

# 口腔鳞癌中 CD24 的表达、作用和治疗靶点价值

莫 珩<sup>1</sup>, 高承志<sup>1</sup>, 王少杰<sup>2</sup>, 李 玫<sup>3</sup>, 董建强<sup>3</sup>, 郁卫东<sup>3△</sup>

(北京大学人民医院 1. 口腔科, 2. 中医科, 3. 临床分子生物学研究所, 北京 100044)

**[摘要]** **目的:**明确口腔鳞癌组织和细胞中黏液素样细胞表面黏附分子 CD24 的表达模式、作用及其作为治疗靶点的潜在价值。**方法:**利用免疫组化、real-time RT-PCR 和 Western blot 方法,明确 CD24 在 78 例人口腔组织标本和 59 例动物模型金地鼠 (*Hamster buccal*) 颊囊组织标本,以及口腔癌前病变上皮细胞 DOK4、口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 中的表达模式;以 CAL-27 和 WSU-HN6 细胞为模型,明确在常规和无血清成球培养条件下,全反式维甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 和 CD24 抗体对 CAL-27 和 WSU-HN6 细胞及肿瘤球生长的影响,并观察它们是否影响这两种细胞中 CD24 的表达。**结果:**人和金地鼠组织的免疫组织染色结果显示,在正常/单纯增生组织、轻度/中度异常增生组织、重度异常增生和鳞癌组织中均依次呈现 CD24 表达递增的现象 ( $P < 0.05$ );与 DOK 细胞相比较,CAL-27 和 WSU-HN6 口腔鳞癌细胞中 CD24 表达上调 ( $P < 0.05$ )。相对于癌前病变细胞 DOK,口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 具有更强的增殖和肿瘤球成球的潜能 ( $P < 0.05$ )。ATRA 能够有效地抑制这两种口腔鳞癌细胞的 CD24 表达、体外增殖和肿瘤球形成的能力 ( $P < 0.05$ ),而 CD24 抗体虽然也一样能够抑制口腔鳞癌细胞的增殖和肿瘤球形成 ( $P < 0.05$ ),但却不影响其 CD24 的表达。**结论:**CD24 在口腔鳞癌中表达上调,具有促进口腔鳞癌细胞增殖和肿瘤球形成的作用,维甲酸和 CD24 抗体皆能以 CD24 为靶点有效地抑制口腔鳞癌细胞的增殖和肿瘤球形成。

**[关键词]** 口腔肿瘤;癌,鳞状细胞;抗原,CD24;维甲酸;细胞增殖

**[中图分类号]** R739.85 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2016)01-0016-07

**doi:**10.3969/j.issn.1671-167X.2016.01.004

## Expression, roles and therapy target values of CD24 in oral squamous cell carcinoma

MO Heng<sup>1</sup>, GAO Cheng-zhi<sup>1</sup>, WANG Shao-jie<sup>2</sup>, LI Mei<sup>3</sup>, DONG Jian-qiang<sup>3</sup>, YU Wei-dong<sup>3△</sup>

(1. Department of Stomatology, 2. Department of Chinese Medicine, 3. Institute of Clinical Molecular Biology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

**ABSTRACT Objective:** To determine the expression profile and potential roles of CD24 in oral squamous cell carcinoma and explore the values of CD24 function as a potential target of clinical therapy. **Methods:** Semi-quantitative immunohistochemistry was used to construct the expression profile of CD24 in 78 human oral tissues and 59 *Hamster buccal* pouch tissues. Real-time RT-PCR and Western blot were used to analyze the CD24 expression levels in oral DOK4 cells, oral cancer CAL-27 and WSU-HN6 cells. Then these two cancer cell lines were selected to evaluate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) and CD24 antibody on CD24 expression, and the proliferation and tumorsphere formation capacity of these two cell lines. **Results:** CD24 expression was found significantly elevated in both human and animal tissues compared with normal and benign tissues ( $P < 0.05$ ), as well as in oral cancer CAL-27 and WSU-HN6 cells compared with DOK cells ( $P < 0.05$ ). CAL-27 and WSU-HN6 cells possess increased proliferative and specific tumorsphere formation capability compared with DOK cells ( $P < 0.05$ ). Both ATRA and CD24 antibody were able to effectively inhibit the proliferation and tumorsphere formation of CAL-27 and WSU-HN6 cells ( $P < 0.05$ ). Among them ATRA at least involved partially in the proliferation by down-regulating the CD24 expression ( $P < 0.05$ ), while CD24 antibody blocking had no effect on the CD24 expression. **Conclusion:** CD24 was upregulated in oral cancer and functioned as a potential factor that promoted the proliferation and tumorsphere formation of CAL-27 and WSU-HN6 cells. Both ATRA and CD24 antibody might effectively inhibit the proliferation and tumorsphere formation of CAL-27 and WSU-HN6 cells and function as a potential therapy target.

**KEY WORDS** Mouth neoplasms; Carcinoma, squamous cell; Antigens, CD24; Tretinoin; Cell proliferation

口腔鳞癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升趋势,虽然近年来在诊断和

治疗方面取得了相当大的进步,但是口腔鳞癌的总生存率依然在 50% 左右,亟待提高<sup>[1-3]</sup>。口腔鳞

癌的发生是一个从口腔癌前病变、轻度异常增生、中度异常增生、重度异常增生到原位癌和浸润癌发展的渐进过程,早期正确识别具有恶变潜能的口腔疾病,正确诊断、持续监测和及时干预,对于阻断甚至逆转其癌变具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。

口腔癌的治疗难点是复发和对于化疗药物的耐受性,其中口腔癌细胞的异质性是一个关键的因素,肿瘤干细胞假说认为在肿瘤组织中存在一群数量非常少的细胞,它们不仅具有干细胞的自我更新和分化的特性,而且具有更强的形成和维持肿瘤的能力,这是包括口腔鳞癌在内的多种恶性肿瘤发生、转移、复发和耐药的根本原因<sup>[4]</sup>,靶向口腔肿瘤干细胞的理论研究和治疗策略的提出是目前口腔鳞癌研究的热点。

黏液素样细胞表面黏附分子 CD24 在包括口腔鳞癌在内的多种恶性肿瘤中表达上调,具有独立评估多种恶性肿瘤预后的特点,是一个潜在的肿瘤干细胞表面标记物,也是一个靶向肿瘤干细胞的重要靶点<sup>[5-9]</sup>。2013 年,Abdulmajeed 等<sup>[5]</sup>报道了 CD24 在口腔上皮异常增生和鳞癌组织中的表达,发现 CD24 在鳞癌组织中表达显著增高,免疫染色评分虽然不能区分口腔上皮异常增生的分级,但却能够有效地区分上皮异常增生和鳞癌组织,是一个潜在的基于口腔鳞癌肿瘤干细胞的治疗靶点。迄今国内尚未见基于 CD24 在口腔鳞癌中作用的相关报道。目前肿瘤的治疗只能杀死大部分已分化的肿瘤细胞,不能杀死肿瘤干细胞<sup>[10]</sup>。诱导分化治疗的作用就是诱导肿瘤干细胞分化,为后续杀死已分化的肿瘤细胞创造更多的机会,是靶向肿瘤干细胞的有效手段,在包括口腔鳞癌在内的多种恶性肿瘤都取得了良好的效果<sup>[4,11-13]</sup>。维甲酸是一种诱导分化剂,能够诱导口腔鳞癌肿瘤干细胞分化,在口腔鳞癌的化学预防(chemoprevention)和治疗上具有重要的作用<sup>[13]</sup>。在其他的恶性肿瘤中,有研究表明维甲酸能够抑制 CD24 的表达<sup>[11]</sup>,但是在口腔鳞癌中是否也存在这样的作用尚不清楚。

因此,本研究在分析中国人口腔鳞癌组织、金地鼠动物模型颊囊鳞癌组织以及不同口腔鳞癌细胞中 CD24 表达模式的基础上,利用口腔鳞癌常规和无血清培养系统,维甲酸处理和 CD24 抗体特异性封闭实验,初步探讨维甲酸在口腔鳞癌中的作用及作为口腔鳞癌治疗靶点的潜在应用价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

**1.1.1 临床组织标本** 收集北京大学人民医院 2013 年 12 月至 2014 年 12 月的 78 个口腔组织病理蜡块纳入本次研究,其中病理诊断为正常和单纯增生的 15 例,轻度和中度异常增生的 16 例,重度异常增生的 7 例和口腔鳞癌 40 例,术前均未接受放疗和化疗。本研究开始前经过北京大学人民医院伦理委员会审查批准,符合医学伦理学要求。

**1.1.2 动物模型组织标本** 既往 0.5% (质量分数)二甲基苯并蒽(dimethyl-benzanthracene, DMBA, Sigma 公司)诱导金地鼠颊囊癌变的动物模型组织蜡块 59 个纳入本研究,其中病理诊断为正常和单纯增生的 18 例,轻度和中度异常增生的 12 例,重度异常增生的 12 例和颊囊鳞癌 19 例。

**1.1.3 模型细胞及主要试剂** DOK 口腔癌前病变细胞、CAL-27 和 WSU-HN6 口腔鳞癌细胞由北京大学口腔医院提供,CD24 (MAB4617)购自美国 Santa Cruz 公司,GAPDH (sc-25778)抗体购自美国 Santa Cruz 公司,总 RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司,逆转录试剂盒购自中国天根公司,KAPA SYBR-GreenFAST qPCR Kit Master Mix 购自美国 KAPABI-OSYSTEMS 公司,CCK-8 细胞活力检测试剂盒购自日本 Dojindo 公司,PCR 引物购自上海生工生物工程股份有限公司,全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)购自美国 Sigma 公司,DMEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司,无血清培养基(ECM0883LD)购自意大利 EuroClone,EGF、FGFb、Insulin、B27 和 DMEM KO-serum 均购自美国 Invitrogen 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色** 免疫组织化学染色结果判断标准:采用半定量法,应用普通光学显微镜,高倍镜下(10×10)随机取 5 个不同的视野,计算阳性细胞占总细胞数的百分率并进行积分,无阳性细胞记 0 分,阳性细胞百分率 < 10% 记 1 分,10% ~ 50% 记 2 分,51% ~ 80% 记 3 分, > 80% 记 4 分,同时观察染色强度,无着色记 0 分,淡黄色记 1 分,棕黄色记 2 分,棕褐色记 3 分,最后计算染色强度积分与阳性细胞百分率积分的乘积。病理阅片及染色积分判定由两位病理专家盲法观察完成,通过比较各组样本的免疫组织化学积分的均值反映 CD24 的相对表达水平。

**1.2.2 细胞培养** DOK 口腔癌前病变细胞、CAL-27 和 WSU-HN6 口腔鳞癌细胞培养用高糖 DMEM 培养基 + 10% (体积分数)胎牛血清常规培养,细胞传代采用 0.25% (质量分数)胰蛋白酶消化。

**1.2.3 real-time RT-PCR 和 Western blot** 按照文献所述<sup>[7-8]</sup>, 依据公式  $Y = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 mRNA 水平 CD24 的相对表达量, 其中 CD24 的引物序列上游 5'-TTCTCCAAGCACCCAGCA-3', 下游 5'-TGGAATAAATCTGCGTGGGTA-3'; GAPDH 的引物序列上游 5'-TTGTTATCGTGAAGGACTCA-3', 下游 5'-TGT-CATCATATTTGGCAGGTT-3'。采用化学发光法检测 CD24 和 GAPDH 的表达。

**1.2.4 CCK-8 法检测细胞增殖**<sup>[14]</sup> 取  $2 \times 10^3$  个 3 类细胞种植在 96 孔板内, 设 3 个复孔。于 0、24、48 和 72 h 测定 CCK-8 光密度值 ( $D$  值), 设 0 h  $D$  为 1, 均一化其他时间点  $D$  值, 绘制生长曲线。

**1.2.5 CAL-27 和 HN6 口腔癌细胞的无血清培养** 无血清培养基组成是 DMEM 添加 20  $\mu\text{g/L}$  (ng/mL) FGFb、20  $\mu\text{g/L}$  EGF、5 g/L 胰岛素、0.4% (质量分数) BSA 和 0.02  $\times$  B27。使用 Corning 超低黏附培养板进行培养, 每隔 3 天添加 1/3 新鲜培养基, 培养后 2 周选择 20 nm 直径的肿瘤球进行相关实验<sup>[15]</sup>。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件, 免疫组织化学半定量结果作为等级变量采用非参数方法完成组间比较, 两两比较采用 Wilcoxon M-W  $U$  检验。定量 RT-PCR 方法 3 次检测计算所得之相对值取均值, 采用双侧检验, 3 个样本比较采用单向方差分析, 当 3 组间差异有统计学意义, 则采用 Dunnett 法进行两两组间比较。细胞增殖数据均采用均值  $\pm$  标准差表示, 应用单因素方差分析比较各组间差异, 采用 Tukey post hoc 进行两两比较。以上各统计学方法以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CD24 在重度异常增生和鳞癌中表达上调, 且在正常/单纯增生-轻/中度异常增生-重度异常增生-鳞癌的演变过程中呈现表达递增的现象**

如图 1A、B、C、D 和 I 所示, 金地鼠颊囊组织免疫组织化学分析显示, CD24 蛋白的相对表达量在正常和单纯增生、轻度和中度异常增生、重度异常增生、鳞癌组中呈现递增现象, 组间差异有统计学意义, 其中正常和单纯增生组与其他各组间差异有统计学意义, 轻度和中度异常增生组与其他 3 组两两相比差异有统计学意义, 重度异常增生组与其他 3 组两两相比差异有统计学意义, 颊囊鳞癌组与其他 3 组两两相比差异有统计学意义。

如图 1E、F、G、H 和 J 所示, 人口腔组织免疫组

织化学分析表明, CD24 蛋白的相对表达量在正常和单纯增生、轻度和中度异常增生、重度异常增生、口腔鳞癌组中亦呈现递增现象, 组间差异有统计学意义, 其中正常和单纯增生组与其他各组间差异有统计学意义, 轻度和中度异常增生组与其他 3 组两两相比, 差异有统计学意义, 重度异常增生组与其他 3 组两两相比, 差异有统计学意义, 而口腔鳞癌组与其他 3 组两两相比差异有统计学意义。

如图 2 所示, 与癌前病变衍生的 DOK 细胞相比较, 两株口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 中 CD24 的表达无论是在 mRNA 还是蛋白水平均显著升高, 差异有统计学意义, 在口腔鳞癌细胞中 WSU-HN6 表达 CD24 更高。

**2.2 CD24 表达上调的口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 增殖能力增强, 且可以在无血清培养基中形成球样结构的细胞**

如图 3A 所示, 相较于口腔癌前病变 DOK 细胞, 口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 表现为增殖能力增强现象, 差异有统计学意义, 口腔鳞癌细胞中, CAL-27 增殖能力更强。在无血清的肿瘤干样细胞培养基中, 这两种口腔鳞癌都可以形成肿瘤球 (tumorsphere), 而 DOK 细胞则在此培养基中没有这种能力。同时, 如图 3B 所示, 在无血清培养基, CAL-27 和 WSU-HN6 的肿瘤球表达 CD24 mRNA 水平平均更高, 与 DOK 细胞相比较, 差异有统计学意义。

**2.3 体外 ATRA 抑制口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 细胞的增殖和 CD24 的表达**

ATRA 能够有效抑制口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 的增殖 ( $P$  值均小于 0.05), 同时还能够显著抑制 CAL-27 和 WSU-HN6 细胞的 CD24 mRNA 和蛋白的表达, 与未处理组相比, 差异有统计学意义 (图 4)。

**2.4 体外 CD24 抗体抑制口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 细胞的增殖, 但不影响这些细胞的 CD24 表达**

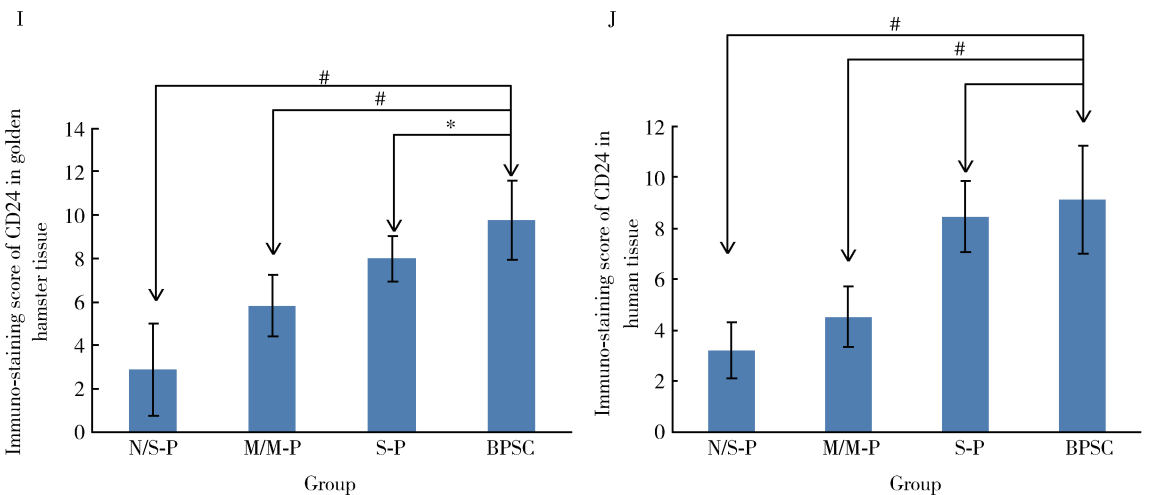
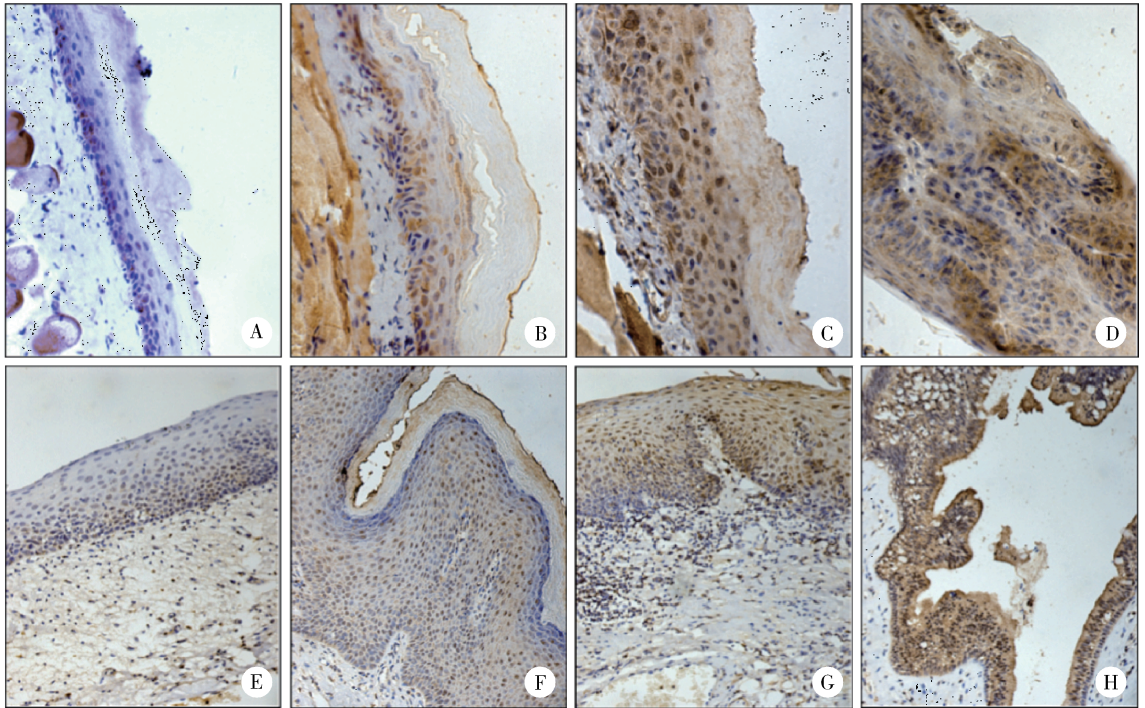
如图 5A 和 B 所示, CD24 抗体能够在体外有效地抑制口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 的增殖, CD24 抗体处理前后, CAL-27 和 WSU-HN6 各自的增殖能力差异有统计学意义, 但是不影响这些细胞 CD24 mRNA (图 5C 和 5D,  $P > 0.05$ ) 和蛋白的表达 (图 5E)。

**2.5 ATRA 和 CD24 均能有效地抑制口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 的肿瘤球生长**

ATRA 能够抑制 CAL-27 和 WSU-HN6 口腔鳞癌细胞的肿瘤球生长, 作用 1 周后肿瘤球全部死亡,

ATRA还能够显著抑制这两类口腔鳞癌细胞肿瘤球中 CD24 mRNA 的表达(CAL-27,  $P < 0.05$  和 WSU-HN6,  $P < 0.05$ , 图 6)。CD24 抗体在体外也能够有效抑制

CAL-27 和 WSU-HN6 口腔鳞癌细胞的肿瘤球生长,但是并不影响两类肿瘤球中 CD24 mRNA 的表达(CAL-27,  $P > 0.05$  和 WSU-HN6,  $P > 0.05$ )。



All pictures representative CD24 immune-stained tissue sections (magnifications,  $\times 100$ ). The expression of CD24 in Hamster buccal pouch tissues (A, B, C, and D) and human oral tissues (E, F, G, and H) were detected by immunohistochemistry. CD24 protein expression was gradually up-regulated in mild/moderate dysplasia (M/M-P) (B and F), severe dysplasia (S-P) (C and G), and oral squamous cell carcinoma (OSCC) or buccal pouch squamous carcinoma (BPSC) (D and H) than in normal tissues and simple epithelial hyperplasia (N/S-P) tissues (A and E). \*  $P < 0.05$  and #  $P < 0.05$ , the average relative protein level of CD24 is up-regulated in golden hamster (I) or human (J) cancer tissues compared with normal epithelial tissues/simple, mild/moderate, and severe epithelial dysplasia tissues.

图 1 人和金地鼠正常、异常增生和鳞癌组织中 CD24 蛋白表达

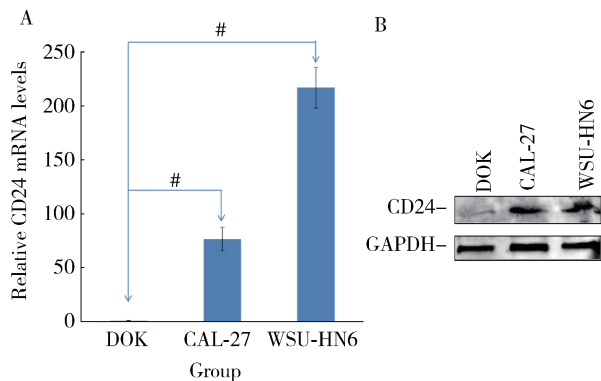
Figure 1 CD24 protein expression in golden hamster and human normal tissues, dysplasia tissues, and squamous cell carcinoma tissues

### 3 讨论

CD24 最早是作为一个细胞表面分子影响血液发生而受到人们关注,近年来,越来越多的研究表明 CD24 具有调节细胞增殖和黏附的作用,并且可能是

一种潜在的肿瘤干细胞表面标志物和重要的肿瘤治疗靶点<sup>[5,6,12,16]</sup>。本免疫组织化学研究发现,CD24 无论是在人口腔组织还是金地鼠颊囊癌变的动物模型组织中,均呈现出正常、单纯增生-轻度、中度异常增生-重度异常增生-鳞癌表达逐步增高的特征(图 1),

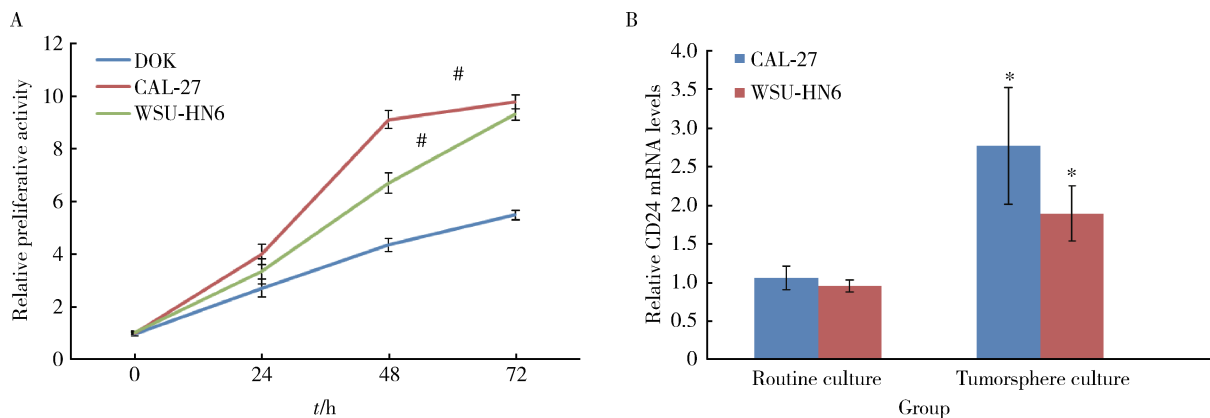
这一点显示了 CD24 参与口腔鳞癌发生发展的整个过程,基于其在重度异常增生及口腔鳞癌组织表达量的差异有统计学意义,可望成为评估口腔鳞癌发展、鉴定良恶性病变的重要标记物,有潜在的诊断价值<sup>[5,17]</sup>。这一点与 2013 年 Abdulmajeed 等<sup>[5]</sup>的报道结果相一致,同时本研究也在对 DOK、CAL-27 和 WSU-HN6 细胞 CD24 表达的分析中进一步证实了这样的表达模式(图 2),综合组织和细胞的表达模式,可以确定 CD24 在口腔鳞癌发生发展中的促癌作用。



#  $P < 0.05$ , the average relative mRNA level of CD24 is up-regulated in CAL-27 (A) and WSU-HN6 (B) oral squamous cells compared with DOK cells.

图 2 CD24 mRNA 和蛋白在 DOK、CAL-27 和 WSU-HN6 细胞系中的表达

Figure 2 mRNA and protein expression of CD24 in DOK, CAL-27 and WSU-HN6 cell lines



A, proliferative activity; #  $P < 0.05$ , compared with DOK cells; B, the average relative mRNA level of CD24 is up-regulated in CAL-27 and WSU-HN6 under tumorsphere culture condition compared with routine culture; \*  $P < 0.05$ , compared with routine culture.

图 3 DOK、CAL-27 和 WSU-HN6 细胞增殖能力比较(A)及常规及成球培养条件下 CD24 mRNA 表达(B)

Figure 3 Comparison of proliferation activity (A) and expression of CD24 mRNA in CAL-27 and WSU-HN6 cell under tumorsphere culture conditions (B)

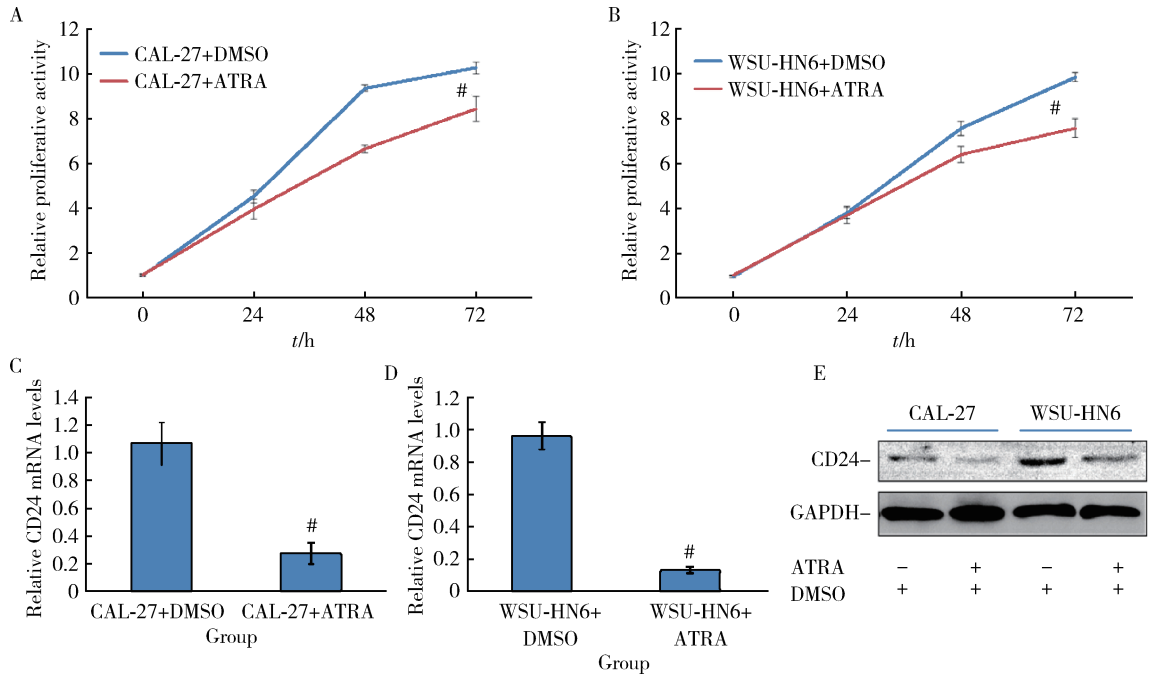
综合以上的研究结果,可以得出 CD24 具有部分影响口腔鳞癌细胞增殖和肿瘤球形成的作用,虽然在本研究中并未体现出 CD24 表达的量效关系,比如 CD24 表达量最高的 WSU-HN6 增殖能力并非最强,但是这些结果也足以反映出 CD24 在口腔鳞

本研究首先以 DOK、CAL-27 和 WSU-HN6 细胞为模型,比较了三者增殖能力的差异,结果发现虽然 CD24 的表达无论在 mRNA 还是蛋白水平均呈现一个递增的表达特征 ( $DOK < CAL-27 < WSU-HN6$ ),CAL-27 和 WSU-HN6 的增殖能力均强于 DOK 细胞,但是 CAL-27 却拥有最强的增殖能力(图 3);其次,还发现在无血清肿瘤球形成培养中,DOK 细胞除了不能形成明确球样结构之外,一般在培养的一周左右就全部死亡,而 CAL-27 和 WSU-HN6 均可以培养形成如图 5 所示的肿瘤球,且可以在无血清培养中长期生长和存活,尽管相对于 CAL-27 细胞,WSU-HN6 细胞所形成的球样结构更加紧致,以上这些结果至少可以说明 CD24 与口腔鳞癌细胞的增殖能力和肿瘤球形成的过程有关;再次,利用添加 ATRA 和 CD24 抗体来明确 CD24 在口腔鳞癌细胞 CAL-27 和 WSU-HN6 增殖和肿瘤球形成过程中的作用,发现无论是 ATRA 还是 CD24 抗体均可有效地抑制口腔鳞癌细胞的增殖能力和肿瘤球的形成,其中 ATRA 可以抑制口腔鳞癌细胞 CD24 的表达(图 3),而 CD24 抗体虽然不影响口腔鳞癌细胞中 CD24 的表达,但是抗体封闭细胞表面分子 CD24 也产生了同样的增殖和肿瘤球形成抑制作用。

癌细胞增殖和肿瘤球形成中的重要作用,也表明了 CD24 是一个口腔鳞癌治疗的有效靶点,本课题组将在后续的研究中进一步探明 CD24 影响口腔鳞癌细胞增殖和肿瘤球形成的作用机制。尽管这项研究对 CD24 的潜在致癌作用有了初步的描述,也提示了

CD24 与口腔鳞癌临床靶向治疗的相关性,但是我们还需要大量的临床样本结合临床资料随访来明确中国人 CD24 表达与口腔鳞癌各种临床病理特征的相关性,且需要从 CD24 表达确切定位(比如膜定位、质核定位,抑或是可以互相转换)、在已分化的肿瘤

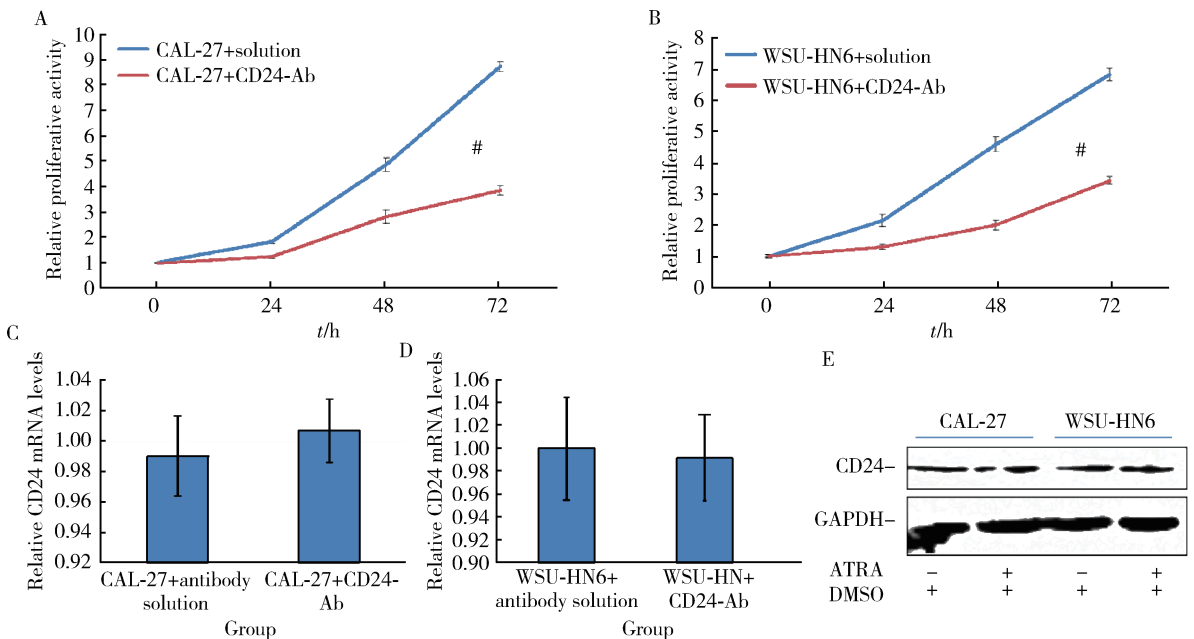
细胞中的作用和治疗机制,基于口腔鳞癌肿瘤干细胞的作用和治疗机制等角度系统的分析和研究。除此之外,本研究还需要进一步利用 CD24 敲低和/或敲除的体外模型和动物模型来进一步确定 CD24 在口腔鳞癌中的作用和机制。



A and B, proliferative activity; #  $P < 0.05$ , compared with CAL-27 cells and WSU-HN6, respectively; C, D and E, the average relative mRNA (C and D) and protein (E) level of CD24 is down-regulated in CAL-27 and WSU-HN6 after treatment with 20  $\mu\text{mol/L}$  ATRA.

图 4 ATRA 部分通过下调 CD24 表达抑制 CAL-27 和 WSU-HN6 细胞增殖

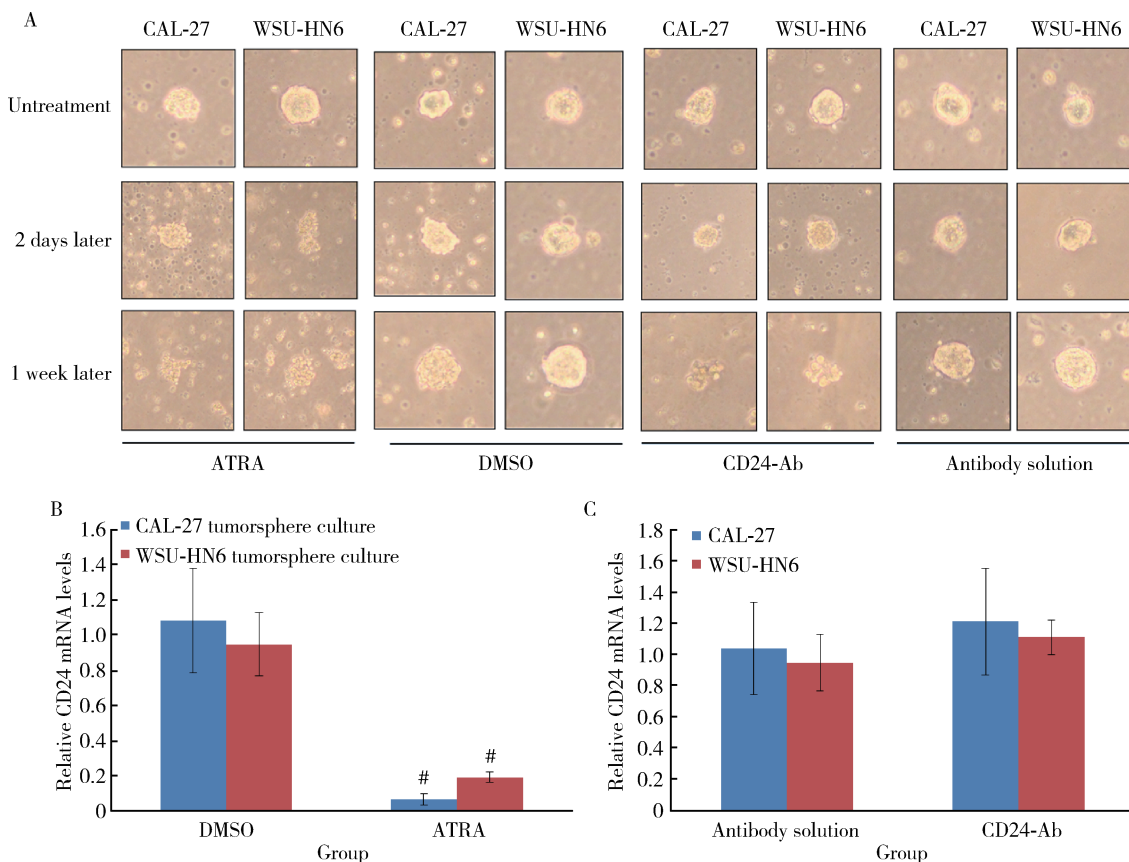
Figure 4 ATRA inhibit the proliferation of CAL-27 and WSU-HN6 cells partially by down-regulated the CD24 expression



A and B, proliferative activity; #  $P < 0.05$ , compared with CAL-27 cells and WSU-HN6, respectively; C, D and E, the average relative mRNA (C and D) and protein (E) level of CD24 is not changed in CAL-27 and WSU-HN6 after treatment with 0.1 mg/L CD24 antibody.

图 5 CD24 抗体封闭抑制 CAL-27 和 WSU-HN6 细胞的增殖

Figure 5 CD24 antibody blocking inhibit the proliferation of CAL-27 and WSU-HN6 cells independent on the CD24 expression



A, tumorsphere formation (magnification, X40) of CAL-27 cells and WSU-HN6, with or without, 20 $\mu$ mol/L ATRA and/or CD24 antibody, respectively; B, #  $P < 0.05$ , the average relative mRNA level of CD24 is downregulated in CAL-27 and WSU-HN6 after treatment with ATRA; C, the average relative mRNA level of CD24 is not changed in CAL-27 and WSU-HN6 after treatment with CD24 antibody.

图 6 ATRA 和 CD24 抗体封闭抑制 CAL-27 和 WSU-HN6 口腔鳞癌细胞的肿瘤球形成

Figure 6 ATRA treatment and CD24 antibody blocking inhibit the tumorsphere formation of CAL-27 and WSU-HN6 under tumorsphere culture conditions

参考文献

[ 1 ] 周曾同, 刘伟. 口腔癌前病变的癌变风险预测 [J]. 实用肿瘤杂志, 2015, 30 (1): 4 - 7.

[ 2 ] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74 - 108.

[ 3 ] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, et al. The global burden of cancer 2013 [J]. JAMA Oncol, 2015, 1(4): 505 - 527.

[ 4 ] da Silva SD, Hier M, Mlynarek A, et al. Recurrent oral cancer: current and emerging therapeutic approaches [J]. Front Pharmacol, 2012, 30 (3): 149.

[ 5 ] Abdulmajeed AA, Dalley AJ, Farah CS. Putative cancer stem cell marker expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma [J]. J Oral Pathol Med, 2013, 42(10): 755 - 760.

[ 6 ] Kristiansen G, Schlüns K, Yongwei Y, et al. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer-patients [J]. Br J Cancer, 2003, 88(2): 231 - 236.

[ 7 ] Sagiv E, Memeo L, Karin A, et al. CD24 is a new oncogene, early at the multistep process of colorectal cancer carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2006, 131(2): 630 - 639.

[ 8 ] Bircan S, Kapucuoglu N, Baspinar S, et al. CD24 expression in ductal carcinoma *in situ* and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study [J]. Pathol Res Pract, 2006, 202(8): 569 - 576.

[ 9 ] Winkler A, Zigeuner R, Rehak P, et al. CD24 expression in urothelial carcinoma of the upper urinary tract correlates with tumour progression [J]. Virchows Arch, 2007, 450(1): 59 - 64.

[ 10 ] 嵇淑莉, 张世能. 肿瘤干细胞与肿瘤靶向治疗 [J]. 基础医学与临床, 2008, 28(9): 914 - 919.

[ 11 ] Herreros-Villanueva M, Er TK, Bujanda L. Retinoic acid reduces

stem cell-like features in pancreatic cancer cells [J]. Pancreas, 2015, 44(6): 918 - 924.

[ 12 ] Kim BJ, Lee YA, Kim KJ, et al. Effects of paracrine factors on CD24 expression and neural differentiation of male germline stem cells [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(1): 255 - 262.

[ 13 ] Wang J, Dai Y, Huang Y, et al. All-trans retinoic acid restores gap junctional intercellular communication between oral cancer cells with up regulation of Cx32 and Cx43 expressions *in vitro* [J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2013, 18(4): 569 - 577.

[ 14 ] Yu W, Ma S, Wang L, et al. Upregulation of GPR34 expression affects the progression and prognosis of human gastric adenocarcinoma by PI3K/PDK1/AKT pathway [J]. Histol Histopathol, 2013, 28(12): 1629 - 1638.

[ 15 ] Chen YK, Huang AH, Lin LM. Sphere-forming-like cells (spheres) with cancer stem-like cell traits from VX2 rabbit buccal squamous cell carcinoma [J]. Int J Oral Sci, 2014, 6(4): 212 - 218.

[ 16 ] Sagiv E, Arber N. The novel oncogene CD24 and its arising role in the carcinogenesis of the GI tract; from research to therapy [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2008, 2(1): 125 - 133.

[ 17 ] Li YC, Chang JT, Chiu C, et al. Areca nut contributes to oral malignancy through facilitating the conversion of cancer stem cells [J]. Mol Carcinog, (2015-06-18) [2015-09-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Areca+nut+contributes+to+oral+malignancy+through+facilitating+%26TransSchema=title&cmd=detailsearch>.

(2015-09-21 收稿)  
(本文编辑: 王 蕾)