

## 研究论文

## 肺腺癌干细胞表达小细胞肺癌相关抗原的实验研究

吴丽霞 徐慧莉 陈复华 张艳 胡晶莹 刘蕾 薛建祥 董强刚\* 王维林\*

(上海交通大学医学院附属仁济医院、上海市肿瘤研究所, 上海 200032)

**摘要** 肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)是指一类具有自我更新(self-renewal)能力的未分化细胞。在肺腺癌中, CSC的自我更新调控机制类似胚胎干细胞, 即高表达*OCT4*、*Nanog*和*Sox2*多潜能基因, 但目前对其表型特征尚存争议。该文采用成球试验(sphere-forming assay)从SPC-A1细胞株中富集CSC后进行分子表型分析。结果显示, 此类肺球体细胞(pulmospheres)同时表达肺脏近端和远端呼吸上皮的多个谱系(lineage)标志, 包括纤毛柱状细胞标志FoxJ1、非纤毛柱状细胞(即Clara细胞)标志CCSP、肺神经内分泌细胞标志GRP、II型肺泡细胞标志SP-C及其转录调控因子TTF-1。这些肺球体细胞也能够被3株小细胞肺癌特异性单抗(2F7、4B3和E6)所识别。通过基因沉默技术使得肺球体细胞中*OCT4*表达转阴后, 上述标志(除E6外)均消失。研究结果揭示, 肺癌CSC具有肺脏呼吸上皮多潜能细胞的表型特征。此外, 初步研究结果发现, 中药冬虫夏草(*Hirsutella Hepialid* of *Cordyceps Sinensis*)的被毛孢菌丝体中含有新颖抗癌成分, 能够显著遏制肺球体细胞增殖, 提示对其进行分离鉴定, 将是研制开发肺癌CSC靶向药物的一个发展方向。

**关键词** 肺腺癌; 肿瘤干细胞; 表型标志; 小细胞肺癌相关抗原

## An Explore Study on the Expression of Small Cell Lung Cancer-related Antigens in Lung Adenocarcinoma Stem cells

Wu Lixia, Xu Huili, Chen Fuhua, Zhang Yan, Hu Jingying, Liu Lei, Xue Jianxiang, Dong Qianggang\*, Wang Weilin\*

(Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200032, China)

**Abstract** Cancer stem cells (CSC) represent a subtype of undifferentiated cells that have the ability to self-renew. It has been recognized that for the CSC of lung adenocarcinoma, the regulatory mechanisms of self-renewal are identical to the embryonic stem cells, that is, they over-express *OCT4*, *Nanog* and *Sox2* pluripotent genes. However, the phenotypic characteristics of these malignant stem cells remained disputes currently. With the sphere-forming assay, we herein enriched the CSC from SPC-A1 cell line and thereby, analyzed their molecular phenotypes. Our results indicated that these pulmospheres co-expressed multiple lineage markers of the proximal and distal respiratory epithelium in the lung, such as the ciliated columnar cell marker Foxj1, the non-ciliated columnar (Clara) cell marker CCSP, the pulmonary neuroendocrine cell marker GRP, the type II alveolar cell marker SP-C and its transcription factor TTF-1. These pulmospheres were also recognized by three monoclonal antibodies

收稿日期: 2013-08-12 接受日期: 2013-09-29

上海市科委科研基金(批准号: 10411968600)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-64046615, E-mail: qgdong@shsci.org; Tel: 021-64164979, E-mail: wangweilin@shsci.org

Received: August 12, 2013 Accepted: September 29, 2013

This work was supported by the Scientific Foundation of Shanghai Science and Technology Commission (Grant No.10411968600)

\*Corresponding authors. Tel: +86-21-64046615, E-mail: qgdong@shsci.org; Tel: +86-21-64164979, E-mail: wangweilin@shsci.org

网络出版时间: 2013-11-12 12:38

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131112.1238.002.html>

specific for small cell lung cancer (2F7, 4B3 and E6). By using of gene silencing technique that specially depleted the expression of OCT4 in these cells, the all above-mentioned markers (except E6) were disappeared. These data demonstrated that the CSC in lung adenocarcinoma shared molecular phenotypes with the pluripotent progenitor cells of respiratory epithelium in human lung. Moreover, our preliminary studies showed that the *Hirsutella Hepialid of Cordyceps Sinensis*, a traditional Chinese medicine, contained some ingredients with anti-cancer activities. These ingredients were able to potentially inhibit the proliferation of pulmospheres *in vitro*. These results point out that the isolation and characterization of these anti-cancer activities will provide a novel direction for the development of CSC-targeted drugs against lung cancer.

**Key words** lung adenocarcinoma; cancer stem cells; phenotypical markers; antigens related to small cell lung cancer

肺癌是一种全球性的高发肿瘤, 通常分为小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)两大类, 后者包括鳞癌、腺癌和大细胞未分化癌等组织类型。实验研究显示, SCLC和NSCLC(特别是肺腺癌)系肺脏呼吸道不同解剖部位的上皮细胞恶性转化所致, 如前者源自近端气道(支气管和细支气管)的肺神经内分泌细胞(pulmonary neuroendocrine cells, PNEC), 而后者源自远端气道(肺泡)的II型肺泡细胞(alveolar type II cells, AT2)<sup>[1-2]</sup>。然而, 最近有研究报道, 肺腺癌在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)靶向治疗失效后会形成具有PNEC样表型特征的肿瘤或SCLC<sup>[3-5]</sup>。对上述肺腺癌转型分化(transdifferentiation)的机制还不清楚, 但推测与肿瘤内的未分化癌细胞有关。

目前认为, 恶性肿瘤中存在少量能够自我更新、具有未分化干细胞特征的癌细胞, 称为肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)<sup>[6]</sup>。在肺腺癌中, 此类假定的(putative) CSC可以通过无血清悬浮培养技术(成球试验, sphere-forming assay)加以富集。资料显示, 肺腺癌的成球细胞(肺球体, pulmospheres)阳性表达OCT4、Nanog和Sox2多潜能(pluripotent)基因以及某些近端气道上皮的特性, 如具有DNA染料Hoechst33342的拒染能力(即侧群细胞, side population)和表达CD133表面抗原<sup>[7-9]</sup>。但对其表型特征还缺乏足够了解, 此类CSC样细胞是否具有SCLC的相关标志, 目前也没有研究报道。本文采用成球试验从SPC-A1肺腺癌细胞株中富集CSC, 观察到这些肺球体细胞表达肺脏呼吸上皮细胞多个谱系(lineage)的表型标志包括PNEC标志, 并可被SCLC特异性抗体识别。靶向灭活低氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF1 $\alpha$ )使得OCT4多潜能基因表达转

阴后, 其细胞表面的谱系标志及SCLC相关抗原随之消失<sup>[10]</sup>。上述结果揭示, 肺腺癌中未分化的CSC可以表达SCLC标志, 此类细胞可能具有分化可塑性。此外, 本文还探讨了肺癌CSC的靶向治疗问题。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

胎牛血清购自奥地利PAA Laboratories GmbH公司; DMEM及DMEM/F12培养基分别购自HyClone公司和GIBCO公司; 实验所用免疫荧光检测抗体: 鼠抗人OCT4单克隆抗体(sc-5279)、鼠抗人Sox2单克隆抗体(sc-365823)、鼠抗人Foxj1单克隆抗体(sc-53139)、鼠抗人P63单克隆抗体(sc-8431)、羊抗人Nanog多克隆抗体(sc-30331)、羊抗人CCSP多克隆抗体(sc-9770)、兔抗人SP-C多克隆抗体(sc-13979)、兔抗人GRP多克隆抗体(sc-28923)荧光素Rhodamine标记的驴抗鼠IgG、驴抗羊IgG及驴抗兔IgG抗体均购自Santa Cruz公司; 生长因子bFGF(basic fibroblast growth factor)和EGF(epidermal growth factor)购自Peprotec公司; 肝素(Heparin, Na Salt)购自Sigma公司; B27 supplement(50 $\times$ )购自GIBCO公司; Trizol试剂购自Ambion公司; cDNA逆转录试剂盒(QuantiTect Reverse Transcription kit)、PCR扩增试剂盒(HotStar Taq plus DNA polymerase)及SYBR GreenI real-time试剂盒(Guantifast SYBR Green PCR kit)购自QIAGEN公司; 流式分析所用细胞固定及通透液试剂盒购自BD Biosciences公司; CCK-8(Cell Counting Kit-8)试剂购自Dojindo公司。SCLC特异性单抗的2F7、4B3及E6杂交瘤由本所自行研制, 通过制备腹水后纯化获得<sup>[11]</sup>。人工培育的冬虫夏草被毛孢(*Hirsutella Hepialid of Cordyceps Sinensis*)菌丝体干粉由杭州柯氏生物技术有限公司惠赠。

## 1.2 抗体-药物交联物制备

顺铂(cisplatin, 江苏豪森药业股份有限公司)和吉西他滨(Gemcitabine, Lilly France)与4B3单抗交联参照文献[12], 交联产物采用Sephadex G50柱过滤, 收集洗脱第一峰。

## 1.3 被毛孢菌丝体醇提物制备

菌丝体干粉按5%(w/v)比例加入无水乙醇, 置摇床上室温(22 °C)萃取24 h后收集上清, 经60 °C旋转蒸发仪(rotary evaporator)浓缩干燥, 所得干粉称重后溶解在DMSO中, 浓度为200 mg/mL, -70 °C保存。

## 1.4 细胞培养

肺腺癌SPC-A1细胞购自中科院上海生科院细胞库, 培养基为含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 µg/mL链霉素的DMEM, 培养条件为37 °C、5% CO<sub>2</sub>。HIF1-KD细胞系HIF1α特异性shRNA慢病毒转染SPC-A1球体细胞后, 采用嘌呤霉素筛选获得<sup>[10]</sup>, 培养条件同上。

## 1.5 成球试验

用1×CSC培养基调整细胞密度至2×10<sup>4</sup>/mL, 24孔超低吸附板(Corning公司, cat No.3473)每孔接种500 µL细胞, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养, 分别于培养3, 5, 7 d加入10×CSC培养基(50 µL/well), 培养8 d收集细胞, 100×g离心2 min后弃上清, 球体细胞重悬于200 µL胰酶消化液, 37 °C作用3 min, 加入800 µL含血清培养基, 采用Countstar自动细胞计数仪(上海艾力特公司)计数活细胞。1×CSC培养基配方为无血清DMEM/F12培养基, 内含20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF、4 µg/mL肝素及1×B27。

## 1.6 免疫荧光检测

将细胞接种内盖玻片的24孔板(Costa公司)中, 培养过夜后经4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次(每次3 min, 下同), 0.25% Triton X-100通透15 min, 3% BSA封闭3 h, PBS洗3次后加入一抗(1:50稀释), 设阴性对照(用PBS代替一抗), 4 °C过夜。PBS洗3次去除非结合抗体后加二抗(1:100稀释), 室温避光1 h, PBS洗3次, 滴加Hoechst33342(1:40稀释)染核5 min, PBS洗2次, 加封片剂于Olympus IX51型荧光显微镜下观察。

## 1.7 流式细胞检测

2 mL离心管内加入4×10<sup>6</sup>细胞, 离心洗涤(400×g, 5 min)后弃上清。加入1 mL cytofix fixation buffer细胞固定剂, 室温避光固定20 min, 加入1 mL 1×perm/wash buffer细胞膜通透剂, 离心洗涤2次。细胞重悬

于1 mL 1×perm/wash buffer, 室温避光通透10 min, 离心洗涤后用2 mL PBS再次洗涤。所得细胞重悬于400 µL PBS, 分为实验管和对照管(100 µL/管), 实验管分别加入10 µL 2F7、4B3及E6抗体(1 mg/mL), 对照管不加抗体, 4 °C避光温育30 min后用2 mL PBS离心洗涤一次。实验管和对照管分别加入100 µL PBS及10 µL Alexa Fluor-594标记的驴抗鼠IgG抗体, 4 °C避光温育30 min后用2 mL PBS离心洗涤, 标记细胞重悬于100 µL PBS中待测。上机分析前取20 µL细胞滴加在Countstar仪玻片中, 荧光显微镜下观察阳性细胞。流式细胞检测在EPICS-XL型流式细胞仪上进行, 采用随机软件计算阳性率。

## 1.7 RT-PCR及定量PCR检测

应用Trizol试剂提取细胞总RNA后, 按Quantitect Reverse Transcription kit说明书将1 µg RNA逆转成cDNA。取2 µL cDNA进行PCR扩增及荧光定量检测, PCR反应液内含2.5 µL 10×PCR buffer, 0.5 µL 10 mmol/L dNTP, 5 µL 5×Q-Solution, 1 µL 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.25 µL Taq酶, 20 µmol/L上游及下游引物各1 µL, 补充DEPC-H<sub>2</sub>O至25 µL体积。PCR扩增条件为: 95 °C预热10 min; 95 °C变性15 s, 60 °C退火45 s, 72 °C延伸30 s, 重复35个循环; 72 °C延伸7 min。扩增产物在2%琼脂糖凝胶上电泳, 紫外检测。定量PCR采用SYBR GreenI real-time试剂, 其余反应条件同上。基因表达以18S rRNA管家基因为基准, 采用相对定量法检测。各引物序列如下, 18S rRNA上游引物: 5'-TCG GAG GTT CGA AGA CGA TC-3'; 下游引物: 5'-CAG CTT TGC AAC CAT ACT CCC-3'。OCT4上游引物: 5'-GGG TGG AGA GCA ACT CCG A-3', 下游引物: 5'-GCT TGG CAA ATT GCT CGA G-3'。Sox2上游引物: 5'-GTT CTA GTG GTA CGG TAG GAG CTT TG-3', 下游引物: 5'-TTT GAT TGC CAT GTT TAT CTC GAT-3'。Nanog上游引物: 5'-CCA GCT GTG TGT ACT CAA TGA TAG ATT T-3', 下游引物: 5'-TTC TGC CAC CTC TTA GAT TTC ATT C-3'。扩增产物均为150 bp。

## 1.8 Western blot检测

参照文献[11], 细胞裂解后用Bradford法测定蛋白浓度, 等量蛋白样品(80 µg)经10%的SDS-PAGE电泳分离后, 转印至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, SCLC特异性单抗(1 mg/mL)按1:1 000比例稀释, 4 °C孵育过夜。经PBST洗涤后, 加入HRP标记的

抗鼠IgG抗体(稀释度同上), 室温下孵育2 h, 最后用ECL化学发光试剂对X光片显影, 扫描图片。

### 1.9 细胞增殖实验

细胞增殖采用CCK-8比色法检测, 96孔板中每孔加入 $5 \times 10^3$ 细胞(100  $\mu$ L体积), 培养过夜后加入100  $\mu$ L不同浓度的药物, 根据实验需要选择作用时间, 每孔加入10  $\mu$ L CCK-8, 温育4 h后在492 nm波长检测光吸收, 细胞存活率(%)=(实验组光吸收值/对照组光吸收值) $\times 100\%$ 。

### 1.10 统计学方法

对实验结果的数据资料进行描述性统计分析。两配对样本比较采用*t*检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计

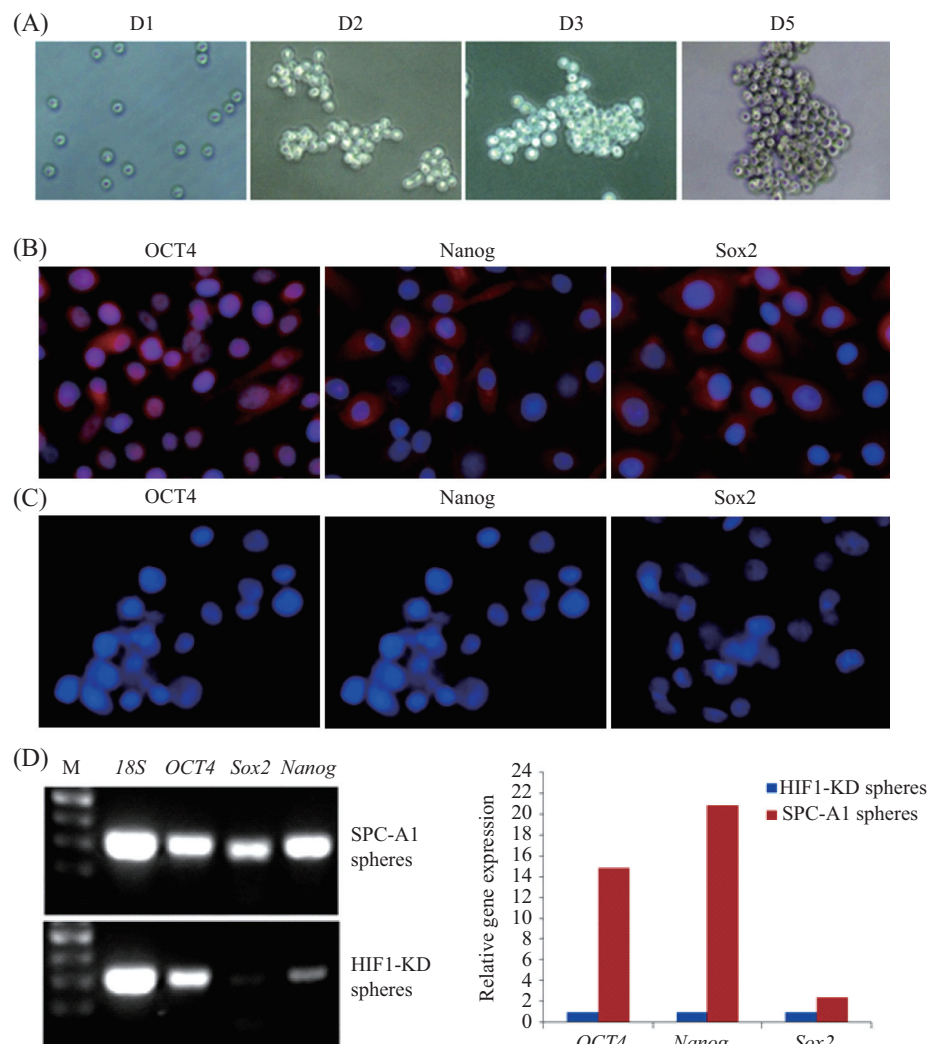
学意义。

## 2 结果

### 2.1 肺腺癌干细胞的富集及其多潜能基因表达分析

在24孔超低吸附板内添加EGF和bGFG等生长因子, SPC-A1细胞能在无血清培养基中悬浮生长。追踪观察发现, 培养24 h后细胞即凝聚成球体雏形, 随后细胞增殖、球体逐渐增大(图1A), 培养7 d后成球(sphere-forming)细胞数量约增加25~30倍。免疫荧光检测显示, SPC-A1的球体细胞阳性表达OCT4、Nanog和Sox2多潜能转录因子(图1B)。

HIF1-KD细胞是采用*HIF1 $\alpha$* 特异性shRNA慢病

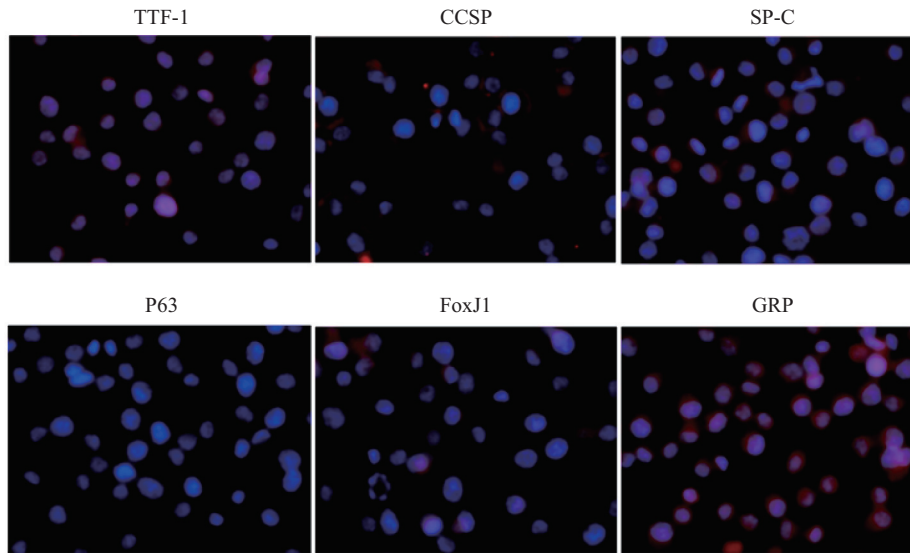


A: SPC-A1细胞在无血清悬浮培养1~5 d的成球状况; B: 培养8 d的SPC-A1球体细胞免疫荧光染色显示OCT4、Nanog及Sox2阳性表达; C: 培养8 d的HIF1-KD球体细胞显示OCT4、Nanog及Sox2阴性表达; D: SPC-A1及HIF1-KD球体细胞的RT-PCR和定量PCR检测结果。

A: the sphere-forming state of SPC-A1 cells during 1~5 days in serum-free, floating culture; B: the positive expression of OCT4, Nanog and Sox2 in SPC-A1 sphere-forming cells after 8 days in culture, assayed by immunofluorescent staining; C: the negative expression of OCT4, Nanog and Sox2 in HIF1-KD sphere-forming cells after 8 days in culture; D: results of RT-PCR and real-time quantitative PCR assays for both SPC-A1 and HIF1-KD sphere-forming cells.

图1 肺腺癌干细胞的富集及鉴定

Fig.1 Enrichment and characterization of lung adenocarcinoma stem cells



免疫荧光检测显示SPC-A1球体细胞阳性表达5个呼吸上皮谱系标志。

The immunofluorescent staining showed positive expression of five lineage markers of respiratory epithelium in SPC-A1 sphere-forming cells.

图2 肺腺癌干细胞的表型标志分析

Fig.2 The analysis of phenotypic markers in lung adenocarcinoma stem cells

毒感染SPC-A1细胞株中的OCT4<sup>+</sup>细胞亚群后获得的基因沉默细胞, 这些细胞中OCT4检测阴性<sup>[10]</sup>。本文采用相同的无血清悬浮培养方法, 发现HIF1-KD细胞仍具有成球能力, 但此类球体细胞与HIF1-KD细胞一样, OCT4、Nanog和Sox2检测阴性(图1C)。

应用RT-PCR方法检测了上述二种球体细胞的OCT4、Nanog和Sox2多潜能基因表达。如图1D所示, SPC-A1球体细胞中上述基因的表达与HIF1-KD球体细胞比较均明显增加, 定量PCR检测结果显示, 以HIF1-KD球体细胞的基因表达水平为基准(设定为1.000), SPC-A1球体细胞中OCT4、Nanog和Sox2的mRNA表达量分别增加了14.853、20.779和2.396倍。上述结果说明HIF1-KD细胞已经失去了CSC组分。

## 2.2 肺球体细胞的表型标志分析

采用免疫荧光检测了肺球体细胞的表型标志, 并以HIF1-KD细胞作为对照。图2结果显示, 肺球体细胞表达远端(distal)呼吸上皮标志, 如AT2细胞标志C型表面蛋白(surfactant protein C, SP-C)及其转录调控因子甲状腺转录因子-1(thyroid transcription factor-1, TTF-1)。此类细胞也阳性表达肺脏近端(proximal)呼吸上皮标志, 如Clara细胞标志Clara细胞分泌蛋白(Clara cell secretory proteins, CCSP)、纤毛柱状细胞标志叉头蛋白J1(forkhead-box J1, FoxJ1)和PNEC标志胃泌素释放肽(gastrin-releasing peptide, GRP), 但基底细胞标志P63(抑癌基因p53家族成员)

呈低或不表达。上述标志在HIF1-KD细胞中均不能检测到(数据未列)。

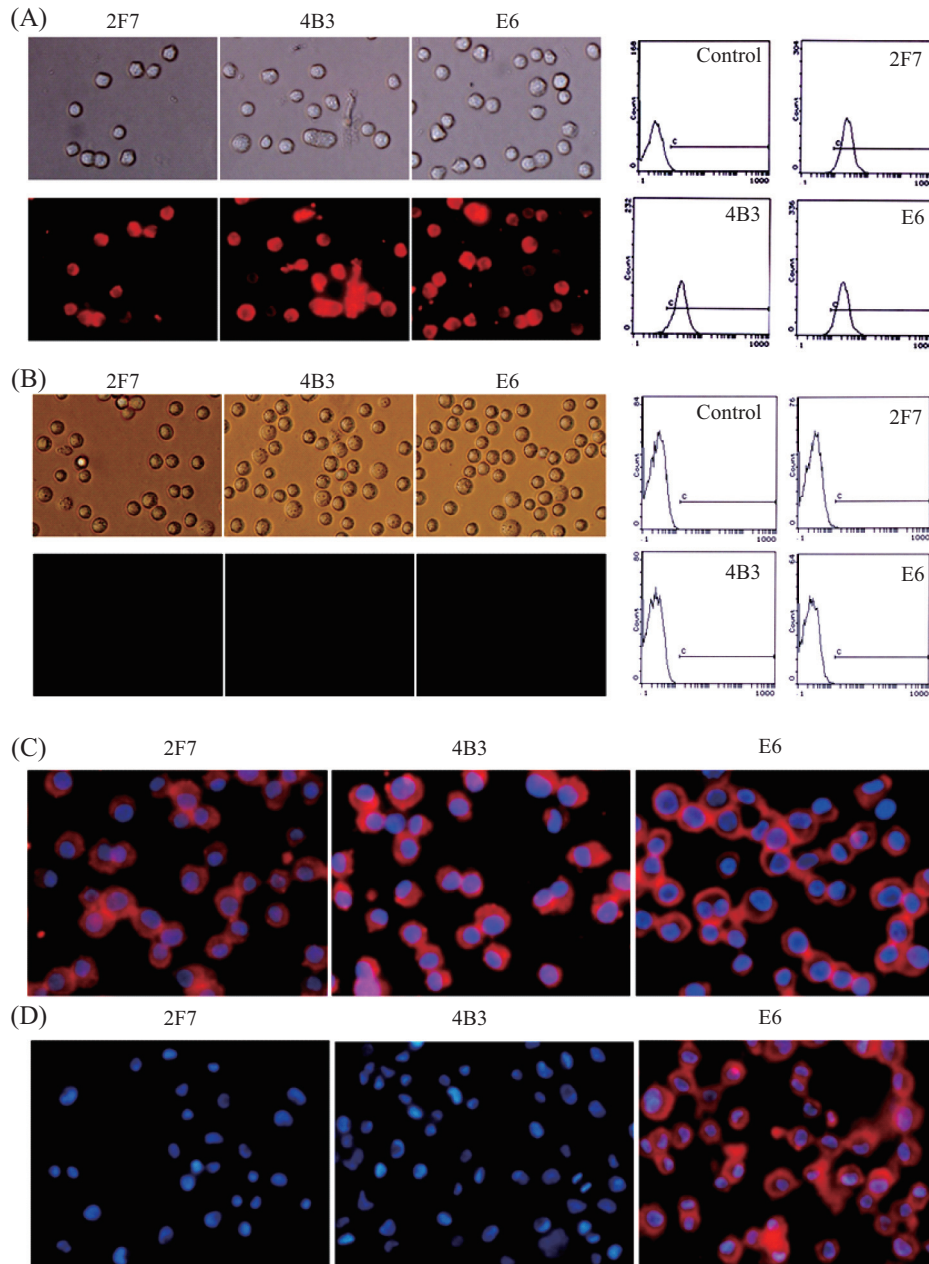
## 2.3 肺球体细胞表达小细胞肺癌相关抗原

对肺球体细胞进行SCLC单抗(2F7、4B3和E6)标记后采用流式细胞(FCM)检测, 发现此类抗体识别的靶抗原属于胞浆蛋白, 如将球体细胞固定通透后经2F7、4B3和E6抗体染色, 显微镜下观察到特异性荧光信号, FCM测得阳性率分别为98.1%、95.7%和96.9%(图3A), 而对未经固定通透处理的活细胞进行抗体染色, 则均呈阴性(图3B)。免疫荧光检测证实, 肺球体细胞阳性表达2F7、4B3和E6抗原(图3C), 而HIF1-KD细胞仅表达E6抗原, 2F7和4B3均阴性(图3D)。Western blot分析显示, 在肺球体细胞中上述抗原的分子量分别为42 kDa(4B3)、50 kDa(2F7)和70 kDa(E6), 而在HIF1-KD细胞中仅检测到E6(数据未列)。

## 2.4 肺球体细胞的靶向治疗

采用CCK-8比色法测试了SCLC抗体的药物靶向作用。实验将4B3抗体分别与顺铂(Cisplatin, DDP)或吉西他滨(Gemcitabine, GEM)交联后, 发现交联药物对肺球体细胞的增殖缺乏抑制效应(图4A)。此结果与FCM检测结果吻合, 说明4B3抗原并不表达在细胞表面, 因而不能被抗体识别发挥抗癌功能。

为了寻找肺癌CSC的新颖治疗手段, 我们探讨了中药冬虫夏草的抗癌作用。对人工培育的中华被孢菌丝体应用乙醇提取法获得粗提物(称为EE-



A: SPC-A1球体细胞经固定通透后, 流式细胞检测显示3株SCLC特异性抗体均染色阳性; B: 未经固定通透的细胞抗体染色阴性; C: 免疫荧光检测显示SPC-A1球体细胞中3株SCLC特异性抗体染色阳性; D: HIF1-KD细胞中仅E6抗体染色阳性。

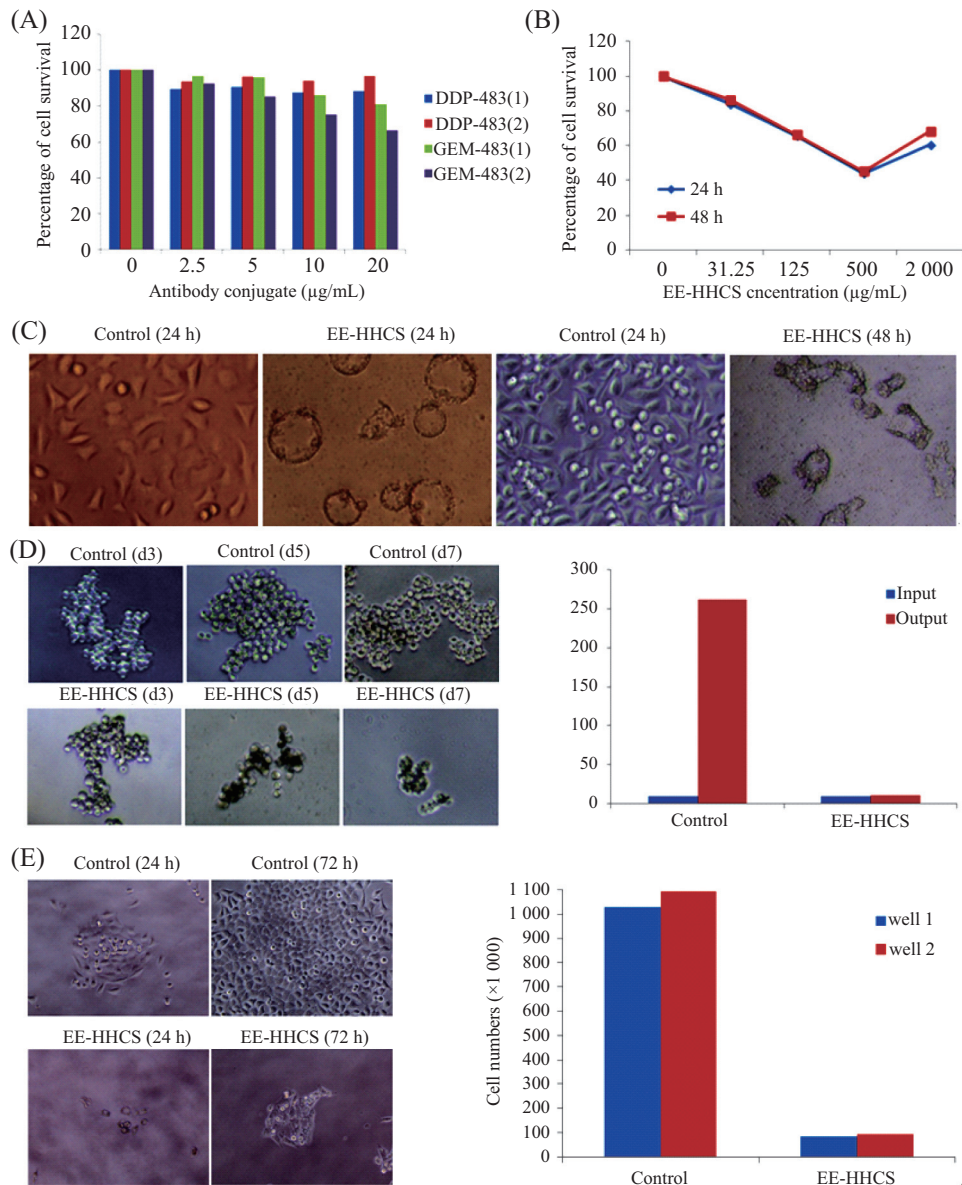
A: after fixation and permeabilization, the SPC-A1 sphere-forming cells showed positive staining of 3 SCLC-specific antibodies, as determined by flow cytometry; B: no positivity was detected in live cells; C: the positive immunofluorescent staining of 3 SCLC-specific antibodies in the SPC-A1 sphere-forming cells; D: HIF1-KD cells were recognized by E6 antibody only.

图3 肺腺癌干细胞表达SCLC相关抗原

Fig.3 The expression of SCLC-related antigens in lung adenocarcinoma stem cells

HHCS)后, 采用CCK-8比色法测试抗增殖效应。图4B结果显示, EE-HHCS在30~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内对肺球体细胞增殖具有剂量依赖性的抑制作用。而2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EE-HHCS处理组出现细胞存活率上升的假象, 形态观察发现, EE-HHCS作用24 h后细胞体积即明显增大, 类似细胞老化特征(图4C)。为了评

估此类CSC是否具有增殖能力, 我们在球体培养d3加入1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EE-HHCS, 作用96 h后(d7)计数细胞发现球体增殖受到显著抑制, 成球细胞数量维持在接种时水平( $1.16 \times 10^4/\text{孔}$ ), 而对照组细胞数量较接种时( $1 \times 10^4/\text{孔}$ )增加了26倍(图4D)。将EE-HHCS作用48 h(d5)的球体细胞转入6孔板用含血清培养基



A: 4B3抗体-药物交联物作用72 h后对SPC-A1球体细胞增殖的影响; B: EE-HHCS作用24 h及48 h后对SPC-A1球体细胞增殖的影响; C: 2 mg/mL EE-HHCS作用24 h及48 h引起的SPC-A1球体细胞形态; D: 1 mg/mL EE-HHCS抑制SPC-A1细胞的成球生长, 收集球体细胞计数; E: 1 mg/mL EE-HHCS作用72 h后, SPC-A1球体细胞的增殖能力明显受损, 收集球体细胞计数。

A: the anti-proliferative effect of 4B3 antibody-drug conjugates on SPC-A1 sphere-forming cells after 72 h exposure; B: the anti-proliferative effect of EE-HHCS on SPC-A1 sphere-forming cells after 24 h and 48 h exposure, respectively; C: the morphology of SPC-A1 sphere-forming cells after 24 h or 48 h exposure to 2 mg/mL EE-HHCS; D: the growth inhibition of spheres after exposure of SPC-A1 cells to 1 mg/mL EE-HHCS. The cell numbers were counted after sphere harvest; E: the impaired ability to proliferate in SPC-A1 sphere-forming cells after 72 h exposure to 1 mg/mL EE-HHCS. The cell numbers were counted after sphere harvest.

图4 肺腺癌干细胞的靶向治疗探索

Fig.4 The exploration of targeted therapies against lung adenocarcinoma stem cells

贴壁培养, 发现该组细胞增殖缓慢, 而对照组细胞生长旺盛(图4E), 连续培养4 d后计数细胞, 显示EE-HHCS组细胞数量仅为对照组的1.0%。

### 3 讨论

通过无血清悬浮培养(成球试验)富集CSC是近

年来的一项常用实验技术。在肺癌CSC研究中, 球体细胞高表达*OCT4*等干细胞多潜能基因, 具有高致瘤和高度耐药特性<sup>[7-9]</sup>。本文以SPC-A1肺腺癌细胞株为研究对象, 也观察到球体细胞中*OCT4*、*Nanog*和*Sox2*基因表达显著增高。作者最近报道, 在此类癌细胞中*OCT4*和*Nanog*均具有转录调控功能, 这些

多潜能基因表达赋予了癌细胞CSC样特性<sup>[10,13]</sup>。此结论与台湾研究组的结果一致, 该研究显示, 转基因表达*OCT4*和*Nanog*可以促使肺腺癌细胞重编程并逆向分化成为高致瘤和高度耐药的CSC样细胞<sup>[14]</sup>。

肺腺癌以外周肺多发, 其癌前期病变(称为不典型腺瘤样增生, *atypic adenomatous hyperplasia*)的病理表现为癌变细胞沿肺泡壁异常增生并具有AT2或Clara细胞的形态特征, 说明肺腺癌源自远端气道尤其是肺泡上皮<sup>[15]</sup>。而应用KRAS转基因模型获得的实验研究结果指出, 肺腺癌有2个潜在的细胞起源, 即位于细支气管-肺泡导管连接处(*bronchioalveolar duct junction*, *BADJ*)的细支气管肺泡干细胞(*bronchioalveolar stem cells*, *BASC*)和肺泡上皮AT2细胞, 此类假定的(*putative*)肺腺癌起始细胞均同时表达AT2细胞标志SP-C和Clara细胞标志CCSP<sup>[16-18]</sup>。与上述研究结果吻合, 我们的前期研究也发现, SPC-A1细胞株中的OCT4<sup>+</sup>细胞亚群具有SP-C<sup>+</sup>CCSP<sup>+</sup>表型特征<sup>[19-20]</sup>。本文采用成球试验从SPC-A1细胞中富集了OCT4<sup>+</sup>细胞亚群并再次证实了上述结果。综合以上研究资料, 可以认为人和小鼠肺腺癌可能具有相同的细胞起源, 其CSC属于远端气道上皮谱系, 但具有近端气道上皮的表型标志, 如CCSP是支气管Clara细胞的特异性表型标志, 在肺脏中该标志阳性细胞在BADJ近端的各级气道均有分布<sup>[21]</sup>。此外, 其他研究组也报道肺球体细胞具有近端呼吸上皮的表型特征, 其中最受关注的是CD133表面抗原和对DNA染料Hoechst33342的拒染能力(即SP)等<sup>[7-9]</sup>。在肺脏呼吸道中, 支气管假复层上皮均阳性表达CD133抗原, 而SP细胞则属于此类上皮中的基底细胞(*basal cells*)<sup>[22-23]</sup>。本文拓展了上述研究结果, 我们观察到SPC-A1球体细胞还能够表达近端气道纤毛柱状细胞标志FoxJ1<sup>[24]</sup>和PNEC标志GRP<sup>[25]</sup>。但值得注意的是, 这种多谱系标志表达与OCT4等多潜能转录因子密切相关, 如靶向灭活*HIF1 $\alpha$* 导致OCT4等基因表达下调后, 上述谱系标志均呈阴性。这些研究结果提示, 在肺腺癌中OCT4、*Nanog*和Sox2转录因子不仅调控CSC的自我更新, 而且通过维持其未分化状态使之同时表达肺脏近端和远端呼吸上皮的多个谱系标志。

上述近端和远端气道的多谱系标志表达现象在人支气管永生细胞的多潜能细胞亚群中也曾有报道<sup>[26]</sup>。但与此类细胞比较, SPC-A1球体细胞的一个特征是阳性表达GRP。GRP属于蛙皮素(*bombesin*)

类神经肽家族, 分布在胞浆神经内分泌颗粒中。人体肺脏呼吸上皮的PNEC中存在该肽类激素, 并且GRP不仅在SCLC中阳性表达而且还具有刺激细胞增殖的功能<sup>[25,27]</sup>。SPC-A1球体细胞表达GRP提示这些细胞中可能还存在其他SCLC相关分子。利用前期国家“863”高新技术项目研究的技术积累, 我们探讨了该问题。结果显示, OCT4<sup>+</sup>球体细胞可被3株SCLC单抗(2F7、4B3和E6)所识别, 其中2个SCLC相关抗原(2F7和4B3)在OCT4<sup>+</sup>的HIF1-KD细胞内消失。2F7和4B3单抗识别SCLC中分子量分别为50 kDa和42 kDa的细胞表面蛋白, 这些抗体与化疗药物交联后具有靶向抗癌效应, 但此类抗原在NSCLC中不表达<sup>[11-12,28]</sup>。与SCLC细胞相反, 我们发现上述抗原仅存在于SPC-A1球体细胞的胞浆内, 此结论得到了流式细胞检测结果的支持。目前, 对这种SCLC相关抗原分布变异的机制还不清楚。E6是2F7杂交瘤细胞在克隆筛选过程中获得一个亚克隆, 此抗体识别约70 kDa抗原, 但该抗原在肺癌各组织类型中的表达不清楚。肺腺癌CSC能够表达SCLC抗原标志, 但是否具备转型分化形成SCLC的潜能, 值得深入研究。我们进行了实验探索, 虽然目前尚未证明这种分化潜能, 但发现此类细胞可以通过药物诱导选择性表达基底细胞标志P63(待发表资料), 说明至少从表型标志的角度, 这些CSC具有多潜能分化特性。因此, 寻找适当的诱导条件使肺球体细胞(即CSC)分化形成SCLC样细胞, 这种可能性是存在的。

CSC靶向治疗是近年来CSC研究中的一个前沿领域, 我们对肺癌CSC的靶向治疗已进行了多年的实验探索。本文首先探讨了SCLC抗体的药物靶向作用, 但实验没有获得预期结果, 主要原因是这些抗体识别的抗原并不表达在细胞表面, 因而不能被抗体识别发挥抗癌效应。随后, 我们选择中药冬虫夏草进行了测试, 发现该药物的醇提物具有显著抗癌效应。冬虫夏草是真菌寄生于蝙蝠蛾幼虫体形成的复合物, 分子生物学研究报道了从冬虫夏草中可以检出中华被毛孢和蝙蝠蛾拟青霉等多种真菌, 并且上述真菌已能够通过人工培育获得菌丝体<sup>[29-30]</sup>。西安交通大学课题组曾报道拟青霉菌丝体的水提物具有抑制A549肺腺癌细胞增殖的作用, 并在高浓度(1~2 mg/mL)时诱导细胞凋亡<sup>[29]</sup>。但被毛孢菌丝体对肺癌是否也具有抗癌效应, 则缺乏研究报道。本文采用乙醇提取法从被毛孢菌丝体中获得了醇提物, 发



现此类粗提物不仅能够遏制肺癌CSC形成球体,而且对球体形成后的细胞增殖也具有显著的抑制功能。鉴于此类癌细胞对多数化疗药物具有高度耐药特性,分离鉴定被毛孢菌丝体中的有效抗癌成份,将是今后研制开发肺癌CSC靶向药物的一个发展方向。

综上所述,本文通过无血清成球培养技术获得了肺腺癌的CSC样细胞。借助免疫荧光等分析技术,证明此类球体细胞表达*OCT4*、*Nanog*和*Sox2*多潜能基因和肺脏呼吸上皮的多个谱系表型标志,这些细胞也阳性表达SCLC相关抗原。因而从表型分析的角度,肺球体细胞属于未分化的恶性干细胞即CSC。鉴于原发肿瘤中存在此类*OCT4*<sup>+</sup>癌细胞,严重威胁肺癌患者生存<sup>[30-31]</sup>,对其实施特异性的靶向治疗是近年来颇受关注的一个研究领域。本课题组也进行了一些探讨,本文结果提示,从中药冬虫夏草中寻找靶向肺癌CSC的新颖抗癌制剂值得深入研究。

### 参考文献 (References)

- Sullivan JP, Minna JD, Shay JW. Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29(1): 61-72.
- Asselin-Labat ML, Filby CE. Adult lung stem cells and their contribution to lung tumorigenesis. *Open Biol* 2012; 2(8): 120094.
- Alam N, Gustafson KS, Ladanyi M, Zakowski MF, Kapoor A, Truskinovsky AM, *et al.* Small-cell carcinoma with an epidermal growth factor receptor mutation in a never-smoker with gefitinib-responsive adenocarcinoma of the lung. *Clin Lung Cancer* 2010; 11(5): E1-4.
- Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, *et al.* Genotypic and histological evolution of lung cancer acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011; 3(75): 75ra26.
- Popat S, Wotherspoon A, Nutting CM, Gonzalez D, Nicholson AG, O'Brien M. Transformation to "high grade" neuroendocrine carcinoma as an acquired drug resistance mechanism in EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2013; 80(1): 1-4.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, *et al.* Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66(19): 9339-44.
- Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, *et al.* Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* 2008; 3(7): e2637.
- Akunuru S, Zhai QJ, Zheng Y. Non-small cell lung cancer stem/progenitor cells are enriched in multiple distinct phenotypic subpopulations and exhibit plasticity. *Cell Death Dis* 2012; 3: e352.
- Pan J, Zhang Q, Wang Y, You M. 26S proteasome activity is down-regulated in lung cancer stem-like cells propagated *in vitro*. *PLoS One* 2010; 5(10): e13298.
- 黄进肃, 宁仁利, 吴丽霞, 李榕, 张艳, 徐慧莉, 等. 靶向灭活肺腺癌干细胞*OCT4*多潜能转录因子后的差异表达基因分析. *中国细胞生物学学报*(Huang Jinsu, Ning Renli, Wu Lixia, Li Rong, Zhang Yan, Xu Huili, *et al.* Profiling of genes differentially expressed after targeted inactivation of *OCT4* pluripotent transcription factor in human lung adenocarcinoma stem cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(7): 928-36.
- 洪锦心, 张欣, 魏明辉, 励雁峰, 刘鹭雯, 王平, 等. 抗原分子量50KD和42KD的人体小细胞肺癌单克隆抗体. *肿瘤*(Hong Jinxin, Zhang Xin, Wei Minghui, Li Yanfeng, Liu Luwen, Wang Ping, *et al.* The antigen molecular weight 50 KD and 42 KD of human small cell lung cancer monoclonal antibody. *Tumor*) 1986; 6(6): 248-51.
- 李斯德, 洪锦心, 张毅, 王平, 谈立松, 蒋茂松, 等. 抗人小细胞肺癌单克隆抗体导向治疗的实验研究. *单克隆抗体通讯*(Li Side, Hong Jinxin, Zhang Yi, Wang Ping, Tan Lisong, Jiang Maosong, *et al.* Experimental therapy of human small cell lung cancer in nude mice with MCAb Conjugate 2F7-HSA-MTX. *Journal of monoclonal antibody*) 1991; 7(1): 48-52.
- 黄进肃, 张艳, 李榕, 吴丽霞, 宁仁利, 徐慧莉, 等. *Nanog*多潜能转录因子在肺腺癌干细胞中的转录功能分析. *中国细胞生物学学报*(Huang Jinsu, Zhang Yan, Li Rong, Wu Lixia, Ning Renli, Xu Huili, *et al.* An analysis on the transcriptional activity of *Nanog* pluripotent transcription factor in lung adenocarcinoma stem cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(7): 958-66.
- Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, *et al.* Coexpression of *OCT4* and *Nanog* enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res* 2010; 70(24): 10433-44.
- Kerr KM. Pulmonary preinvasive neoplasia. *J Clin Pathol* 2001; 54(4): 257-71.
- Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, *et al.* Identification of Bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121(6): 823-35.
- Xu X, Rock JR, Lu Y, Futtner C, Schwab B, Guinney J, *et al.* Evidence for type II cells as cells of origin of K-Ras-induced distal lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(13): 4910-5.
- Lin C, Song H, Huang C, Yao E, Gacayan R, Xu SM, *et al.* Alveolar type II cells possess the capability of initiating lung tumor development. *PLoS One* 2012; 7(12): e53817.
- 董强刚, 姚明, 耿沁, 周瑾, 闫明霞. 人体肺腺癌干细胞的分离及鉴定. *肿瘤*(Dong Qianggang, Yao Ming, Geng Qin, Zhou Jin, Yan Mingxia. Isolation and identification of human lung adenocarcinoma stem cell. *Tumor*) 2008; 28(1): 1-7.
- 郑必强, 周瑾, 耿沁, 董强刚. 人肺腺癌干细胞源自肺脏细支气管肺泡干细胞的初步研究. *中国肺癌杂志*(Zheng Biqiang, Zhou Jin, Geng Qin, Dong Qianggang. A preliminary study on the origin of human lung adenocarcinoma stem cells from lung bronchioalveolar stem cells. *Chinese Journal of Lung Cancer*) 2008; 11(6): 759-64.
- Reynolds SD, Malkinson AM. Clara cell: Progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(1): 1-4.
- Woo T, Okudela K, Mitsui H, Yazawa T, Ogawa N, Tajiri M, *et al.* Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Int J Clin Exp Pathol* 2011; 4(1): 32-42.
- Hackett TL, Shaheen F, Johnson A, Wadsworth S, Pechkovsky

- DV, Jacoby DB, *et al.* Characterization of side population cells from human airway epithelium. *Stem Cells* 2008; 26(10): 2576-85.
- 24 Gomperts BN, Gong-Cooper X, Hackett BP. Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117(8): 1329-37.
- 25 Weichselbaum M, Sparrow MP, Hamilton EJ, Thompson PJ, Knight DA. A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium. *Respir Res* 2005; 6: 115-26.
- 26 Delgado O, Kaisani AA, Spinola M, Xie XJ, Batten KG, Minna JD, *et al.* Multipotent capacity of immortalized human bronchial epithelial cells. *PLoS One* 2011; 6(7): e22023.
- 27 Sethi T, Langdon S, Smyth J, Rozengurt E. Growth of small cell lung cancer cells: Stimulation by multiple neuropeptides and inhibition by broad spectrum antagonists *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 1992; 52(9): 2737s-42s.
- 28 王平, 张华忠, 魏明辉, 施达仁, 张欣, 李斯德, 等. 人体小细胞肺癌相关抗原及其表达研究. *肿瘤*(Wang Ping, Zhang Huazhong, Wei Minghui, Shi Daren, Zhang Xin, Li Side, *et al.* Expression of tumor associated antigens in human small cell lung carcinoma. *Tumor*) 1988; 8(5): 246-48.
- 29 Thakur A, Hui R, Hongyan Z, Tian Y, Tianjun C, Mingwei C. Pro-apoptotic effects of paecilomyces hepiali, a cordyceps sinensis extract on human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro*. *J Cancer Res Ther* 2011; 7(4): 421-6.
- 30 Kubo E, Yoshikawa N, Kunitomo M, Kagota S, Shinozuka K, Nakamura K. Inhibitory effect of cordyceps sinensis on experimental hepatic metastasis of melanoma by suppressing tumor cell invasion. *Anticancer Res* 2010; 30(9): 3429-33.
- 31 Zhang X, Han B, Huang J, Zheng B, Geng Q, Aziz F, *et al.* Prognostic significance of OCT4 expression in adenocarcinoma of the lung. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40(10): 961-6.
- 32 Cortes-Dericks L, Galetta D, Spaggiari L, Schmid RA, Karoubi G. High expression of octamer-binding transcription factor 4A, Prominin-1 and aldehyde dehydrogenase strongly indicates involvement in the initiation of lung adenocarcinoma resulting in shorter disease-free intervals. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012; 41(6): e173-81.