

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000009

CD133⁺ 细胞的干性鉴定及 ¹³¹I-CD133 抗体对其体内外抑制作用

段丽群, 侯妍利, 陈兴月, 唐 敏, 康强强, 舒 锦, 李少林

(重庆医科大学基础医学院放射医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究 CD133⁺细胞的干性鉴定和 ¹³¹I-CD133 抗体在体内外对人肝癌 CD133⁺-HepG2 干细胞的抑制作用。**方法:**氯胺 T 法制备并鉴定 ¹³¹I-CD133 抗体;免疫磁珠(magnetic-activated cell sorting, MACS)分选 CD133⁺-HepG2 细胞;流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测分选前后 CD133 表达率;体外克隆形成实验、成球实验和体内成瘤实验验证其干细胞特性;将分选出的 CD133⁺细胞分组为 CD133 抗体、¹³¹I-¹³¹I-CD133 抗体和 ¹³¹I+CD133 抗体 4 个组, MTT 法检测不同处理后不同组中 CD133⁺细胞生长抑制率;成功构建人肝癌 CD133⁺-HepG2 移植瘤模型;随机分 4 组, 1 次/2 d 给予尾静脉用药, 共 14 次。4 周后, 处死小鼠, 比较肿瘤的体积、质量、计算抑瘤率;HE 染色观察肿瘤组织病理学改变。**结果:**¹³¹I-CD133 抗体标记率为 89.34%, 纯化纯度为 98.21%。流式显示分选前后 CD133 表达率分别为 $(1.78 \pm 0.54)\%$ 和 $(98.46 \pm 0.97)\%$ 。成球实验、克隆形成实验和裸鼠成瘤实验显示 CD133⁺细胞相对于 CD133⁻细胞更具有干细胞特性。¹³¹I-CD133 抗体治疗组体外对细胞抑制率及体内抑瘤率明显高于其余各实验组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:**¹³¹I-CD133 抗体在体内外均能有效抑制人肝癌 CD133⁺-HepG2 细胞的生长。

【关键词】CD133; 肝癌干细胞; ¹³¹I; 单克隆抗体; 裸鼠

【中图分类号】R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-10

作者介绍:段丽群, Email: qunqunduan1314@163.com,

研究方向: 肝癌干细胞体内显像与靶向治疗。

通信作者:李少林, Email: lishaolin@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(编号:30970843、81171365)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000009.html>

少, 提示人工设计的 ZFP 可抑制 HBX 蛋白表达, 为后续实验奠定了基础。

HepG2.2.15 细胞是一株完整整合有 HBV 基因组的 HepG2 细胞, 能稳定表达 HBsAg、HBeAg 以及 Dane 颗粒, 并可在细胞内检测到 cccDNA, 是目前国际上研究 HBV 复制与筛选抗 HBV 药物的经典细胞模型。实验结果证实, 与阴性对照组相比, ZFP 转染入 HepG2.2.15 细胞后, 可明显检测到 HBV mRNA, HBV DNA 和 HBeAg 的显著减少, 提示人工设计的 ZFP 可以抑制 HBV 的转录。

本文率先设计并验证了结合于 HBX 基因启动子的 ZFP 可明显干扰 HBV 的转录, 抑制病毒的复制, 但是 ZFP 在体内实验中是否也存在同样效果有待于进一步探索。

参 考 文 献

[1] Kuo TC, Chao CC. Hepatitis B virus X protein prevents apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by up regulating SATB1 and HURP ex-

pression[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(7): 1093-1102.

[2] Arzumanyan A, Friedman T, Ng IO, et al. Does the hepatitis B anti-gen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells? [J]. Cancer Res, 2011, 71(10): 3701-3708.

[3] Yu J, Liang QY, Wang J, et al. Zinc-finger protein 331, a novel putative tumor suppressor, suppresses growth and invasiveness of gastric cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(3): 307-317.

[4] Mori H, Ueno-Noto K. A theoretical study of the physicochemical mechanisms associated with DNA recognition modulation in artificial zinc-finger proteins[J]. J Phys Chem B, 2011, 115(16): 4774-4780.

[5] 李 鑫, 吴忠均, 陈 聪. 特异性结合于 HBV X 基因启动子的人工锌指蛋白真核表达载体的构建及表达[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(3): 270-273.

[6] Hiraoka D, Yoshida W, Abe K, et al. Development of a method to measure DNA methylation levels by using methyl CpG-binding protein and luciferase-fused zinc finger protein[J]. Anal Chem, 2012, 84(19): 8259-8264.

[7] Wilson KA, Chateau ML, Porteus MH. Design and development of artificial Zinc finger transcription factors and Zinc finger nucleases to the hTERT Locus[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2013. doi: 10.1038/mtna.2013.12. [Epub ahead of time].

(责任编辑: 冉明会)

Identification of the stem property of CD133⁺ liver cancer cells and inhibition effect of ¹³¹I-labeled anti-CD133 mAb on them in vitro and vivo

Duan Liqun, Hou Yanli, Chen Xingyue, Tang Min, Kang Qiangqiang, Shu Jin, Li Shaolin

(Department of Radiation Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the identification the stem property of CD133⁺ liver cancer cells and inhibition effect of ¹³¹I-labeled monoclonal antibody (mAb) against CD133 on them in vitro and vivo. **Methods:** The monoclonal antibody CD133 labeled with ¹³¹I was prepared using the chloramines-T method and its stability was evaluated. Magnetic-activated cell sorting (MACS) was used to isolate CD133⁺ and CD133⁻ cells from HepG2 cells. Flow cytometry (FCM) was used to detect the expression of CD133 before and after the cell isolation. The stem cell properties of sorted CD133⁺ cells were validated by sphere-forming assay, colony formation assay in vitro and tumorigenesis experiment in vivo. There were four groups including ¹³¹I-labeled anti-CD133 mAb group, ¹³¹I group, CD133 mAb group and ¹³¹I+CD133 mAb group. The inhibitory effects of different treatments on the proliferation of CD133⁺ cells were measured by MTT assay. The animal model was established by subcutaneous inoculation of CD133⁺-HepG2 cells (5×10^4) to right front legs of BALB/c mice. After tumor model being established, 12 mice were randomly divided into 4 groups. Drugs were injected into the tail vein of the nude mice at a frequency of one time/2 d (14 times in total). The tumor size and volume were measured twice a week after the treatment and the tumor inhibitory rate was calculated. After 4 weeks, the mice were sacrificed for pathological examination. **Results:** The labeling ratio of the ¹³¹I-labeled anti-CD133 mAb was 89.34% and the radiochemical purity was 98.21%. The sorted CD133⁺ cells showed a high purity (98.46 ± 0.97)% compared with that before cell sorting (1.78 ± 0.54)%. CD133⁺ cells showed a high tumor sphere formation ability and tumorigenesis capacity compared with those of CD133⁻ cells. The tumor inhibitory rate of CD133⁺ cells was significantly higher in ¹³¹I-labeled anti-CD133 mAb group than in ¹³¹I group, CD133 mAb group and blank control group in vivo and vitro ($P < 0.05$). **Conclusion:** ¹³¹I-labeled anti-CD133 mAb can effectively inhibit the growth of CD133⁺-HepG2 cells in vivo and vitro.

【Key words】CD133; liver cancer stem cells; ¹³¹I; monoclonal antibodies; nude mice

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 起病隐匿, 预后较差, 是中国死亡率最高的癌症之一^[1]。目前临床上肝癌在手术、放化疗后仍常见复发和转移, 主要原因是由于肿瘤细胞对放疗和化疗的抵抗^[2]。最近的研究^[3-8]发现, 几乎所有的肿瘤中都潜伏着极少的肿瘤干细胞, 是癌症产生、复发、转移的根源。已有研究发现肝癌中也存在着肿瘤干细胞, 和肝癌细胞比较, 具有高致瘤性^[9-12], 在放化疗中表现出更强的抵抗性的特点^[13-14]。因此, 寻找疗效确切、不良反应轻、患者耐受好的新型治疗方法具有非常重要的临床意义。基于本课题的前期研究成果, 本实验以肝癌干细胞标志物 CD133 蛋白为治疗靶点, 选用 ¹³¹I 标记 CD133 单克隆抗体, 研究其在体内外对肝癌 CD133⁺-HepG2 细胞生长的抑制作用, 探讨将其用于肝癌放射免疫治疗的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌 HepG2 细胞由本实验室保存; 12 只 BALB/c 裸鼠 (SPF 级, 雌雄各半, 体质量 20~26 g, 4~6 周龄) 购自重庆医科

大学实验动物中心, 饲养于恒温 (25 ℃)、恒湿 (45%) 的 SPF 级层流架中 [动物合格证号: SCXK (京) 2009-2007]; Na¹³¹I 由重庆医科大学附属第一医院核医学科提供; 新生胎牛血清、DMEM 及 DMEM/F12 (1:1) 培养基均购自 Gibco 公司; MACS 系统、CD133 MicroBead 抗体、CD133/2-PE 流式抗体、CD133/1-pure Western blot 抗体、FcR Blocking 阻断剂均购自德国 Miltenyi Biotec 公司; CD133 单克隆抗体购自 Immunoway 公司; 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 及胰岛素均购自美国 Pe-pro Tech 公司; MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 粉购自碧云天生物技术研究所产品; Giemsa 染液试剂购自北京索莱宝公司; 氯胺-T 购自天津天台精细化学品公司; 偏重亚硫酸钠购自温州东升化工试剂厂。

1.2 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞以含 10% 新生胎牛血清的 DMEM 培养基置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度孵育箱中培养, 待细胞覆盖率达 80%~90% 时按 1:2 或 1:3 传代, 取对数生长期细胞进行磁珠分选。

1.3 实验方法

1.3.1 ¹³¹I-CD133 抗体的制备和鉴定 采用氯胺 T 法将 Na¹³¹I 标记抗 CD133 单克隆抗体并纯化。以 37 MBq Na¹³¹I: 50 μg CD133 的比例标记, 在 SN-684 型放射免疫计数仪上测量

放射性计数,并采用纸层析法计算标记率、放射性化学纯度、放射性浓度、比活度。标记率(%)=第一峰(^{131}I -CD133 抗体)的放射性测量值/所有洗脱液的放射性测量值。放射化学纯度(%)=纸层析中 ^{131}I -CD133 抗体的放射性计数/所有纸段的放射性计数之和。放射性浓度=放射性活度(Bq)/样品体积(ml)。比活度=投入的 Na^{131}I 总量×标记率/投入的 CD133 抗体量。

1.3.2 免疫磁珠细胞分选(magnetic-activated cell sorting, MACS)CD133⁺细胞 取对数生长期 HepG2 细胞 10^8 数量级进行免疫磁珠分选:①细胞经磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤后,适量胰酶消化,缓冲液洗涤,重悬,1 200 r/min,离心 10 min,充分去上清。②300 μl 缓冲液重悬细胞,加入 100 μl FcR Blocking 阻断剂,再加入 100 μl CD133 MicroBead 抗体,充分混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。③加入 1~2 ml 缓冲液清洗细胞,1 200 r/min,离心 10 min,充分去除上清液。④用缓冲液重悬细胞至 500 μl 。⑤放置好分选架、分选器、MS 柱及滤器,向滤器中加入 500 μl 缓冲液润洗分选柱。⑥将先前准备好的细胞过柱,分别收集 CD133⁺细胞与 CD133⁻细胞并计数。将分选得到的 CD133⁺细胞在含有 EGF 20 ng/ml、bFGF 10 ng/ml、BSA 4%、胰岛素 5 mg/ml 的 DMEM/F12 培养基中培养。

1.3.3 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测分选前后 CD133 表达率 取分选前的 HepG2 细胞、分选后的 CD133⁺细胞,重悬细胞到 1×10^7 个/80 μl 缓冲液,加入 20 μl FcR Blocking 阻断剂,加 10 μl CD133/2 抗体,充分混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光冻存 20 min,加入 1~2 ml 缓冲液,1 200 r/min,离心 10 min。用适量 buffer 液重悬细胞,用于流式检测。

1.3.4 克隆形成实验对比 CD133⁺细胞与 CD133⁻细胞克隆形成能力 采用梯度倍数稀释法将 CD133⁺细胞与 CD133⁻细胞稀释至 1×10^4 个/ml,以 1 000 个细胞每孔分别接种于 6 孔板中,每 3 d 换液,10~14 d 后终止培养。弃去上清液,用 PBS 浸洗 2 次。用甲醇固定 2~3 min 后,加入提前配置好的 Giemsa 染液试剂(A:B=1:9)1.5 ml/孔,染色 30 min,然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。最后于普通光学显微镜下计数 ≥ 50 个细胞的集落,并计算克隆形成率(plating efficiency, PE):PE=集落数目/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3.5 BALB/c 裸鼠成瘤实验 [BALB/c 裸鼠:专业名称为 CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlVr,由 Charles River Japan(CRJ)公司通过对 BALB/cABon-nu 鼠和 BALB/cAnNCrj-nu 鼠进行交配和回交得到]将分选后的 CD133⁺、CD133⁻细胞调整成 1×10^2 个/200 μl 、 1×10^3 个/200 μl 、 1×10^4 个/200 μl 、 1×10^5 个/200 μl 4 个浓度,分别接种到 12 只 BALB/c 裸鼠两侧前臂皮下:左侧 CD133⁻细胞,右侧 CD133⁺细胞。每种浓度接种 3 只裸鼠。每周观察 2 组裸鼠的成瘤和生长情况,连续观察 4 周。以肿瘤直径 ≥ 0.5 cm 为种植瘤成功,裸鼠死亡或肿瘤直径 <0.5 cm 为种植失败。同时取对数生长期的 CD133⁺细胞以 5×10^4 个/200 μl 浓度接种于另外 12 只裸鼠右前肢皮下。观察生长情况,待肿瘤直径至 1.5~2.0 cm 时用于下一步实验。

1.3.6 免疫组化染色及结果判定 取其中 3 只两侧均成瘤的裸鼠的肿瘤组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片染色,免疫组化检测 CD133 的表达。滴加 CD133 单克隆抗体(1:100)及 PBS,以肿瘤细胞膜出现黄褐色颗粒且着色强度高于背景非特异性染色为 CD133 阳性。评分标准:0,无阳性染色;+,弥散弱的包膜染色,强染色的细胞数 $<10\%$;++,中等至强的胞膜染色,阳性细胞数 10%~90%;+++,90%以上的细胞强染色。0~+为低表达,++~+++为高表达。

1.3.7 MTT 法检测 ^{131}I -CD133 抗体对 CD133⁺-HepG2 细胞生长抑制 设立 ^{131}I -CD133 抗体组、 ^{131}I 组、CD133 抗体组、 ^{131}I +CD133 抗体组,每组 3 个复孔。将 CD133⁺细胞接种 96 孔板,用干细胞培养基将 ^{131}I -CD133 抗体、 ^{131}I 、CD133 抗体分别调整至浓度 18 MBq/ml(CD133 抗体约 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、18 MBq/ml、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ^{131}I +CD133 抗体组中 ^{131}I 浓度为 18 MBq/ml,CD133 浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$;对照组为单纯干细胞培养基培养细胞,每孔加 100 μl 干细胞培养基。上述各组培养 3 h 后,第 1、3、4 组换液移去未结合抗体,第 2 组加含同样浓度的 ^{131}I 完全培养基 100 μl ,继续培养 12、36 h 后加 20 $\mu\text{l}/\text{孔}$ MTT(5 mg/ml)染液,孵箱中继续培养 6 h 后,吸上清,每孔加 100 μl DMSO,避光震荡 10 min。酶标仪上,570 nm 波长测定各孔吸光度(absorbance, A)值,计算抑制率。抑制率=(1-实验组 A 值/对照组 A 值) $\times 100\%$ 。

1.3.8 BALB/c 裸鼠分组治疗观察 用药前 3 d 至治疗结束后 7 d 所有实验鼠喂 K^{131}I ,以封闭甲状腺。将 12 只裸鼠随机分为 4 组:生理盐水对照组(注射生理盐水 0.1 ml)、 ^{131}I -CD133 抗体组(注射 ^{131}I 约 37 MBq,CD133 抗体约 25 μg)、 ^{131}I 组(注射 ^{131}I 约 37 MBq)和 CD133 抗体组(注射 CD133 抗体约 25 μg),1 次/2 d,共 14 次。均采用尾静脉注射。每 3 d 用游标卡尺测量一次肿瘤最大直径(a)和最大垂直直径(b),肿瘤体积计算公式用($V=\pi ab^2/6$)。4 周后处死裸鼠,剥离肿瘤组织、称重,计算抑瘤率 $\text{IR}=(V_0-V_n)/V_0 \times 100\%$ (V_0 为对照组肿瘤体积, V_n 为治疗组肿瘤体积)。剥离的肿瘤组织用 4%的多聚甲醛固定,石蜡包埋作病理切片,HE 染色后观察病理学改变。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数进行比较采用方差分析,两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

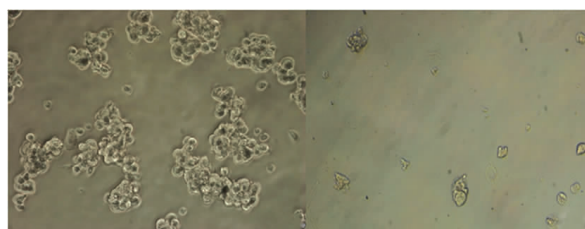
2 结果

2.1 ^{131}I -CD133 抗体的制备和鉴定

氯胺 T 法标记得 ^{131}I -CD133 抗体,测定其标记率为 89.34%,纯化后的放射化学纯度为 98.21%,放射性比活度为 0.51 MBq/ μg 。24、48、72 h 测得的放射性化学纯度依次为 96.31%、95.05%和 92.97%,提示 ^{131}I -CD133 抗体在体外具有较好的稳定性。

2.2 无血清培养磁珠分选得到的 CD133⁺细胞

CD133⁺细胞在含生长因子的无血清培养基中成球生长,至第 5 天开始出现立体球形。而 CD133⁻细胞在相同条件下出现形态异常最后逐渐死亡。见图 1A、B。



A. CD133⁺ 细胞 B. CD133⁻ 细胞

图 1 体外无血清培养观察成球情况 (200 ×)

Fig.1 Tumor sphere formation of cells cultured in serum-free medium (200 ×)

2.3 FCM 检测分选前后的细胞 CD133 表达率

FCM 检测结果显示,未分选的 HepG2 细胞中 CD133 的表达率为 $(1.74 \pm 0.05)\%$,磁珠分选出的 CD133⁺细胞的表达率为 $(98.16 \pm 0.06)\%$ 。LSD-*t* 法两两比较,CD133⁺细胞的表达率明显高于未分选细胞,两者具有统计学差异 ($P=0.000$)。见图 2。

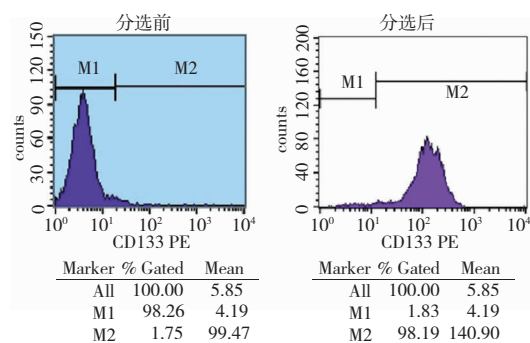


图 2 分选前后细胞 CD133 的表达率

Fig.2 CD133 expression of HepG2 cells before and after sorting detected by FCM

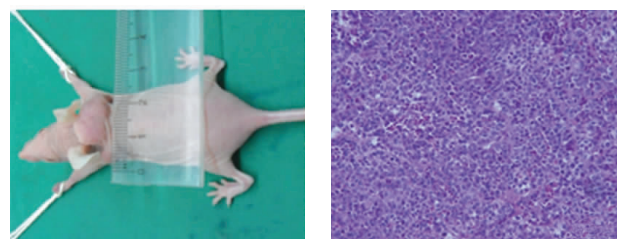
2.4 克隆形成实验对比 CD133⁺细胞与 CD133⁻细胞的增殖能力

克隆形成实验显示 CD133⁺细胞的克隆形成率为: $(42.69 \pm 0.12)\%$,而 CD133⁻细胞仅为: $(3.43 \pm 0.11)\%$ 。LSD-*t* 法两两比较,CD133⁺细胞的克隆形成率明显高于 CD133⁻细胞,两者具有统计学差异 ($P=0.000$)。

2.5 CD133⁺细胞和 CD133⁻细胞在 BALB/c 裸鼠体内的成瘤能力

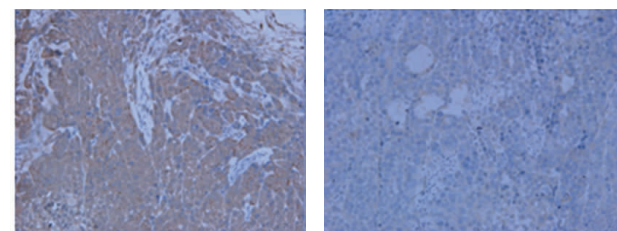
将 CD133⁺细胞与 CD133⁻细胞分别接种于 12 只 4 周龄 BALB/c 裸鼠双侧前臂皮下,对比两者的成瘤能力。结果显示: CD133⁺细胞 1×10^3 个/ml 细胞浓度在 4 周内就可形成皮下移植瘤, 1×10^4 个/ml 细胞浓度的 3 只裸鼠全部成瘤,而 CD133⁻细胞在 1×10^5 个/ml 细胞浓度才能形成移植瘤。HE 染色显

示 CD133⁺细胞形成的肿瘤组织中肿瘤细胞排列紧密,细胞核清晰可见。见图 3A、B。将肿瘤组织做免疫组化染色,镜下显示 CD133⁺细胞组肿瘤细胞膜染色较浓,呈深棕色,核分裂相多见,染色细胞数 $>90\%$,评分(+++);CD133⁻细胞组肿瘤细胞核分裂相明显,与 CD133⁺细胞组相似,但细胞膜仅见弱棕黄色颗粒,评分(+)。见图 3C、D。提示 CD133⁺细胞形成的移植瘤中仍高表达 CD133。



A. BALB/c 裸鼠右边接种为 CD133⁺ 细胞,移植瘤明显;左边接种为 CD133⁻ 细胞,未形成移植瘤

B. 移植瘤的 HE 染色 (200 ×)



C. CD133⁺ 细胞移植瘤免疫组化染色 (200 ×)

D. CD133⁻ 细胞移植瘤免疫组化染色 (200 ×)

图 3 CD133⁺ 细胞和 CD133⁻ 细胞在 BALB/c 裸鼠体内成瘤实验

Fig.3 Tumorigenesis ability of HepG2-CD133⁺ and HepG2-CD133⁻ cells

2.6 ¹³¹I-CD133 抗体对 CD133⁺细胞的体外抑制作用

MTT 法测 ¹³¹I-CD133 抗体组、¹³¹I 组、CD133 抗体组和 ¹³¹I+CD133 抗体组 4 组细胞的抑制率,见表 1。各组相比较,不同组抑制率不同 ($F=212.378, P=0.000$)。从表 1 可以看出在 12、36 h 2 个时间段 ¹³¹I-CD133 抗体组细胞抑制率均明显高于其余 3 个组 ($P=0.000$),且 36 h 时各组的抑制率也明显高于 12 h 各组,组间比较有统计学意义 ($P=0.000$)。

表 1 12、36 h 时不同治疗组对 CD133⁺ 细胞的生长抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

Tab.1 Inhibition ratio of CD133⁺ cell induced by different drug groups at 12 h and 36 h ($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

时间	¹³¹ I-CD133 抗体	¹³¹ I	CD133 抗体	¹³¹ I+CD133 抗体
12 h	27.88 ± 0.01	19.25 ± 0.05	18.44 ± 0.05	20.34 ± 0.02
36 h	65.25 ± 0.02 ^{a,b}	41.15 ± 0.03 ^a	39.98 ± 0.02 ^a	40.59 ± 0.03 ^a

注: a,在相同治疗组中不同时间点下 2 组间抑制率差异有统计学意义 ($F=212.378, P=0.000$); b,在相同时间点中 ¹³¹I-CD133 抗体抑制率明显高于其余 3 组间抑制率,差异有统计学意义 ($F=212.378, P=0.000$)。但 ¹³¹I、CD133 抗体和 ¹³¹I+CD133 抗体 3 组之间无差异

2.7 各实验组裸鼠治疗效果比较

接种后 4 周,裸鼠右前臂皮下可见直径约 2.0~2.5 cm 大小的类圆形结节,突出皮面,质硬且活动,成瘤率 100%。治疗前各组裸鼠间体质量、瘤体积差异无统计学差异($F=0.170$, $P=0.913$);给药后,除生理盐水组肿瘤生长较快外,其余各组生长均受到不同程度抑制。 ^{131}I -CD133 抗体组肿瘤体积(0.19 ± 0.01) cm^3 明显小于其余各组($F=33.882$, $P=0.000$),肿瘤质量(1.66 ± 0.07)g 明显轻于其余各组($F=1077.841$, $P=0.000$),抑瘤率(85.21 ± 2.53)%明显高于其余 2 组($F=440.297$, $P=0.000$),差异具有统计学意义($P=0.000$)(表 2)。

表 2 各治疗组药物对荷瘤裸鼠瘤体生长的抑制作用
($\bar{x} \pm s$, %, $n=3$)

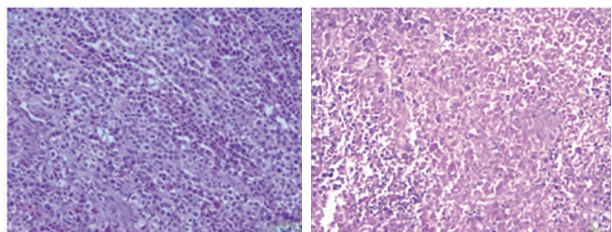
Tab.2 Inhibitory effect of different drugs on tumor growth in each treatment group ($\bar{x} \pm s$, %, $n=3$)

药物	肿瘤体积 (cm^3)		质量 (g)	抑瘤率 (%)
	治疗前	治疗后		
生理盐水组	0.75 ± 0.19	1.29 ± 0.24	7.55 ± 2.14	—
^{131}I -CD133 抗体组	0.69 ± 0.14	0.19 ± 0.01^a	1.66 ± 0.07^a	85.21 ± 2.53^b
^{131}I 组	0.75 ± 0.16	0.47 ± 0.05	4.66 ± 0.13	62.80 ± 4.31^b
CD133 抗体组	0.68 ± 0.15	0.57 ± 0.14	4.48 ± 0.05	56.31 ± 3.13^b

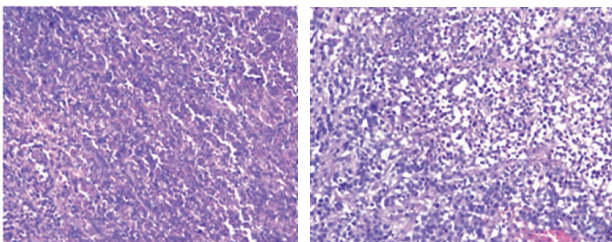
注:a, ^{131}I -CD133 抗体组与其余各组间差异有统计学意义($P=0.000$)。而治疗后 ^{131}I 组和 CD133 组体积无差异;b, 表示各组抑瘤率两两间差异有统计学意义(CD133 抗体组与 ^{131}I 组比较的 $P=0.027$, 其余各组两两比较的 $P=0.000$);—, 无相应数据

2.8 病理学改变

颈椎脱臼处处死裸鼠后,取出瘤组织切片经 HE 染色后显微镜下观察结果。与生理盐水对照组比较, ^{131}I -CD133 抗体组大片肿瘤细胞坏死,核固缩、核碎裂,呈玻璃样变;胞质红染,胞膜破裂,细胞解体;间质内胶原纤维崩解、液化,基质解聚(图 4A、B)。 ^{131}I 治疗组和 CD133 抗体组肿瘤细胞排列稀疏,多数细胞的细胞质透明呈空泡状,细胞核分裂相多见,明显异型性,但未见大片组织坏死(图 4C、D)。



A. 生理盐水对照组肿瘤组织 B. ^{131}I -CD133 抗体治疗组肿瘤组织



C. ^{131}I 治疗组肿瘤组织 D. CD133 抗体治疗组肿瘤组织

图 4 各治疗组中肿瘤组织病理学改变 (HE, 200 ×)

Fig.4 Pathological changes in tumor tissues of each treatment group (HE, 200 ×)

3 讨论

人 CD133 是一种分子量为 97 kD 的细胞表面糖蛋白,具有 5 个跨膜区,为非成熟造血干细胞和祖细胞的标志物。在脑胶质瘤、结肠癌、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、肝癌、肾癌等多种肿瘤的干细胞中均有表达^[15-21]。本实验采用磁珠分选法从 HepG2 细胞系中分选出 CD133⁺细胞。并通过流式细胞术检测分选前后细胞中 CD133 的表达分别为 (1.74 ± 0.51)%和 (98.16 ± 0.16)%,再通过体外成球实验、克隆形成实验和体内成瘤实验证明 CD133⁺细胞更具有自我更新能力、增殖能力和成瘤能力,证明 CD133⁺细胞更具有干细胞特性。这与 Ma 等^[9]的研究报道一致,从而为放射免疫治疗选用 CD133 单克隆抗体提供了理论依据。 ^{131}I 可同时发射 β 和 γ 2 种射线^[22], β 射线在组织中射程仅 2~3 mm,既保证了能在局部产生足够的电离辐射生物学效应,达到抑制及破坏病变组织的目的,又避免对邻近正常组织造成不必要的辐射,是目前较理想的放射免疫治疗用放射性核素。本实验选择放射性核素 ^{131}I 和抗肝癌干细胞表面标志物 CD133 的单克隆抗体结合,观察 ^{131}I -CD133 抗体对体内外 CD133⁺-HepG2 细胞靶向治疗的作用效果,探讨放射免疫治疗法在肝癌中的应用前景。

氯胺 T 法将 ^{131}I 标记抗 CD133 单克隆抗体,以 37 MBq: 50 μg 的比例标记,获得较稳定的 ^{131}I -CD133 抗体,标记率 89.37%,放射化学纯度为 98.21%,放射性比活度为 0.51 MBq/ μg 。本研究分别从体外和体内两个方面证实 ^{131}I -CD133 抗体对 CD133⁺细胞有明显的抑制作用。体外 MTT 实验从 12、36 h 2 个时间点观察, ^{131}I -CD133 抗体在 12、36 h 2 个时间点对 CD133⁺细胞的抑制率均高于 ^{131}I 组、CD133 抗体组和 ^{131}I +CD133 抗体组对 CD133⁺细胞的抑制率;且随着时间的延长,各组的抑制率逐渐增加,在 36 h 时,对细胞的抑制率达为 (40.43 ± 0.72)%。从表 1 可见 ^{131}I -CD133 抗体、 ^{131}I 、CD133 抗体均能够对 CD133⁺细胞产生抑制作用,而 ^{131}I -CD133 抗体的抑制作用最明显。取 CD133⁺细胞形成的移植瘤进行免疫组化染色可见 >90% 肿瘤细胞膜呈深染棕色,相反,CD133 细胞形成的移植瘤仅见细胞膜上浅棕色。说明 CD133⁺细胞形成的移植瘤体内仍高表达 CD133。这为体内实

验提供了重要的实验依据。无论 ^{131}I -CD133 抗体组、 ^{131}I 组还是 CD133 抗体组与生理盐水组相比较,移植瘤体积明显缩小,有明显的抑制作用,但 ^{131}I -CD133 抗体组肿瘤体积(0.19 ± 0.01) cm^3 、质量(1.66 ± 0.07) g、抑瘤率(85.21 ± 2.53)%,均明显高于其余 2 组。但本次实验中无 1 只裸鼠的肿瘤治疗后达完全缓解,这可能与开始治疗时肿瘤体积较大及 ^{131}I 在肿瘤部位的浓聚量有关^[23]。

综上所述, ^{131}I -CD133 抗体在体外能高效抑制 CD133⁺-HepG2 细胞的生长,也能有效抑制人肝癌 CD133⁺-HepG2 裸鼠移植瘤的生长。通过对肝癌干细胞表面标志物 CD133 靶向治疗肿瘤干细胞,有望成为肝癌治疗研究的新领域。

参 考 文 献

- [1] Gomes MA, Prilli DG, Tranlhao JG, et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, biology, diagnosis, and therapies[J]. *Re Assoc Mes Bras*, 2013, 59 (5): 514-524.
- [2] Ishii H, Iwatsuki M, Ieta K, et al. Cancer stem cells and chemoradiation resistance[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(10): 1871-1877.
- [3] Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(7): 545-554.
- [4] Yin T, Wei H, Gou S, et al. Cancer stem-like cells enriched in pancreatic spheres possess increased migration ability and resistance to gemcitabine[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(3): 1595-1604.
- [5] Winquist RJ, Boucher DM, Wood M, et al. Targeting cancer stem cells for more effective therapies: taking out cancer's locomotive engine[J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78(4): 326-334.
- [6] Zhang Q, Shi S, Yen Y, et al. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2010, 289(2): 151-160.
- [7] Izumiya M, Kabashima A, Higuchi H, et al. Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(9): 3847-3853.
- [8] Jin Y, Bin ZQ, Qiang H, et al. ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantrone, a chemotherapeutic drug for glioma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(10): 1369-1376.
- [9] Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2542-2556.
- [10] Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, et al. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective[J]. *Cancer Lett*, 2009, 286(2): 145-153.
- [11] Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012-1024.
- [12] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2): 153-166.
- [13] Yang W, Yan HX, Chen L, et al. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4287-4295.
- [14] Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012-1024.
- [15] Pallini R, Ricci-Vitiani L, Montano N, et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis[J]. *Cancer*, 2011, 117(1): 162-174.
- [16] 何向辉, 罗宇东, 卢兰涛, 等. 结直肠癌组织 CD133 的表达及其意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15(2): 120-123.
- [17] Shibahara I, Sonada Y, Saito R, et al. The expression status of CD133 is associated with the pattern and timing of primary glioblastoma recurrence[J]. *Neuro-Oncology*, 2013, 15(9): 1151-1159.
- [18] Vander Griend DJ, Karthaus WL, Dalrymple S, et al. The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 9703-9711.
- [19] Immervoll H, Hoem D, Steffensen OJ, et al. Visualization of CD44 and CD133 in normal pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas: non-overlapping membrane expression in cell populations positive for both markers[J]. *J Histochem Cytochem*, 2011, 59(4): 441-445.
- [20] Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(1): 92-97.
- [21] Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cell possess high capacity for tumorigenicity[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(7): 1444-1450.
- [22] 李少林. 核医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [23] 董 潇, 胡健铭, 石怡珍, 等. ^{131}I 标记曲妥珠单抗对高表达 HER-2/neu 人卵巢癌的体内外实验研究[J]. *肿瘤*, 2010(5): 363-369.

(责任编辑: 唐宗顺)