

头颈部肿瘤干细胞的表面标志物及其分选

徐晓蓉¹ 贾俊^{1,2}综述 张文峰²审校

(1.口腔基础医学省部共建国家重点实验室培育基地和口腔生物医学教育部重点实验室, 武汉大学口腔医学院; 2.武汉大学口腔医院口腔颌面外科 武汉 430079)

[摘要] 越来越多的研究显示,头颈部肿瘤干细胞很可能是头颈部肿瘤形成、复发、转移和耐药的根源。本文就头颈部肿瘤干细胞表面特异分子标志物,头颈部肿瘤干细胞的分选等研究进展作一综述。

[关键词] 肿瘤干细胞; 表面标志物; 体外培养分选术; 荧光激活细胞分选术; 磁激活细胞分选术; 侧群细胞分选术

[中图分类号] Q 51 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.05.013

Head and neck cancer stem cells' surface markers and their sorting Xu Xiaorong¹, Jia Jun^{1,2}, Zhang Wen-feng². [1. The State Key Laboratory Breeding Base of Basic Science of Stomatology(Hubei-MOST) & Key Laboratory of Oral Biomedicine Ministry of Education, School and Hospital of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China]

[Abstract] Increasing data showed head and neck cancer stem cells were responsible for head and neck cancer on carcinogenesis, relapse, metastasis and drug resistance. The purpose of this review is to provide a summary on research progress of specific surface stem cell markers in head and neck cancer stem cells and their sorting.

[Key words] cancer stem cell; surface marker; *in vitro* separation method; fluorescence activated cell sorting; magnetic activated cell sorting; side population cell sorting

头颈部肿瘤通常分为良性肿瘤和恶性肿瘤,恶性肿瘤中以鳞状细胞癌最为常见。头颈部鳞状细胞癌占全身恶性肿瘤的第六位,每年的患病人数为 64.4 万,其中有 20 万左右的患者死亡,近 30 多年来其 5 年生存率并无明显的提高^[1-2];因此,研究头颈部肿瘤形成的机制,对临床治疗头颈部肿瘤极其重要。在头颈部肿瘤细胞中,一个较小比例的细胞亚群具有自我更新、分化成不同成熟状态的肿瘤细胞的能力,而且在肿瘤的发生、发展和侵袭转移中起着关键性的作用,这个亚群的肿瘤细胞被称为肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)或者肿瘤激发细胞^[3-12]。

1 头颈部 CSC 的表面特异性标志物

CSC 分选鉴定的关键是寻找到特异性的表面标志物^[13]。目前认为能够表达标志物的肿瘤细胞是分

化程度较低,比例较小的一个细胞亚群(<1%)^[14]。

1.1 CD133

CD133 分子是一种跨膜蛋白,定位于细胞膜和细胞质,在各种组织的干细胞或者起始细胞中通常都有表达^[15-16],具有自我更新、分化为成熟细胞的能力^[17]。CD133 的一个最为显著特点就是:CD133 的表达随着细胞的分化迅速下调,使其成为一个独特的分离和鉴定干细胞的分子标志物。CD133 在白血病干细胞、脑 CSC、大肠 CSC、前列腺 CSC 和肝 CSC 等多种实体 CSC 中均有表达,即 CD133 可能是一种较为常见的 CSC 标志物,在 CSC 的分选和鉴定中具有一定的参考价值。

以磁激活细胞分选术(magnetic activated cell sorting, MACS)从喉癌 Hep-2 细胞系和人舌鳞癌 Tca8113 细胞系分离纯化的 CD133⁺肿瘤细胞,有较其他细胞亚群更强的体外分化、增殖和致瘤能力^[18-19]。Wei 等^[20]以 MACS 和荧光激活细胞分选术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)从喉癌 Hep-2 细胞系分离纯化出 CD133⁺肿瘤细胞,进一步证实了以上结论,表明 CD133 是喉癌 CSC 的标

[收稿日期] 2011-10-22; [修回日期] 2012-05-03

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30973329)

[作者简介] 徐晓蓉(1984—),女,湖北人,硕士

[通讯作者] 张文峰, Tel: 13986141217

志物之一。Zhang 等^[11]用 FACS 和 MACS 从口腔鳞状细胞癌的细胞系和组织中鉴定出 CD133⁺ CSC, 这是一个比例较小的亚群(1%~2%)。这些 CD133⁺ CSC 具有 CSC 的特性, 包括 CSC 标志物的高表达和较 CD133⁻细胞强的增殖性、侵袭性和体外致瘤性。同时, 这些细胞还具有较强的化疗耐药性。以上证据表明, CD133⁺肿瘤细胞亚群可能是控制头颈部鳞状细胞癌发生和复发的 CSC。

1.2 CD44

CD44 与肿瘤的发生、发展、转移和预后的关系近年来备受业界关注^[21], 但是其研究尚处于早期阶段。

Pries 等^[22]在运用 FACS 检测人头颈部鳞状细胞癌组织和人头颈部鳞状细胞癌永生细胞株中 CD44 的表达情况时发现: 在肿瘤组织中, CD44 的表达水平个体差异较大; 而所有的人头颈部鳞状细胞癌永生细胞株均可以表达 CD44。他们认为, CD44⁺ CSC 可能在人头颈部鳞状细胞癌永生细胞株建立上起主导作用, 有极强地促进人头颈部鳞状细胞癌进展和转移的潜能。Prince 等^[23]将人头颈部鳞状细胞癌组织解离后, 以 FACS 分离出 CD44⁺和 CD44⁻细胞群, 再将纯化的 CD44⁺ Lin⁺细胞和 CD44⁻ Lin⁻细胞以不同的数量分别种植于小鼠体内, CD44⁺ Lin⁺细胞的致瘤率明显高于 CD44⁻ Lin⁻细胞。Prince 等^[24]运用 FACS 从头颈部鳞状细胞癌中分离出具有高度致瘤性的 CD44⁺肿瘤细胞亚群, 将 CD44⁺和 CD44⁻肿瘤细胞分别注入裸鼠体内, 结果只有 CD44⁺肿瘤细胞才能激发裸鼠形成新的肿瘤; 因此他们认为, CD44⁺细胞为头颈部鳞状细胞癌干细胞。

1.3 醛脱氢酶

醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)是一组由乙醛氧化而成的乙酸同工酶, 可保护细胞免受醛过氧化物的损害。其中, ALDH1 有活性时可对化疗药物产生耐药性, 而且可作为标志物来分选骨髓干细胞和脐血干细胞^[3]。Visus 等^[25]发现: ALDH1 既可以作为区分头颈部鳞状细胞癌前病变细胞的标志物, 也可以作为重要的表位疫苗来治疗头颈部鳞状细胞癌; 用体外培养分选术得到的 ALDH1⁺细胞具有非常高的自我更新能力、致瘤性和抗辐射性, 将 3 000~5 000 个头颈部鳞状细胞癌 ALDH1⁺细胞注入裸鼠体内, 可以形成头颈部鳞状细胞癌, 但将 10 000 个 ALDH1⁻细胞注入裸鼠体内却不能在裸鼠体内成瘤。Clay 等^[26]发

现, 以 FACS 从头颈部鳞状细胞癌中分离纯化出来的 ALDH 细胞具有高度的致瘤性。高致瘤性的 ALDH 细胞可在动物模型体内成瘤, 而且新形成的肿瘤与原来肿瘤的表型异质性相似, 即高致瘤性的 ALDH 细胞具有干细胞特性。

Chen 等^[3]赞成以 ALDH 作为头颈部鳞状细胞癌细胞表面特异性标志物来分选干细胞。

Seigel 等^[27]在以干细胞表面标志物分析人与鼠的视网膜母细胞瘤中具有 CSC 特征的细胞亚群时发现, 少量的视网膜母细胞瘤细胞(<1%)可表达干细胞的表面标志物腺苷三磷酸结合区转运蛋白 G 超家族成员 2(adenosine triphosphate binding cassette superfamily G member-2 of transport protein, ABCG2)、ALDH1、微小染色体维持标志物(mini-chromosome maintenance marker 2, MCM2)、干细胞抗原 1 和 P63, 这些细胞表现出干细胞样特性, 尤其是 ABCG2 细胞⁺不仅排斥烟酸己可碱(Hoechst)染色, 而且对 20 多种化疗药物表现出耐药性。Wang 等^[28]认为, 硫酸软骨素蛋白多糖 4 也可作为头颈部鳞状细胞癌干细胞的表面标志物。

2 头颈部 CSC 的分选

目前, 大多数学者采用肿瘤细胞体外培养分选、免疫学分选和功能学分选等方法分选 CSC, 其中最为常用和有效的是免疫学分选术。

2.1 体外培养分选术

体外培养分选术是将肿瘤标本通过机械和酶消化将其分散, 将得到的肿瘤细胞群用含有表皮生长因子和成纤维细胞生长因子的无血清培养基培养, 以观察细胞能否悬浮生长、生长速度、增殖能力和细胞球形成情况。结果显示, 大部分的肿瘤细胞不能耐受无血清培养, 只有少数未分化的以指数形式增长且形成漂浮的肿瘤细胞球富集 CSC。

Fang 等^[29]将转移的恶性黑色素瘤组织经酶消化后进行体外培养, 所得到的无黏着力的球状细胞具有自我更新的特征, 可以分化成黑色素细胞。小鼠移植瘤试验显示, 这些球状细胞有较强的致瘤性。在恶性黑色素瘤细胞系中也能发现相似的多能球状细胞, 这种具有多功能干细胞性质的细胞大多为 CD20⁺细胞。

2.2 免疫学分选术

免疫学分选术主要包括 FACS 和 MACS。在头颈部鳞状细胞中, 通过免疫学分选术可以分离

纯化出具有干细胞特性的 CD44⁺肿瘤细胞亚群^[11]。FACS 利用待分选细胞结合荧光素标志抗体能力的差异或者外排荧光染料性质的差异来分离 CSC，有无荧光标志物的细胞引发的光电信号不同，故带上的电荷也不同。

MACS 是基于细胞表面抗原可与连接有磁珠的特异性单抗结合，在外加磁场中，通过抗体与磁珠相连的细胞被吸附而滞留在磁场中，无该种表面抗原的细胞不能与特异性单抗结合，故不能被磁珠捕获，因而没有磁性，不在磁场中停留，从而细胞得以分离。

2.3 功能学分选

功能学分选是根据 CSC 较其他肿瘤细胞具有荧光染料烟酸己可碱 33342 排出优势的特点，利用流式细胞术和分子标志物 Burpl/ABCG2 把具有干细胞特性的细胞亚群分离纯化出来的方法。所分选出的干细胞通常称为侧群(side population, SP)细胞。功能学分选由此亦可称为烟酸己可碱 33342 染料法和 SP 细胞分选法，这有利于分离纯化未知表面标志物的CSC^[30]。

Zhang 等^[31]从口腔鳞状细胞癌中分离出来的 SP 细胞具有更高的集落形成能力，低表达细胞角蛋白(cytokeratin, CK)13，高表达 CK19，而且高表达 B 细胞特异的莫洛尼小鼠白血病病毒着丝区 1 蛋白和八聚体 4 等干细胞标志物。在体外培养观察中，1×10⁴ 个 SP 细胞就能使裸鼠形成与原发肿瘤表型相同的肿瘤，而 1×10⁶ 个非 SP 细胞却不能形成肿瘤。SP 细胞还可以新生出一些 SP 细胞和非 SP 细胞的亚群细胞，但是非 SP 细胞却不能生成 SP 细胞。上述研究皆表明，从口腔鳞状细胞癌中分离出来的 SP 细胞具有干细胞的特性和表型。

Wang 等^[32]从 5 种鼻咽癌细胞系中检测到 SP 细胞的存在，其中从 CNE2 鼻咽癌细胞系中分离出的 SP 细胞表现出干细胞特性，将其注入非肥胖糖尿病重症联合免疫缺陷小鼠具有强致瘤性，而且免疫荧光检测到该 SP 细胞高度表达 CK19，故推测 CK19 可作为鼻咽癌干细胞分离的一个表面标志物。这些试验提示，可用 SP 细胞分选术寻找潜在的表面标志物用于 CSC 的表型分离。

3 结语

CSC 理论的提出是肿瘤研究中的重大突破，

研究者们对肿瘤的发生发展过程有了一个新的认识，也为肿瘤发病机制的研究提供了新的思路。目前，已经从多种肿瘤组织中分离鉴定出了 CSC，对 CSC 生物学特性和耐药机制的研究也有助于肿瘤诊断、治疗方法的改进和创新；但由于对 CSC 特异性标志物的了解还不成熟、分离鉴定方法还不完善，所以对 CSC 的研究还存在着一些问题。例如，SP 细胞是否具有干细胞特性就颇具争议性。Burkert 等^[33]认为，SP 细胞也不能完全体现干细胞的特性。Harper 等^[34]从头颈部鳞状细胞癌细胞系中分离纯化出比例非常小的 SP 细胞亚群，但并不能确定这些细胞和非 SP 细胞是否具有干细胞特性；因为在生长方面，SP 细胞和非 SP 细胞没有显著差别，在增殖速率方面也几乎一样。

4 参考文献

- [1] Chen ZG. The cancer stem cell concept in progression of head and neck cancer [J]. J Oncol, 2009, 2009 : 894064.
- [2] de Boeck A, Narine K, de Neve W, et al. Resident and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2010, 46(5) 336-342.
- [3] Chen YC, Chen YW, Hsu HS, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(3) 307-313.
- [4] Behbod F, Rosen JM. Will cancer stem cells provide new therapeutic targets[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(4) : 703-711.
- [5] Polyak K, Hahn WC. Roots and stems : Stem cells in cancer[J]. Nat Med, 2006, 12(3) 296-300.
- [6] Kamstrup MR, Gniadecki R, Skovgaard GL. Putative cancer stem cells in cutaneous malignancies[J]. Exp Dermatol, 2007, 16(4) 297-301.
- [7] Jordan CT. The leukemic stem cell[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2007, 20(1) :13-18.
- [8] Lou H, Dean M. Targeted therapy for cancer stem cells : The patched pathway and ABC transporters[J]. Oncogene, 2007, 26(9) :1357-1360.
- [9] Graziano A, d'Aquino R, Tirino V, et al. The stem cell hypothesis in head and neck cancer[J]. J Cell Biochem, 2008, 103(2) :408-412.
- [10] Bianchini C, Giorba A, Pelucchi S, et al. Head and neck cancer : The possible role of stem cells[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2008, 265(1) :17-20.
- [11] 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 che-

- motherapy[J]. *Cancer Lett*, 2010, 289(2) :151-160.
- [12] Chiou SH, Yu CC, Huang CY, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13) :4085-4095.
- [13] Marhaba R, Klingbeil P, Nuebel T, et al. CD44 and EpCAM : Cancer-initiating cell markers[J]. *Curr Mol Med*, 2008, 8(8) :784-804.
- [14] Ahn SM, Goode RJ, Simpson RJ. Stem cell markers : Insights from membrane proteomics[J]. *Proteomics*, 2008, 8(23/24) :4946-4957.
- [15] LaBarge MA, Bissell MJ. Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6) :2021-2024.
- [16] Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, et al. AC133/CD133/Prominin-1[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(4) :715-719.
- [17] Rizzo S, Attard G, Hudson DL. Prostate epithelial stem cells[J]. *Cell Prolif*, 2005, 38(6) :363-374.
- [18] Zhou L, Wei X, Cheng L, et al. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line[J]. *Laryngoscope*, 2007, 117(3) :455-460.
- [19] 康非吾, 王开, 吴滔, 等. 舌鳞状细胞癌Tca8113细胞系 CD133⁺亚群生物学特性的研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2010, 28(5) :560-564.
- [20] Wei XD, Zhou L, Cheng L, et al. *In vivo* investigation of CD133 as a putative marker of cancer stem cells in Hep-2 cell line[J]. *Head Neck*, 2009, 31(1) :94-101.
- [21] 姜蕾, 赵良瑜, 何金, 等. 骨桥蛋白及其受体CD44v6在口腔鳞状细胞癌中的定量表达及意义[J]. *华西口腔医学杂志*, 2008, 26(3) :248-251.
- [22] Pries R, Witkopf N, Trenkle T, et al. Potential stem cell marker CD44 is constitutively expressed in permanent cell lines of head and neck cancer[J]. *In Vivo*, 2008, 22(1) :89-92.
- [23] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(3) :973-978.
- [24] Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(17) :2871-2875.
- [25] Visus C, Ito D, Amoscato A, et al. Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 as a novel CD8⁺ T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21) :10538-10545.
- [26] Clay MR, Tabor M, Owen JH, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase[J]. *Head Neck*, 2010, 32(9) :1195-1201.
- [27] Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, et al. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma[J]. *Mol Vis*, 2005, 11 :729-737.
- [28] Wang X, Wang Y, Yu L, et al. CSPG4 in cancer : Multiple roles[J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10(4) :419-429.
- [29] Fang D, Nguyen TK, Leishear K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20) :9328-9337.
- [30] Tokar EJ, Ancrile BB, Cunha GR, et al. Stem/progenitor and intermediate cell types and the origin of human prostate cancer[J]. *Differentiation*, 2005, 73(9/10) :463-473.
- [31] Zhang P, Zhang Y, Mao L, et al. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes[J]. *Cancer Lett*, 2009, 277(2) :227-234.
- [32] Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8) :3716-3724.
- [33] Burkert J, Otto WR, Wright NA. Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells[J]. *J Pathol*, 2008, 214(5) :564-573.
- [34] Harper LJ, Piper K, Common J, et al. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2007, 36(10) :594-603.

(本文编辑 刘世平)

(上接第 603 页)

- [18] Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, et al. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules *in vitro*[J]. *J Periodontol*, 1991, 62(8) :499-503.
- [19] Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, et al. Development of an *in vitro* wound healing model for periodontal cells[J]. *J Periodontol*, 2000, 71(2) :226-237.
- [20] 刘娟, 赵红宇, 轩东英, 等. 人牙周膜细胞群多向分化潜能的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2010, 28(2) :185-189.
- [21] Ivanovski S, Li H, Haase HR, et al. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts[J]. *J Periodontol Res*, 2001, 36(3) :131-141.
- [22] Lang H, Schüler N, Nolden R. Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects—a study in minipigs[J]. *J Dent Res*, 1998, 77(2) :393-405.
- [23] 王丽霞, 赵震, 蒋波, 等. 人牙周膜细胞在透明质酸/胶原支架上的黏附与生长[J]. *华西口腔医学杂志*, 2009, 27(2) :220-223.

(本文编辑 刘世平)