

## CD90<sup>+</sup>肝癌干细胞的鉴定及靶向治疗研究

杨 蕊,唐秋莎\*

(东南大学医学院病理与病理生理学系,江苏 南京 210009)

**[摘要]** 目的:对人肝癌组织和细胞株 BEL-7404 中的 CD90<sup>+</sup>细胞进行干细胞特性鉴定;制备载 17-AAG 的抗 CD90 磁性热敏脂质体(CD90@17-AAG/TMs)靶向杀伤 CD90<sup>+</sup> 肝癌干细胞(liver cancer stem cells,LCSCs)。方法:利用免疫组化染色检测人肝癌组织中 CD90 的表达,并研究其与肝癌临床病理特征的关系;利用免疫磁珠分选法从人肝癌细胞株 BEL-7404 中分离出 CD90<sup>+</sup> LCSCs 并验证其干细胞特性;“旋转蒸发-水化法”制备 CD90@17-AAG/TMs,通过体内杀伤实验验证其杀伤 CD90<sup>+</sup> LCSCs 的能力。结果:CD90 的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、甲胎蛋白(AFP)无关( $P > 0.05$ ),与病理分级有关( $P < 0.05$ );肝癌细胞中 CD90<sup>+</sup>细胞具有明显的干细胞特性;CD90@17-AAG/TMs 在体内可以有效杀伤 CD90<sup>+</sup> LCSCs,抑制肝癌的生长。结论:CD90<sup>+</sup> 细胞具有明显的干细胞特性,采用 CD90@17-AAG/TMs 可有效清除 CD90<sup>+</sup> LCSCs,抑制肝癌的形成及生长,为肝癌及其他恶性肿瘤的治疗提供了新的手段。

**[关键词]** 肝癌干细胞;CD90;靶向杀伤

**[中图分类号]** R735.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)10-1174-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20161006

## Identification and target therapy of CD90<sup>+</sup> liver cancer stem cells

Yang Rui, Tang Qiusha\*

(Department of Pathology and Pathophysiology, Medical School of Southeast University, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To detect the CD90<sup>+</sup> cells' stem cell characteristics in human hepatocellular carcinoma and BEL-7404 cell lines and killed CD90<sup>+</sup> liver cancer stem cells (LCSCs) by an anti-CD90 monoclonal antibody targeted thermosensitive magnetoliposomes encapsulated HSP90 inhibition 17-AAG (CD90@17-AAG/TMs). **Methods:** Immunohistochemical staining was performed to explore the relationship between the expression of CD90 and the clinicopathological parameters of human hepatocellular carcinoma. Magnetic activated cell sorting was performed to isolate the CD90<sup>+</sup> cells from the BEL-7404 cell lines and its stem cell characteristics were identified. CD90@17-AAG/TMs was prepared by rotary evaporator-hydration method to kill the CD90<sup>+</sup> LCSCs *in vivo*. **Results:** There was no significant correlation among the age, sex, tumor size, and AFP with the expression of CD90 in hepatocellular carcinoma tissues ( $P > 0.05$ ). The expression of CD90 was relative to the pathology classification ( $P < 0.05$ ). The CD90<sup>+</sup> LCSCs showed a significantly stem cell characteristics. CD90@17-AAG/TMs effectively killed CD90<sup>+</sup> LCSCs and inhibited the tumor growth. **Conclusion:** CD90<sup>+</sup> LCSCs has significant stem cell characteristics. CD90@17-AAG/TMs can effectively kill CD90<sup>+</sup> LCSCs *in vivo* and inhibit the formation and growth of tumors, which may provide a novel therapy approach for hepatocellular carcinoma and other cancers.

**[Key words]** LCSCs; CD90; target killing

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(10): 1174-1180]

近几年提出的肿瘤干细胞学说普遍认为,在几乎所有的肿瘤中都潜伏着极少量的肿瘤干细胞,是所有肿瘤细胞的祖细胞,它们负责形成和维持肿瘤

**[基金项目]** 国家重点基础研究规划(973)项目(2013CB933904);国家自然科学基金(81271635);东南大学优博基金项目(YB-JJ1459)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: panyixi-tqs@163.com

并引发其在体内转移。由于目前临床上肿瘤的常规治疗方法都是针对处于增殖阶段的肿瘤细胞,虽然肿瘤能消退或缓解,但并没有将肿瘤干细胞完全清除,往往在一段时间后会复发。因此,寻找到一种理想有效的针对肿瘤干细胞的治疗方法,作为常规肿瘤治疗手段的补充,在减少肿瘤复发和转移,降低患者病死率,提高肿瘤的治疗效果方面具有一定的

理论意义与临床应用价值。

磁流体热疗(magnetic fluid hyperthermia,MFH),是一种很有前景的肿瘤治疗方法。它本身的不良反应小,将热疗与放疗或化疗联合应用,不仅可以减少放、化疗剂量,从而减少放、化疗不良反应,而且可以实现全周期、全空间对癌细胞的杀伤,大大提高疗效<sup>[1]</sup>。然而,目前热疗单独应用还存在一定的不足,需采用多次热疗来增强肿瘤热疗疗效,但多次热疗极易诱导热休克蛋白 90(heat shock protein 90,HSP)的过度表达,抑制肿瘤细胞的凋亡,产生的热耐受是影响热疗疗效的重要因素之一<sup>[2]</sup>。同时,与正常组织相比较,肿瘤组织中 HSP90 表达明显上调。因此,HSP90 可以作为治疗肿瘤的有效靶点<sup>[3]</sup>。此外,近期研究表明,肝癌中存在 CD90<sup>+</sup> 肝癌细胞,参与了肝癌的形成,对肝癌的发生、发展有一定的调控作用,已经被认为是肝癌干细胞(liver cancer stem cells,LCSCs)的一个重要标志<sup>[4]</sup>。因此,基于以上背景,本实验以肝癌干细胞表面标记蛋白 CD90 作为靶点,以热敏脂质体为载体,内部包裹磁性 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 和 HSP90 分子伴侣复合物阻滞剂坦螺旋霉素(tanespimycin,17-AAG),表面耦连抗 CD90 单克隆抗体(anti-CD90 monoclonal antibody,anti-CD90 mAb),联合外加磁场引导,靶向输送纳米磁性热敏脂质体(thermosensitive magnetoliposomes,TMs)至肿瘤干细胞部位,在外加交变电流磁场(alternating magnetic field,AMF)照射作用下,使 CD90 靶向纳米磁性热敏脂质体磁感应升温,发挥热疗及化疗的作用杀灭肝癌干细胞。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 标本、细胞与实验动物

收集无锡市第一人民医院肝胆外科手术切除的原发性肝癌标本 27 例,其中男 25 例,女 2 例;年龄 25~73 岁,中位数为 55 岁,四分位数间距为 9 岁;所有标本均经病理证实为原发性肝细胞癌。患者术前未进行任何抗肿瘤治疗,手术后患者 4 周内仍存活。人 BEL-7404 细胞株购自中国科学院上海细胞研究所。4~6 周雌性裸小鼠购自扬州大学比较医学实验动物中心。

#### 1.1.2 试剂

DMEM/F12 干细胞培养基(GIBCO 公司,美国);细胞分选磁珠(CD90 MicroBeads,Miltenyi 公司,德国);免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技

术有限公司);二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DPPC,Lipoid 公司,德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组化染色

常规石蜡切片。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min。5%~10%牛血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10 min,倾去血清,勿洗。滴加一抗工作液,37℃孵育 1~2 h 或 4℃过夜。PBS 冲洗,5 min 3 次。滴加适量生物素标记二抗工作液,37℃孵育 10~30 min。PBS 冲洗,5 min 3 次。滴加适量的辣根酶或碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育 10~30 min。PBS 冲洗,5 min 3 次。显色剂(DAB)显色 3~15 min。自来水充分冲洗,复染,脱水,透明,封片。

阳性判定标准:CD90 的表达主要在细胞膜或细胞浆,随机取 5 个视野计数其中的阳性细胞,计算阳性细胞百分率,根据阳性细胞百分率进行评分:0 分(阳性细胞率为 0)、1 分(阳性细胞率≤25%)、2 分(25%<阳性细胞率≤50%)、3 分(50%<阳性细胞率≤75%)、4 分(阳性细胞率>75%)。再根据阳性细胞染色强度进行评分:无显色 0 分、浅棕黄色 1 分、棕黄色 2 分、棕褐色 3 分。最后将两项评分相乘,0 分为阴性(-),1~3 分为弱阳性(+),4~5 分为中度阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。

#### 1.2.2 磁珠分选 CD90<sup>+</sup> BEL-7404 细胞

常规消化细胞后,充分吹打制备单细胞悬液,按照 Miltenyi MicroBeads 说明书进行分选。分选结束后取一部分细胞悬液台盼蓝染色后显微镜下计数,计算分选后细胞活性;另取部分细胞悬液流式细胞术检测分选纯度。

#### 1.2.3 CD90<sup>+</sup> BEL-7404 干细胞特性鉴定

成球培养:将分选出的细胞用 DMEM/F12 干细胞培养基重悬,接种于低黏附培养瓶中,37℃,5% CO<sub>2</sub> 的培养箱进行培养。每 2 d 换入新鲜的标准培养基,待细胞球直径>50 μm 时进行消化传代培养。

增殖实验:将分选的 CD90<sup>+</sup> 细胞、CD90<sup>-</sup> 细胞种植于同一 96 孔板上,每组设置 5 个复孔,1 000 个/孔。置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃饱和湿度的培养箱中培养;在第 1、3、5、7 天用 CCK-8 测定细胞的增殖状态,检测 450 nm 的吸光度(optical density,OD)值,绘制细胞生长曲线,比较两组细胞的增殖速度。

耐药实验:将分选的 CD90<sup>+</sup> 细胞、CD90<sup>-</sup> 细胞种植于同一 96 孔板上,1 000 个/孔。将多柔比星(doxorubicin,DOX)用培养液稀释为 0.625、1.250、5.000、

10.000  $\mu\text{g/mL}$  后加入 96 孔后培养 24 h, 每组设置 5 个复孔, 用 CCK-8 在 450 nm 处检测细胞的吸光度值, 计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ )。

**侵袭实验:** 取分选出的  $\text{CD90}^+$  和  $\text{CD90}^-$  细胞调整浓度分别为  $1 \times 10^5$  个/mL, 取 200  $\mu\text{L}$  加入上室, 下室加入 10% FBS 的完全培养液, 每组 3 个复孔; 加液后于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内培养; 24 h 后取出小室, 吸出残余液体, 自然风干。用棉棒轻轻拭去上室面残余细胞。0.1% 结晶紫染色 30 min 后, PBS 冲洗 3 次并风干; 倒置显微镜下观察, 分别选取上下左右及中间 5 个视野计数穿膜细胞数, 细胞侵袭率 (%) = (实验组穿膜细胞数/对照组穿膜细胞数)  $\times$  100%。

**成瘤实验:** 取分选后  $\text{CD90}^+$  和  $\text{CD90}^-$  细胞, 按  $2 \times 10^6$  个/mL 密度接种 100  $\mu\text{L}$  于裸鼠背部皮下, 每组 6 只; 每 3 d 观察 1 次肿瘤形成情况及测量肿瘤大小, 连续 4 周, 比较两组的成瘤能力; HE 染色比较瘤体的组织学差异, 显微镜下观察并拍照。

#### 1.2.4 载 17-AAG 的抗 CD90 磁性热敏脂质体 ( $\text{CD90@17-AAG/TMs}$ ) 的制备

采用化学共沉淀法制备磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子<sup>[5]</sup>。17-AAG/TMs 的制备采用旋转蒸发-水化法<sup>[6]</sup>。mPEG2000-DSPE 和 Mal-PEG2000-DSPE 按摩尔比 4:1 溶于适量氯仿, 在旋转蒸发后 PBS 溶液水化 1 h, 制备 Mal-PEG2000-DSPE 胶束。参照我们之前的方法<sup>[7]</sup>, Anti-CD90 mAb 先与 Traut's 试剂进行反应以增加抗体上的巯基, 然后与 Mal-PEG-DSPE 胶束反应形成硫醚键而将 CD90 连接至 PEG 上形成  $\text{CD90-PEG-DSPE}$ 。最后将  $\text{CD90-PEG2000-DSPE}$  与 17-AAG/TMs 按磷脂摩尔比 0.05:1 (脂质体中的磷脂主要是 DPPC),  $60^\circ\text{C}$  孵育 1 h, 即可得  $\text{CD90@17-AAG/TMs}$ 。

#### 1.2.5 $\text{CD90@17-AAG/TMs}$ 体内杀伤实验

$2 \times 10^5$  个  $\text{CD90}^+$  LCSCs 细胞接种于 4~6 周的 Balb/c 裸小鼠右下肢皮下, 当肿瘤体积大于 200  $\text{mm}^3$  时进行体内实验。

将荷瘤小鼠随机分为 5 组: ①阴性对照组 (生理盐水注射组); ②17-AAG/TSLs 组 (载 17-AAG 温敏脂质体注射组); ③TMs + AMF 组 (注射 TMs 加 AMF 照射); ④17-AAG/TMs + AMF 组 (注射 17-AAG/TMs 加 AMF 照射); ⑤ $\text{CD90@17-AAG/TMs}$  组 (注射  $\text{CD90@17-AAG/TMs}$  加 AMF 照射)。将每组的荷瘤裸鼠麻醉后, 按照以上分组尾静脉注射不同的治疗介质, 注射频率为隔天 1 次, 单次注射剂量

为 10 mg Fe/kg 体重。肿瘤部位置于 SP-06A 高频感应加热设备线圈上加热, 设置加热 30 min, 设定功率为 200 kHz, 电流为 20 A。治疗周期为 7 d, 治疗频率为每隔 1 d 照射 1 次。每天观察并记录肿瘤的生长情况, 测量肿瘤的长径和短径, 计算肿瘤体积, 公式如下: 肿瘤体积 = 肿瘤长径  $\times$  肿瘤短径<sup>2</sup>/2; 计算肿瘤体积和质量抑制率: 肿瘤体积抑制率 (%) = (对照组肿瘤体积 - 实验组肿瘤体积)/对照组肿瘤体积  $\times$  100%; 肿瘤质量抑制率 (%) = (对照组肿瘤质量 - 实验组肿瘤质量)/对照组肿瘤质量  $\times$  100%。HE 染色观察肿瘤组织病理学改变。

#### 1.2.6 TUNEL 染色观察细胞凋亡

常规石蜡包埋组织切片, 脱蜡, 酒精脱水, 双蒸水稍洗, PBS 浸洗。蛋白酶 K 孵育 10 min, 滴加 TUNEL 反应液,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h, DAB 显色 10 min, PBS 充分浸洗, 加拿大树胶封片, 阳性凋亡细胞核为棕褐色, 背景细胞核为蓝色。显微镜下随机取 5 个视野, 计数凋亡细胞和非凋亡细胞, 计算凋亡指数 (%), 公式如下: 凋亡细胞数/(凋亡细胞 + 非凋亡细胞)  $\times$  100%。

#### 1.3 统计学方法

以 SPSS 18.0 统计软件输入和分析结果。等级资料采用秩和检验; 满足正态分布的计量资料采用  $t$  检验, 非正态分布的计量资料采用秩和检验; 计数资料采用卡方检验, 利用 Kruskal-Wallis 秩和检验对 CD90 与肝癌临床病理特征的相关性进行分析。  $P \leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

#### 2.1 CD90 的表达与临床病理特征的关系

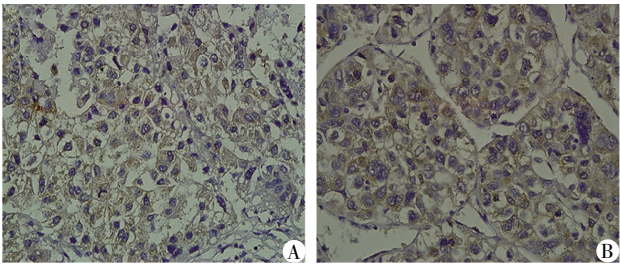
免疫组化结果显示, CD90 在肝癌组织中有不同程度的阳性表达, 如图 1 所示, 从 27 例标本中任选 2 例标本显微镜下观察, 可见 CD90 主要表达于肝癌细胞的胞膜或胞浆中。经统计分析, CD90 的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小和甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 无关 ( $P > 0.05$ ), 与病理分级有关 ( $P < 0.05$ , 表 1), 这与相关报道相符<sup>[4]</sup>。

#### 2.2 磁珠分选 $\text{CD90}^+$ LCSCs 的纯度和活性

利用免疫磁珠分选方法, 成功分选出了纯度为 90.8% 的  $\text{CD90}^+$  BEL-7404 细胞 (图 2), 分选的活性可以达到 98.9%。

#### 2.3 $\text{CD90}^+$ LCSCs 干细胞特性鉴定

肿瘤干细胞的一个重要能力就是可以在加入干细胞培养基的低黏附培养皿中形成干细胞球。将



A:CD90 表达于细胞膜;B:CD90 表达于细胞质。

图 1 CD90 免疫组化结果示意图(×400)

Figure 1 Results of CD90 immunohistochemical staining(×400)

表 1 CD90 阳性表达与肝癌临床病理特征关系

Table 1 Relationship between the expression of CD90 and the clinicopathological parameters of human hepatocellular carcinoma

病理特征	例数	CD90				Z 值	P 值
		-	+	++	+++		
年龄(岁)						-0.46	0.64
≤55	14	0	5	5	4		
>55	13	0	4	4	5		
性别						-0.88	0.38
男	25	0	8	8	9		
女	2	0	1	1	0		
肿瘤大小 (cm)						-0.46	0.63
≤5	14	0	6	1	7		
>5	13	0	3	8	2		
分化程度						-3.34	<0.01
中高	6	0	6	0	0		
中低	21	0	3	9	9		
AFP(μg/L)						-0.46	0.64
<400	13	0	5	2	6		
≥400	14	0	4	7	3		

分选出的 CD90<sup>+</sup> BEL-7404 细胞在干细胞培养基中培养 7 d 后,可形成干细胞球(第 1 代,P1),将其消化为单个细胞后仍具有成球能力(P2),初步证明了其具有干细胞特性(图 3A)。与 CD90<sup>-</sup> BEL-7404 细胞相比,CD90<sup>+</sup> BEL-7404 细胞有较强的增殖能力,至第 3 天,细胞增殖明显,曲线陡直;而 CD90<sup>-</sup> BEL-7404 细胞曲线较为平坦,体外增殖能力较弱(图 3B)。为了检测 CD90<sup>+</sup> BEL-7404 细胞的耐药性,用不同浓度的 DOX 作用于 CD90<sup>+</sup> BEL-7404 和 CD90<sup>-</sup> BEL-7404 细胞,用细胞抑制率对剂量对数作图并按照作图法求出 IC<sub>50</sub>(图 3C)。结果显示,CD90<sup>+</sup> BEL-7404 细胞的 IC<sub>50</sub> 是 CD90<sup>-</sup> BEL-7404 细胞的 10 倍以上 [(12.6 ± 1.04)μg/mL vs. (1.07 ± 0.13)μg/mL]。此外,如图 3D 所示,CD90<sup>+</sup> BEL-7404 细胞的侵袭能力要明显强于 CD90<sup>-</sup> BEL-7404 细胞 (P < 0.05,图

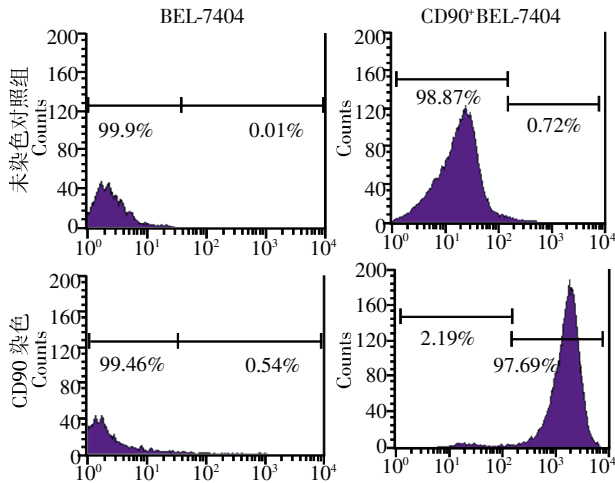


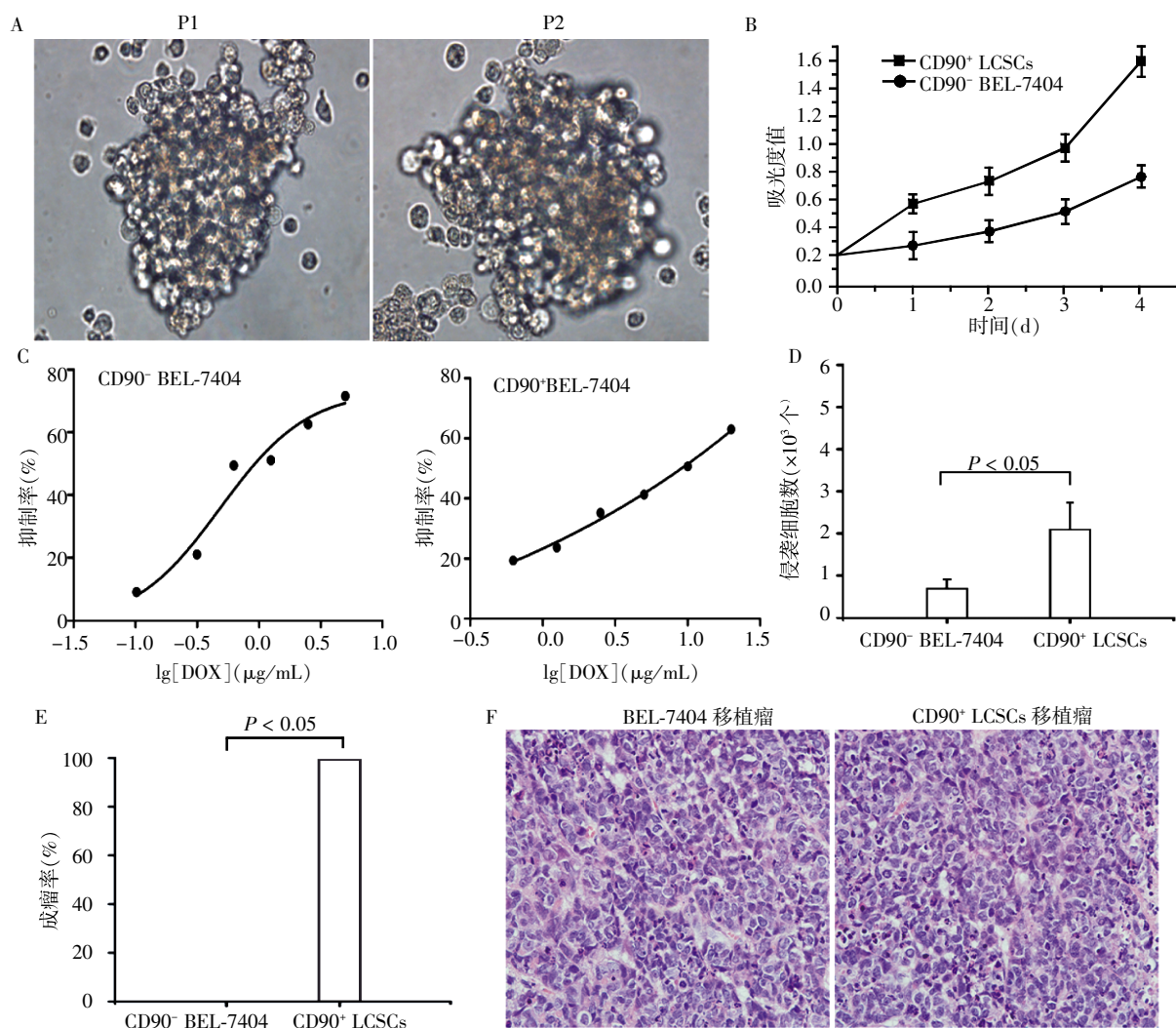
图 2 流式细胞仪检测 BEL-7404 分选前后 CD90 表达率  
Figure 2 Expression rates of CD90 before and after BEL-7404 has being sorted by flow cytometry

3D)。成瘤实验是肿瘤干细胞特性鉴定的金标准,如图 3E、F 所示,将相同数目的 CD90<sup>+</sup> BEL-7404 和 CD90<sup>-</sup> BEL-7404 细胞注射入裸鼠皮下,CD90<sup>+</sup> BEL-7404 细胞组完全成瘤,而 CD90<sup>-</sup> BEL-7404 细胞组未见成瘤。取其中一半小鼠做 HE 染色,发现 CD90<sup>+</sup> BEL-7404 细胞组的肿瘤组织形态与未分选 BEL-7404 相似,证实其仍为肝癌细胞。综上所述,我们分选出的 CD90<sup>+</sup> 细胞具有在干细胞培养基中成球生长的能力,相对于 CD90<sup>-</sup> 细胞而言,其具有较强的增殖、耐药、侵袭和成瘤能力,也就是具有明显的干细胞特性,可以作为 LCSCs 标记物之一。

#### 2.4 CD90@17-AAG/TMs 肿瘤抑制实验

将纳米材料通过尾静脉注射进入荷瘤小鼠体内证实 CD90@17-AAG/TMs 的杀伤特性。为了增强疗效,以 7 d 为 1 个治疗周期,隔天注射 1 次纳米材料并热疗 1 次,每次治疗 30 min,利用具有高通透高滞留效应(EPR 效应)和 anti-CD90 mAb 的主动靶向性的纳米材料在肿瘤部位富集联合磁热疗来杀伤肿瘤干细胞。如表 2 所示,TMs + AMF 组和 17-AAG/TSLs 组由于 EPR 效应可在肿瘤部位短暂富集纳米材料,对肿瘤的生长具有一定的抑制作用。17-AAG/TMs + AMF 组由于化疗与热疗相结合,其肿瘤体积抑制率和质量抑制率明显高于任意一个单独杀伤的效果,也表明了 17-AAG 可增强热疗的敏感性。而 CD90@17-AAG/TMs + AMF 由于靶向热化疗联合杀伤 CD90<sup>+</sup> LCSCs,再加上 EPR 效应杀伤总的肿瘤细胞,所以肿瘤的生长抑制最为明显,肿瘤体积和质量抑制率分别达到 90.4%和 80.1%。





A: CD90<sup>+</sup> BEL-7404 成球培养(×400); B: CD90<sup>+</sup> LCSCs 和 CD90<sup>-</sup> BEL-7404 体外增殖实验; C: 细胞抑制率示意图; D: CD90<sup>+</sup> LCSCs 和 CD90<sup>-</sup> BEL-7404 侵袭细胞数比较; E: CD90<sup>+</sup> LCSCs 和 CD90<sup>-</sup> BEL-7404 成瘤率比较; F: CD90<sup>+</sup> LCSCs 和 BEL-7404 体内成瘤实验(HE 染色, ×400)。

图3 CD90<sup>+</sup> LCSCs 干细胞特性鉴定

Figure 3 Identify of CD90<sup>+</sup> LCSCs

表2 不同治疗组的质量和肿瘤抑制率

Table 2 Inhibition rates of tumor volume and tumor mass in different groups

组别	肿瘤体积(mm <sup>3</sup> )	肿瘤体积抑制率(%)	肿瘤质量(g)	肿瘤质量抑制率(%)
生理盐水对照组	1 392.7 ± 108.7	—	1.37 ± 0.02	—
TM <sub>s</sub> + AMF 组	1 154.5 ± 90.6 <sup>**</sup>	17.1	1.15 ± 0.04 <sup>**</sup>	15.6
17-AAG/TSL <sub>s</sub> 组	1 110.0 ± 74.3 <sup>**</sup>	20.3	1.12 ± 0.03 <sup>**</sup>	14.9
17-AAG/TM <sub>s</sub> + AMF 组	664.3 ± 40.6 <sup>*</sup>	52.3	0.90 ± 0.01 <sup>*</sup>	34.1
CD90@17-AAG/TM <sub>s</sub> + AMF 组	133.7 ± 24.3	90.4	0.27 ± 0.04	80.1

与 CD90@17-AAG/TM<sub>s</sub> + AMF 组比较, <sup>\*</sup>P < 0.05; 与 17-AAG/TM<sub>s</sub> + AMF 组比较, <sup>\*\*</sup>P < 0.05。

## 2.5 HE 染色

热疗前后肿瘤组织形态学的改变见图4, 热疗1周后, CD90@17-AAG/TM<sub>s</sub> + AMF 的热疗效果最好, 由于EPR效应和CD90@17-AAG/TM<sub>s</sub>的主动靶向性, 肿瘤组织中可见具有明确界限的大片坏死区, 而坏死组织中可见大量磁性Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米颗粒, 存活的肿瘤细胞较少。而单纯的热疗和放疗则坏死区

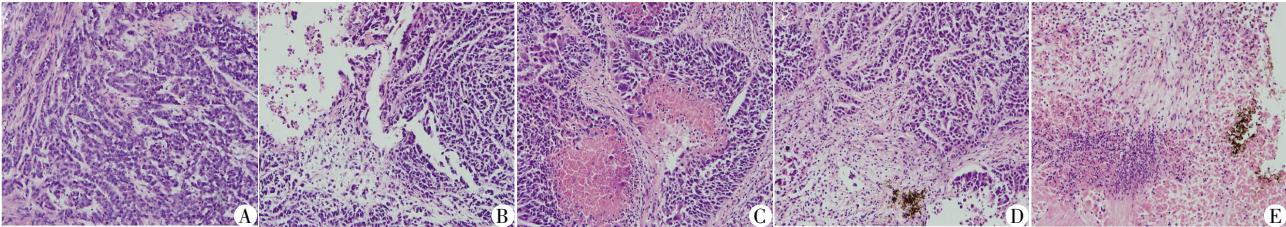
域较小, TM<sub>s</sub>+AMF 由于EPR效应, 在肿瘤中也可见少量棕褐色铁颗粒。联合热疗和化疗后, 肿瘤组织显示了比单纯热疗或者放疗更剧烈的组织坏死: 纳米材料周边组织坏死, 可见大面积的坏死区域与边缘残留的肿瘤细胞。而对照组细胞胞浆丰富, 细胞排列紧密, 未见明显的坏死。由此可见, CD90@17-AAG/TM<sub>s</sub> 联合磁感应升温治疗在体内也显示出了

良好的治疗效果。

2.6 TUNEL 染色

在治疗结束后,利用 TUNEL 染色检测了不同治疗组细胞的凋亡,如图 5 和表 3 所示,17-AAG/TSLs 组和 TMs 组肿瘤组织中的凋亡细胞较少,凋亡

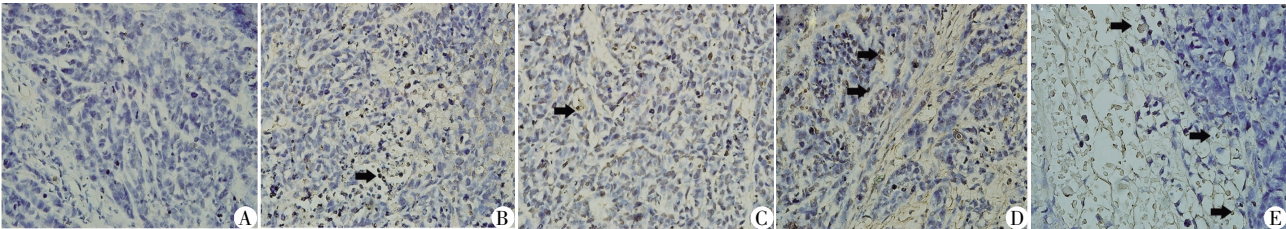
指数分别为 16.3%和 15.7%,而当二者联合治疗后,肿瘤组织中凋亡细胞明显增多,凋亡指数可达 46.9%,约为二者单独应用的 2 倍。靶向联合热疗和化疗之后,肿瘤组织内可见大片棕褐色细胞核,细胞凋亡更加明显,凋亡指数可达 83.6%。



A: 阴性对照组;B: TMs+AMF 组;C: 17-AAG/TSLs 组;D: 17-AAG/TMs+AMF 组;E: CD90@17-AAG/TMs + AMF 组。

图 4 各治疗组肿瘤组织 HE 染色(×200)

Figure 4 HE staining of different groups(×200)



A: 阴性对照组;B: TMs+AMF 组;C: 17-AAG/TSLs 组;D: 17-AAG/TMs+AMF 组;E: CD90@17-AAG/TMs + AMF 组(黑色箭头代表凋亡细胞)。

图 5 TUNEL 染色后小鼠肿瘤组织形态图(×400)

Figure 5 TUNEL staining of different groups' tumor tissues(×400)

表 3 TUNEL 染色检测小鼠肿瘤组织中细胞凋亡指数

Table 3 Apoptosis index of different groups (%)

组别	凋亡指数
生理盐水对照组	0
TMs + AMF 组	15.7 <sup>**</sup>
17-AAG/TSLs 组	16.3 <sup>**</sup>
17-AAG/TMs + AMF 组	46.9 <sup>*</sup>
CD90@17-AAG/TMs + AMF 组	83.6

与 CD90@17-AAG/TMs + AMF 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 17-AAG/TMs + AMF 组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨论

肿瘤热疗是继传统的手术治疗、化疗、放疗以及新兴的生物治疗之后又一抗肿瘤治疗手段,它是通过局部或者全身加热至有效治疗温度(42~46℃)从而导致肿瘤细胞变性或者酶失活而杀伤肿瘤细胞的一种治疗方法<sup>[1]</sup>。热疗因不良反应小,对机体无创或者微创等优点已经被逐步应用于临床。由于肿瘤干细胞的存在,传统的治疗方法如手术治疗、放疗、化疗无法彻底根治肿瘤,那么通过热疗是否可以有效地杀伤肿瘤干细胞呢? Burke<sup>[8]</sup>等比较了传统的水浴热疗和纳米材料介导的热疗对三阴性乳腺

癌干细胞的杀伤,表明纳米材料介导的热疗可有效杀伤乳腺癌干细胞,而对传统的热疗具有耐受性。那么磁性纳米材料介导的热疗是否也可以有效的杀伤肿瘤干细胞呢?Sadhukha 等<sup>[9]</sup>研究表明,磁性纳米材料介导的热疗不仅可以有效杀伤三阴性乳腺癌干细胞,而且可以降低肿瘤干细胞的成瘤能力,抑制肿瘤的生长。

然而热疗也存在自身的缺陷,在对肿瘤细胞进行非致死剂量的热疗时,可诱导细胞合成应激蛋白 HSP90。HSP90 可提高细胞对温度的耐受性,表现为细胞存活率的增加以及对后续热疗的耐受<sup>[3]</sup>。本课题组前期研究发现,在 LCSCs 中也存在着热耐受的现象,且此现象的产生与 HSP90 的表达水平升高密切相关,抑制 HSP90 的表达可以明显增加 LCSCs 对热疗的敏感性<sup>[7]</sup>。因此,我们选择了热疗联合 HSP90 抑制剂 17-AAG 来杀伤 CD90<sup>+</sup> LCSCs。体内实验结果也显示,联合 17-AAG 可以增加热疗疗效,二者具有良好的协同作用。

肿瘤干细胞作为肿瘤发生、发展、复发、转移以及耐药的根源,是肿瘤治疗的良好靶点。但是非肿瘤干细胞占肿瘤细胞的绝大部分,其产生的细胞因

子对机体恶液质状态和肿瘤的免疫逃逸具有重要作用,同时对肿瘤干细胞的生长具有保护和调控作用。随着研究的深入,研究者们发现非肿瘤干细胞在一定条件下可以转化为肿瘤干细胞,二者是动态变化的<sup>[10]</sup>。所以,单纯针对肿瘤干细胞或者非肿瘤干细胞的治疗都存在局限性。我们制备的 CD90@17-AAG/TMs 联合磁感应热可以有效杀伤总体的肿瘤细胞,推测可能是通过以下几种方式:①由于 EPR 效应的存在以及重复注射纳米材料,使得 CD90@17-AAG/TMs 可以有效地富集在肿瘤细胞间或者 CD90<sup>+</sup> LCSCs 内,从而实现 CD90<sup>-</sup> 细胞和 CD90<sup>+</sup> LCSCs 的共同杀伤;②研究表明,肿瘤细胞对纳米颗粒具有较强的吞噬能力(是正常细胞的 4~800 倍),而且还可以将其均匀分配到子代中去<sup>[11]</sup>。当 CD90<sup>+</sup> LCSCs 将 CD90@17-AAG/TMs 吞噬后,可将其中的磁性 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒子平均分至分化的 CD90<sup>-</sup> 和 CD90<sup>+</sup> 细胞中去。使 CD90<sup>-</sup> 的细胞也可以进行热疗而进行杀伤。当 CD90<sup>+</sup> LCSCs 热疗后崩解,释放出的磁性 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒子也可能被周围的非肿瘤干细胞吞噬,再置于 AMF 中也可起到杀伤的作用;③吞噬磁性纳米材料的肿瘤细胞在外加 AMF 照射作用下会使包含磁性纳米材料的溶酶体突然遭到大量破坏,大量的水解酶释放并活化,不仅会损伤肿瘤细胞本身,同时也会触发周围细胞的损伤<sup>[12]</sup>;④对细胞的非热能的破坏<sup>[12]</sup>;当 CD90@17-AAG/TMs 进入肿瘤组织后,外加 AMF 会产生磁性造成纳米材料的震荡而产生机械性的损伤;⑤另外,热疗也可以激活机体的免疫系统从而对肿瘤干细胞进行杀伤,但在本实验中的免疫缺陷小鼠体内不存在这种情况<sup>[13-14]</sup>。以上这几种情况也需要进一步的验证,这也是本课题的不足之处和今后需要深入研究的地方。

综上所述,我们认为 CD90 是很有潜力的肝癌干细胞标记物之一。CD90@17-AAG/TMs 联合磁感应热可以有效杀伤 CD90<sup>+</sup> 肝癌干细胞,抑制肿瘤的生长。

#### [参考文献]

- [1] Cui ZG, Piao JL, Kondo T, et al. Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by docosahexaenoic acid; Implication for cancer therapy[J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 215(2014): 46-53
- [2] Calderwood K. Hyperthermia, the tumor microenvironment and immunity[M]//*Tumor Ablation*. Springer Netherlands, 2013: 29-37
- [3] Sidera K, Patsavoudi E. HSP90 inhibitors; current development and potential in cancer therapy[J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2014, 9(1): 1-20
- [4] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer[J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-928
- [5] Li Y, Liu J, Zhong Y, et al. Biocompatibility of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au composite magnetic nanoparticles *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Nanomed*, 2011, 6: 2805
- [6] Wang L, Zhang J, An Y, et al. A study on the thermochemotherapy effect of nanosized As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/MZF thermosensitive magnetoliposomes on experimental hepatoma *in vivo* and *in vivo*[J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(31): 315102
- [7] Yang R, Tang Q, Miao F, et al. Inhibition of heat-shock protein 90 sensitizes liver cancer stem-like cells to magnetic hyperthermia and enhances anti-tumor effect on hepatocellular carcinoma-burdened nude mice[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10(31): 7345-7358
- [8] Burke AR, Singh RN, Carroll DL, et al. The resistance of breast cancer stem cells to conventional hyperthermia and their sensitivity to nanoparticle-mediated photothermal therapy[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(10): 2961-2970
- [9] Sadhukha T, Niu L, Wiedmann TS, et al. Effective elimination of cancer stem cells by magnetic hyperthermia[J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(4): 1432-1441
- [10] 喻 杨, 王喻义, 王乙钦, 等. 肿瘤干细胞与肿瘤微环境相互作用的研究进展[J]. *华西医学*, 2015, 30(9): 1784-1788
- [11] Jordan A, Scholz R, Wust P, et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): cancer treatment with magnetic fluid induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles [J]. *J Magn Magn Mater*, 1999, 201(1): 413-419
- [12] 刘力坤, 敖碧凤, 丁文金, 等. 磁性纳米粒子的性状及其在肿瘤磁靶向热疗中的应用与挑战[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2015, 42(9): 685-688
- [13] Frey B, Weiss EM, Rubner Y, et al. Old and new facts about hyperthermia-induced modulations of the immune system[J]. *Int J Hyperthermia*, 2012, 28(6): 528-542
- [14] Zunino B, Rubio-Patiño C, Villa E, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy leads to an anticancer immune response via exposure of cell surface heat shock protein 90[J]. *Oncogene*, 2016, 35(2): 261-268

[收稿日期] 2016-04-20