

• 论 著 •

CD44 通过重编程 SP 侧群细胞影响鼻咽癌的进展

吴 峰¹, 朱圣明¹, 王 科¹, 曹传华^{2△}

(1. 湖北省十堰市太和医院/湖北医药学院附属医院肿瘤科, 湖北十堰 442000; 2. 湖北文理学院附属襄阳市中心医院肿瘤科, 湖北襄阳 441021)

摘 要:目的 探讨 CD44 通过重编程侧群细胞和影响鼻咽癌进展的分子机制。方法 利用超高速细胞分选平台, 鉴定、分选鼻咽癌细胞系 SP 侧群细胞。从蛋白质水平研究鼻咽癌细胞、SP 侧群细胞生物学特性及其影响鼻咽癌进展的分子机制。结果 CD44 分子作用网络中 CXCR4、CD31、MMP-9 在 SP 细胞中表达上调($P < 0.05$); CD44 及其下游调控分子 ZAP70 蛋白在 SP 细胞中表达增高($P < 0.05$)。MTT 细胞加入 SP 细胞中肿瘤微球的数目显著增加($P < 0.05$)。CD44 分子作用网络中 CXCR4、CD31、MMP-9、ZAP70 蛋白在 SP 细胞中表达与肿瘤微球的数目呈正比($P < 0.05$)。结论 CD44 通过重编程 SP 侧群细胞影响鼻咽癌的进展。

关键词:鼻咽癌; 肿瘤干细胞; CD44; 侧群细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.14.027 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)14-2078-02

CD44 can affect the progression of nasopharyngeal carcinoma by reprogramming the SP side population cells

WU Feng¹, ZHU Shengming¹, WANG Ke¹, CAO Chuanhua^{2△}

(1. Department of Oncology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Xiangyang Central Hospital Affiliated to Hubei University of Arts and Sciences, Xiangyang, Hubei 441021, China)

Abstract: **Objective** To explore the molecular mechanism of CD44 can affect the progression of nasopharyngeal carcinoma by reprogramming the SP side population cells. **Methods** Identification and sorting of side population cells of nasopharyngeal carcinoma cell line SP by super high speed cell sorting platform. The biological characteristics of nasopharyngeal carcinoma cell and SP side population and the molecular mechanism of its influence on the progression of nasopharyngeal carcinoma were explored from the protein level. **Results** CD44, CD31 and MMP-9 were up-regulated in CXCR4 cells ($P < 0.05$) in SP cells. The expression of ZAP70 protein in SP cells was increased in CD44 and its downstream regulatory molecules ($P < 0.05$). The number of MTT cells added to SP cells was significantly increased ($P < 0.05$). The expression of CXCR4, CD31, MMP-9 and ZAP70 protein in SP cells were proportional to the number of tumor microspheres ($P < 0.05$) in CD44 cells. **Conclusion** CD44 affects the progression of nasopharyngeal carcinoma by reprogramming the SP side population cells.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; tumor stem cells; CD44; side population cells

鼻咽癌通常是指鼻咽部上皮细胞出现病变而导致的一种恶性肿瘤, 常见于我国南方地区, 其致病因素包括化学及物理致癌、病毒感染、原癌和抑癌基因突变, 以及染色体异常等, 然而目前临床尚未完全清楚鼻咽癌的发病机制。肿瘤干细胞(CSCs)作为一种可以无限自我更新并能多向分化的细胞, 可以利用对称、不对称的分裂方式进行增殖, 在肿瘤的发生、转移过程中起关键作用。而 SP 侧群细胞的增殖、迁移及自我更新能力较强, 具有和肿瘤干细胞细胞周期相似的生物学特性^[1-3]。最新研究发现 SP 侧群细胞特性可以很好地为研究 CSCs 提供新的思路^[4-5]。现通过研究 CD44 重编程 SP 侧群细胞影响鼻咽癌的进展, 为鼻咽癌诊疗提供理论支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料 鼻咽癌细胞系: 未分化 NPC 细胞系(C666-1), 高分化 NPC 细胞系(HK-1), 由香港中文大学建株; 低分化鼻咽癌细胞系(HNE-1、HNE-2), 由本研究团队建株; 所有细胞均采用 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基进行贴壁培养。

1.2 研究方法

1.2.1 SP 侧群细胞的培养增殖 (1) 细胞传代: 采用 1% 的胰蛋白酶消化鼻咽癌细胞 1 min, 加培养基终止消化后离心, 弃上清液, 分装细胞于预热 10% 血清的培养基中。(2) 细胞染

色: 在黑暗环境中对细胞进行染色, 染色分实验组和对照组, 实验组采用细胞悬浮液中加入终浓度; 对照组在实验组的基础上加阻断剂维拉帕米。(3) 细胞孵育: 全程避光将细胞悬液均匀混合后立刻放入恒温水浴。孵育结束后离心, 弃上清液, 使用预冷的 PBS 清洗细胞, 然后离心, 倒掉上清液, 并充分吸干, 重悬细胞。细胞在冰上保存, 用于控制染料的外排。

1.2.2 MTT 细胞的培养增殖 流程同上。

1.2.3 肿瘤微球形成实验 按照每孔个细胞将新鲜纯化的细胞接种在超低黏附型孔板中, 设置个复孔。在培养箱中采用选择性培养基培养 10 d, 观察肿瘤微球的形成情况, 并在显微镜下统计出现明显的肿瘤微球的个数。

1.2.4 使用 ELISA 法 检测 CD44 分子作用网络中 CXCR4、CD31、MMP-9 在 SP 细胞中的表达情况。

1.2.5 使用 ELISA 法 检测 CD44 的下游调控分子 ZAP70 蛋白在 SP 细胞中的表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析, 计数资料以例数或百分率表示, 使用 χ^2 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CXCR4、CD31、MMP-9 的表达结果 CD44 分子作用网

络中 CXCR4、CD31、MMP-9 在 SP 细胞中的表达上调 ($P<0.05$);CD44 及其下游调控分子 ZAP70 蛋白在 SP 细胞中的表达增高 ($P<0.05$)。MTT 细胞加入 SP 细胞中肿瘤微球的数目显著增加[(18.20±2.14)、(29.54±7.51)个/视野] ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 CXCR4、ZAP70、CD31、MMP-9 在 SP 细胞中的表达结果($\bar{x}\pm s$,ng/g)

项目	SP 细胞	(MTT+SP)细胞	P
CXCR4	111.85±17.34	202.14±25.27	<0.05
ZAP70	30.65±2.98	65.17±17.34	<0.05
CD31	58.76±12.55	211.85±17.34	<0.05
MMP-9	380.85±40.31	211.85±17.34	<0.05

2.2 CXCR4、CD31、MMP-9、ZAP70 蛋白的表达结果 CD44 分子作用网络中 CXCR4、CD31、MMP-9、ZAP70 蛋白在 SP 细胞中的表达与肿瘤微球的数目呈正比 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 CXCR4、CD31、MMP-9、ZAP70 蛋白与肿瘤微球的相关性

指标	CXCR4	CD31	MMP-9	PCⅢ
IL-17	$r=0.94,P<0.05$	$r=0.93,P<0.05$	$r=0.93,P<0.05$	$r=0.94,P<0.05$

3 讨 论

鼻咽癌是我国南方特别高发的一种恶性肿瘤,目前对其发病机制仍未完全明确。鼻咽癌治疗面临的最大挑战是肿瘤细胞的转移和复发,临床对肿瘤细胞的转移和复发机制及原因并不明确。近年来,CSCs 理论认为,肿瘤复发、转移,以及对治疗的耐受等均与 CSCs 相关。CSCs 理论为肿瘤治疗提供的新思路,并逐步成为肿瘤研究的热点,被研究者接受。SP 侧群细胞是通过流式细胞仪观察染色后的小鼠骨髓细胞时发现的一类染色程度普遍较低的细胞,由于其偏离主群细胞而被称作 SP 侧群细胞^[6-8]。侧群细胞在体内具有强致瘤性,对放化疗具有抵抗性,其与 CSCs 有较多共性。SP 侧群细胞具有和 CSCs 类似的特性,包括自我更新速度快、耐药性强、多向分化及高致瘤性等,因此将其作为 CSCs 研究的切入点,为 CSCs 分子机制及生物学功能研究奠定基础。SP 侧群细胞具有造血干细胞的表面标志,通过极少量细胞就可重新建立骨髓造血系统,而这种表型和细胞表面蛋白成员转运蛋白家族密切相关^[9-11]。通过细胞分析法从众多肿瘤组织、细胞中鉴定并分离出细胞。进一步研究发现,SP 侧群细胞的多向分化、自我更新、周期静止、高致瘤性、放化疗抵抗等方面与 CSCs 有相似的特点^[12]。大量实验证明,CSCs 启动并参与肿瘤的形成和转移过程,因此缺乏特定 CSCs 标志物的前提下,细胞分析法可作为鉴定、分离肿瘤细胞的有效方法之一。另有研究报道,其通过透明质酸与非基质配体相互作用,调节细胞之间、细胞与细胞外基质之间的连接,引发多种恶性肿瘤的迁移、侵袭等应答反应,这种复杂的复合物共同激活下游信号通路,从而调节肿瘤细胞的趋药性、增殖等生物活性。

本研究表明,黏附因子、基质金属蛋白酶水平在细胞中的表达升高,其原因可能是 SP 侧群细胞通过募集协同复合物而激活下游信号通路,从而改变细胞的侵袭潜能。CD44 是一种跨膜受体蛋白,属于黏附分子家族,可与透明质酸等配体

结合,介导细胞与细胞、细胞与基质之间的黏附,已在鼻咽癌中的表达得到证实,其高表达与鼻咽癌颈部淋巴结转移及远处转移高度相关,同时又是 Wnt/ β -catenin 信号通路下游区的靶基因,具有抗凋亡、增殖能力强、稳定传代等一系列干细胞特性,提示 CD44 为 CSCs 标志物,为分子靶向治疗提供新的靶点。

本研究仅证明该假设的部分内容,后期仍需研究这些通路影响 CSCs 导致其增殖、迁移的可能机制。CSCs 样细胞的差异表达及其一系列信号级联反应,有待深入探索,为鼻咽癌及其他实体瘤诊疗提供新的方法。

综上所述,CD44 分子作用网络中 CXCR4、ZAP70、CD31、MMP-9 在 SP 细胞中表达上调;CD44 及其下游调控分子 ZAP70 蛋白在 SP 细胞中表达增高。表明 CD44 通过重编程 SP 侧群细胞影响鼻咽癌的进展。

参考文献

[1] 陈伟,姜楠,张彤,等. 肝癌细胞株 Bel-7402 中侧群细胞的分离和致瘤能力[J]. 中山大学学报(医学科学版),2012,33(5):561-566.

[2] 黄涛,周奇,宫东伟,等. 肝癌 SMMC-7721 细胞中侧群细胞分选及其生物学特性的研究[J]. 中国病理生理杂志,2011,27 (3):523-527.

[3] 李雪,汪学非,唐兆庆,等. 胃癌侧群细胞检测分选及其增殖能力的初步分析[J]. 复旦学报(医学版),2009,36 (1):10-13.

[4] 李雪,汪学非,唐兆庆,等. 盆腔浆液性肿瘤患者腹水中侧群(SP)细胞及乙醛脱氢酶阳性(ALDH+)细胞比例高于原发灶[J]. 复旦学报(医学版),2014,41(6):727-733.

[5] 王波,杨欢,黄玉政,等. 人小细胞肺癌细胞株 H 446 侧群细胞的生物学特征[J]. 癌症,2010,29(3):272-278.

[6] 于锋,艾毛毛,周毅波. 喉癌中侧群细胞的分选及其体外生物学特性[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28 (18):1418-1422.

[7] 于锋,艾毛毛. 喉癌细胞株 Hep-2 中侧群细胞分选条件优化[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(15):1137-1141.

[8] 郑丹薇. CD38 在鼻咽癌侧群细胞中高表达并通过影响 ZAP70 信号通路发挥其生物学效应[D]. 长沙:中南大学,2014.

[9] 熊姗姗,邱前辉,詹建东,等. CD44 在鼻咽癌侧群细胞中的表达及意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2015,29 (9):841-844.

[10] 仇飞飞,万光伦,陈召灵,等. 稳定转染 ABCG2 shRNA 真核沉默载体的人喉癌 Hep-2 细胞的建立及其 SP 检测[J]. 安徽医药,2014,18(10):1888-1891.

[11] 洪锐,钟琦,宋舸,等. 人喉癌组织及喉癌细胞系肿瘤干细胞表面标记的差异[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2011,18 (9):461-464.

[12] 张婉姣,兰玲,郑旭琴,等. 甲状腺癌中类干细胞的侧群细胞的分离及鉴定[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2012,32(5):585-591.