

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00252

肾透明细胞癌 CD133 的表达及其体外对 α -干扰素和 5-氟尿嘧啶处理效果的影响

翟羽佳^{1,2}, 常文军², 侯建国³, 谭晓洁², 马立业⁴, 曹广文^{2*}

1. 海军航空工程学院青岛分院, 青岛 266041
2. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433
3. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433
4. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

[摘要] **目的:** 观察肾透明细胞癌中是否存在类似肿瘤干细胞(TSC)特性的细胞, 并探讨这部分细胞对干扰素及化学治疗肾透明细胞癌疗效的影响。**方法:** 选用高转移性肾透明细胞癌细胞株 RCC05-TXJ、低转移性肾透明细胞癌细胞株 RCC05-ZYJ、临床原位肿瘤样本培养的低代数非转移性肾透明细胞癌细胞(来自男、女性患者各 1 例)。采用流式细胞术及免疫组化法检测上述 4 种细胞干细胞标志物 CD133 的表达情况; 采用 α -干扰素、5-FU 分别处理 4 种细胞, 用 MTT 法检测药物处理前后细胞存活率。**结果:** 流式细胞术检测结果发现转移性的 RCC05-TXJ 及 RCC05-ZYJ 细胞有 CD133 表达, 男、女性原位癌细胞 CD133 几乎不表达; 免疫组化结果显示 RCC05-TXJ 及 RCC05-ZYJ 在细胞膜上局部表达 CD133, 男、女性肾透明细胞癌细胞几乎不表达 CD133; 化疗药和干扰素干预组 RCC05-TXJ、RCC05-ZYJ 均出现撤药后 24 h 细胞存活率明显反弹现象, 而男、女性原位癌细胞在撤药后细胞存活率持续降低。**结论:** 肾透明细胞癌中存在少数 CD133 阳性具 TSC 特性的细胞, 这些细胞可能是影响干扰素及化疗效果的原因之一; 针对这部分细胞的治疗有望成为今后临床药物治疗的新方向。

[关键词] 肾肿瘤; 干扰素; 5-氟尿嘧啶; 肿瘤干细胞; CD133

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0252-04

Expression of CD133 in clear cell renal cell carcinoma cells and the related drug resistances

ZHAI Yu-jia^{1,2}, CHANG Wen-jun², HOU Jian-guo³, TAN Xiao-jie², MA Li-ye⁴, CAO Guang-wen^{2*}

1. Qingdao Branch, Naval Aeronautical Engineering Academy, Qingdao 266041, China
2. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433
3. Department of Urological Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433
4. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the expression of CD133 in the clear cell renal cell carcinoma (RCC) and to investigate the related drug resistance. **Methods:** Flow cytometry and immunohistochemical method were used to examine the expression of CD133 in metastatic RCC cell line RCC05-TXJ, low metastatic RCC cell line RCC05-ZYJ and two clinical non-metastatic RCC primary cultures isolated from a male and a female patient. The four cell lines were treated with IFN- α and 5-FU and the viability of cells were examined by MTT assay before and after treatment. **Results:** Flow cytometry showed that RCC05-TXJ and RCC05-ZYJ expressed CD133. The *in situ* carcinomas of male and female patients hardly expressed CD133. Immunohistochemistry examination showed that the local membrane of RCC05-TXJ and RCC05-ZYJ cells expressed CD133. RCC cells of female and male patients hardly expressed CD133. RCC05-TXJ and RCC05-ZYJ cells exposed to IFN- α or 5-FU showed a rebound of survival 24 h after withdrawal of drugs. The survival rates of RCC cells of male and female patients kept at a low level after withdrawal of drugs. **Conclusion:** There are a small number of CD133⁺ RCC cells in RCC patients, with a property similar to tumor stem cells, which might be one of the important factors influencing the immunotherapy and chemotherapy of tumors.

[KEY WORDS] kidney neoplasms; interferon; 5-fluorouracil; tumor stem cells; CD133

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(3):252-255]

[收稿日期] 2008-08-09 **[接受日期]** 2008-10-29

[基金项目] 国家自然科学基金(30370788, 30571609). Supported by National Natural Science Foundation of China(30370788, 30571609).

[作者简介] 翟羽佳, 硕士. E-mail: zhaiyujia.1982@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

肿瘤化疗、免疫治疗无效的主要原因是药物错误的靶向治疗。肿瘤干细胞理论提示必须重新评价抗肿瘤药物的作用机制和治疗靶位。近年来许多学者^[1-6]从神经上皮肿瘤和胶质瘤细胞系中分离出 CD133⁺肿瘤干细胞(tumor stem cells, TSC),提出 TSC 致瘤模型和 TSC 耐药模型。TSC 耐药模型很好地解释了目前胶质瘤药物治疗后肿瘤复发的原因。该理论已在乳腺癌^[7]、脑肿瘤^[6]、肺腺癌^[8]、前列腺肿瘤^[9]、胰腺癌^[10]、卵巢癌^[11]、部分消化道肿瘤细胞系^[12]中得到了证实。笔者推测肾癌中也存在少数 CD133⁺的具有 TSC 特性的细胞,这部分细胞可能是引起肾癌耐药和停药反弹的重要原因之一。本实验采用细胞免疫组化及流式细胞术检测 CD133 在肾癌细胞膜的表达情况,应用临床常用化疗药物及干扰素对细胞进行干预,初步探讨肾透明细胞癌是否也具有 CD133⁺、生物学行为类似 TSC 的极少数细胞,以及它对免疫、化疗治疗效果的影响及机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 2 株具有转移能力或倾向的细胞系,包括:汉族人肾透明细胞癌细胞株 RCC05-TXJ(具有明确的转移能力)和 RCC05-ZYJ(具有转移倾向),由本教研室前期建立^[13]。2 株由肾原位肿瘤(肾透明细胞癌)筛选出的不具备转移能力的细胞株,均处在培养的第 3 代,分别来源于 1 例男性和 1 例女性患者。罗扰素(α -干扰素,interferon- α , IFN- α)购自罗氏公司。5-氟尿嘧啶注射液(5-fluorouracil, 5-FU)购自上海旭东海普药业有限公司。MTT 试剂盒购自凯基生物公司。小鼠抗人 CD133 单克隆抗体(Miltenyi Biotec) 100 μ g/ml,使用时 1:100 稀释;四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记二抗(山羊抗小鼠)购自北京鼎国生物技术有限责任公司,原始浓度 1.5 mg/ml,使用时 1:100 稀释。DAPI 和抗荧光淬灭剂购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 流式细胞术检测 4 种细胞均选用含有 10% 小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)的 RPMI 1640 培养液培养,调整细胞状态,每种细胞准备约 1×10^7 个细胞准备平行重复 2~3 次。细胞用 D-Hank 液洗 3 遍,加入 0.25% 胰蛋白酶,37℃ 孵箱消化 5~10 min 并轻缓吹打 1~2 次,倒置显微镜下观察有部分消散成单细胞或小的细胞团即可。无血清 1640 终止消化,0.01% PBS 洗涤,重悬,离心(离心半径 132 mm,1 000 r/min) 5 min,加入 FITC 标记的 CD133,室温避光 30 min,0.01% PBS 洗涤,

0.5% 甲醛固定,上机。实验中设立空白对照组。

1.3 免疫组化染色 培养细胞贴片生长,PBS(pH 7.2~7.6)清洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 清洗 3 遍,30% H₂O₂ + 纯甲醇 1:50 混合,室温浸泡 30 min,PBS 清洗 3 遍,滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,滴加适当稀释的 CD133 抗体,4℃ 过夜。PBS 洗 3 次,每次 2 min,滴加 TRITC 标记荧光二抗,37℃ 40 min。PBS 洗 4 次,每次 5 min。DAPI 染核常温 5 min,封片。荧光显微镜下观察。每株细胞观察 5 个以上视野,计算每 100 个细胞中阳性细胞数。

1.4 药物干预实验

1.4.1 实验分组 设计 2 组实验,分别给予 IFN- α 12 000 U(100 μ l)和 5-FU 1×10^5 μ mol/ml(100 μ l),药物使用 1640 培养液稀释。每组所用 4 种细胞均设立 3 个复孔、3 个不加药物的对照孔及 3 个阴性对照孔。设定药物作用的 4 个时间点:给药后 2、12、24 h 和 24 h 后撤药再培养 24 h。

1.4.2 MTT 法测定细胞存活率 以每孔 1×10^4 细胞(100 μ l)接种于 96 孔培养板,置 37℃、5% CO₂、100% 湿度的条件下培养 24 h 后细胞贴壁。按照预先设计的药物分组、干预浓度进行实验。在预定的药物作用时间点后每孔加 $1 \times$ MTT(5 rag/L)50 μ l,在 37℃、5% CO₂、100% 湿度的条件下孵育 4 h;吸出上清液,每孔加 150 μ l DMSO,用平板摇床摇匀,酶联免疫测试仪测定 492 nm 波长下吸光度(D)值,计算方法为:细胞存活率 = (实验组 D 值 - 本底 D 值)/(对照组 D 值 - 本底 D 值) \times 100% (本底值为完全培养基加 MTT 后测得,无细胞)。

2 结果

2.1 细胞生长情况 2 株有转移性的细胞,RCC05-TXJ 细胞消化时间为 2~3 min(0.25% 胰酶、37℃、5% CO₂、100% 湿度),细胞贴壁时间短(2 h 即有 50% 以上细胞贴壁),传代时间为 2~2.5 d;RCC05-ZYJ 的生长情况与 RCC05-TXJ 相似,但传代时间略长,为 3~4 d。2 株来自肾癌原位的非转移性细胞消化时间均超过 5 min,贴壁时间长(50% 以上细胞贴壁需 12 h),传代为 5 d 左右,来自男性肾癌患者的原位株老化很快。

2.2 流式细胞术检测结果 药物干预实验中所用 4 种细胞经流式细胞术检测发现,具有转移性的 RCC05-TXJ 及 RCC05-ZYJ 细胞 CD133 阳性表达较高,男、女性原位癌细胞 CD133 几乎不表达,差异具有统计学意义(*t* 检验, $P < 0.01$,图 1)。

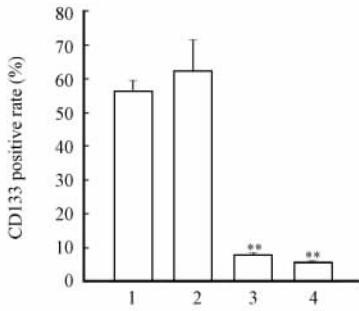


图 1 流式细胞术检测结果分析

Fig 1 Result of flow cytometry

1:RCC05-TXJ; 2:RCC05-ZYJ; 3:Cancer cell from male; 4:Cancer cell from female. ** $P < 0.01$ vs RCC05-TXJ; $n = 3, \bar{x} \pm s$

RCC05-ZYJ 细胞爬片上,少部分细胞可与抗 CD133-TRITC 结合,在荧光显微镜下见长满细胞的小载玻片上有稀疏的红色荧光,与细胞膜的位置吻合,但只在细胞膜上局部表达。用 DAPI 在同一张细胞爬片上复染,见细胞轮廓清晰,数量密集,且染色浓深,说明细胞活性好,且 CD133 只在少数细胞中表达,其余的大多数细胞均不表达(图 2A)。男、女性原位癌细胞爬片 DAPI 染色效果好,男性原位癌细胞未见 CD133 阳性表达,女性原位癌细胞的载玻片上有一处微弱的红色荧光(图 2B)。CD133 阳性细胞计数(每 100 个细胞):RCC05-TXJ 为(5.4 ± 1.14)个,RCC05-ZYJ 为(4.6 ± 0.89)个,男性原位肾癌细胞株为 0,女性原位肾癌细胞株为(0.2 ± 0.45)个,与上述流式细胞术检测结果相符。

2.3 CD133免疫组化检测结果 在RCC05-TXJ及

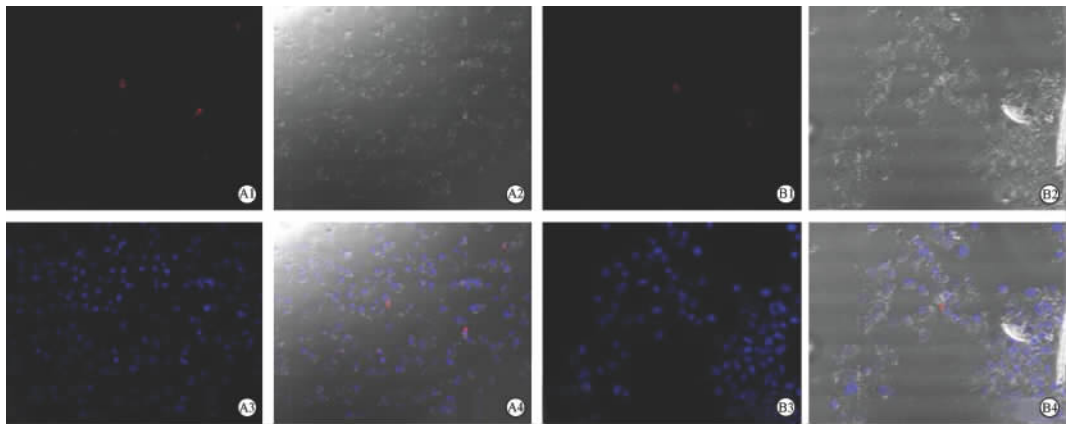


图 2 细胞免疫组化共聚焦图

Fig 2 Immunohistochemistry of cells (TRITC and DAPI staining, CD133)

A:RCC05-TXJ,Original magnification:×100;B:Primary RCC cells, generation 5,female, Original magnification:×200. A1,B1:TRITC;A2,B2:Blank;A3,B3:DAPI;A4,B4:TRITC+DAPI

2.4 药物干预实验结果 在干扰素处理组,前 3 个用药时间点(2、12、24 h)4 种细胞存活率均明显下降,但撤药 24 h 后 RCC05-TXJ 细胞存活率明显升高为用药 24 h 的 2.19 倍,RCC05-ZYJ 细胞存活率也明显升高为用药 24 h 的 1.72 倍,而 2 株原位癌细胞在撤药后细胞存活率仍持续下降(t 检验, $P < 0.01$,图 3A)。

化疗药处理组与干扰素组结果相似,前 3 个用药时间点(2、12、24 h)4 种细胞存活率均明显下降,撤药 24 h 后 RCC05-TXJ 细胞存活率升高为用药 24 h 的 1.22 倍,RCC05-ZYJ 细胞存活率升高为用药 24 h 的 1.19 倍,2 株原位癌细胞在撤药后细胞存活率持续下降(t 检验, $P < 0.05$,图 3B)。

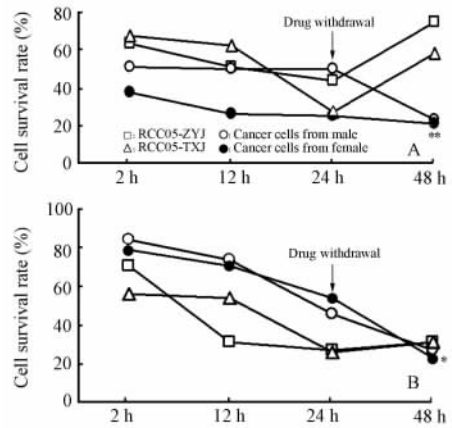


图 3 IFN-α(A)及5-FU(B)用药后4组细胞存活率比较

Fig 3 Comparison of survival rates of cells after treated with IFN-α(A) and 5-FU(B)

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs RCC05-TXJ; $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

目前在血液和实体肿瘤中的干细胞研究进展表明, TSC 是发生肿瘤耐药的根源。TSC 对药物是天然耐受的, 它能凭借正常干细胞所赋予的自身更新能力和处于静止期的特性而逃脱药物的杀伤作用, 从而导致肿瘤的复发和转移。TSC 可能经过基因突变的积累把这种多药耐药机制遗传下来; 或存在基因突变和分化异常导致复发的肿瘤出现多药耐药性^[14-16]。这就可以解释为什么本来不具有耐药性的肿瘤在化疗后复发并获得多药耐药性。目前的化疗药物多数是细胞周期抑制剂, 而干扰素类药物也只能通过免疫系统对处于细胞周期中的细胞起作用, 所以它们对 TSC 的消除无效。

肾细胞癌 (renal cell carcinoma, RCC) 是泌尿系统常见的恶性肿瘤, 占全球内脏恶性肿瘤的 2.6%, 发病率约占肾肿瘤的 85%, 近年来 RCC 的发病率和病死率不断上升^[17]。目前除手术治疗外, 应用较为广泛的治疗方法为化疗和免疫治疗, 但这些疗法个体差异性较大, 且效果不理想, 部分患者停药后病情反弹严重。作者推测可能与 TSC 耐药理论相同, 肾细胞癌中也存在少数以 CD133 为细胞表面标志物、生物学行为与 TSC 相似的细胞, 正是由于这部分细胞的存在而导致肾细胞癌的耐药和复发。证据如下: (1) 免疫组化和流式细胞术检测结果证实肾癌细胞中也存在 CD133⁺ 细胞, CD133 在细胞膜上局部表达; (2) 比较本实验所选 4 株细胞, CD133⁺ 细胞数量极少, 但含有 CD133⁺ 细胞的细胞株消化、贴壁和增殖时间短, 具有较强的增殖、浸润和转移能力, 而不含 CD133⁺ 细胞的细胞株上述能力相对很差; (3) 药物干预实验结果证实, 目前肾细胞癌治疗的常用药物只能针对多数肾癌细胞, 在多数肾癌细胞被杀灭后, CD133⁺ 细胞仍然存活, 停药后这部分未被药物杀灭的 CD133⁺ 细胞重新进入细胞周期, 引起肿瘤复发。以上证据均符合目前的 TSC 理论。

我们的实验仅能证明肾细胞癌中存在 CD133⁺、生物学特性与 TSC 相似的细胞, 这部分细胞是目前药物治疗的主要障碍之一, 但这部分细胞是否是肾癌干细胞, 还具有什么生物学特性, 是否来源于正常干细胞基因突变等一系列问题, 仍需进一步研究。

总之, 肾细胞癌的异质性决定了肿瘤组织中仅存在小部分的类 TSC 对化疗、免疫治疗产生持续的内在耐药性。作者认为, 肾癌治疗的关键是以这部分细胞为治疗靶点, 即新的肾癌药物应可选择地消

除这部分具有 TSC 特性的细胞而不损伤正常的干细胞, 同时杀死静止期和增殖期的肿瘤细胞, 达到治愈肿瘤的目的。TSC 耐药理论有助于目前在肿瘤治疗研究方面观念的转变及对肿瘤耐药本质的解释, 为临床上肾细胞癌的综合治疗提供新的思路和治疗靶点。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 邓永文, 方加胜, 李茗初, 陈风华, 刘劲芳, 伍军, 等. 胶质瘤中肿瘤干细胞的分离、培养及鉴定[J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15:2449-2452.
- [3] 方加胜, 邓永文, 李茗初, 陈风华, 王延金, 卢明, 等. 神经上皮来源脑肿瘤干细胞的分离培养与鉴定[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87:298-303.
- [4] Donnenberg V S, Donnenberg A D. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis[J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45:872-877.
- [5] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5:275-284.
- [6] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:781-786.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [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] Li C, Heidt D G, Dalerba P, Burant C F, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67:1030-1037.
- [11] Bapat S A, Mali A M, Koppikar C B, Kurrey N K. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:3025-3029.
- [12] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard G F, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system[J]. *Stem Cells*, 2006, 24:506-513.
- [13] 翟羽佳, 谭晓洁, 侯建国, 肖建如, 徐丹枫, 余永伟, 等. 汉族人肾透明细胞癌细胞系的建立[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29:479-484.
- [14] Zhai Y J, Tan X J, Hou J G, Xiao J R, Xu D F, Yu Y W, et al. Establishment of clear cell renal cell carcinoma lines of Han nationality in China[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29:479-484.
- [15] 曾新益. 肿瘤学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2003:405-407.
- [16] Cohen H T, McGovern F J. Renal-cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353:2477-2490.