

CD44 作为筛选下咽癌肿瘤干细胞 分子标志物的价值

沈晨凌,向明亮,聂 琛,胡海霞,马 衍,吴 皓

(上海交通大学医学院附属新华医院 耳鼻咽喉头颈外科,上海交通大学医学院耳科学研究所,上海 200092)

摘 要: **目的** 探讨 CD44 作为筛选下咽癌肿瘤干细胞分子标记物的价值。**方法** 应用流式细胞仪检测下咽癌 FADU 细胞系中 CD44 的表达;采用免疫磁珠分选技术(MACS)分选 CD44+ 细胞,并用流式细胞仪检测其纯度;运用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测 CD44+、CD44-细胞的体外增殖能力,将相同数量级(1×10^6 、 1×10^5)的 CD44+、CD44-细胞分别注射于雄性非肥胖糖尿病型/重症联合免疫缺陷(non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency, NOD/SCID)小鼠皮下,观察其体内致瘤能力的差异。**结果** 下咽癌 FADU 细胞系中 CD44+ 细胞占 $(21.1 \pm 1.56)\%$,免疫磁珠分选后的 CD44+ 细胞纯度达 $(99.4 \pm 0.29)\%$ 。体外增殖能力研究显示 CD44+ 细胞增殖速度明显快于 CD44-细胞。NOD/SCID 鼠体内致瘤实验结果显示: 1×10^5 CD44+ 细胞致瘤率为 $12.5\% (1/8)$, 1×10^5 CD44-细胞致瘤率为 $0 (0/8)$; 1×10^6 CD44+ 细胞致瘤率为 $100\% (8/8)$, 1×10^6 CD44-细胞致瘤率为 $50\% (4/8)$;相同数量级的 CD44+ 与 CD44-两组细胞致瘤率差异具有统计学意义($P < 0.05$)。此外,CD44+ 细胞组比 CD44-细胞组更早成瘤,潜伏期明显缩短。CD44+ 细胞组所致肿瘤体积平均为 $(2017.81 \pm 538.50) \text{mm}^3$,而 CD44-细胞组所致肿瘤体积平均为 $(1153.25 \pm 503.18) \text{mm}^3$,两组差异具有统计学意义($t = 2.67, P < 0.05$)。**结论** 下咽癌肿瘤中 CD44+ 细胞比 CD44-细胞具有更强的体外增殖能力和体内致瘤能力,提示肿瘤干细胞可能存在于 CD44+ 肿瘤细胞内,CD44 可作为筛选下咽癌肿瘤干细胞的一个重要分子标记物。

关 键 词: 肿瘤干细胞;分子标记物;CD44;下咽癌
中图分类号: R34;R739.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2013)05-0388-06

CD44 as a molecular marker to screen tumor stem cells in hypopharyngeal carcinoma

SHEN Chen-ling, XIANG Ming-liang, NIE Chen, et al.

(Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, the Ear Institute, the Affiliated Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China)

Abstract: **Objective** To study the significance of CD44 as a molecular marker for screening tumor stem cells in hypopharyngeal carcinoma. **Methods** The CD44 expression levels in the hypopharyngeal carcinoma cell line FaDu were analyzed using flow cytometry. The CD44+ and CD44-cell populations were sorted by using magnetic-associated cell sorting (MACS) technology. After separation, the purity of the CD44+ cells was detected using flow cytometry. The MTT method was used to detect the different proliferation capability of the CD44+ and CD44-cells in vitro. The tumorigenicity of the CD44+ and CD44-cells was determined by injecting CD44+ or CD44-cells (1×10^6 and 1×10^5) into the body of NOD/SCID mice. **Results** CD44 expressed in $(21.1 \pm 1.56)\%$ of the FaDu cells. The CD44+ population was efficiently sorted by MACS with the purity of $(99.4 \pm 0.29)\%$. The MTT assay indicated that the sorted CD44+ cells had a stronger proliferative capacity than the CD44-cells. The tumorigenicity study showed

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81271088);上海市自然科学基金资助项目(11ZR1423600)
作者简介:沈晨凌,女,硕士研究生。
通讯作者:向明亮,Email: xiangming_liang@yahoo.com.cn

that all the mice injected with 1×10^6 CD44+ cells developed tumors (8/8), half of the mice injected with 1×10^6 CD44-cells developed tumors (4/8), 1 of the 8 mice injected with 1×10^5 CD44+ cells developed tumors (12.5%), but none of the mice injected with 1×10^5 CD44-cells developed any tumors (0/8). At the same concentration, the difference in tumorigenic rates between the CD44+ and CD44-groups was statistically significant (Fisher's exact test, $P < 0.05$). In addition, the CD44+ group had a shorter incubation period than the CD44-group. Furthermore, the average tumor volume of the CD44+ group was (2017.81 ± 538.50) mm³, while that of the CD44-group was (1153.25 ± 503.18) mm³, and the difference was statistically significant ($t = 2.67$, $P < 0.05$). **Conclusions** The CD44+ cells have stronger proliferative capacity and higher tumorigenic potential than the CD44-cells, which suggests that the tumor stem cells of hypopharyngeal carcinoma may exist in the CD44+ tumor cell population. Therefore, CD44 maybe an important biological marker for screening of tumor stem cells in hypopharyngeal carcinoma.

Key words: Tumor stem cell; Molecular marker; CD44; Hypopharyngeal carcinoma

下咽癌是预后最差的头颈部恶性肿瘤之一,其发生发展机制尚未阐明。肿瘤干细胞是近年来提出的有关肿瘤发生发展的一种新理论:肿瘤组织中存在具有干细胞样作用的肿瘤细胞,它们是一群数量较少但具有无限自我更新潜能并能促使肿瘤形成的细胞,在肿瘤的生长中起着决定性作用。目前已从脑肿瘤、白血病、乳腺癌、喉癌、肺癌等多种肿瘤组织中提取到了肿瘤干细胞,并进行了相关细胞学及分子生物学研究^[1-9]。从当前的研究结果来看,不同的肿瘤中,尽管其肿瘤干细胞生物学特性有共同点,如无限自我更新潜能、分化能力等,但肿瘤干细胞表面标志物不尽相同,这提示实验中需要对不同的肿瘤进行相应研究,以寻找其肿瘤干细胞的特异性标志物。本研究拟通过检测 CD44 在下咽癌 FADU 细胞系中的表达及相关功能研究,探讨 CD44 作为筛选下咽癌肿瘤干细胞分子标记物的价值。

1 材料与方法

1.1 下咽癌 FADU 细胞系培养

将下咽癌 FADU 细胞(来源于 American Type Culture Collection,由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所提供)培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基(Gibco, USA)中,在 CO₂ 恒温细胞培养箱(Thermo, USA)中于 5% CO₂、37℃ 条件下进行培养,细胞传代和收集均采用 0.25% 胰蛋白酶(Gibco, USA)消化。

1.2 下咽癌 FADU 细胞中 CD44 的表达检测

以未分选对数期下咽癌 FADU 细胞为研究

对象,取细胞培养瓶,吸除上清, PBS 洗 2 遍,去除未贴壁细胞,移除 PBS 后加入 1 ml 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min,再用 1 ml 含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基中止消化并吹打成单细胞悬液,1000 r/min 离心 5 min,取 1×10^6 个未分选细胞重悬于 90 μl PBS 缓冲液中,加入 10 μl CD44-PE 荧光标记的抗体(Miltenyi Biotec, Germany),4℃ 暗处孵育 25 min, PBS 洗涤 2 遍后采用流式细胞仪(BD Company, USA)进行检测。同时设立空白对照组。

1.3 CD44+ 细胞与 CD44-细胞分选

采用免疫磁珠分选(Magnetic Cell Sorting, MACS)方法分选细胞。收集对数生长期的 FADU 细胞 1×10^8 个,离心后重悬于 800 μl 磁分选缓冲液(PBS, pH 7.2, 0.5% BSA 和 2 mmol/L EDTA; Miltenyi Biotec, Germany)。单细胞悬液与 200 μl CD44 MicroBeads(Miltenyi Biotec, Germany)避光 4℃ 孵育 30 min,用磁分选缓冲液洗涤离心,重悬于 500 μl 缓冲液。架设分选架,将磁分选 LS 柱(Miltenyi Biotec, Germany)放入磁分选器(Miltenyi Biotec, Germany)中,加入 3 ml 缓冲液润柱,再将 500 μl 单细胞悬液洗柱,流出的为 CD44-细胞。随后用 3 ml 缓冲液冲洗 LS 柱 3 次,再将分选柱移出至磁场外,加入 5 ml 磁分选缓冲液,用 LS 柱内针芯加压将分选的阳性细胞用力冲出,此时获得的细胞即为 CD44+ 细胞。

1.4 CD44+ 细胞纯度检测

取 MACS 分选后的 CD44+ 细胞 1×10^6 个重悬于 90 μl 缓冲液中,加入 10 μl CD44-PE 荧光标记抗体,4℃ 暗处孵育 25 min, PBS 洗涤 2 遍后用流式细胞仪测定。同时设立空白对照

组。

1.5 CD44 + 细胞与 CD44-细胞体外增殖能力的研究

将CD44 + 和 CD44-细胞按 5×10^3 个/孔接种于 4 块 96 孔板,每 7 板每种细胞设 6 个复孔,同时以不加细胞的培养基调零。置于培养箱内分别培养 1,3,5,7 d,结束前 4 h 每孔加入四甲基偶氮唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT] (Sigma, USA) 20 μ l,继续培养 4 h,滤去上清,加入 150 μ l DMSO (Sigma, USA),振荡溶解蓝紫色结晶 10 min,全自动荧光酶标仪在 490 nm 波长下测定吸光度值,取均值绘制生长曲线。

1.6 NOD/SCID 小鼠体内致瘤性比较

将 32 只 6 周龄、体重 20 ~ 25 g 的雄性非肥胖糖尿病型/重症联合免疫缺陷 (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency, NOD/SCID) 小鼠(由中国科学院上海生命科学研究院斯莱克实验动物中心提供)按数字法随机分为 4 组,每组 8 只。将 MACS 分选出的CD44 + 和 CD44-细胞分别以 1×10^6 , 1×10^5 数量级(悬浮于 0.2 ml PBS 中)注射到 4 组小鼠的右上腋窝皮下(图 1A)。所有实验动物均饲养于 SPF 级层流室中,每周触诊观察注射部位 2 次,记录成瘤情况。7 周后处死小鼠,摘除瘤体(图 1B),测量其长轴(a)、短轴(b),根据公式 $V = ab^2/2$ 计算肿瘤体积(图 1C)。所有肿瘤均行组织病理学检查,由高年制病理科医师观察诊断。

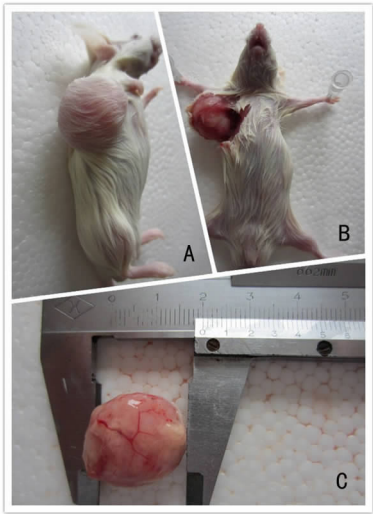


图 1 7 周后小鼠瘤体情况 A:成瘤部位;B:解剖瘤体;C:测量瘤体体积的方法

1.7 统计学分析

数据采用 SAS 9.13 软件进行统计学分析,符合正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,瘤体体积比较采用两独立样本成组 *t* 检验,两组细胞致瘤率比较采用 Fisher 精确概率算法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 下咽癌 FADU 细胞系 CD44 的表达情况

利用流式细胞技术检测单细胞悬液 FADU 细胞 CD44 的表达率,在未分选 FADU 细胞中 CD44 + 细胞比例为 $(21.1 \pm 1.56)\%$ (图 2A)。MACS 分选后,CD44 + 细胞的分选纯度高达 $(99.4 \pm 0.29)\%$ (图 2B),结果说明应用免疫磁珠分选技术可以高效、高纯度地将 CD44 + 和 CD44-细胞予以分离。

2.2 CD44 + 和 CD44-细胞的体外增殖能力

将CD44 + 和 CD44-细胞以相同的浓度种植到 96 孔板培养,分别于培养后 1,3,5,7 d 测定其 MTT 值并绘制细胞生长曲线。FADU 细胞系中 CD44 + 和 CD44-细胞的生长曲线形状明显不同,CD44 + 细胞增殖速度较 CD44-细胞明显为快(图 3),表明它们拥有不同的体外增殖能力。

2.3 CD44 + 和 CD44-细胞的体内致瘤性

将 NOD/SCID 小鼠分别接种相同数量级(1×10^5 、 1×10^6)的 CD44 + 和 CD44-细胞后,共监测 7 W,各组小鼠成瘤情况见表 1 及图 4,相同数量级的 CD44 + 与 CD44-两组细胞致瘤率采用 Fisher 精确概率法,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。从表中可看出,CD44 + 细胞组比 CD44-细胞组更早成瘤,潜伏期明显缩短。此外,CD44 + 细胞组所致肿瘤体积平均为 $(2017.81 \pm 538.50) \text{ mm}^3$,而 CD44-细胞组所致肿瘤体积平均为 $(1153.25 \pm 503.18) \text{ mm}^3$,两者比较差异具有统计学意义 ($t = 2.67, P < 0.05$) (表 2)。结果显示,在相同条件下,CD44 + 细胞比 CD44-细胞具备更强的体内致瘤能力,提示前者具备肿瘤干细胞的某些特性。组织病理学检验结果:所有肿瘤均为低分化鳞癌(图 5)。

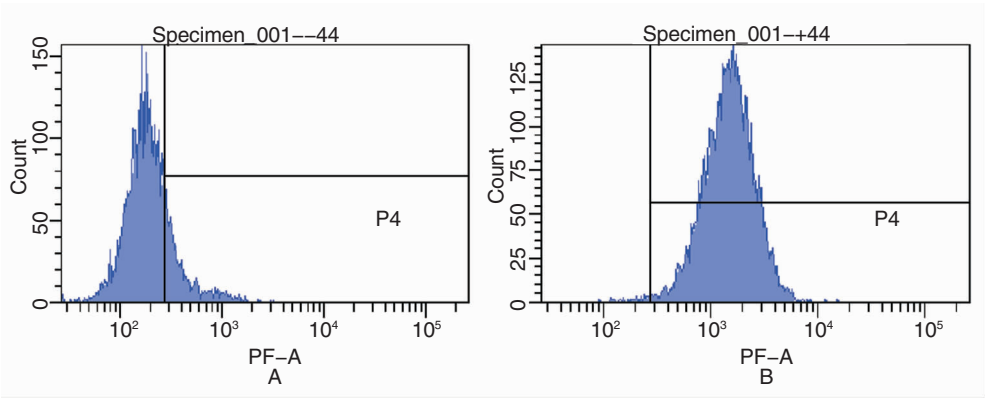


图 2 流式细胞技术检测单细胞悬液 FADU 细胞 CD44 的表达率 A:未分选 FADU 细胞中CD44 + 细胞比例为 (21.1 ± 1.56) % ;B:MACS 分选后CD44 + 细胞的分选纯度为 (99.4 ± 0.29) %

表 1 4 组CD44 + 和 CD44 细胞的成瘤能力比较			
组别	注射细胞数/只	成瘤数/有效接种数	致瘤率(%)
CD44 +			
1 × 10 ⁶	8	8/8	100
1 × 10 ⁵	8	1/8	12.5
CD44-			
1 × 10 ⁶	8	4/8	50
1 × 10 ⁵	8	0/8	0

表 2 各组CD44 + 和 CD44-细胞成瘤体积比较				
组别	长轴(a) (mm)	短轴(b) (mm)	肿瘤体积 V = ab ² /2 (mm ³)	平均肿瘤 体积(mm ³)
CD44 +	20	16	2560.0	2017.81 ± 538.50
1 × 10 ⁶	19	17	2745.5	
	16	14	1568.0	
	16	14	1568.0	
	18	15	2025.0	
	20	16	2560.0	
CD44 +	18	14	1764.0	1764.0
1 × 10 ⁵	18	14	1764.0	
CD44-	18	14	1764.0	
1 × 10 ⁶	14	11	847.0	
	16	13	1352.0	
	13	10	650.0	

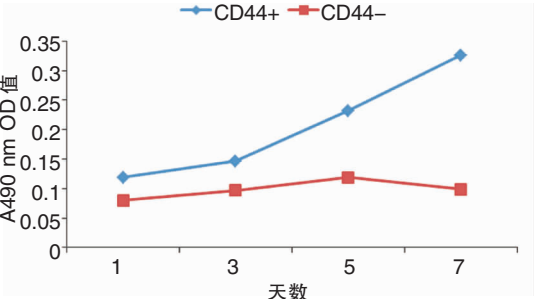


图 3 CD44 + 、CD44-细胞的体外增殖曲线

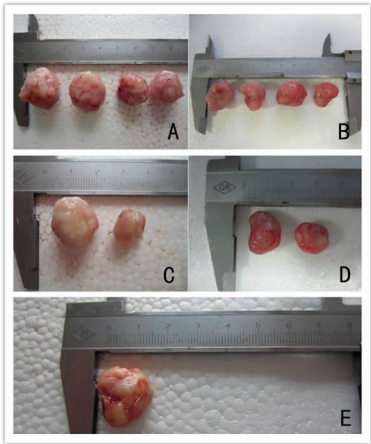


图 4 CA44 + 、CD44-细胞的体内致癌性 A、B:CD44 + 细胞组(1 × 10⁶) 成瘤情况;C、D:CD44-细胞组(1 × 10⁶) 成瘤情况;E:CD44 + 细胞组(1 × 10⁵) 成瘤情况

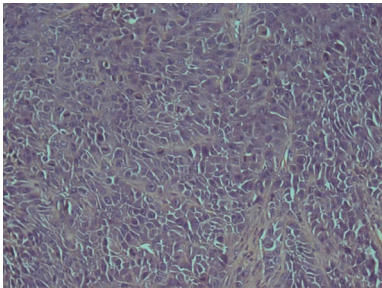


图 5 组织病理学结果示低分化鳞癌(HE × 200)

3 讨论

CD44 是由单一基因编码的具有高度异质性的单链细胞膜表面糖蛋白,通过介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的黏附作用而发挥其生物学功能^[10]。根据其所含外显子类型的不同分为标准型 CD44 (CD44s) 和变异型

CD44 (CD44v), 前者在间质和造血源性细胞中表达, 后者则在上皮细胞中表达。相关研究表明, CD44 的过表达与恶性肿瘤的浸润、转移、临床分期和耐药等有关^[11], 是提示肿瘤进展的一个重要标记。近年来的研究显示, CD44 可能为乳腺癌^[12]、结肠癌^[13-14]、前列腺癌^[15]、胃癌^[16]等恶性肿瘤组织肿瘤干细胞的重要分子标记物。

肿瘤干细胞的分选和鉴定对研究肿瘤的发生发展机制以及临床治疗研究至关重要。目前主要从肿瘤干细胞生物学功能特点和其表面特异性标志物两方面来进行鉴定和筛选。最常用的筛选方法为利用肿瘤细胞表面特异性标志物, 技术手段主要借助流式细胞术和磁珠分选法。流式细胞技术成本低, 但对分选的细胞活性影响相对较大。免疫磁珠分选技术虽然成本较高, 但最大的优点为对细胞损伤小。本研究采用免疫磁珠分选技术分选 FADU 细胞系 CD44+ 细胞和 CD44- 细胞, 取其对细胞损伤小的优势, 以利后续细胞培养和在体实验, 其分选纯度高达 $(99.4 \pm 0.29)\%$, 为下咽癌 CD44+ 细胞后续研究的稳定性和可靠性提供了基本保障。

有关 CD44 与下咽癌肿瘤干细胞关系的研究目前未见文献报道。但已有研究显示, CD44 可能为某些头颈部鳞状细胞癌的肿瘤干细胞标记物之一。王莹颖等^[17]在喉癌、口腔癌等头颈部鳞状细胞癌中发现 CD44 阳性细胞有可能是肿瘤干细胞, Prince 等^[18]将某些头颈部鳞状细胞癌组织解离后采用流式细胞仪分离出 CD44+ 和 CD44- 细胞群, 再将荧光激活细胞分类纯化的 CD44+ Lin+ 细胞和 CD44- Lin- 细胞以不同剂量分别接种植于小鼠体内, 发现在同一剂量水平下, CD44+ Lin+ 细胞的致瘤效率明显高于 CD44- Lin- 细胞, 故认为 CD44+ 细胞可能为某些头颈部鳞癌的干细胞。本研究以经典的下咽癌 FADU 细胞系为研究对象, 采用流式细胞检测等方法, 发现下咽癌 FADU 细胞系中有肿瘤细胞表达 CD44; 离体实验显示, 免疫磁珠分选后的 CD44+ 和 CD44- 细胞, 其生长繁殖能力有明显差异, CD44+ 细胞增殖速度较 CD44- 细胞显著为快; 将 CD44+ 和 CD44- 细胞分别注射于 NOD/SCID 小鼠进行致瘤在体实验, 发现 CD44+ 细胞致瘤能力明显强于 CD44- 细胞。本

研究结果提示, CD44+ 细胞具有肿瘤干细胞的某些特性, CD44 可作为筛选下咽癌肿瘤干细胞的一个重要生物标记。

本研究采用流式细胞学技术检测发现, 下咽癌 FADU 细胞中 CD44+ 细胞的表达率为 $(21.1 \pm 1.56)\%$, 与肿瘤干细胞在数量上只占肿瘤细胞小部分的肿瘤干细胞理论不符, 但这并非否定 CD44+ 作为下咽癌肿瘤干细胞的分子标记。我们认为下咽癌中 CD44+ 细胞之所以较高, 原因可能有: ①下咽癌是一种进展快、转移高的恶性肿瘤, 其肿瘤组织中所含的肿瘤干细胞也许本身就高; ②本研究所采用的 FADU 细胞系是一种低分化的下咽癌细胞系, 具有高成瘤、高转移的特性, 其肿瘤干细胞含量很可能较其他肿瘤细胞系为高; ③下咽癌肿瘤干细胞所含的分子标记物很可能有多个, CD44+ 并非其独特而唯一的分子生物标志, 某些非肿瘤干细胞亦很可能表达 CD44。从只需 $20 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$ 个 CD44+ 细胞即可于 SCID 鼠腹部皮下和胃浆膜下形成胃癌移植瘤^[14], 而本研究需 1×10^6 个 CD44+ 细胞方能在 NOD/SCID 小鼠皮下 100% (8/8) 致瘤, 1×10^5 个 CD44+ 细胞致瘤率仅 12.5% (1/8) 来看, 最后一种可能性较大。虽然 CD44+ 作为下咽癌肿瘤干细胞分子标志物的特异性究竟如何有待进一步的深入研究去验证, 但从本研究离体和在体实验均显示 CD44+ 细胞的致瘤性明显强于 CD44- 细胞来考虑, 我们推测, 肿瘤干细胞可能存在于 CD44+ 肿瘤细胞内, CD44 作为筛选下咽癌肿瘤干细胞的分子标记物具有较重要的理论价值。

参考文献:

- [1] Hirose H, Yamamoto H, Miyoshi N, et al. Cancer stem cells in solid tumors [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2010, 37(13): 2809-2812.
- [2] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [3] Barreyro L, Will B, Bartholdy B, et al. Overexpression of IL-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in AML and MDS [J]. *Blood*, 2012, 120(6): 1290-1298.
- [4] La Porta CA. Thoughts about cancer stem cells in solid

(下转第 398 页)