library which against human gastric cancer stem cells, and to test inhibit self-renew and invasive ability of gastric cancer stem cells, so as to provide candidate antibody drugs for stem cell targeted therapy of gastric cancer. [Methods] Cancer stem cells in SNU-5 cell line proved with serum-free medium, PKH26 stain and flow cytometry. Dual-fluorescent, fluorescence-activated cell sorting (FACS) were used to identify 25G5 recognize gastric cancer cells. Effect of 25G5 on gastric cancer stem cells were detected by sphere forming, transwell assay and drug resistance analysis. [Results] SUN-5 cells could survive, proliferate and form sphere cells in serum-free medium. The percentage of CD44⁺ and CD90⁺ cells population in sphere cells were 72.4% and 8.55%, respectively. Those percentage increased by 21.3 and 2.4 folds compared to SUN-5 parent cells. Cell immunofluorescence showed that antigen recognized by 25G5 co-expression with CD44 and CD90 on cell membrane. Then we applied the FACS to isolate 25G5⁺ cells for sphere culture, invasion assay, chemosensitivity and tumorigenicity test. The sorted 25G5⁺ cell presented stem cell-like features, including self-renewal [sphere formation rate: (21.4±0.3)% vs (12.3±0.7)%], invasion ability [the number of invasive cells: (244.5±13.5)

基金项目: 国家 863 计划青年科学家专题 (2014AA020537)

通讯作者: 杨治华, 教授, 学士; 广西医科大学医学科学实验中心, 广西壮族自治区南宁市青秀区双拥路 22 号 (530021); E-mail: profyzh@126.com

收稿日期: 2015-10-24; **修回日期:** 2015-12-28

vs (122.4±7.2)] and tumorigenic capacity and chemosensitivity. All these results demonstrated that 25G5⁺ cells were cancer stem cells featured with strong self-renewal, invasive and drug resistance. In vitro functional assay showed that mAb 25G5 significantly suppressed the sphere formation ability of SUN-5 cells, with the inhibitory rates being 46.4%. MAb 25G5 significantly suppressed the invasive ability of SNU-5 cells, with the inhibitory rates being 58.4%. [Conclusion] MAb 25G5 is a functional antibody which against gastric cancer stem cells and could be the candidate antibody drug targeting cancer stem cell.

Subject words: human gastric cancer cell; cancer stem cell; monoclonal antibody; CD44; CD90

胃癌是世界上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4位和第2位^[1]。我国是胃癌高发地区，其发病率和死亡率均居第2位。每年约有50万人死于胃癌。目前临床上治疗胃癌仍然采用传统的手术、放疗和化疗。即使三者结合治疗，近30年来胃癌患者的5年生存率并未见提高，仍然徘徊在20%~30%。导致胃癌高死亡率的根本原因是胃癌细胞的高转移率和高复发率，而且转移复发的胃癌对化疗药几乎都是耐药的^[2]。已有研究认为肿瘤干细胞在恶性肿瘤的复发、转移中发挥着关键性作用，而现有的治疗手段无法针对肿瘤干细胞，是导致肿瘤治疗失败、复发和转移的主要原因^[3]。因此若能靶向杀灭肿瘤干细胞将有望有效治疗肿瘤的转移、复发，延长患者生存期，改善预后，可望肿瘤治疗有新的突破。

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是指在肿瘤组织中只有一小部分细胞具有无限增殖及分化的能力，能维持肿瘤的形成及生长^[4]。现有研究证明人胃癌组织中也存在有肿瘤干细胞，它可能来源于胃成体干细胞的突变，其中CD90⁺、CD44⁺的细胞具有高致瘤性被认为是胃癌干细胞的标志物之一^[5]。因此，针对肿瘤干细胞的靶向治疗有望弥补临床上现有治疗手段的缺陷，改善胃癌患者的预后^[6]。目前尚未见到有靶向人胃癌干细胞治疗的研究报道。研究者所在实验室在前期工作中采用本室建立的大容量功能性单克隆抗体库(简称单抗库)技术平台，成功建立了人胃癌干细胞单抗库，并初步筛选获得9株识别人胃癌干细胞的单抗。为了获得能抑制人胃癌干细胞功能的单抗，本研究选择人胃癌细胞系SNU-5为细胞模型，对其中一株单抗25G5进行了进一步的鉴定和体外功能的研究，为研发靶向胃癌干细胞抗体药物提供候选单抗。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞系SNU-5由中国医学科学院肿瘤医院细胞及分子生物学实验室保存。常规细胞培养液、表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、白血病抑制因子(LIF)、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，胎牛血清(FBS)购自美国Hyclone公司，PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit和DAPI购自美国Sigma公司，FITC-CD90、FITC-CD44购自美国eBioscience公司。兔来源的CD90购自美国ABGENT公司，兔来源的CD44购自美国Abcam公司。孔径为8μm的Transwell小室购自美国Millipore公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及传代

人胃癌细胞系SNU-5用含10%FBS的1640培养液培养。无血清球体细胞培养采用含有EGF(20ng/ml)、bFGF(20ng/ml)、LIF(10ng/ml)、氢化可的松(40ng/ml)、B27(1:50)的DMEM-F12无血清培养液培养中，在37℃、5%CO₂孵箱中培养7d，用于SNU-5 Sphere细胞流式检测。

1.2.2 PKH26染色成球细胞验证SNU-5细胞的干性特征

研究报道表明肿瘤干细胞能够在无血清培养液中成球生长，是肿瘤干细胞的标志之一。胃癌细胞系SNU-5中含有一定比例的肿瘤干细胞，并能在无血清培养液中成球生长。PKH26作为亲脂性红色荧光染料，可被肿瘤干细胞长期保留，用于特异性标记肿瘤干细胞。因此，我们将处于对数生长期的SNU-5细胞消化为单个细胞，根据PKH26染料试剂盒说明书进行染色。即用试剂盒中C液稀释细胞至1×10⁷个/ml，

迅速与用 C 液稀释至 4×10^{-6} mol/L 的 PKH26 染料混合, 室温避光培养 5min 后用等体积血清终止染色, 再用含血清培养液洗 1 次, 无血清培养液洗 2 次。用无血清培养液重悬, 以 500 个/孔接种于含 0.8% 甲基纤维素的无血清培养液的低黏附 24 孔板中, 于 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养, 不同时间点于荧光显微镜下观察染料在球体细胞中的分布情况。

1.2.3 流式细胞术检测 SNU-5 中表达干细胞标志物的细胞

我们采用流式细胞术检测了 SNU-5 亲本细胞以及无血清成球细胞中 CD90、CD44 的表达情况。收集消化成单个的细胞, 1×10^6 个/管, 加入带有荧光标记的抗体, 室温培养 1h, PBS 洗涤 3 次, 1% 多聚甲醛溶液固定后, 用流式细胞仪进行检测。

1.2.4 活细胞双色免疫荧光检测胃癌干细胞标志物与单抗 25G5 共定位

在无菌玻片接种细胞, 培养 48h, PBS 洗涤 1 次, 单抗与标志物 (CD90 或 CD44) 同时加入, 室温反应 1h, 用 1% BSA 的 PBST 洗涤 5 次, 洗涤后用 4% 多聚甲醛固定 15min, 再加入荧光二抗室温避光反应 30min, 用 0.1% BSA 的 PBST 洗涤 5 次, 洗涤后用含 50% 甘油的 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DAPI 封片。激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.5 流式细胞术检测肿瘤干细胞标志物与单抗 25G5 识别抗原的共表达

采用双色流式细胞术检测 SNU-5 亲本细胞中以及无血清成球细胞中标志物 (CD90、CD44) 与单抗 25G5 的共表达情况。收集消化成单个的细胞, 1×10^6 个/管, 加入一抗, 室温培养 1h, PBS 洗涤 3 次, 加入二抗, 室温避光反应 30min, 1% 多聚甲醛溶液固定后, 用流式细胞仪进行检测。

1.2.6 流式细胞术分选 SNU-5 亲本中 25G5⁺ 细胞并检测成球能力

无菌环境下, 将对数期生长的 SNU-5 细胞消化为单细胞悬液, PBS 洗涤 2 次, 加入单抗 25G5, 细胞密度为 1×10^7 个/ml, 室温反应 1h, PBS 洗涤 3 次, 加入二抗, 避光孵育 30min, PBS 洗涤 3 次, 再用含 1% BSA 的 PBS 重悬, 上机进行流式细胞仪分选。将分选得到的 25G5⁺ 细胞、亲本细胞、25G5⁻ 细胞以 500 个/孔接种于低黏附 24 孔板, 进行无血清悬浮培养, 每隔 2d 补液 1 次, 7d 左右在显微镜下计球体细胞数, 并计算成球率。

1.2.7 流式细胞术分选 SNU-5 亲本中 25G5⁺ 细胞并用 Transwell 法检测其侵袭特征

1mg/ml 的 matrigel 胶包被于 Transwell 小室中, 将流式分选得到的 25G5⁺ 细胞、25G5⁻ 细胞、亲本细胞以 4×10^4 个/孔接种到 Transwell 小室的上室, 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养 24h 后固定液固定, PBS 洗涤 2 次, 取下底膜, DAPI 染色、封片, 荧光显微镜下观察穿过细胞, 拍照并计数。

1.2.8 流式细胞术分选 SNU-5 亲本中 25G5⁺ 细胞对化疗药物的耐药性

将流式分选得到的 25G5⁺ 细胞、亲本细胞、25G5⁻ 细胞以 4000 个/孔接种于 96 孔板, 每组细胞均用含 0、0.0125、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 8 种不同浓度顺铂的培养基, 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养, 3 天换液, 7 天后按照 CCK-8 试剂盒说明书加入 CCK-8 试剂, 测定 OD_{450} 值, 用 IC_{50} 软件计算各组 IC_{50} 值。

1.2.9 无血清悬浮培养法检测 25G5 单抗对 SNU-5 sphere 细胞成球的作用

收集 SNU-5 sphere 细胞, 吹散成单个, 用不同浓度单抗 25G5 (1、0.5、0.25、0.125mg/ml) 孵育细胞, 37°C 2h, 以 500 个细胞/孔接种于低黏附 24 孔板中, 用含 0.8% 甲基纤维素的无血清悬浮培养, 7 天后计成球数并计算抑制率。抑制率 = $(1 - \text{实验组成球数} / \text{对照组成球数}) \times 100\%$

1.2.10 Transwell 法检测 25G5 单抗对 SNU-5 sphere 细胞侵袭能力的影响

收集 SNU-5 sphere 细胞, 吹散成单个, 用不同浓度单抗 25G5 (1、0.5、0.25、0.125mg/ml) 孵育细胞, 37°C 2h, 以 4×10^4 个/孔将细胞接种于预先包被 1mg/ml Matrigel 胶的 Transwell 上室中, 在 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养 24h 后固定液固定, PBS 洗涤 2 次, 取下底膜, DAPI 染色、封片, 荧光显微镜下观察穿过细胞, 拍照并计数。

1.3 统计学处理

应用 SPSS19.0 软件分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 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 胃癌细胞系 SNU-5 中肿瘤干细胞的鉴定

SNU-5 细胞 PKH26 染色后进行无血清培养, 第 13 天可见 sphere 细胞中仅有单个细胞着色, 结果提

示 SNU-5 细胞系中存有肿瘤干细胞。流式细胞术检测 SNU-5 的 sphere 细胞中标志物 CD90、CD44 的阳性比例分别为 8.55%、72.4%，较亲本 SNU-5 分别提高 2.4 倍、21.3 倍，提示 SNU-5 细胞中含有肿瘤干细胞，其标志物为 CD90 和 CD44。

2.2 抗胃癌干细胞杂交瘤单抗的筛选、鉴定

2.2.1 杂交瘤单抗识别 SNU-5 亲本及 sphere 细胞中的胃癌干细胞

采用流式细胞术检测 9 株单抗在 SNU-5 亲本及 sphere 细胞中的阳性比例，结果显示在检测的 9 株单抗中有 3 株单抗(25G5、25A3、25A9)在 SNU-5 的 sphere 细胞的阳性比例明显高于亲本细胞(Table 1)，提示该 3 株单抗能够识别胃癌干细胞。

Table 1 Expression of mAbs in SNU-5 cells and sphere cells detected by flow(%)

Clone number	Positive rate		Enrichment
	Parent	Sphere	
4C2	5.20	3.50	0.7
25G5	6.00	17.10	2.9
25A9	3.68	8.38	2.3
25A3	1.13	4.08	3.6
23G5	11.90	8.70	0.7
17G12	8.00	3.04	0.4
12D6	4.20	5.30	1.3
11H5	3.58	2.55	0.7
11D12	7.50	5.00	0.7

2.2.2 杂交瘤单抗与胃癌干细胞标志物 CD90、CD44 共定位

为了进一步证明 3 株杂交瘤单抗能够特异识别胃癌干细胞，我们检测 3 株杂交瘤单抗在 SNU-5 亲本及 sphere 细胞中与胃癌干细胞标志物 CD90、CD44 的共表达情况 (Table 2)，结果显示 SNU-5 sphere 细胞中 CD90⁺细胞表达比例为 9.4%，单抗 25G5 识别细胞的比例为 22.2%，两者共染比例 7.72%，较亲本细胞中共染比例(2.66%)提高 2.9 倍。SNU-5 sphere 细胞中 CD44⁺细胞表达比例为 80.2%，单抗 25G5 识别细胞的比例为 28.6%，两者共染比例 25.1%，较亲本细胞中共染比例(0.8%)提高 31.4 倍。双色细胞免疫荧光检测结果显示，单抗 25G5 与 CD90、CD44 在 SNU-5 亲本细胞上共定位，提示单抗 25G5 是识别 CD90⁺、CD44⁺的胃癌干细胞的单抗 (Figure 1)。

Table 2 Co-expression of CD90, CD44 and mAbs in SNU-5 cells and SNU-5 sphere cells (%)

Clone number	Co-expression of mAbs and CD90			Co-expression of mAbs and CD44		
	Parent	Sphere	Enrichment	Parent	Sphere	Enrichment
4C2	0.80	2.80	3.5	2.80	3.60	1.3
25G5	2.66	7.72	2.9	0.80	25.10	31.4
25A9	3.05	3.82	1.3	1.62	5.92	3.7
25A3	2.39	4.51	1.9	1.08	2.43	2.3
23G5	2.30	5.10	2.2	2.70	4.12	1.5
17G12	1.84	8.30	4.5	3.67	12.90	3.5
12D6	1.80	2.74	1.5	0.80	3.30	4.1
11H5	1.30	2.44	1.9	0.80	3.55	4.4
11D12	0.70	3.24	4.6	2.80	4.50	1.6

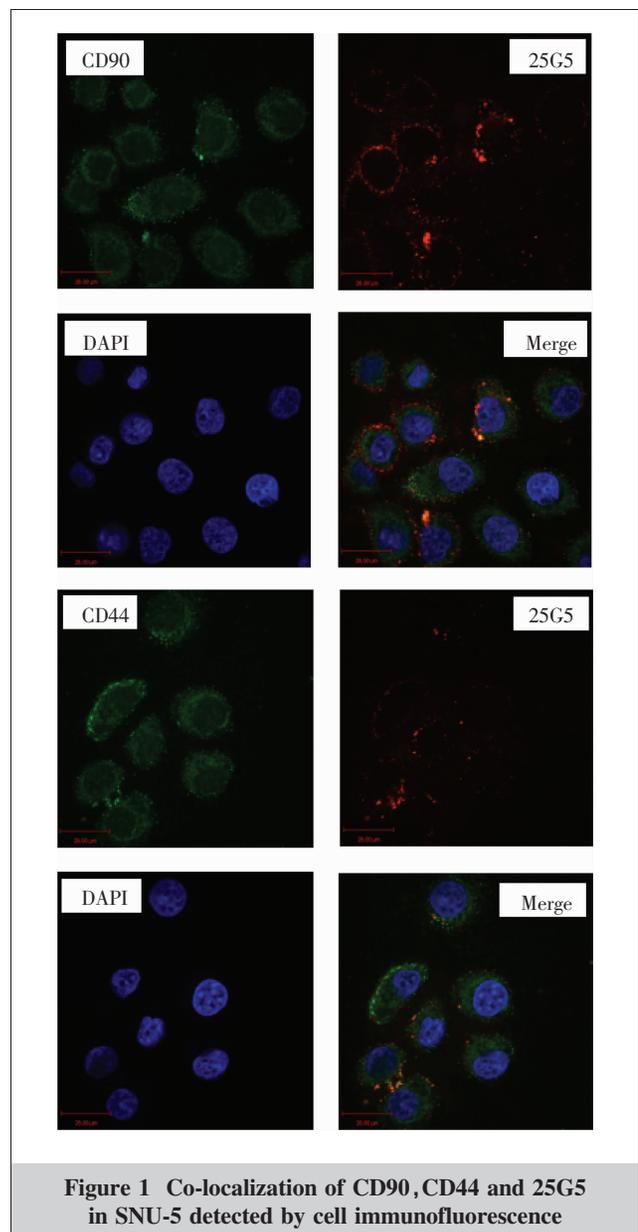


Figure 1 Co-localization of CD90, CD44 and 25G5 in SNU-5 detected by cell immunofluorescence

2.3 25G5 单抗识别的细胞具有肿瘤干细胞的特性

2.3.1 25G5 单抗识别的细胞具有肿瘤干细胞自我更新能力

采用细胞流式分选技术从 SNU-5 亲本细胞中分离出的 25G5⁺细胞、25G5⁻细胞和亲本细胞进行无血清成球培养。结果显示,25G5⁺细胞的成球率为 (21.4±0.3)%,明显高于 25G5⁻细胞(12.3±0.7)%和亲本细胞 (16.1±1)% ($P<0.05$) (Figure 2), 表明 25G5⁺细胞较亲本细胞和 25G5⁻细胞具有更强的自我更新能力,具有肿瘤干细胞的特征。

2.3.2 25G5 单抗识别的细胞侵袭能力明显高于 25G5⁻和亲本细胞

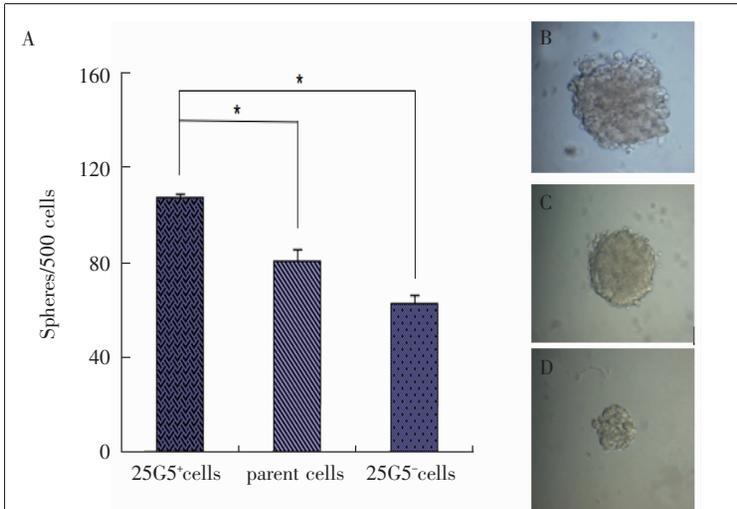
Transwell 小室法检测从 SNU-5 亲本细胞中分选出的 25G5⁺细胞、25G5⁻细胞和亲本细胞侵袭能力实验,结果显示,25G5⁺细胞侵袭细胞数为 244.5±13.5/视野,明显高于 25G5⁻细胞 (122.4±7.2/视野)和亲本细胞 (143.2±6.4/视野) ($P<0.01$) (Figure 3), 表明 25G5⁺细胞较亲本细胞和 25G5⁻细胞具有更强的侵袭能力。

2.3.3 25G5 单抗识别的细胞具有肿瘤干细胞高耐药性特征

采用 CCK-8 法检测不同浓度的顺铂对 25G5⁺细胞、亲本细胞和 25G5⁻细胞的影响,结果显示,25G5⁺细胞、亲本细胞及 25G5⁻细胞的 IC₅₀ 分别为 0.285μmol/L、0.155μmol/L、0.094μmol/L,提示 25G5⁺细胞的耐药性显著强于 25G5⁻细胞及亲本细胞 (Figure 4)。25G5⁺细胞能够抵抗顺铂的能力,具有肿瘤干细胞的特征。

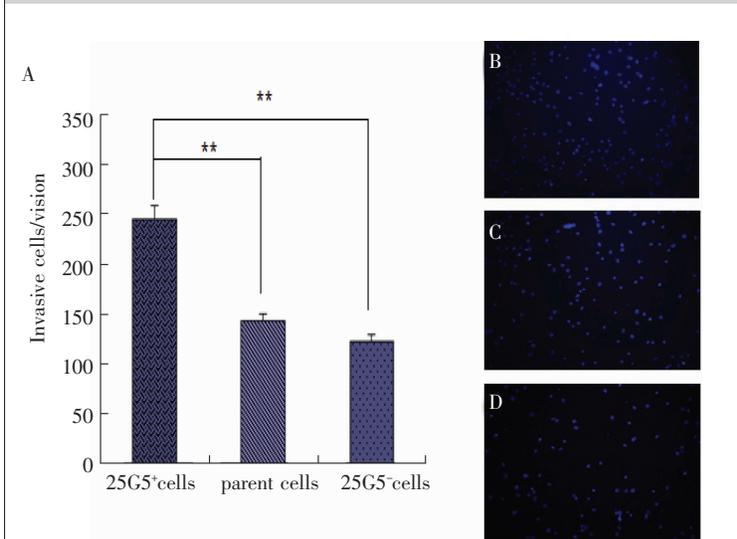
2.3.4 25G5 单抗识别的细胞具有高致瘤性特征

动物体内成瘤实验检测 25G5⁺细胞、亲本细胞和 25G5⁻细胞的致瘤性,我们将流式分选获得的 25G5⁺、25G5⁻及亲本细胞分别接种于 BALB/c 小鼠,结果显示,25G5⁺细胞体内致瘤性明显强于 25G5⁻细胞和亲本细胞,25G5⁺细胞 2×10³ 个细胞 2 周即可成瘤,25G5⁻细胞未成瘤,而亲本细胞 2×10⁴ 个细胞 6 周仍未成瘤,1×10⁵ 个细



Note :A: the spheres of 25G5⁺,parent and 25G5⁻(* $P<0.05$);B: 25G5⁺ cells(x400);C:parent cells(x400);D: 25G5⁻ cells(x400).

Figure 2 Self-renewal assay of 25G5⁺, parent and 25G5⁻ cells



Note:A: comparison of invasion capacity of 25G5⁺, parent cells and 25G5⁻ (** $P<0.01$);B: 25G5⁺ cells(x200);C:parent cells(x200);D: 25G5⁻ cells(x200).

Figure 3 Comparison of invasion capacity of 25G5⁺, parent cells and 25G5⁻

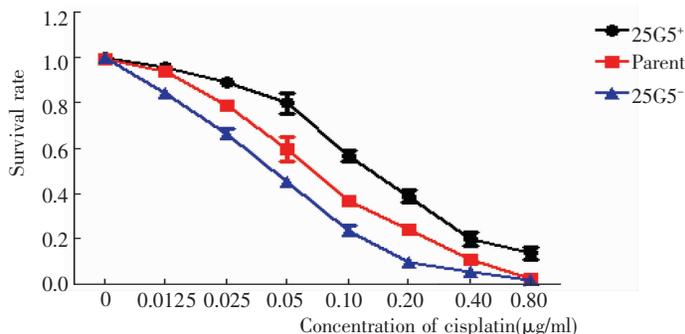


Figure 4 Comparison of the drug-resistance capacity of 25G5⁺, parent and 25G5⁻ cells

细胞 6 周仅有 3 只成瘤(Table 3),表明 25G5⁺细胞具有高致瘤性,具有肿瘤干细胞的特征。

2.4 单抗 25G5 体外功能的研究

2.4.1 单抗 25G5 对 SNU-5 细胞无血清成球生长的影响

采用无血清悬浮培养法培养 SNU-5 亲本细胞,同时加入不同浓度的 25G5 单抗,观察其对 SNU-5 亲本细胞成球生长的影响。结果显示单抗 25G5 处理组的成球数随抗体浓度升高而减少。单抗 25G5 能显著抑制 SNU-5 细胞的成球,抑制率达到 46.4% ($P < 0.05$) (Figure 5),提示单抗 25G5 能够抑制胃癌干细胞的自我更新。

2.4.2 单抗 25G5 对 SNU-5 sphere 细胞侵袭能力的影响

Transwell 小室法检测单抗 25G5 对 SNU-5 sphere 细胞侵袭能力的影响,结果显示 (Figure 6),经单抗 25G5 作用过的细胞随抗体浓度升高,侵袭穿过细胞数明显减少,表明单抗 25G5 对 SNU-5 细胞侵袭能力有明显抑制作用,抑制率最高可达 58.4%。单抗 25G5 是抑制胃癌干细胞的功能性抗体。

3 讨论

目前临床治疗胃癌的手段主要为手术、放疗、化疗,仅能抑制和杀灭肿瘤组织内的癌细胞,但对肿瘤干细胞无能为力,从而导致肿瘤复发、转移以及临床治疗的失败。胃癌最常用的化疗药物顺铂和氟尿嘧啶,能够缓解胃癌患者的症状但是仍不能明显延长患者的生存期。相对于传统的放化疗治疗方式,单克隆抗体的靶向治疗具有高亲和力,低毒副,可有效治疗转移、复发,不易产生耐药等相关优点。美国 FDA 批准上市的肿瘤靶向药物已经取得了非常显著的疗效,如靶向 CD20 的美罗华治疗 B 细胞淋巴瘤,靶向 HER-2 的赫塞汀治疗乳腺癌,靶向 VEGF 的贝伐单抗治疗转移性大肠癌以及非小细胞肺癌等^[7],即能特异靶向杀灭胃癌干细胞,有效地抑制肿瘤的转移、复发、耐药,降低和减少胃癌的复发和转移,改善患者的预后,为靶向胃癌干

Table 3 Tumorogenicity of 25G5⁺, parent cells and 25G5⁻

Tumorogenicity groups	Injected cells	Time after injection(week)					
		1	2	3	4	5	6
25G5 ⁺ cells	2×10 ³	0/5	0/5	1/5	2/5	2/5	2/5
	2×10 ⁴	0/5	0/5	2/5	3/5	3/5	3/5
	5×10 ⁴	0/5	1/5	3/5	5/5	5/5	5/5
Parent cells	2×10 ⁴	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	5×10 ⁴	0/5	0/5	1/5	2/5	2/5	2/5
	1×10 ⁵	0/5	1/5	3/5	3/5	3/5	3/5
25G5 ⁻ cells	2×10 ⁴	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	5×10 ⁴	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1×10 ⁵	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

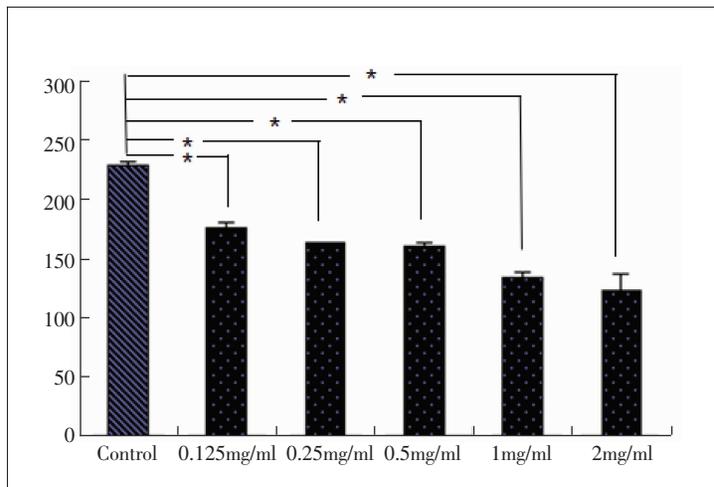


Figure 5 Sphere inhibitory of different concentrations of 25G5

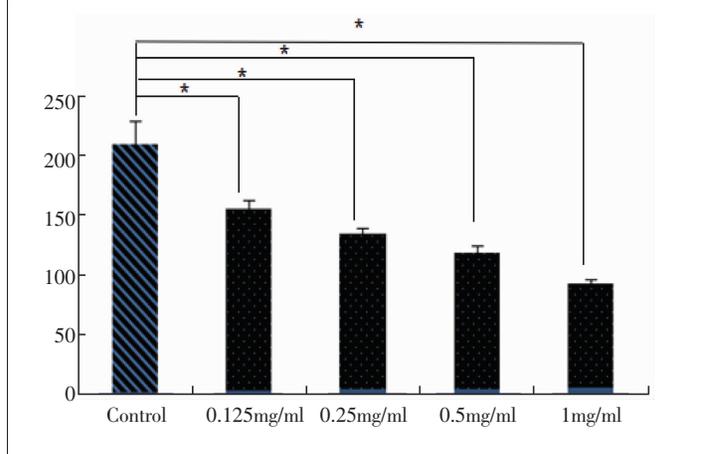


Figure 6 Invasion inhibitory of different concentrations of mAb

细胞治疗胃癌提供抗体候选药物和治疗方案。在临床应用已十分广泛,效果也十分令人鼓舞。但靶向肿瘤干细胞治疗肿瘤研究才刚刚起步,由于靶向肿瘤干细胞治疗方案有可能对目前临床上导致死亡的难治性转移、复发有巨大的应用潜力,因此其已成为目前肿瘤研究的新热点^[8]。

本室在前期研究中,已成功从人胃癌组织中分离、鉴定出胃癌干细胞,并采用无血清悬浮培养方法富集肿瘤干细胞,将其免疫 BALB/c 小鼠,成功建立了抗胃癌干细胞大容量的单抗库。本研究是在此基础上,通过细胞无血清成球抑制实验、细胞免疫荧光等实验,初步筛选获得 9 株特异性识别胃癌干细胞的单抗。本研究选择其中一株具有高特异性识别胃癌干细胞 CD44 与 CD90 的单抗 25G5,进行了深入的研究。

首先,我们将 SNU-5 细胞 PKH26 染色后进行无血清悬浮培养,发现球体细胞中仅有单个细胞着色,证明了 SNU-5 中存在肿瘤干细胞。根据已有文献报道,胃癌干细胞标志物为 CD44 和 CD90。因此我们又采用流式细胞术检测 SNU-5 亲本细胞和 sphere 细胞中 CD44 和 CD90 的表达情况,结果显示 sphere 细胞中 CD44⁺和 CD90⁺细胞比例分别为 72.4%和 8.55%,较亲本细胞分别提高了 21.3 倍和 2.4 倍,以上研究表明 SNU-5 中存在有胃癌干细胞,标志物为 CD44、CD90,因此我们选择 SNU-5 细胞中 CD44⁺、CD90⁺作为胃癌干细胞模型进行单克隆抗体的筛选鉴定研究。

为了进一步确定单抗 25G5 可识别胃癌干细胞,我们采用双色流式细胞术检测单抗 25G5 与干细胞标志物共染的情况,结果显示单抗 25G5 可与胃癌干细胞标志物 CD44、CD90 共染,且在 sphere 细胞中双染比例较亲本细胞双染比例分别提高了 31.4 倍和 2.9 倍。采用双色细胞免疫荧光也发现单抗 25G5 识别的抗原分子与 CD44、CD90 共定位于胃癌干细胞膜上。同时我们采用流式细胞术分选出 25G5⁺细胞进行体外功能实验,结果显示 25G5⁺胃癌细胞成球率明显高于 25G5⁻细胞 [(21.4±0.3)% vs (12.3±0.7)%],25G5⁺细胞的侵袭能力显著强于 25G5⁻细胞 [(244.5±13.5/视野) vs (122.4±7.2/视野)],且耐药性也明显较高 [IC₅₀ 值:0.285μmol/L vs 0.094μmol/L]。此外,确定肿瘤干细胞的金标准是动物体内的致瘤性。因此,我们还分选出 25G5⁺、25G5⁻及亲本细胞分别接种于 BALB/c 裸鼠观察致瘤性,结果显示 25G5⁺细胞体内致瘤能力明显强于 25G5⁻细胞和亲本细胞,其中 2×10³ 个细胞 2 周即可成瘤,25G5⁻细胞未成瘤,而亲本细胞 2×10⁴ 个细胞 6 周仍未成瘤,1×10⁵ 个细胞 6 周仅有 3 只成瘤,表明

25G5⁺细胞在亲本细胞致瘤性中起到极其重要的作用。以上研究表明单抗 25G5 识别的细胞具有肿瘤干细胞的特征。

为了研究单抗 25G5 的功能,我们将单抗 25G5 作用后的 SNU-5 Sphere 细胞进行体外功能实验,发现单抗 25G5 能显著抑制其成球和侵袭能力。单抗 25G5 能明显抑制 SNU-5 Sphere 细胞的生长,2mg/ml 时成球抑制率达到 46.4%。侵袭抑制实验中,1mg/ml 时侵袭抑制率达到 58.4%。上述结果提示我们单抗 25G5 是一株抗胃癌干细胞的功能性单抗。

综上所述,本研究发现 25G5⁺细胞具有高致瘤性,高无血清成球、侵袭、耐药能力,且单抗 25G5 能够识别 SNU-5 细胞中 CD44⁺、CD90⁺细胞亚群,能有效抑制胃癌细胞的自我更新和侵袭等体外功能,是一株候选的抗胃癌干细胞的功能性单克隆抗体。我们将进一步分离获得相应的功能性分子靶标,为筛选靶向胃癌干细胞的其他抗体药物奠定基础,以期作为靶向肿瘤干细胞的胃癌治疗提供更多的抗体靶向药物。

参考文献:

- [1] Bu Z, Ji J. A current view of gastric cancer in China[J]. TGC, 2013; 1-4.
- [2] Singh SR. Gastric cancer stem cells: a novel therapeutic target[J]. Cancer Lett, 2013, 338(1): 110-119.
- [3] Stojnev S, Krstic M, Ristic-Petrovic A, et al. Gastric cancer stem cells: therapeutic targets [J]. Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association, 2013, 16(11): 789.
- [4] Han ME, Oh SO. Gastric stem cells and gastric cancer stem cells[J]. Anat Cell Biol, 2013, 46(1): 8-18.
- [5] Zheng S, Xin L, Liang A, et al. Cancer stem cell hypothesis: a brief summary and two proposals[J]. Cytotechnology, 2013, 65(4): 505-512.
- [6] Sherley JL. New cancer diagnostics and therapeutics from a ninth 'hallmark of cancer': symmetric self-renewal by mutated distributed stem cells [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2013, 13(8): 797-810.
- [7] Naujokata C, Lauferc S. Targeting cancer stem cells with defined compounds and drugs[J]. J Cancer Res, 2013, 2(1): 37.
- [8] Kulig J, Kołodziejczyk P, Kulig P, et al. Targeted therapy for gastric cancer—current status[J]. J Oncol Pharm Pract, 2013, 19(1): 75-81.