

应用 p75^{NTR} 分选食管肿瘤干细胞并鉴定其生物学特性

孙志刚,黄盛东*,张宝仁,徐志云,刘晓红,龚德军,袁 扬
第二军医大学长海医院胸心外科,全军胸心外科研究所,上海 200433

[摘要] **目的:**应用 p75^{NTR} 进行人食管肿瘤干细胞的分选,并对其生物学特性进行鉴定。**方法:**对人食管癌标本癌细胞及食管癌细胞株 TE-1、Eca109 进行培养,应用流式细胞仪检测 p75^{NTR} 在人食管癌细胞(esophageal cancer cells,ECCs)中的表达,应用磁珠分选(MACS)法进行 p75^{NTR} 阳性细胞与阴性细胞的分选,观察 p75^{NTR} 阳性细胞的增殖、分化及软琼脂克隆形成能力,并进行裸鼠接种以观察其致瘤能力;应用化疗药物作用于 ECCs 后检测其中 p75^{NTR} 阳性细胞与阴性细胞存活率,以评价 p75^{NTR} 阳性细胞对化疗药物的耐受性。**结果:**8 个食管肿瘤细胞系(株)中,除 SHEC-1、SHEC-5 未检测到 p75^{NTR} 阳性细胞外,其余 6 个细胞系(株)SHEC-4、SHEC-6、SHEC-7、SHEC-8、Eca109、TE-1 中均检测到 p75^{NTR} 阳性细胞,阳性细胞比例分别为 2.71%、0.32%、3.35%、1.13%、2.15%、0.45%。与阴性及未分选细胞相比,MACS 分选后的 p75^{NTR} 阳性细胞具有较强的增殖能力,具有分化产生其他表型细胞的能力,在软琼脂中具有较强的克隆形成能力($P<0.01$);行裸鼠接种时,p75^{NTR} 阳性细胞表现出较强的致瘤性,其中 SHEC-7 细胞只需 2×10^3 个即可致瘤,其致瘤能力是未分选细胞的 50 倍。化疗药物分别作用于 p75^{NTR} 阳性细胞与阴性细胞 48 h 后,p75^{NTR} 阳性细胞的存活比例明显高于阴性细胞($P<0.05$)。**结论:**人食管肿瘤细胞中 p75^{NTR} 阳性细胞具有自我更新、分化、增殖能力,对化疗药物具有较强的耐受性,并具有较强的致瘤能力,具有肿瘤干细胞的特性。

[关键词] 食管肿瘤;肿瘤干细胞;p75^{NTR};细胞分选;致癌性试验;肿瘤抗药性

[中图分类号] R 735.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0481-06

p75^{NTR} in isolation and identification of cancer stem cells from human esophageal carcinoma

SUN Zhi-gang, HUANG Sheng-dong*, ZHANG Bao-ren, XU Zhi-yun, LIU Xiao-hong, GONG De-jun, YUAN Yang
Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Institute of Cardiothoracic Surgery of PLA, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To isolate and identify cancer stem cells from esophageal cancer cells (ECCs) using cell surface marker p75^{NTR}. **Methods:** ECCs were cultured from surgically resected ECC specimens; ECC cell lines TE-1 and Eca109 were also cultured. The expression of p75^{NTR} in human ECCs was examined by flow cytometry. p75^{NTR} positive cells were isolated from ECCs using magnetic activated cell sorting (MACS) method. The proliferation, differentiation, and the ability of colony-forming in soft agar of the p75^{NTR} positive cells were observed. The p75^{NTR} positive cells were injected into BALB/c nude mice subcutaneously to observe their tumorigenesis ability. The survival rates of p75^{NTR} positive and negative cells were assessed after treated with chemotherapy drugs to evaluate the resistance of p75^{NTR} positive cells. **Results:** Six out of the eight cell lines, including SHEC-4, SHEC-6, SHEC-7, SHEC-8, Eca109, and TE-1, were positive of p75^{NTR}, with the positive rates being 2.71%, 0.32%, 3.35%, 1.13%, 2.15%, and 0.45%, respectively. It was showed that p75^{NTR} positive cells possessed higher proliferation ability compared with p75^{NTR} negative cells ($P<0.01$). The p75^{NTR} positive cells had higher colony-forming ability in soft agar compared with p75^{NTR} negative cells ($P<0.01$). The p75^{NTR} positive cells demonstrated stronger tumorigenesis ability in nude mice. As few as 2 000 SHEC-7 cells could give rise to new tumors in xenotransplantation, with a tumorigenesis ability 50 times as high as that of the p75^{NTR} negative cells. When treated with chemotherapy drugs for 48 h, p75^{NTR} positive cells had significantly higher survival rate than p75^{NTR} negative cells ($P<0.05$). **Conclusion:** The p75^{NTR} positive ECCs possess self-renewal, differentiation, and proliferation abilities; they are strongly resistant to chemotherapy drugs, which gives them strong tumorigenesis ability and the characters of tumor stem cells.

[KEY WORDS] esophageal neoplasms; tumor stem cells; p75^{NTR}; cell storing; tumorigenecity test; neoplasm drug resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5): 481-486]

[收稿日期] 2008-09-03 **[接受日期]** 2008-12-04
[基金项目] 国家自然科学基金(30471718). Supported by National Natural Science Foundation of China(30471718).
[作者简介] 孙志刚, 博士生, 主治医师. E-mail: sun9102@gmail. com
* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873439, E-mail: huangsd@public6. sta. net. cn

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是指肿瘤中具有自我更新、无限增殖能力与分化潜能的细胞群,是目前肿瘤研究的热点。这部分细胞虽然只占少数,但却是肿瘤发生、发展、转移与复发的关键^[1]。人们相继在数种肿瘤中发现了CSCs,包括白血病^[2-3]、乳腺癌^[4-5]、脑肿瘤^[6-7]、前列腺癌^[8-9]、肺癌^[10]、肝癌^[11]、结肠癌^[12-13]及喉癌^[14]等,并对其特性进行了研究。这些证据均有力地支持了CSCs学说。本研究拟应用食管上皮干细胞的表面标志p75^{NTR}对食管肿瘤细胞(esophageal carcinoma cells, ECCs)进行标记、检测和分选,并对分选后的细胞进行生物学性状研究,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 ECCs的培养 38例人原发食管肿瘤标本均来源于第二军医大学长海医院胸心外科行食管癌切除术患者的肿瘤组织(均经患者或委托人知情同意)。所有患者术前均无放、化疗史,均经2名以上有经验的病理科医师确诊为食管鳞状细胞癌。所有标本均在手术切除后30 min内取材并送实验室。参考文献^[4]方法将其制成单细胞悬液,加入含10% FBS的DMEM(Gibco公司)置于37℃、5%CO₂培养箱内培养,静置培养约48 h后换液1次,待有细胞贴壁生长后,用机械刮除法和反复贴壁法去除成纤维细胞,纯化ECCs。每周换液2~3次,细胞生长至约80%汇合时,以0.25%胰酶+0.02%EDTA消化,按1:2~1:3传代。将购自中国科学院上海细胞研究所的食管癌细胞株TE-1、Eca109在含10%FBS的DMEM中进行常规培养及传代。

1.2 流式细胞仪分析 将处于对数生长期的ECCs以0.25%胰酶+0.02%EDTA消化,含血清培养液终止,PBS洗涤,重悬,800×g离心5 min。重悬于PBS中,加入鼠抗人p75^{NTR}(Millipore公司)为一抗,4℃孵育30 min;PBS洗涤2次,800×g离心5 min,去尽上清液;再加PBS(1×10⁸/ml)充分混悬细胞后,加入标记PE的羊抗鼠IgG为二抗(Santa Cruz公司),混匀,室温下避光孵育15 min;800×g离心5 min,PBS洗涤2次,重悬于PBS中;用FAC Scan流式细胞仪(Becton Dickinson公司)检测。对照组以PBS为一抗。

1.3 免疫磁珠分选 以小鼠抗人p75^{NTR}单克隆抗体为一抗与肿瘤细胞结合,以包被有羊抗小鼠IgG(二抗)的免疫磁珠(Invitrogen公司)与肿瘤细胞共

孵育。利用磁极(Invitrogen公司)对悬液中的肿瘤细胞进行分离。对照组以PBS为一抗。

1.4 细胞体外增殖能力检测 将分选后的p75^{NTR}阳性细胞与p75^{NTR}阴性细胞重悬于含10% FBS的DMEM培养基中,稀释为2×10⁴/ml,以每孔200 μl接种于96孔培养板中,每一浓度每天测定3个平行孔,连续测定8 d,即每一浓度需接种8 d×3孔。共设置1个空白对照组(A行,无细胞的DMEM培养基)和7个测定组(B~H行)。将接种完成的96孔细胞培养板置入37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下进行培养。每间隔24 h测定3列。每次在测定前4 h,于每孔加入20 μl MTT,继续培养4 h后终止培养,逐孔吸弃液体后加入DMSO 150 μl,水平振荡仪振荡10 min,倒置显微镜下观察细胞内蓝紫色结晶完全溶解,形成均匀的蓝紫色溶液。以空白对照组调零,用酶联免疫检测仪(上海第三分析仪器厂)于570 nm处测定各孔光密度(D)值,每种细胞每次测定3孔,取其平均值,描绘细胞生长曲线。

1.5 细胞体外分化能力检测 将分选后的p75^{NTR}阳性细胞接种于24孔板中,加入含10% FBS的DMEM中,置37℃、5%CO₂及饱和湿度的培养箱中培养,每3 d换液1次,在培养的0、3、6、9、12 d用流式细胞仪动态检测其中p75^{NTR}阳性细胞的百分比变化,观察增殖中的ECCs表面抗原p75^{NTR}表达情况,以了解增殖中细胞的分化情况。

1.6 软琼脂克隆形成试验 将p75^{NTR}阳性细胞与阴性细胞分别加入含10%FBS的DMEM的0.3%琼脂培养基,置于6孔板中,每孔2 ml,含细胞200个。“十”字方向晃动培养板,使细胞均匀分散,置37℃、5%CO₂下培养2周。2周后,于6孔板的每个孔内加入0.5 ml MTT,37℃下孵育30 min,使活细胞着色。计数所形成细胞数在50个以上的克隆数,数码相机拍照。

1.7 裸鼠成瘤试验 将p75^{NTR}阳性与阴性细胞分别重悬于PBS,将不同密度细胞接种于BALB/c裸鼠(购自第二军医大学实验动物中心)背部皮下,每种细胞每个密度接种4只,对侧皮下注射等量的PBS作对照。观察移植瘤出现时间及数量等指标。以引颈法将裸鼠处死,取出皮下移植瘤,以10%甲醛溶液固定24 h,石蜡包埋,常规切片。石蜡切片常规脱蜡至水,行H-E染色,光镜下观察,并与人原发食管癌标本对照。

1.8 p75^{NTR}阳性细胞对化疗药物的耐受性 将生

长状况良好的 ECCs 接种于 24 孔板,每孔 1×10^5 个细胞,加入 1 ml 含 10% FBS 的 DMEM,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中过夜。待细胞贴壁后,将其分为:对照组,不加化疗药物;实验组,分别加入顺铂(DDP)、5-氟尿嘧啶(5-Fu)。药物的终浓度为 DDP 1 μg/ml、5-Fu 2 μg/ml,每种药物实验设 6 个复孔,结果取其平均值。在药物作用后 1~7 d 的固定时间分别将细胞消化分离后,行一抗、二抗标记,流式细胞仪检测,观察 p75^{NTR} 阳性细胞比例的变化。将分选后的 p75^{NTR} 阳性细胞与 p75^{NTR} 阴性细胞分别置于含不同浓度 DDP、5-Fu 的培养液中培养,48 h 后检测 p75^{NTR} 阳性细胞与 p75^{NTR} 阴性细胞的存活率,以评价其对化疗药物耐受性的差异。

1.9 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用 *t* 检验。所有数据分析用 SPSS 10.0 软件完成, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 可连续传代的食管肿瘤细胞系的建立 本研究将 38 例肿瘤标本剪碎,胶原酶消化后以含 10% FBS 的 DMEM 培养液进行培养,1 周后有 9 例肿瘤细胞生长,纯化后连续传代。其中 3 例只传 4~7 代即生长缓慢或停止生长而逐渐死亡,提示其中可能不含有能够长期自我更新的细胞。另 6 例可进行连续传代(分别命名为 SHEC-1、SHEC-4、SHEC-5、SHEC-6、SHEC-7、SHEC-8),至今均已传 40 代以上,均为鳞状细胞癌。倒置相差显微镜下观察:细胞主要呈三角形、多角形或短梭形,大小不等,胞质丰富,胞核圆形、卵圆形,体积增大,核质比增大或增大不明显(图 1)。

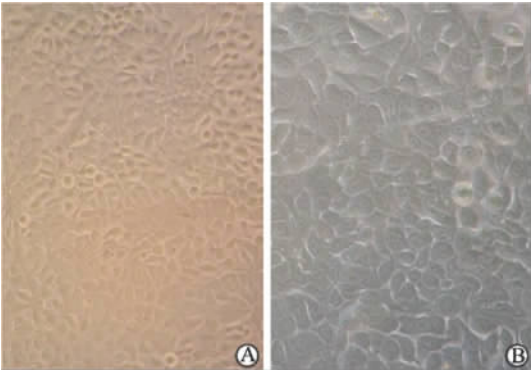


图 1 倒置相差显微镜下观察 ECCs 形态

Fig 1 Morphology of ECCs under inverted phase contrast microscope

ECCs were in polygon or short fusiform-shape with different sizes, abundant cytoplasm, nuclei multiplication, and increased karyoplasmic ratio or not. Original magnification: $\times 100$ (A), $\times 400$ (B)

2.2 p75^{NTR} 在 ECCs 中的表达 以小鼠抗人 p75^{NTR} 为一抗,以 PE 标记的羊抗小鼠 IgG 为二抗,对照组以 PBS 为一抗;以阳性标记者为 B 门。将标记好一抗、二抗的肿瘤细胞行流式细胞仪检测,在 8 个食管肿瘤细胞系(株)中,除 SHEC-1、SHEC-5 未检测到 p75^{NTR} 阳性细胞外,其余 6 个细胞系(株)SHEC-4、SHEC-6、SHEC-7、SHEC-8、Eca109、TE-1 中均检测到 p75^{NTR} 阳性细胞,阳性细胞百分率分别为 2.71%、0.32%、3.35%、1.13%、2.15%、0.45%。

2.3 ECCs 中的 p75^{NTR} 阳性细胞分选 应用免疫磁珠分选技术分离 ECCs 中的 p75^{NTR} 阳性细胞,将 p75^{NTR} 阳性细胞及 p75^{NTR} 阴性细胞均加入二抗标记后行流式细胞仪检测,以评价分选的效率。结果表明:分选后 p75^{NTR} 阳性细胞的纯度为 90.3%~96.5%,p75^{NTR} 阴性细胞的纯度均为 100%。

2.4 细胞体外增殖能力检测 结果(图 2)表明:在每种 ECCs 中 p75^{NTR} 阳性细胞与 p75^{NTR} 阴性细胞相比,生长速度均较快。p75^{NTR} 阳性细胞群体倍增时间平均为 (16.5 ± 3.2) h,而 p75^{NTR} 阴性细胞群体倍增时间平均为 (36.8 ± 7.3) h,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

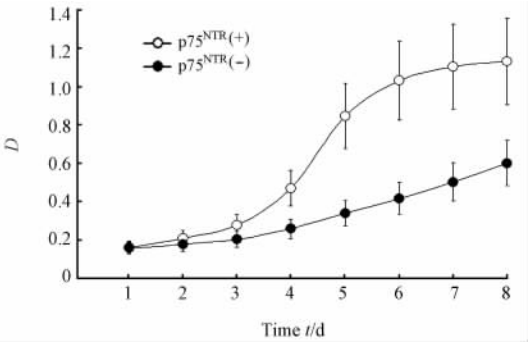


图 2 ECCs 中 p75^{NTR} 阳性细胞与阴性细胞分别培养时的细胞生长曲线

Fig 2 Cells growth curve of separated p75^{NTR} positive cells and negative cells

$n = 30, \bar{x} \pm s$

2.5 细胞体外分化能力检测 结果表明:随着培养时间的延长,表达 p75^{NTR} 的细胞比例逐渐减少,以前 6 d 为显著,由 92.68% 降至 40.72%,培养至第 12 天,p75^{NTR} 阳性细胞的比例下降至 5.53%,与分选前比例相似。

2.6 软琼脂克隆形成试验 结果表明:p75^{NTR} 阳性细胞、p75^{NTR} 阴性细胞、未分选细胞在软琼脂中的克隆形成率分别为 $(45.9 \pm 8.9)\%$ 、 $(3.7 \pm 2.1)\%$ 、

(12.6 ± 2.9)%, p75^{NTR} 阳性细胞克隆形成率明显高于阴性细胞及未分选细胞($P < 0.01$)。

2.7 裸鼠成瘤试验

2.7.1 成瘤情况 将 10^3 、 10^4 、 10^5 个 p75^{NTR} 阳性细胞与 p75^{NTR} 阴性细胞分别接种于裸鼠背部皮下。所有裸鼠观察 8 周后处死,解剖其背部皮下出现的移植瘤并查看其他脏器有无转移。形成移植瘤的情况如表 1 所示。所有接种 p75^{NTR} 阴性细胞的裸鼠,接种细胞量 $\leq 10^5$ 时均未形成移植瘤。SHEC-7 中

p75^{NTR} 阳性细胞的致瘤性最强,注射 10^4 个细胞均形成移植瘤,但 10^3 个细胞均未成瘤。接下来又分别将 2×10^3 、 5×10^3 个 SHEC-7 中 p75^{NTR} 阳性细胞接种于裸鼠背部皮下,每组 4 只。观察 8 周,发现注射 5×10^3 个细胞的裸鼠中有 2 只形成移植瘤,而接种 2×10^3 个细胞的裸鼠中有 1 只形成移植瘤。这说明在 SHEC-7 细胞中只需 2×10^3 个 p75^{NTR} 阳性细胞即可在异体接种时形成移植瘤,比 p75^{NTR} 阴性细胞成瘤能力强 50 倍,表现了强大的致瘤性。

表 1 p75^{NTR} 阳性细胞与阴性细胞接种裸鼠的成瘤情况

Tab 1 Tumorigenesis of p75^{NTR} positive and negative cells in nude mice

Tumor cells	SHEC-4		SHEC-7		SHEC-8		Eca109	
	10^5	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4
p75 ^{NTR} (+)	3/4	0/4	4/4	4/4	3/4	1/4	4/4	0/4
p75 ^{NTR} (-)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

2.7.2 病理学观察 将 p75^{NTR} 阳性细胞在裸鼠皮下形成的肿瘤组织块,切下后行 H-E 染色,显微镜下观察,结果(图 3)表明:与人原发食管肿瘤相比,6 个食管肿瘤细胞系(株)中 p75^{NTR} 阳性细胞形成的肿瘤在形态学上无明显差异。

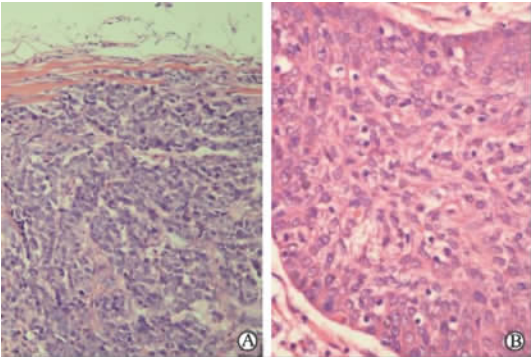


图 3 p75^{NTR} 阳性细胞接种裸鼠形成的移植瘤组织(A)及人原发食管肿瘤(B)的 H-E 染色

Fig 3 H-E staining of representative sections of tumors in BALB/C nude mice injected with p75^{NTR} positive cells (A) and human primary esophageal carcinoma (B)

Original magnification: $\times 20$

2.8 p75^{NTR} 阳性细胞对化疗药物的耐受性

2.8.1 p75^{NTR} 阳性细胞比例的变化 化疗药物 5-Fu、DDP 作用 1~5 d 后,分别用 p75^{NTR} 对 ECCs 进行标记,以流式细胞仪检测其中 p75^{NTR} 阳性细胞的比例。结果(图 4)表明在化疗药物作用后 p75^{NTR} 阳性细胞的比例有不同程度的提升,至 4 d 时达到最大,5 d 后亦未见明显增加。

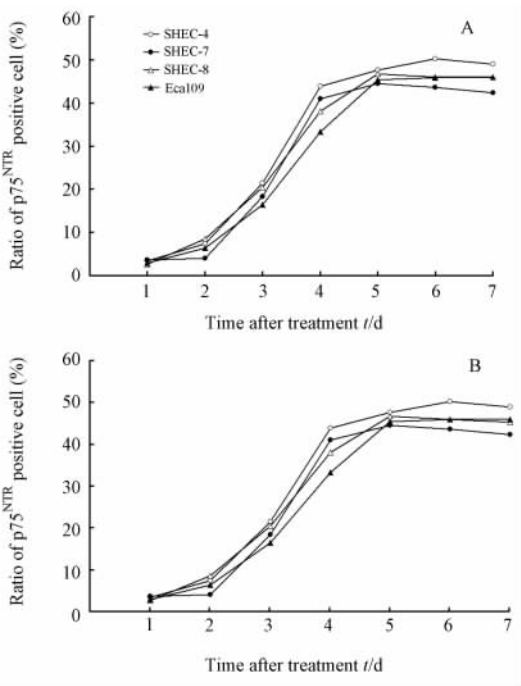


图 4 ECCs 在含化疗药物的培养液中培养后 p75^{NTR} 阳性细胞比例

Fig 4 Proportion of p75^{NTR} positive cells in ECCs cultured in FBS/DMEM medium with chemotherapy drugs

A: 5-Fu; B: DDP

2.8.2 细胞存活率的比较 将 p75^{NTR} 阳性细胞与 p75^{NTR} 阴性细胞分别在不同浓度的化疗药物中作用 48 h 后,应用 MTT 法检测细胞存活状况。结果(图 5)表明:较低浓度化疗药物作用后,有少量 p75^{NTR} 阴性细胞死亡,p75^{NTR} 阳性细胞出现少量增殖;在较高化疗药物浓度作用后,p75^{NTR} 阳性细胞表现出较强

的耐药性,只出现少量细胞死亡,而 p75^{NTR} 阴性细胞存活明显减少($P<0.05$)。

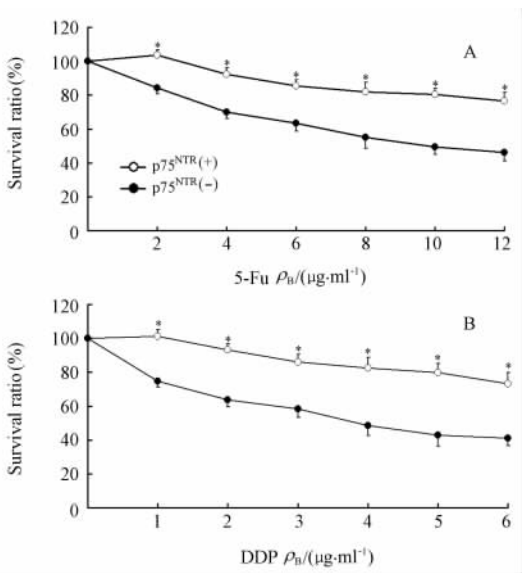


图 5 ECCs 中 p75^{NTR} 阳性细胞与阴性细胞在化疗药物中的存活曲线

Fig 5 Survival curve of p75^{NTR} positive cells and negative cells derived from ECCs after exposed to chemotherapy agents

Both p75^{NTR} positive and p75^{NTR} negative tumor cells were collected from ECCs by MACS sorting. 1×10^4 cells/well were plated in 96-well plate and treated with various concentrations of 5-Fu or DDP for 48 h in FBS/DMEM medium. * $P<0.05$ vs autologous p75^{NTR} negative cells; $n=18, \bar{x} \pm s$. A: 5-Fu; B: DDP

3 讨论

p75^{NTR} 是一种相对分子质量为 75 的蛋白受体,属 I 型跨膜 TNF 受体超家族成员,可与 NGF、BDNF、NT-3 和 NT-4 等低亲合性结合,在 Trk 存在条件下被活化,提高对神经营养因子的反应性^[15],曾被用来分离神经冠干细胞^[16]等。Okumura 等^[17]研究证明正常食管上皮细胞中的 p75^{NTR} 阳性细胞具有增殖、自我更新及多向分化能力,经鉴定为食管上皮干细胞。CSCs 学说认为 CSCs 可能起源于正常干细胞的突变,那么 CSCs 就可能具有与相应组织来源的干细胞相同的表面标志。此观点不断得到实验证实,如急性髓性白血病(AML)及慢性髓性白血病(CML)中的 CSCs 具有与造血干细胞相同的标志 CD34⁺CD38⁻^[2-3,18-19];脑肿瘤干细胞具有与神经干细胞相同的标志 CD133^[7,20]。

本研究将从手术标本中获取的人 ECCs 进行原代培养并建立可连续传代的细胞系,探讨 ECCs 表

面抗原 p75^{NTR} 的表达,并研究了 p75^{NTR} 阳性细胞在体外增殖能力、分化能力、克隆形成能力及接种裸鼠时致瘤能力。流式细胞仪检测结果显示,p75^{NTR} 阳性细胞在 ECCs 中占少数,个别细胞系中未见有表达,与文献中报道的 CSCs 表面抗原的表达情况相符。本研究对应用免疫磁珠分选的食管肿瘤细胞中 p75^{NTR} 阳性细胞与 p75^{NTR} 阴性细胞的增殖能力、分化能力及克隆形成能力进行了研究,结果显示:p75^{NTR} 阳性细胞与 p75^{NTR} 阴性细胞相比,具有较强的增殖、扩增能力,在软琼脂中具有较强的克隆形成能力。将 p75^{NTR} 阳性细胞在含 10% FBS 的 DMEM 中进行培养,动态观察其表面标志 p75^{NTR} 的表达情况,结果显示,随着培养时间的延长,表达 p75^{NTR} 的细胞比例逐渐减少。结果说明 p75^{NTR} 阳性细胞在细胞增殖过程中分化产生了大量其他表型的细胞,证实了其具有分化产生其他表型细胞的能力,从另一侧面也说明了 p75^{NTR} 阳性细胞具有自我更新能力。Cifone^[21]研究发现,干细胞能够悬浮生长或在半固体培养基中生长,而普通细胞不附着于固体表面就不能生长。其确切的原因尚不清楚,可能是由干细胞非附着性生长的特性决定的。CSCs 也具有这种特性。本实验结果也证实了 p75^{NTR} 阳性细胞能够在软琼脂中形成克隆,说明了其具有自我更新能力。

CSCs 的致瘤能力是鉴定 CSCs 最重要的环节。本实验结果显示,所有食管肿瘤细胞系(株)中的 p75^{NTR} 阳性细胞在接种 10^4 、 10^5 个细胞时均有部分形成移植瘤,而 SHEC-7 细胞中只需 2×10^3 个 p75^{NTR} 阳性细胞即可在异体接种时形成移植瘤,比未分离的细胞成瘤能力强 50 倍,表现了强大的致瘤性。且所形成移植瘤的病理形态与原发人食管肿瘤相似而所有接种 p75^{NTR} 阴性细胞的裸鼠,接种细胞量 $\leq 10^5$ 时均未形成移植瘤。CSCs 是造成肿瘤耐药的最根本原因^[11],肿瘤细胞对化疗药物的耐受性是肿瘤治疗的主要障碍。这可以解释为什么肿瘤经过放疗或化疗后,只能使其体积缩小而不能根除肿瘤最终导致肿瘤复发。本实验结果表明,ECCs 中 p75^{NTR} 阳性细胞符合我们假定的 CSCs 的特性,即对化疗药物具有一定的耐受性,在食管肿瘤细胞抵抗化疗药物时起了重要作用。此结果为 EC 的治疗提供了新的治疗靶点,即研发针对其中 p75^{NTR} 阳性细胞的治疗。

总结本实验的结果, p75^{NTR} 阳性细胞具有如下特性: (1) 自我更新能力; (2) 较快速的增殖能力; (3) 分化产生其他表型肿瘤细胞的能力; (4) 较强的致瘤性, 虽然其在人 ECCs 中仅占较低比例, 但其为起始肿瘤的关键细胞; (5) p75^{NTR} 阳性细胞对化疗药物较强的耐受能力。因此, 我们认为细胞表面抗原 p75^{NTR} 可以作为分选、鉴定人食管 CSCs 的标志。在本实验中, 我们也观察到, p75^{NTR} 阴性细胞在软琼脂中也能形成少部分克隆, 说明其也具有较弱的自我更新能力, 提示在此亚群细胞中仍有干细胞的存在, p75^{NTR} 可能并非人食管 CSCs 的唯一标志, 可能还有其他标志参与共同表达。在以后的研究中, 我们将联合其他标志进行食管 CSCs 的分离与鉴定。

[参考文献]

- [1] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, Weissman I L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414: 105-111.
- [2] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. *Nat Med*, 1997, 3: 730-737.
- [3] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice [J]. *Nature*, 1994, 367: 645-648.
- [4] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 5506-5511.
- [5] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, Morrison S J, Clarke M F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3983-3988.
- [6] Singh S K, Hawkins C, Clarke I D, Squire J A, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432: 396-401.
- [7] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, Bonn V E, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 5821-5828.
- [8] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, et al. Highly purified CD44⁺ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 1696-1708.
- [9] Collins A T, Berry P A, Hyde C, Stower M J, Maitland N J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 10946-10951.
- [10] Kim C F, Jackson E L, Woolfenden A E, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer [J]. *Cell*, 2005, 121: 823-835.
- [11] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351: 820-824.
- [12] O'Brien C A, Pollett A, Gallinger S, Dick J E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445: 106-110.
- [13] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. *Nature*, 2007, 445: 111-115.
- [14] Zhou L, Wei X, Cheng L, Tian J, Jiang J J. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line [J]. *Laryngo-scope*, 2007, 117: 455-460.
- [15] Barker P A, Murphy R A. The nerve growth factor receptor: a multicomponent system that mediates the actions of the neurotrophin family of proteins [J]. *Mol Cell Biochem*, 1992, 110: 1-15.
- [16] Muftaba T, Mayer-Proschel M, Rao M S. A common neural progenitor for the CNS and PNS [J]. *Dev Biol*, 1998, 200: 1-15.
- [17] Okumura T, Shimada Y, Imamura M, Yasumoto S. Neurotrophin receptor p75^{NTR} characterizes human esophageal keratinocyte stem cells *in vitro* [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 4017-4026.
- [18] Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 1999, 94: 2056-2064.
- [19] Terstappen L W, Huang S, Safford M, Lansdorp P M, Loken M R. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺ CD38⁻ progenitor cells [J]. *Blood*, 1991, 77: 1218-1227.
- [20] Singh S K, Clarke I D, Hide T, Dirks P B. Cancer stem cells in nervous system tumors [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 7267-7273.
- [21] Cifone M A. *In vitro* growth characteristics associated with benign and metastatic variants of tumor cells [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1982, 1: 335-347.

[本文编辑] 贾泽军