

膀胱癌细胞在不同生长环境中癌干细胞相关标志物 CD44、CXCR4 表达情况的初步研究

程继文, 蒙清贵, 唐 勇, 王植柔

基金项目: 广西科学青年基金项目(编号:0640061)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学附属肿瘤医院泌尿外科

作者简介: 程继文(1977-), 男, 硕士学位, 主治医师, 研究方向: 泌尿系统肿瘤。E-mail: chengjiwen1977@qq.com

通讯作者: 王植柔(1940-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 泌尿系统肿瘤。E-mail: zrwang01@sina.com

[摘要] **目的** 观察癌干细胞相关标志物 CD44、CXCR4 在不同环境下膀胱癌细胞的变化情况, 为人体膀胱癌干细胞的进一步研究提供前期数据与背景资料。**方法** 采用免疫组织化学与流式细胞术等技术, 对体外培养、皮下移植瘤以及裸鼠淋巴结转移模型等不同的生长微环境的膀胱癌 5637 细胞系癌干细胞相关标志物 CD44、CXCR4 的表达进行检测。**结果** 在体外培养环境中, 膀胱癌 5637 的细胞膜蛋白 CD44 呈阳性表达, 而 CXCR4 呈弱阳性表达; 膀胱癌裸鼠移植瘤中 CD44、CXCR4 均呈阳性表达。与体外培养体系比较, 流式细胞术检测发现膀胱癌细胞中 5637 的 CD44 阳性表达水平无显著变化, 而 CXCR4 阳性表达水平显著高于体外培养体系($P < 0.01$); 在裸鼠淋巴结转移模型中, 转移淋巴结均有 CD44、CXCR4 阳性表达。**结论** 膀胱癌细胞中部分癌干细胞相关标志物的变化受体内外不同环境变化的调控, 也提示膀胱癌 5637 细胞系存在有癌干细胞。

[关键词] 膀胱癌; 癌干细胞; 癌干细胞标志物

[中图分类号] R 737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)10-0923-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.10.01

Preliminary research on the expression of bladder cancer stem cell marker CD44 and CXCR4 in different environment CHENG Ji-wen, MENG Qing-gui, TANG Yong, et al. Department of Urinary Surgery, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To observe and collect the information of determination of bladder cancer stem cell marker CD44 and CXCR4. **Methods** Cell line is bladder cancer 5637 cell line. The different environments (niche) include cell culture system, the model of human bladder cancer xenograft, the metastatic lymph node model of bladder cancer. CD44 and CXCR4 were detected by immunohistochemical staining and flow cytometry respectively. **Results** In the bladder cancer 5637 cell line in vitro, CD44 was strong positive, and CXCR4 was low positive. In the model of xenograft, CD44 and CXCR4 were positive. Compared with the bladder cancer 5637 cell line in vitro, the positive expression of CD44 was no change and the positive expression of CXCR4 was higher ($P < 0.01$). In the metastatic lymph node model, CD44 and CXCR4 were positive. **Conclusion** The expression of bladder cancer stem cell markers are regulated by the different environments. Bladder cancer stem cells exist in the 5637 cell line.

[Key words] Bladder cancer; Cancer stem cell; Markers of cancer stem cell

目前癌干细胞学说认为肿瘤的发生、转移、耐药以及复发的根源是癌干细胞, 因此, 寻找、分离和纯化癌干细胞就是其中研究的热点, 其手段主要为以下两个方面, 一是利用干细胞外排 DNA 荧光染料 Hoechst 33342 特性, 采用流式分选系统分选出 SP (side population) 细胞, 其通用分子标记是 Bcrp1/

ABCG2; 二是通过癌干细胞相关标志物的上调与下调进行流式或磁式分选, 如 CD44、CXCR4 等膜蛋白, 均是寻找与分离造血系统肿瘤、乳腺癌、头颈部肿瘤、前列腺癌以及肝癌等血液性和实体肿瘤癌干细胞的相对特异性标志物^[1]。由此可知, 癌干细胞相关标志物的选择在研究癌干细胞中占有重要的地

位。但从癌干细胞与微环境(niche)相互作用的角度来分析,细胞表面膜蛋白等标志物的表达,是癌干细胞适应环境而展现其功能的体现,因此,本实验以膀胱癌细胞5637细胞系为研究对象,建立体外培养、皮下移植瘤以及裸鼠淋巴结转移模型等实验体系,营造体外培养以及体内的皮下移植和淋巴结转移等不同的微环境,并观察癌干细胞相关标志物的上调与下调情况,为膀胱癌干细胞的分离和纯化以及相关标志物的选择提供前期的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

1.1.1 膀胱癌细胞系与裸鼠 人膀胱癌细胞5637由中国科学院细胞库提供;BALB/C-nu裸鼠,4~6周龄,雌雄不拘,购自中国啮齿类种子中心上海分中心,生产许可证SCXK(沪)2003-0003。

1.1.2 培养基、血清及抗体 RPMI1640培养基、胎牛血清购自美国Hyclone公司;CD44-PE抗体、抗人CXCR4-PE/cy5抗体、抗人ESA-FITC抗体购自Biollegend公司;兔抗人CD44抗体、兔抗人CXCR4抗体、即用型快速免疫组化MaxVision™检测试剂盒与DBA显色试剂盒,购自福建迈新生物技术开发公司。

1.2 实验方法

1.2.1 体外培养体系 人膀胱癌细胞系5637细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基,37℃、5%CO₂培养箱常规培养。

1.2.2 裸鼠皮下移植瘤的建立 人膀胱癌细胞系5637细胞密度调整至 $5 \times 10^7/\text{ml}$,800 rpm离心5 min,弃上清,RPMI1640培养基1 ml重悬。0.2 ml注射器吸取细胞悬液,注射至BALB/C-nu裸鼠两侧腋窝皮下,0.2 ml/侧,即每侧注射细胞数为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

1.2.3 膀胱癌淋巴结转移裸鼠模型的建立^[2] 4~6周龄BALB/C-nu裸鼠,采用爪垫注射膀胱癌细胞系5637细胞建立膀胱癌淋巴结转移小鼠模型^[1]。建模8周后,收集腹股沟、腹腔和腋下淋巴回流的淋巴结,4%多聚甲醛固定,按常规制作组织蜡块,切片制作胶片,用免疫组织化学检测癌干细胞相关标记蛋白,包括CD44、CXCR4。

1.2.4 流式细胞术检测 用荧光标记抗体CD44-PE抗体、抗人CXCR4-PE/cy5抗体,对膀胱癌移植瘤组织块或消化培养的膀胱癌细胞制备的细胞悬液进行癌干细胞相关标记蛋白表达水平的检测。

1.2.5 细胞悬液制备及细胞切片 消化培养的膀

胱癌细胞,离心压成细胞团块,4%多聚甲醛固定,制备成细胞蜡块,切片制作胶片,用于癌干细胞相关标记CD44、CXCR4等膜蛋白的免疫组织化学检测。

1.2.6 免疫组织化学检测 对用细胞悬液制备的细胞切片、移植瘤与膀胱癌淋巴结转移裸鼠淋巴结的组织切片,采用SP法,DBA显色,具体按用型快速免疫组化MaxVision™检测试剂盒实验步骤进行,检测癌干细胞相关标记蛋白CD44、CXCR4,阳性细胞主要表现为细胞膜呈黄褐色染色,其中细胞切片、移植瘤组织切片中阳性染色细胞达到5%~25%为弱阳性(±),超过25%为阳性(+),淋巴结组织切片中阳性染色细胞超过5%~10%即为阳性(+).

1.3 统计学方法 应用SPSS12.0统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠皮下移植瘤与膀胱癌淋巴结转移裸鼠模型的基本情况 腋窝皮下注射膀胱癌细胞系5637细胞4~6周成瘤,直径超过1.0 cm。足垫注射膀胱癌细胞1~2周后,出现小结节并持续增大,在8周观察期中,腠窝、腹股沟等处淋巴结均未触及和观察到有明显肿大。

2.2 体外培养体系中膀胱癌细胞CD44、CXCR4的表达情况 (1)膀胱癌细胞系5637细胞CD44、CXCR4免疫组化检测情况:在体外培养体系中,膀胱癌细胞系5637细胞膜上CD44蛋白阳性表达,CXCR4弱阳性表达。(2)膀胱癌细胞系5637细胞CD44、CXCR4流式细胞术检测情况:在体外培养体系中,膀胱癌细胞系5637细胞CD44、CXCR4流式细胞术检测的阳性细胞分别为 $(82.6 \pm 1.6)\%$ 、 $(10.2 \pm 0.6)\%$ 。见表1,2;图1。

2.3 裸鼠皮下移植瘤CD44、CXCR4的表达情况 (1)裸鼠皮下移植瘤的CD44、CXCR4免疫组化检测情况:裸鼠皮下移植瘤CD44、CXCR4均为阳性表达。(2)裸鼠皮下移植瘤的CD44、CXCR4流式细胞术检测情况:膀胱癌裸鼠皮下移植瘤的细胞悬液,CD44、CXCR4流式细胞术检测的阳性细胞分别为 $(76.8 \pm 6.8)\%$ 、 $(56.6 \pm 8.2)\%$,与体外培养体系比较,其中膀胱癌细胞系5637的CD44阳性表达水平无显著变化,而CXCR4阳性表达水平显著高于体外培养体系($P < 0.01$)。见表1,2;图2。

2.4 膀胱癌淋巴结转移裸鼠模型中淋巴结CD44、CXCR4表达免疫组化检测情况 CD44、CXCR4均为阳性表达。见表1,图3。

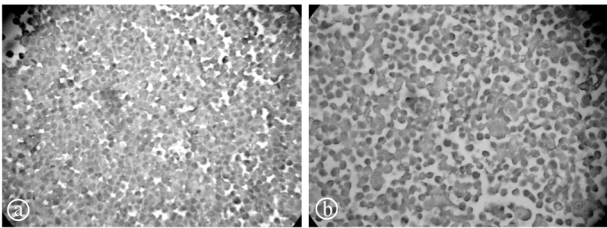
表 1 体外培养体系中免疫组化检测 CD44、CXCR4 在膀胱癌细胞中的表达情况

组 别	例数	表达情况	
		CD44	CXCR4
体外培养体系	5	+	±
裸鼠移植瘤	5	+	+
转移的淋巴结	5	+	+

表 2 体外培养体系与移植瘤中流式细胞术检测 CD44、CXCR4 在膀胱癌细胞中的表达情况[$(\bar{x} \pm s)$, %]

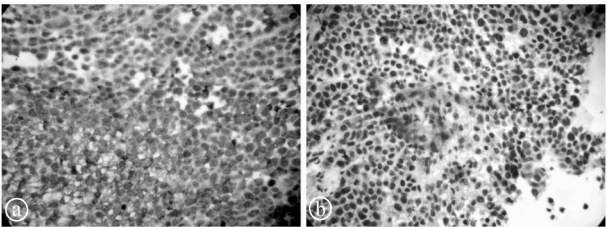
组 别	例数	表达情况	
		CD44	CXCR4
体外培养体系	6	82.6 ± 1.6	10.2 ± 0.6
裸鼠移植瘤	6	76.8 ± 6.8	56.6 ± 8.2 *
<i>t</i>	—	2.0337	13.8236
<i>P</i>	—	>0.05	<0.01

注:与体外培养体系比较, * $P < 0.01$



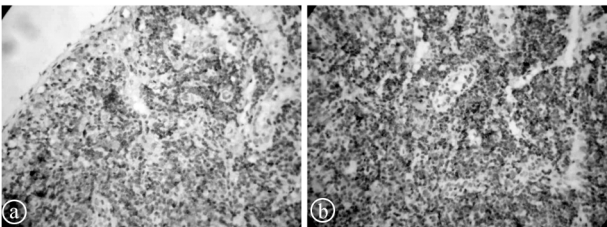
① CD44; ② CXCR4

图 1 体外培养体系中膀胱癌细胞系 5637 细胞膜上 CD44 蛋白阳性表达、CXCR4 弱阳性表达(×400)



① CD44; ② CXCR4

图 2 裸鼠皮下移植瘤 CD44、CXCR4 均为阳性表达(×400)



① CD44; ② CXCR4

图 3 膀胱癌淋巴结转移裸鼠模型中淋巴结 CD44、CXCR4 均为阳性表达(×200)

3 讨论

目前关于膀胱癌干细胞的研究较少,有研究利用其外排荧光染料 Hoechst33342 特性与 EMA⁻CD44v6⁺组合从膀胱癌细胞系(如 T24)或临床膀胱癌组织之中分选出膀胱癌干细胞,是目前流行的研究手段^[3,4]。但从癌干细胞的特性而言,上述所分选出的细胞只能说其中包含膀胱癌干细胞,而并非都是膀胱癌干细胞,因此,目前研究所谓癌干细胞标志物只是相关标志物,而并非特异性标志物,如何选择其中标志物进行研究是“瓶颈”问题。如本研究所选的 CD44、CXCR4 分别是乳腺癌、前列腺癌等实体肿瘤癌干细胞标志物^[1],也可能是膀胱癌干细胞的候选膜蛋白标志物。而本研究选取常规研究中膀胱癌细胞所处的体内外实验环境,发现不同环境下膜蛋白的一些变化规律,包括体外培养的离体培养微环境、皮下移植瘤的皮下在体环境以及裸鼠淋巴结转移模型的转移微环境,并简要分析如下:(1)在体内外不同环境中,膜蛋白 CD44 为强阳性表达,在定量的流式检测中也有超过 50% 的高阳性表达水平,阳性率很高,是持续阳性表达膜蛋白,提示膜蛋白 CD44 表达有可能是膀胱癌细胞适应不同环境的基本表现,如要作为膀胱癌干细胞的分选标志物搭配组合的候选蛋白;(2)CXCR4 在体外培养的膀胱癌细胞中有所表达,但在移植瘤与转移环境中具有较高的表达水平。(3)这些数据变化现象可以说明膀胱癌细胞在不同环境中行为学的变化,而且出现了不同细胞标志物的细胞群体,也证实膀胱癌细胞系中存在有癌干细胞,可以在不同的环境中衍生出新标志物的细胞群体。此外,从细胞学以及生命科学的基本规律来分析,高等动物的单个细胞是难以长期单独存活的,而具体到膀胱癌细胞的增殖、传代扩增成瘤以及转移灶形成等生物学行为,其本质是膀胱癌细胞在不同环境中生存下来,而且已经适应了环境,而本研究所选取的 CXCR4 蛋白和肿瘤的转移密切相关,而且 CXCR4 还与肿瘤的恶性程度正相关^[5],因此我们可以认为移植瘤,尤其是转移灶中的膀胱癌细胞恶性度更高,也可以认为环境起了筛选或调控作用,导致 CXCR4 等新标志物的出现,就其来源,也应该是癌干细胞所衍生的。进一步分析可以发现,CXCR4 在转移灶中明显阳性表达,而转移灶主要是由部分迁移的膀胱癌细胞形成的,其中是包含癌干细胞的,所以针对 CXCR4 在体外培养环境中的低表达水平,可以作以下推测,上述两环境中存在有小群 CXCR4 细胞,可能扮演癌干细胞的角色

色,等到移植瘤或转移环境才发挥其作用,提示 CXCR4 可能是小群体癌干细胞的标志物;但也可以有另外角度的分析,CXCR4 标志物的出现仅仅是癌干细胞为适应环境而衍生出的新的细胞群体,与膀胱癌干细胞无直接关系,因此,CXCR4 是否是膀胱癌干细胞的标志物,有待进一步研究。

参考文献

- 1 Woodward WA, Sulman EP. Cancer stem cells: markers or biomarkers? [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27(3): 459-470.
- 2 高进,章静波. 癌细胞转移模型的建立与应用[M]. 北京:科学出版社, 2003: 74-78.
- 3 Yang YM, Chang JW. Bladder cancer initiating cells (BCICs) are among EMA⁻CD44v6⁺ subset: novel methods for isolating undetermined cancer stem (initiating) cells [J]. *Cancer Invest*, 2008, 26(7): 725-733.
- 4 Ning ZF, Huang YJ, Lin TX, et al. Subpopulations of stem-like cells in side population cells from the human bladder transitional cell cancer cell line T24 [J]. *J Int Med Res*, 2009, 37(3): 621-630.
- 5 Retz MM, Sidhu SS, Blaveri E, et al. CXCR4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(2): 182-189.

[收稿日期 2010-05-04][本文编辑 谭毅 黄晓红]

课题研究·论著

过敏性鼻炎口服液对变应性鼻炎动物模型骨髓 IL-5 的影响

冯纬纭, 吴延佳, 韦常丽, 黄卓燕, 方燕飞, 谢芳, 侯田培

基金项目: 广西科技厅自然科学基金项目(编号:桂科自 0640151)

作者单位: 530023 南宁,广西中医学院第一附属医院耳鼻喉科(冯纬纭,黄卓燕,方燕飞),检验科(吴延佳,韦常丽); 530001 南宁,广西中医学院(谢芳,侯田培)

作者简介: 冯纬纭(1968-),女,研究生学历,医学硕士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合防治变应性鼻炎。E-mail: fwyywf@126.com

[摘要] 目的 观察过敏性鼻炎口服液对变应性鼻炎大鼠骨髓中白细胞介素-5(IL-5)表达的影响,以探讨该药治疗变应性鼻炎的作用机理。**方法** 40 只大鼠随机分为过敏性鼻炎口服液实验组、扑尔敏对照组、盐水对照组、正常对照组;造模完成后第 2 天,前 3 组分别予过敏性鼻炎口服液、扑尔敏、生理盐水灌胃 7 d;最后处死动物,取骨干髓腔将骨髓细胞冲洗出,离心沉渣涂片。采用免疫组化方法检测骨髓中 IL-5 的表达。**结果** 过敏性鼻炎口服液实验组的骨髓 IL-5 与扑尔敏对照组、盐水对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$),与正常对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 过敏性鼻炎口服液能降低骨髓 IL-5,抑制 AR 的发生,这可能是过敏性鼻炎口服液治疗变应性鼻炎患者的作用机理之一。

[关键词] 过敏性鼻炎口服液; 变应性鼻炎; 动物模型; 骨髓; 白细胞介素-5(IL-5)

[中图分类号] R 765.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)10-0926-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.10.02

Effect of rhinallergosis oral liquid on marrow IL-5 in rat model of allergic rhinitis FENG Wei-yun, WU Yan-jia, WEI Chang-li, et al. Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530023, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of rhinallergosis oral liquid on marrow IL-5 in rat model of allergic rhinitis, in order to discuss the mechanism of that remedy. **Methods** Forty rats were divided randomly into rhinallergosis oral liquid experiment group, chlorpheniramine control group, saline control group and normal control group; the next day after the model was fulfilled, rhinallergosis oral liquid, chlorpheniramine and saline were separately lavaged to the stomach of rats in former 3 groups for 7 days; then rats were sacrificed, the skeleton marrow of them was got, then cen-