·论 著·

CXCR4阳性Lewis肺癌细胞耐药实验研究

辇伟奇[1],敖绪军[2],陈芳琳[1],陈正堂[1] (1. 第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所,重庆 400037;2. 解放军第532医院普通外科,安徽 黄山 245041)

[摘 要] **目的** 研究CXCR4阳性Lewis肺癌细胞(Lewis lung carcinoma,LLC)原发性耐药机制。**方法** 激光共聚焦检测小鼠移植瘤组织内CXCR4阳性LLC;以CXCR4作为磁珠分选细胞的表面标志,应用CCK-8法检测CXCR4阳性和阴性LLC对顺铂的敏感性,RT-PCR检测两者ABCG2、IGF1R mRNA表达情况。**结果** 小鼠移植瘤组织内散在分布胞膜呈红色荧光的CXCR4阳性LLC;CXCR4阳性与阴性LLC比较,具有更强的增顺铂抗拒性($P<0.05$);CXCR4阳性LLC的ABCG2 mRNA表达(0.5240±0.0078)明显高于CXCR4阴性LLC(0.3870±0.0066),相差显著($P<0.01$);CXCR4阳性LLC的IGF1R mRNA表达(0.4209±0.0074)明显高于CXCR4阴性LLC(0.1848±0.0066)相差显著,($P<0.01$)。**结论** Lewis肺癌细胞中的CXCR4阳性亚群具有更强上调ABCG2、IGF1R表达的能力,具有顺铂抗拒性。

[关键词] Lewis肺癌细胞;CXCR4;新生血管形成

[中图分类号] R734 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2009)06-0371-03

Chemoresistance of CXCR4 positive cells in Lewis lung carcinoma cell line

NIAN Wei-qi, AO Xu-jun, CHEN Fang-lin, CHEN Zheng-tang (Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the chemoresistance mechanism of the CXCR4 positive cells in Lewis lung carcinoma cell line (LLC). **Methods** CXCR4-positive LLC were observed by laser scanning confocal microscope (LSCM). Isolated by magnetic cell sorting, CXCR4-positive and CXCR4-negative LLC were planted in 96-well plates, and cisplatin was added in a concentration gradient. CCK-8 cell viability assay was used to determine theirs chemotherapy sensitivity to cisplatin. RT-PCR was performed to analyze ABCG2 and IGF1R mRNA express in CXCR4-positive and CXCR4-negative populations. **Results** Red immunofluorescent staining cells scattered in LLC growing tumor tissue. The chemotherapy sensitivity to cisplatin of CXCR4-positive LLC were lower than of CXCR4-negative LLC($P<0.05$). The expression of ABCG2 mRNA in CXCR4-positive LLC(0.5240±0.0078) was higher than that in CXCR4-negative LLC (0.3870±0.0066). The expression of IGF1R mRNA in CXCR4-positive LLC(0.4209±0.0074) was higher than that in CXCR4-negative LLC(0.1848±0.0066). **Conclusion** CXCR4-positive LLC exhibite higher resistance to chemotherapeutic drugs than CXCR4-negative LLC. The drug-resistance machanism may be relate to the over expression of ABCG2 and IGF1R.

Keywords: Lewis lung cancer cells; CXCR4; angiogenesis

病灶完全切除的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)患者接受顺铂为主辅助化疗后将有一定程度的获益,但由于肺癌细胞对化疗的抗拒性制约了其疗效[1-2]。现已有研究表明[3-4],肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSCs)与癌细胞化疗抗拒性的关系十分密切,CXCR4是高侵袭性肿瘤干细胞亚群的重要标志之一,同时其表达程度与NSCLC患者预后高度相关。本研究从小鼠Lewis肺癌细胞株(Lewis lung carcinoma,LLC)中,分离出具有肿瘤干细胞部分特性的CXCR4阳性LLC细胞,初步探讨其原发性耐药机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基、优等胎牛血清购自美国Hyclone公司;小鼠Easy Sep磁珠分选系统购自Stem Cell公司;PE标记大鼠抗小鼠CXCR4单克隆抗体,PE标记的IgG同型对照购自eBioscience公司。

1.2 细胞株和动物

小鼠Lewis肺癌细胞株由四川大学细胞中心提供;健康C57BL/6小鼠,4~6周,雌性,由第三军医大学动物所提供;激

[基金项目] 国家高技术研究发展计划"863"项目(2007AA02Z129);国家自然科学基金项目(30901790);重庆市自然科学基金项目(2008BB5117)

[作者简介] 辇伟奇(1977-),男,吉林省大安市人,主治医师,第三军医大学在读博士研究生,主要从事肺癌抗转移方面的研究。电话:(023)68752055,E-mail: nwqone@yahoo.com.cn

[通信作者] 陈正堂,E-mail: chenzhengtang@mail.tmmu.com.cn

[收稿日期] 2009-08-01 [修回日期] 2009-09-05

光扫描共聚焦显微镜，型号为 Leica TCS SP5，由第三军医大学基础医学部中心实验室提供。

1.3 细胞培养

LLC 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。

1.4 小鼠移植瘤组织中 CXCR4 表达检测

取对数生长期的 LLC 细胞，制成单细胞悬液，将细胞浓度调整为 5×10^6 个/mL，以 0.2 mL/只接种于 C57BL/6 小鼠右腋皮下，3 周后，将皮下肿瘤组织取出，制成冰冻切片，切片用冰丙酮固定 10 min，PBS 漂洗，5 min × 3 次，加入 PE 标记的 CXCR4 抗体（1 ∶ 200），对照组加入 PBS，室温孵育 30 min；倾去存留的荧光抗体，PBS 漂洗，5 min × 3 次，1 μg/mL DAPI 复染，室温孵育 10 min，5 min × 3 次，再用蒸馏水洗 1 min，除去盐结晶，用 50% 缓冲甘油封片，共聚焦显微镜下观察。

1.5 免疫磁珠分选

将 LLC 细胞制成单细胞悬液，调成 1×10^8 mL，悬于 100 μl 的 DMEM 培养液中；加入 PE 标记的 CXCR4 抗体 20 μl，避光，室温孵育 15 min；加入 Easy Sep PE selection cocktail 混合液 7 μl，充分混匀，避光，室温孵育 15 min；加入磁珠纳米颗粒 5 μl，充分混匀，室温孵育 10 min；加入含 2% FBS 和 1 mmol/L EDTA 的 PBS 至 2.5 mL，混匀细胞后将试管插入磁极中，静置 5 min；倒掉上清部分，保持磁极与试管倒置状态 2 ~ 3 s，然后使试管口恢复向上的位置；重复漂洗 4 次，用无血清的 DMEM 重悬细胞。应用流式细胞仪检测分选阳性细胞的纯度，台盼蓝染色检测细胞活力。

1.6 顺铂敏感性检测

将分选的 CXCR4 阳性和阴性 LLC 制备单细胞悬液，以 5×10^4/mL 分别接种 96 孔培养板，每孔 0.1 mL，培养 24 h 细胞贴壁后，加入不同浓度的顺铂终浓度为 0.25 ~ 16 μg/mL，每一浓度设 3 个测量孔，并设无细胞空白对照及无顺铂阴性对照孔，继续培养 72 h，加入 CCK-8 10 μl，3 h 后全自动酶标仪 450 nm 波长测各孔吸光度 OD 值，并计算抑制率。抑制率 =（对照孔 OD 值-试验孔 OD 值）/对照孔 OD 值 × 100%。

1.7 RT-PCR 检测 ABCG2、IGF1R mRNA 的表达

按照 Trizol 说明书分别提取 CXCR4 阳性和阴性 LLC 总 RNA，按试剂盒操作说明合成第 1 条链。紫外分光光度计测定 RNA 浓度，琼脂糖电泳证实 RNA 的完整性。ABCG2 引物序列为正义引物 5'-CCATAGCCACAGGCCAAAGT-3'，反义引物 5'-GGGCCACATGAT TCTTCCAC-3'；IGF1R 引物序列为正义引物 5'-CACTCTGTACCGCATCGATATC-3'，反义引物 5'-GGCAACCGGCAGAGCAATGATC-3'；GAPDH 引物序列为正义引物 5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCA TGAC-3'；反义引物 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCG TTCAGC-3'。PCR 反应条件：94 ℃ 30 s，61 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，29 个循环。每组实验重复 3 次。产物在质量浓度为 1% 的琼脂糖上电泳，以 GAPDH 为内参，做 OD 目的基因/OD GAPDH 的光密度比值测定。

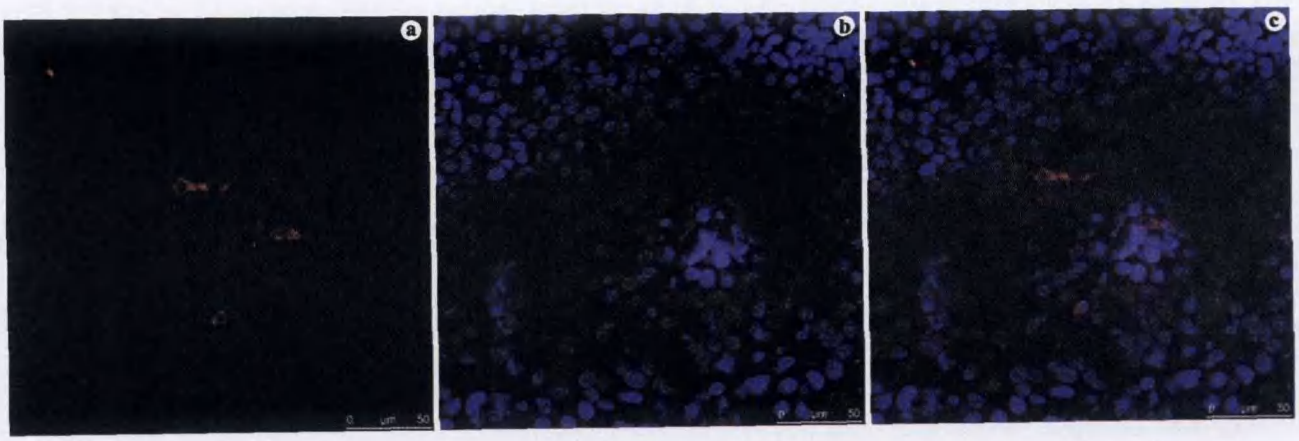
1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，利用 SPSS13.0 软件进行分析，组间比较采用 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CXCR4 抗原表达

在 Lewis 肺癌肿瘤组织中，可以看到少许细胞 CXCR4 染色阳性，阳性细胞分散分布于肿瘤组织中，见图 1。



a：CXCR4 荧光染色；b：DAPI 复染；c：荧光叠加

图 1 Lewis 肺癌肿瘤组织中 CXCR4 抗原表达

2.2 免疫磁珠分选

分选后 CXCR4 阳性细胞百分比为 95.58%（图 2），分选后细胞活力为 96.1%，显示应用磁珠分选可明显提高细胞纯度而基本不影响细胞活力。

2.3 癌细胞抑制率分析

两组细胞从顺铂浓度 1 μg/mL 开始，均受到明显抑制，但 CXCR4 阴性 LLC 与阳性 LLC 比较，对顺铂具有更高的敏感性；对两组细胞在顺铂各浓度下的抑制率进行 t 检验，结果表明两

组之间差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

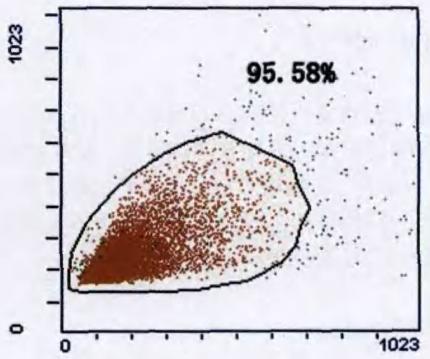


图 2 分选后 CXCR4 阳性细胞比例测定

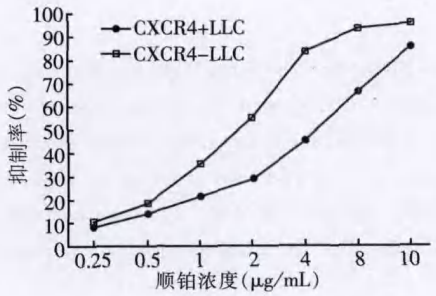
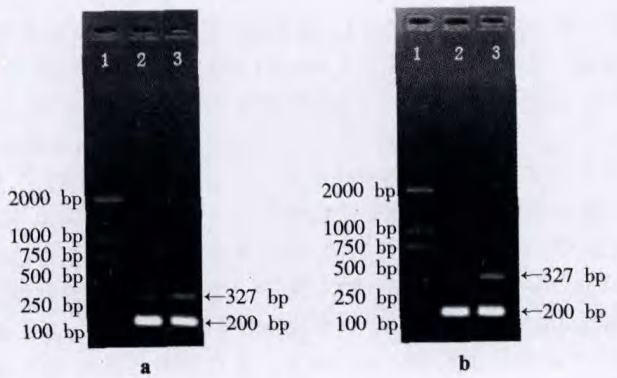


图 3 两组细胞顺铂耐药敏感性比较

2.5 ABCG2、IGF1R mRNA 表达

CXCR4 阳性和阴性 LLC 均有 ABCG2、IGF1R mRNA 表达,见图 4;CXCR4 阳性 LLC 的 ABGC2 mRNA 表达(0.5240 ± 0.0078)明显高于 CXCR4 阴性 LLC(0.3870 ± 0.0066)($P<0.01$);CXCR4 阳性 LLC 的 IGF1R mRNA 表达(0.4209 ± 0.0074)明显高于 CXCR4 阴性 LLC(0.1848 ± 0.0066),$P<0.01$;差异具有统计学意义。



a: ABCG2; b: IGF1R; 1:DNA Marker DL2000; 2: CXCR4 阴性 LLC PCR 产物; 3: CXCR4 阳性 LLC PCR 产物

图 4 ABCG2、IGF1R mRNA 在 LLC 不同亚群中的表达

3 讨论

NSCLC 是肺癌最为常见的组织类型(约占 80%),手术是早期患者最佳的治疗手段,但病灶完全切除的早期患者五年生存率也仅为 30% ~60%,相当一部分术后病人死于复发或转移。现已有研究证明[5],以铂类为主辅助化疗是延长 NSCLC 早期患者术后无病生存期和总生存期的有效手段。然而,与血液恶性肿瘤相比,NSCLC 的化疗敏感性较低,并可逐步获得化疗抗拒性,大大地限制了化疗疗效的进一步提高。既往有关 NSCLC 化疗耐药性的研究大多集中在其后天获得性,新近肿瘤干细胞的发现使人们逐渐关注到 NSCLC 的原发性耐药机制。

CXCR4/SDF-1 轴对 NSCLC 转移调控发挥着重要作用,在 NSCLC 术后患者外周血中可检测到 pan-cytokeratin、CXCR4 双阳性细胞[6-7]。Giulia 等[7]研究发现,对不同肺癌细胞株裸鼠移植瘤应用顺铂化疗 1 周后,CD133、CXCR4 双阳性细胞亚群比例明显上升。这表明 CXCR4 阳性肺癌细胞可能与肿瘤耐药密切相关。我们应用激光共聚焦在小鼠 Lewis 肺癌移植瘤组织中检测到 CXCR4 阳性 LLC,利用免疫磁珠实现了高效分选,进而证实了其对顺铂敏感性明显低于 CXCR4 阴性亚群,其 ABCG2、IGF1R mRNA 表达明显高于 CXCR4 阴性亚群,初步验证了其原发耐药机制。

ABCG2 和 IGF1R 均与肿瘤细胞耐药有关,近来研究发现它们还是肿瘤干细胞的相关标志。ABCG2/Bcrp1 被证实可能是大鼠气管上皮干细胞的标记物,Ho 等[8]从六个人肺癌细胞株(H460,A549,H441 等)分离 SP 细胞,证实其具有干细胞某些特性,且 ABCG2 呈高表达,对多种化疗药物耐药。IGF1R 是人体 ES 细胞的表面标志之一,IGF1R 信号通路在维持 ES 细胞自我更新过程中起重要作用[9]。董强刚等[10]在 A549 和 SPC-A 肺腺癌细胞中发现一个新的癌细胞亚群,此类癌细胞的表型特征为 CD24、IGF1R 双阳性,具有高侵袭性和高致瘤性。因此,我们在 Lewis 肺癌细胞株分离的 CXCR4 阳性亚群,ABCG2、IGF1R mRNA 呈高表达,很可能具有肿瘤干细胞的相关特征,值得进一步研究。

[参考文献]

[1] Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(21): 3552 - 3559.

[2] Brooks KR, To K, Joshi MB, et al. Measurement of chemoresistance markers in patients with stage Ⅲ non-small cell lung cancer: a novel approach for patient selection[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 76(1): 187 - 193.

(下转第 376 页)

一来自于将水分子从靶分子的沟槽中取代出来，这些沟槽主要存在于受体与配体的结合位点或活性部位[13]。③亲和筛选中回收的噬菌体均是与筛选配基结合牢固且能耐受漂洗过程的噬菌体。因此，通过筛选所获得的结合肽具有一定的特异性和亲和力。

筛选出的结合肽种类较少，可能的原因是：①由于P-糖蛋白胞外段分子较小，其蛋白序列中的免疫活性表位可能较少；②随筛选轮次的增加，使筛选到序列完全一致的肽的几率增加；③所用肽库经过几次扩增，可能使其中的某些序列丢失。

亲和筛选中，即使经过多轮筛选，也不能排除非特异性噬菌体克隆的存在，因而进一步挑取单个克隆，确定它与筛选配基的特异性吸附是实验必不可少的步骤。通常采用的确定阳性克隆的方法有：micropanning、ELISA、噬斑分析及膜印实验等[14]；其中，ELISA能半定量测定筛选配基与噬菌体克隆间的结合常数，是最为常用的方法。实验中，我们应用该方法筛选阳性克隆，采用不含P-糖蛋白的GST蛋白作为对照，以GST-Pgp A_{450}/GST A_{450} > 2.5作为阳性结果判定标准，避免了由于噬菌体用量过大所可能造成的假阳性，所获得的实验结果较为可靠。本研究Bio-NP-12肽免疫细胞化学分析结果表明，筛选获得的结合肽具有一定的亲和力，可与特定的肿瘤细胞结合，表现出一定的肿瘤特异性。

P-糖蛋白特异性结合肽的筛选，为人膀胱癌多药耐药的靶向逆转研究提供了导向载体。可以利用该合成短肽，联接化疗敏感药物或毒素，进行膀胱灌注给药，这样在获得治疗效果的同时，可避免对正常膀胱粘膜细胞的损伤。另外，通过构建重组P-糖蛋白结合肽免疫毒素，能更有效的应用于多药耐药的靶向逆转。

[参考文献]

[1] Sonneveld P, List AF. Chemotherapy resistance in acute myeloid leukaemia[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2001, 14(1): 211-233.

[2] Brown CK, Modzelewski RA, Johnson CS, et al. A novel approach for the identification of unique tumor vasculature binding peptides using an E. coli peptide display library[J]. AnnSurgOncol, 2000, 7(10): 743-749.

[3] 王祥卫，杨唐俊，张立新. P-糖蛋白胞外段的高效表达[J]. 中华泌尿外科杂志，2002，23(9)：565-567.

[4] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on virion surface[J]. Science, 1985, 228(4705): 1315-1317.

[5] Romagnoli G, Poloni F, Flego M, et al. Epitope mapping of the monoclonal antibody MM12.10 to external MDR1 P-glycoprotein domain by synthetic peptide scanning and phage display technologies[J]. Biol Chem, 1999, 380(5): 553.

[6] 汪 云，肖 岚，吕凤林. HPV18E2蛋白CTL表位多肽的构建与表达[J]. 局解手术学杂志，2007，16(6)：376-378.

[7] Devlin JJ, Panganiban LC, Devlin PE, et al. Random peptide library: a source of specific protein binding molecule[J]. Science 1990, 249(4967): 404-406.

[8] Zhu Z, Ming Y, Sun B. Identification of epitopes of trichosanthin by phage peptide library [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 282(4): 921-927.

[9] Ohkubo S, Miyadera K, Sugimoto Y, et al. Substrate phage as a tool to identify novel substrate sequences of proteases[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2001, 4(7): 573-583.

[10] Pasqualini R. Vascular targeting with phage peptide libraries[J]. Q J Nucl Med, 1999, 43(2): 159-162。

[11] Szardenings M. Phage display selection on whole cells yields a peptide specific for melanocortin receptor 1[J]. J Biol Chem' 1997, 272(44): 27943-27948.

[12] Wells JA. Binding in the growth hormone receptor complex[J]. Proc Natl Acd Sci USA, 1996, 93(1): 1-6.

[13] Ring D. What makes a binding site. [J] Curr Opin Struct Biol, 1995, 5(2): 825-829.

[14] Cook AD, Davies JM, Myers MA, et al. Mimotopes identified by phage display for the monoclonal antibody CII-C1 to type II collagen[J]. J Autoimmun, 1998, 11(3): 205-11.

（编辑：左艳芳）

（上接第373页）

[3] Kvinlaug BT, Huntly BJ. Targeting cancer stem cells[J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(7): 915-927.

[4] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(3): 313-323.

[5] Winton T, Livingston R, Johnson D, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2005, 352(25): 2589-2597.

[6] Reckamp KL, Figlin RA, Burdick MD, et al. CXCR4 expression on circulating pan-cytokeratin positive cells is associated with survival in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 213-221.

[7] Giulia Bertolini, Luca Roz, Paola Perego, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment[J]. PNAS, 2009, 106(38): 16281-16286.

[8] Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(10): 4827-4833.

[9] Bendall SC, Stwartm H, Menendez P, et al. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of p luripotent human cells in vitro[J]. Nature, 2007, 448 (7157): 1015-1021.

[10] 董强刚，姚 明，耿 沁，等. 人肺腺癌干细胞的分离及鉴定[J]. 肿瘤，2008，28(1)：1-7.

（编辑：左艳芳）