

桑辛素对喉癌干细胞干性表型调控的作用研究*

陈 辰¹, 许子寒², 王 力^{2△}

1. 四川省医学科学院·四川省人民医院耳鼻咽喉头颈外科(成都 610072); 2. 四川大学华西医院 肺癌中心(成都 610041)

【摘要】目的 探索桑辛素对喉癌干细胞干性表型调控的影响。**方法** 流式细胞仪分选并检测CD133⁺喉癌干细胞比例;肿瘤球形成实验检测CD133⁺喉癌干细胞的自我更新能力;Transwell实验检测CD133⁺喉癌干细胞的迁移能力;改良MTT实验检测化疗药物对CD133⁺喉癌干细胞的细胞毒性作用;免疫荧光染色、实时荧光定量PCR(RT-qPCR)及Western blot检测CD133⁺喉癌干细胞的干细胞标志物表达;在不同浓度的桑辛素处理CD133⁺喉癌干细胞后(以桑辛素0 μmol/L为对照),通过肿瘤球形成实验、Transwell实验、改良MTT实验及Western blot,分别检测CD133⁺喉癌干细胞的自我更新能力、迁移能力、化疗药物的细胞毒性作用及干细胞标志物表达变化。**结果** 流式细胞仪分选结果显示,CD133⁺喉癌干细胞占喉癌细胞的比例为(3.50±0.34)%;经过培养富集后,其比例可达(93.20±5.23)%。肿瘤球形成实验结果显示,与喉癌细胞相比,CD133⁺喉癌干细胞具有增强的自我更新能力($P<0.001$);Transwell实验显示,与喉癌细胞相比,CD133⁺喉癌干细胞的迁移能力增强($P<0.05$);改良MTT实验结果显示,与喉癌细胞相比,CD133⁺喉癌干细胞抵抗化疗药物(5-氟尿嘧啶及顺铂)的细胞毒性作用($P<0.05$);免疫荧光染色、RT-qPCR及Western blot结果显示,干细胞标志物(CD133、ALDH1、Sox2、ABCG2及N-cadherin)在CD133⁺喉癌干细胞中呈高表达水平。通过不同浓度的桑辛素处理CD133⁺喉癌干细胞,其自我更新能力降低($P<0.05$);迁移能力亦下降($P<0.05$);此外,桑辛素处理的CD133⁺喉癌干细胞对化疗药物的细胞毒性作用更加敏感($P<0.05$);Western blot结果显示,不同浓度的桑辛素处理的CD133⁺喉癌干细胞,其上述的干细胞标志物表达水平下调($P<0.05$)。**结论** CD133⁺喉癌干细胞具有干性表型特征;桑辛素可减弱喉癌干细胞的干性表型,可能与下调其干细胞标志物表达相关。

【关键词】 桑辛素 喉癌 肿瘤干细胞 干性表型

The Effect of Morusin on Stemness Phenotype of Laryngeal Cancer Stem Cell CHEN Chen¹, XU Zi-han², WANG Li^{2△}. 1. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; 2. Lung Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: wangli37029192@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the regulation effect of Morusin on stemness phenotype of laryngeal cancer stem cells. **Methods** Separation and detection the proportion of CD133⁺ laryngeal cancer stem cells through flow cytometry; evaluation the self-renewal ability of CD133⁺ laryngeal cancer stem cells by tumor sphere formation assay; exploring the migration ability of CD133⁺ laryngeal cancer stem cells by Transwell assay; analyzing the cytotoxicity of chemotherapy drugs on CD133⁺ laryngeal cancer stem cells by modified MTT assay; detection of the expression levels of stemness associated markers by immunofluorescence staining, RT-qPCR and Western blot. After treatment with different concentrations of Morusin, cells were performed the above experiments for detection the self-renewal ability, migration ability, cytotoxicity resistance and expression of stemness associated markers. **Results** Flow cytometry analysis showed that the proportion of CD133⁺ laryngeal cancer stem cells was (3.50±0.34)%, while after enrichment, the proportion increased to (93.20±5.23)%. CD133⁺ laryngeal cancer stem cells exhibited better self-renewal ability ($P<0.001$) and migratory ability ($P<0.05$); they were resistant to the cytotoxicity of chemotherapy drug ($P<0.05$), and highly expressed of stemness associated markers. After being treated with Morusin, the self-renewal and migratory abilities of CD133⁺ laryngeal cancer stem cells were reduced ($P<0.05$). In addition, after treated with Morusin, CD133⁺ laryngeal cancer stem cells were more sensitive to chemotherapy drugs; moreover, the expression levels of stemness associated markers were decreased. **Conclusion** CD133⁺ laryngeal cancer stem cells possessed stemness phenotypic characteristics. Morusin attenuated stemness phenotype of laryngeal cancer stem cells, which may be related to its down-regulation effect on stemness associated markers.

【Key words】 Morusin Laryngocarcinoma Cancer stem cell Stemness phenotype

喉癌是头颈部较为常见的恶性肿瘤之一^[1]。当前,对于喉癌的处理包括手术切除、放疗及化疗等综合治疗。尽

管上述治疗能给患者带来生存获益,然而,仍有部分患者,特别是晚期喉癌患者,在治疗后,甚至治疗过程中,就出现肿瘤的复发转移^[2]。当前有观点认为,喉癌组织内存在的肿瘤干细胞可能是导致喉癌复发转移的关键之所在。

* 四川省科技厅重点研发项目(No.2018FZ0115)资助

△ 通信作者, E-mail: wangli37029192@sina.com

肿瘤干细胞是肿瘤组织或细胞系中存在的一小类异质性细胞群,这类细胞群具有干细胞样表型特征,包括增强的自我更新能力、转移潜能、抵抗放化疗及高表达干性基因等^[3-4];现阶段的研究显示,减弱肿瘤干细胞干性表型,甚至杀灭肿瘤干细胞,可明显抑制肿瘤进展。

近年来,天然产物抗肿瘤研究受到了广泛的关注,有报道显示,天然产物,包括绿茶、黄连素等^[5-6],对肿瘤干细胞具有较好的抑制效应;我国天然产物资源丰富,探索并开发具有抗肿瘤干细胞活性的天然产物,通过饮食治疗,将成为减少肿瘤致死率的一个可行途径。桑辛素是来源于桑科植物根皮的烯化黄酮类物质。既往研究表明,桑辛素能抑制血小板聚集、抗超氧化自由基形成,具有抗菌活性。近期的研究显示,桑辛素能抑制肺癌、肝癌及结肠癌等多种肿瘤生长^[7-9];然而,对于抗肿瘤治疗后肿瘤复发及转移根源的肿瘤干细胞,桑辛素是否对其具有调控效应,目前尚无相关研究报道。本实验将桑辛素作用于喉癌干细胞,探索并研究其对喉癌干细胞干性表型调控的影响,以期对喉癌的治疗提供新策略。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 桑辛素(纯度 $\geq 90.0\%$)、顺铂(纯度 $\geq 99.9\%$)及5-氟尿嘧啶(纯度 $\geq 99\%$)购自Sigma公司;细胞培养基DMEM、DMEM/F12及胎牛血清购自Gibco公司;Transwell小室购自Corning公司;RNA提取试剂盒及反转录试剂盒购自TaKaRa公司; β -actin鼠单克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术公司;荧光标记的CD133购自eBioscience公司;CD133、ALDH1、Sox2、ABCG2、E-cadherin及N-cadherin购自北京博奥森生物技术有限公司;细胞裂解液RIPA及BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司。

1.1.2 细胞株 喉癌细胞株Hep-2购自中国科学院细胞库,用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的DMEM培养基,在体积分数为5%CO₂、37 °C的孵育箱中培养。流式细胞仪分选出的CD133⁺Hep-2细胞置于超低吸附的6孔板中,用含20 ng/mL表皮生长因子、20 ng/mL碱性成纤维细胞生长因子及2% B27的DMEM/F12培养基,在体积分数为5%CO₂、37 °C的孵育箱中培养富集。

1.2 实验方法

1.2.1 流式细胞仪分选及检测 分选:取对数生长长期的Hep-2细胞并消化为单个细胞,按1:500的稀释比加入FITC-CD133抗体,避光,室温孵育30 min后,通过流式细胞仪分选出CD133⁺Hep-2细胞。

检测:流式细胞术分选CD133⁺Hep-2细胞后,置于超低吸附的6孔板中,用含20 ng/mL表皮生长因子、20 ng/mL碱性成纤维细胞生长因子及2% B27的DMEM/F12培养基,在体积分数为5%CO₂、37 °C的孵育箱中培养富集7 d后,收集细胞并消化为单个细胞,按1:500的稀释比加入FITC-CD133抗体,避光,室温孵育30 min后,通过流式细胞仪检测CD133⁺Hep-2细胞的比例。

1.2.2 肿瘤球形成实验检测CD133⁺Hep-2细胞的自我更新能力 取对数生长长期的Hep-2细胞及CD133⁺Hep-2细胞并消化为单个细胞,以50及100细胞/孔的密度分别接种于96孔板中,培养12 d后进行肿瘤球的计数(50个细胞以上聚集为一个肿瘤球);肿瘤球形成率=最终形成的肿瘤球数量÷最初接种的细胞数量 $\times 100\%$ 。

取对数生长长期的CD133⁺Hep-2细胞并消化为单个细胞,以100个细胞/孔的密度接种于96孔板中,以不同浓度的桑辛素(2 $\mu\text{mol/L}$ 及4 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞,培养12 d后进行肿瘤球的计数,方法同上。

1.2.3 Transwell实验检测CD133⁺Hep-2细胞的迁移能力 取对数生长长期的Hep-2细胞及CD133⁺Hep-2细胞并消化为单个细胞,同时收集不同浓度的桑辛素(2 $\mu\text{mol/L}$ 及4 $\mu\text{mol/L}$)处理48 h后的CD133⁺Hep-2细胞,分别以 2×10^5 个细胞/孔的密度接种于Transwell小室的上室,下室加入相应培养基,48 h后,取出Transwell小室,进行固定、染色,并在倒置显微镜下观察细胞迁移数量并拍照。

1.2.4 改良MTT实验检测5-氟尿嘧啶、顺铂及桑辛素的细胞毒性 取对数生长长期的Hep-2细胞及CD133⁺Hep-2细胞并消化为单个细胞,分别以 2×10^3 细胞/孔的密度接种于96孔板中,过夜后,分别加入不同浓度的5-氟尿嘧啶(1、3、5、7及9 $\mu\text{g/mL}$)或顺铂(1、3、5、7及9 $\mu\text{g/mL}$),置于体积分数为5%CO₂、37 °C孵育箱中培养48 h后,每孔加入10 μL MTT,孵育4 h,再加入100 μL 10%SDS/0.01 mmol/L HCl后,置于孵箱内过夜,用酶标仪($\lambda = 570 \text{ nm}$)测定光密度(OD)值。取其平均值,计算细胞存活率。细胞存活率=(实验组OD值-对照组OD值)/(对照组OD值-对照组OD值) $\times 100\%$ 。运用软件Originpro9.0公式Growth/Sigmoidal Logistic进行半数致死量(50% inhibition concentration, IC₅₀)值的计算。对照组为未经5-氟尿嘧啶或顺铂处理的Hep-2细胞及CD133⁺Hep-2细胞;处理组为上述不同浓度5-氟尿嘧啶或顺铂处理的Hep-2细胞及CD133⁺Hep-2细胞。

取对数生长长期的CD133⁺Hep-2细胞并消化为单个细胞,以 2×10^3 细胞/孔的密度接种于96孔板中,待过夜后,分别加入不同浓度的桑辛素(0.5、1、2、4、6及8 $\mu\text{mol/L}$),置

于体积分数为5%CO₂、37℃孵箱中培养48 h后,细胞存活率及IC₅₀计算方法同上。对照组为未经桑辛素处理的CD133⁺ Hep-2细胞;处理组为上述不同浓度桑辛素处理的CD133⁺ Hep-2细胞。

收集2 μmol/L桑辛素处理48 h后的CD133⁺ Hep-2细胞,以2×10³个细胞/孔的密度接种于96孔板中,待过夜后,分别加入不同浓度的5-氟尿嘧啶(1、3、5、7及9 μg/mL)或顺铂(1、3、5、7及9 μg/mL),置于体积分数为5%CO₂、37℃孵箱中培养48 h后,细胞存活率及IC₅₀计算方法同上。对照组为未经5-氟尿嘧啶或顺铂处理的CD133⁺ Hep-2细胞;处理组为上述不同浓度5-氟尿嘧啶或顺铂处理的CD133⁺ Hep-2细胞。

1.2.5 免疫荧光染色检测CD133⁺ Hep-2细胞的干细胞标志物CD133及ALDH1表达 取对数生长期的Hep-2细胞及CD133⁺ Hep-2细胞,分别接种于96孔板中,待过夜后,去除未贴壁细胞,加入体积分数为4%多聚甲醛固定15 min,加入1%Triton X-100透化液,10 min后,加入5%牛血清蛋白30 min, PBS洗涤1次,分别加入一抗CD133及ALDH1(1:200稀释),4℃过夜后,加入适当的荧光二抗,37℃避光孵育1 h,加入DAPI染细胞核,10 min后,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.6 实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 检测CD133⁺ Hep-2细胞的干细胞标志物CD133、ALDH1、Sox2、ABCG2、E-cadherin及N-cadherin表达 取对数生长期的Hep-2细胞及CD133⁺ Hep-2细胞,用Trizol提取总RNA并检测RNA浓度。每管加入等量的RNA,利用逆转录试剂盒进行反转录得到cDNA,利用SYBR GREEN Real-time PCR Master Mix作为荧光染料,加入不同引物,进行实时定量PCR反应;以GAPDH作为内参,用2^{-ΔΔCt}法计算CD133、乙醛脱氢酶1(ALDH1)、胚胎干细胞关键蛋白抗体(Sox2)、三磷酸腺苷结合转运蛋白G超家族成员2抗体(ABCG2)、E-cadherin及N-cadherin相对表达水平。扩增反应条件:95℃ 45 s, 56℃ 30 s, 72℃ 3 min, 共40个循环。PCR引物由上海生工生物公司合成,引物序列见表1。

1.2.7 Western blot检测CD133⁺ Hep-2细胞的干细胞标志物CD133、ALDH1、Sox2、ABCG2、E-cadherin及N-cadherin表达 取对数生长期的Hep-2细胞、CD133⁺ Hep-2细胞以及经不同浓度(2 μmol/L及4 μmol/L)的桑辛素处理48 h后的CD133⁺ Hep-2细胞,用RIPA裂解液裂解细胞,并用BCA蛋白定量试剂盒测蛋白浓度。每孔加入蛋白样品(30 μg)进行SDS-PAGE电泳,电泳结束后进行PVDF转膜,5%的脱脂奶粉室温封闭1 h后,加入一抗CD133、ALDH1、Sox2、ABCG2、E-cadherin及N-cadherin

表 1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

Gene	Primer sequence (5' to 3')
CD133	Upstream: CTGGGGCTGCTGTTATTATTC
	Downstream: ACGCCTTGTCCTTGGTAGTGT
ALDH1	Upstream: CCTGTCTACTCACCGATTGT
	Downstream: CCTCCTCAGTTGCAGGATTAA
Sox2	Upstream: TAGAGCTAGACTCCGGGCGAT
	Downstream: TTGCCTTAACAAGACCACGA
ABCG2	Upstream: CCATAGCCACAGGCCAAAGT
	Downstream: GGGCCACATGATTCTTCCAC
E-cadherin	Upstream: AGGATGGTGTAAGCGATGCG
	Downstream: CGGGAATGCAGTTGAGGATC
N-cadherin	Upstream: AGGTTTGCCAGTGTGACTCC
	Downstream: TGATGATGCAGAGCAGGATG
GAPDH	Upstream: ACCACAGTCCATGCCATCAC
	Downstream: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

CD133: Cluster of differentiation 133; ALDH1: Aldehyde dehydrogenase family 1; Sox2: Sex determining region Y-box 2; ABCG2: ATP-binding cassette sub-family G member 2; E-cadherin: Epithelial calcium dependent adhesion protein; N-cadherin: Neuronal calcium dependent adhesion protein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

(1:500稀释),4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,然后加入二抗(1:10 000稀释),室温摇床孵育1 h,TBST洗膜3次,每次15 min后,加入显影液;利用Tanon凝胶成像系统进行图像采集,并通过Image J软件检测各条带灰度值,以内参β-actin灰度值为1,计算其他条带的相对灰度值进行半定量分析。

1.3 统计学方法

文中所有实验均在相同条件下重复3次。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异比较时如果方差具有齐同性用F检验,方差不具齐同性则用秩和检验;两组间差异比较用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

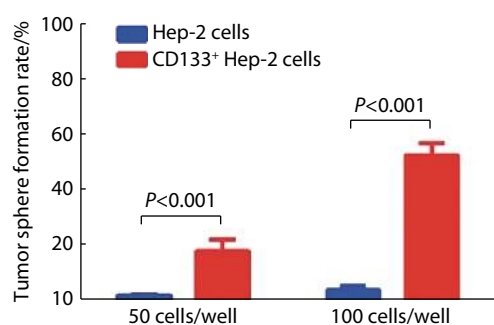
2 结果

2.1 CD133⁺ Hep-2细胞的流式分选及检测

通过流式细胞仪,以CD133为标志,对Hep-2细胞进行分选,CD133⁺ Hep-2细胞比例为(3.50±0.34)%;进一步对分选的CD133⁺ Hep-2细胞进行富集培养,并通过流式细胞仪检测,富集后的CD133⁺ Hep-2细胞比例为(93.20±4.23)%。

2.2 CD133⁺ Hep-2细胞自我更新能力增强

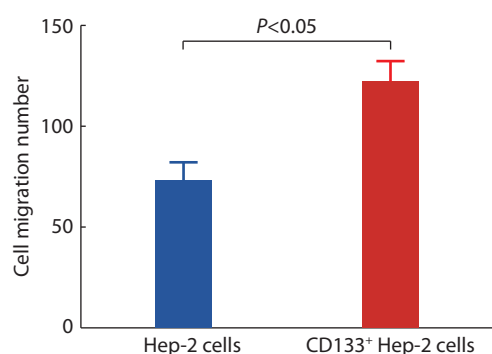
肿瘤球形成实验结果(图1)显示,富集的CD133⁺ Hep-2

图1 CD133⁺Hep-2细胞的肿瘤球形成率 (n=3)Fig 1 Tumor sphere formation efficiency of CD133⁺Hep-2 cells (n=3)

细胞的肿瘤球形成率高于Hep-2细胞($P < 0.001$), 提示相对于Hep-2细胞, CD133⁺Hep-2细胞自我更新能力更强。

2.3 CD133⁺Hep-2细胞迁移能力增强

Transwell实验证实, CD133⁺Hep-2细胞的迁移能力较Hep-2细胞增强($P < 0.05$)。见图2。

图2 CD133⁺Hep-2细胞的迁移能力 (n=3)Fig 2 Migration of CD133⁺Hep-2 cells (n=3)

2.4 CD133⁺Hep-2细胞具有抵抗化疗药物细胞毒性的能力

改良MTT实验结果(图3)显示, 与Hep-2细胞比较, CD133⁺Hep-2细胞对化疗药物5-氟尿嘧啶及顺铂的细胞毒性作用具有明显抵抗($P < 0.05$); 对于5-氟尿嘧啶, Hep-

2细胞的 IC_{50} 为3.81 $\mu\text{g/mL}$, 而CD133⁺Hep-2细胞的 IC_{50} 为14.92 $\mu\text{g/mL}$; 对于顺铂, Hep-2细胞的 IC_{50} 为2.71 $\mu\text{g/mL}$, 而CD133⁺Hep-2细胞的 IC_{50} 为9.54 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 CD133⁺Hep-2细胞高表达干细胞标志物

免疫荧光染色Hep-2细胞及CD133⁺Hep-2细胞结果显示, 干细胞标志物CD133及ALDH1在CD133⁺Hep-2细胞上的荧光强度明显强于Hep-2细胞(图4A); qPCR(图4B)及Western blot(图4C)检测干细胞标志物表达, 结果显示, 与Hep-2细胞比较, CD133、ALDH1、Sox2、ABCG2及N-cadherin基因和蛋白表达水平在CD133⁺Hep-2细胞升高, 而E-cadherin水平下降($P < 0.05$)。

2.6 桑辛素对CD133⁺Hep-2细胞具有细胞毒性作用

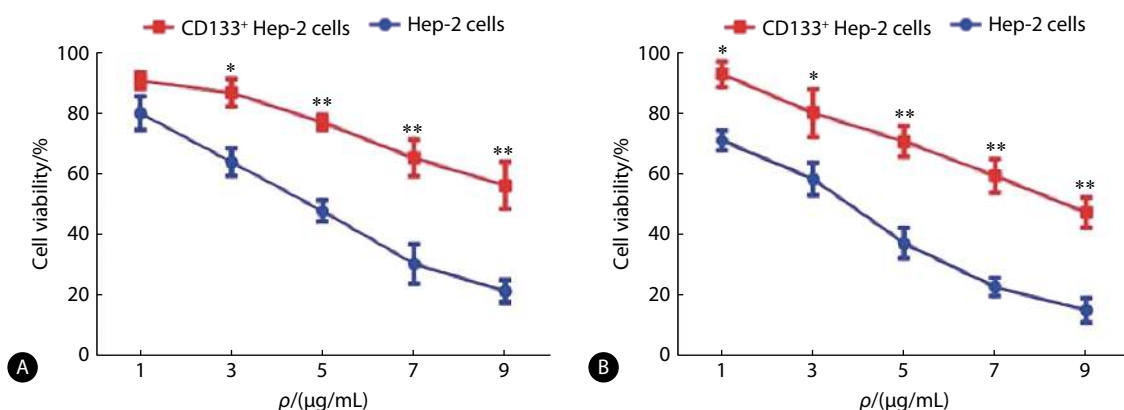
改良MTT实验结果(图5)显示, 桑辛素对CD133⁺Hep-2细胞具有明显的增殖抑制作用, 随着剂量的增加, 增殖抑制作用增强, 呈剂量依赖关系($P < 0.05$); 其 IC_{50} 为2.43 $\mu\text{mol/L}$; 基于 IC_{50} , 在后续的实验, 我们选用的桑辛素浓度为2 $\mu\text{mol/L}$ 及4 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.7 桑辛素抑制CD133⁺Hep-2细胞的自我更新能力

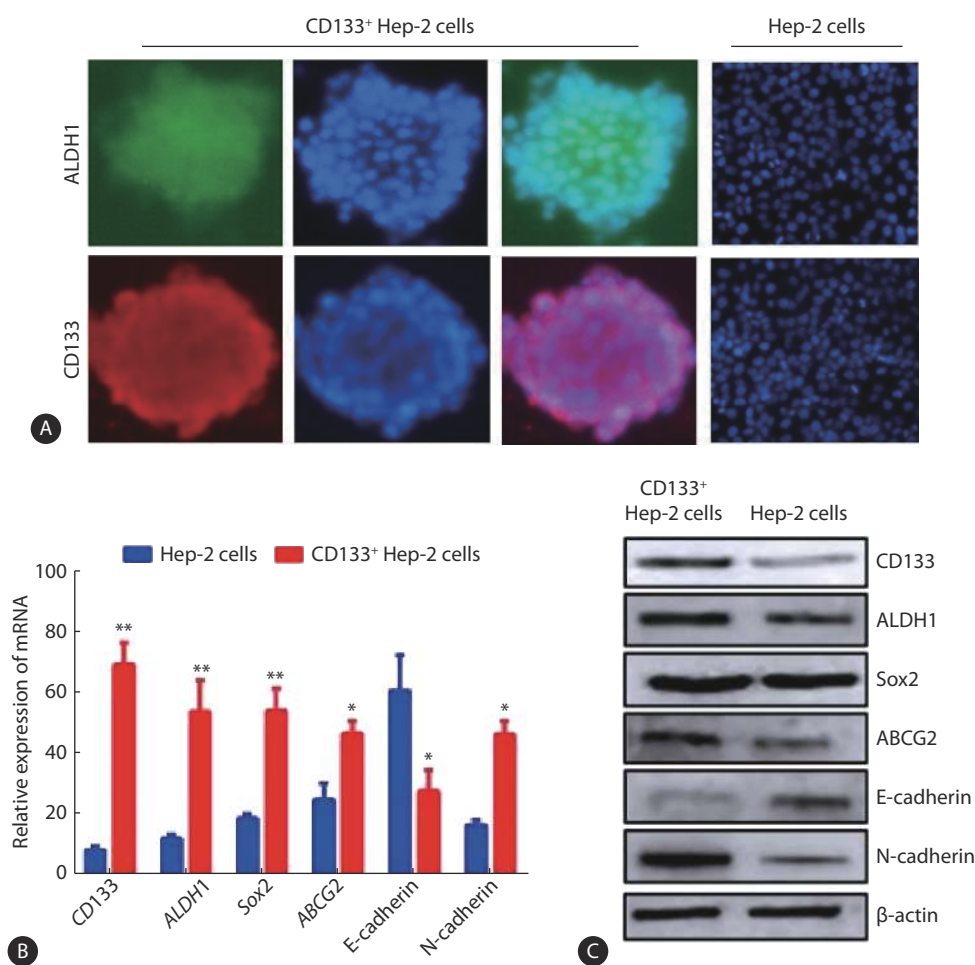
与对照组相比, 2 $\mu\text{mol/L}$ 及4 $\mu\text{mol/L}$ 桑辛素处理后的CD133⁺Hep-2细胞, 其肿瘤球形成率降低($P < 0.05$), 见图6, 提示桑辛素对CD133⁺Hep-2细胞的自我更新能力具有抑制作用。2 $\mu\text{mol/L}$ 与4 $\mu\text{mol/L}$ 桑辛素处理组间, CD133⁺Hep-2细胞的肿瘤球形成率比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.8 桑辛素抑制CD133⁺Hep-2细胞的迁移

与对照组相比, 2 $\mu\text{mol/L}$ 及4 $\mu\text{mol/L}$ 桑辛素处理后的CD133⁺Hep-2细胞, 其迁移细胞数下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示桑辛素可能对CD133⁺Hep-2细胞的转移潜能具有抑制效应(图7)。2 $\mu\text{mol/L}$ 与4 $\mu\text{mol/L}$ 桑辛素处理组间, CD133⁺Hep-2细胞的迁移细胞数比较, 差异无

图3 化疗药物5-氟尿嘧啶(A)及顺铂(B)对CD133⁺Hep-2细胞的细胞毒性作用 (n=3)Fig 3 Cytotoxicity of 5-fluorouracil (A) and cisplatin (B) to CD133⁺Hep-2 cells (n=3)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. Hep-2 cells.

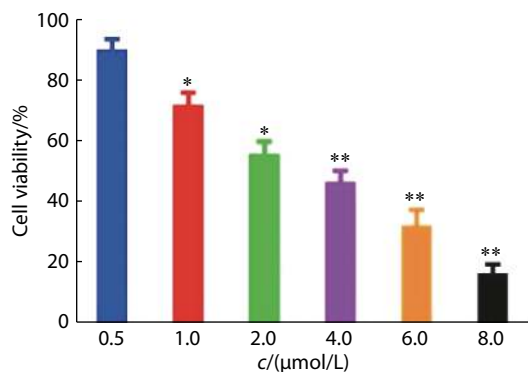
图 4 CD133⁺Hep-2细胞的干细胞标志物表达 (n=3)Fig 4 The expression levels of stemness associated markers of CD133⁺Hep-2 cells (n=3)

A: Immunofluorescent staining of CD133 and ALDH1, $\times 100$; B: qPCR analysis of CD133, ALDH1, Sox2, ABCG2, E-cadherin and N-cadherin; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. Hep-2 cells; C: Western blot analysis of CD133, ALDH1, Sox2, ABCG2, E-cadherin and N-cadherin.

统计学意义 ($P > 0.05$)。

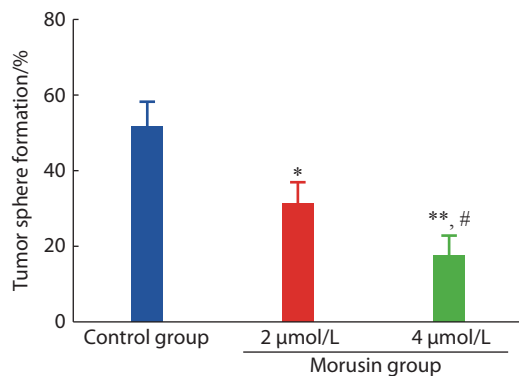
2.9 桑辛素增强CD133⁺Hep-2细胞对化疗药物细胞毒性作用的敏感性

结果显示(图8), 桑辛素提高了CD133⁺Hep-2细胞对

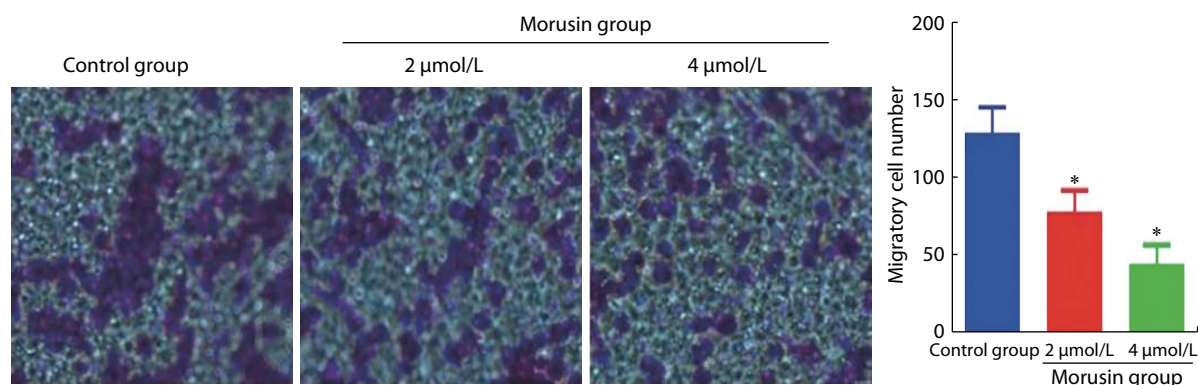
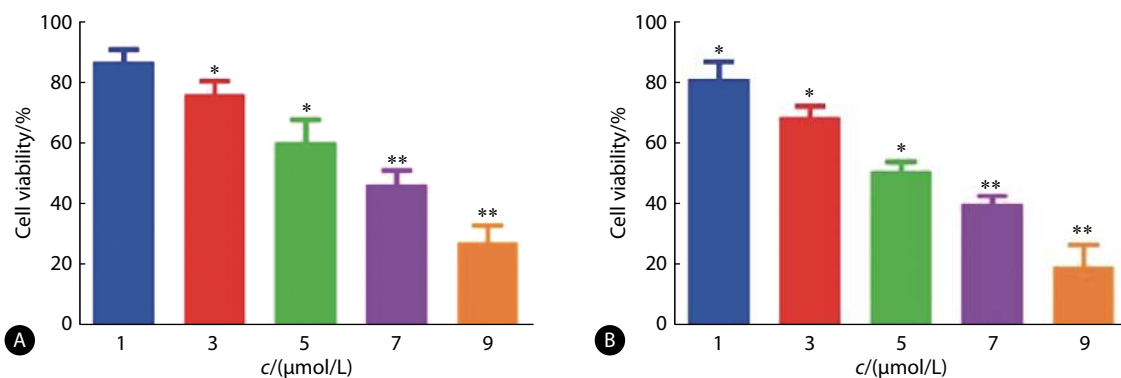
图 5 桑辛素对CD133⁺Hep-2细胞的细胞毒性作用 (n=3)Fig 5 Cytotoxicity of Morusin on CD133⁺Hep-2 cells (n=3)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. control group (100%).

5-氟尿嘧啶及顺铂的细胞毒性作用的敏感性; 对于5-氟尿嘧啶, 其 IC_{50} 为5.83 $\mu\text{g/mL}$; 对于顺铂, 其 IC_{50} 为4.28 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 6 桑辛素对CD133⁺Hep-2细胞的肿瘤球形成率的影响 (n=3)Fig 6 Tumor sphere formation efficiency of CD133⁺Hep-2 after Morusin treatment (n=3)

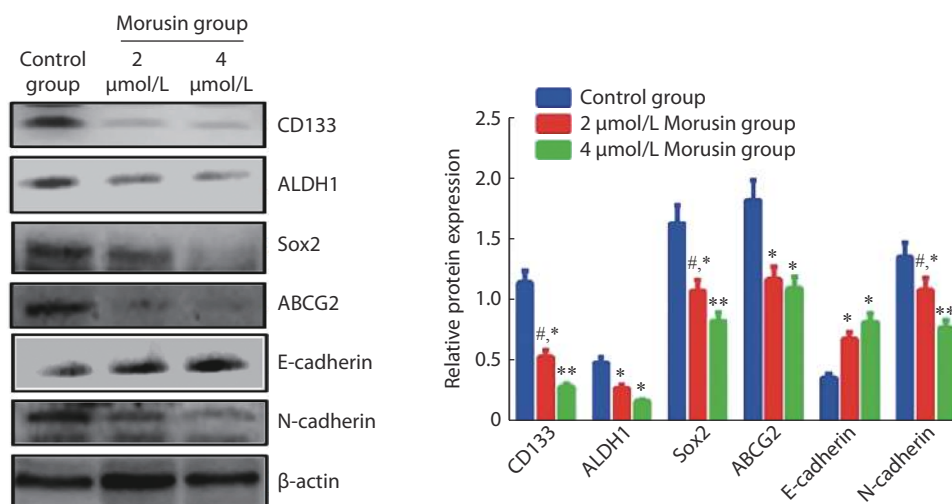
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. 2 $\mu\text{mol/L}$ Morusin group.

图7 桑辛素对CD133⁺Hep-2细胞的迁移能力的影响 (×100, *n*=3)Fig 7 Tumor sphere formation efficiency of CD133⁺Hep-2 after Morusin treatment (×100, *n*=3)* *P*<0.05, vs. control group.图8 2 μmol/L桑辛素对CD133⁺Hep-2细胞化疗敏感性的影响 (*n*=3)Fig 8 Chemosensitivity of CD133⁺Hep-2 cancer stem cells after 2 μmol/L Morusin treatment (*n*=3)A: 5-fluorouracil; B: Cisplatin. * *P*<0.05, ** *P*<0.01, vs. control group (100%).

2.10 桑辛素抑制CD133⁺Hep-2细胞的干细胞标志物表达

Western blot结果显示(图9),与对照组相比,2 μmol/L及4 μmol/L桑辛素处理后的CD133⁺Hep-2细胞,

其干细胞标志物CD133、ALDH1、Sox2、ABCG2及N-cadherin表达水平均下调,E-cadherin表达水平上调,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。2 μmol/L与4 μmol/L桑辛素

图9 2 μmol/L与4 μmol/L桑辛素对CD133⁺Hep-2细胞的干细胞标志物表达的调控 (*n*=3)Fig 9 The expression of stemness associated markers of CD133⁺Hep-2 cells after 2 μmol/L or 4 μmol/L Morusin treatment (*n*=3)* *P*<0.05, ** *P*<0.01, vs. control group; #*P*<0.05, vs. 4 μmol/L Morusin group.

处理组间, CD133⁺ Hep-2 细胞 CD133、Sox2 及 N-cadherin 表达水平比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 2 $\mu\text{mol/L}$ 与 4 $\mu\text{mol/L}$ 桑辛素处理组间, CD133⁺ Hep-2 细胞 ALDH1、ABCG2 及 E-cadherin 表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

喉癌是头颈部较为常见的一类肿瘤。尽管目前的治疗手段包括手术切除、放疗及化疗能让喉癌患者获益,但总体的 5 年生存率并不高,部分喉癌患者,特别是晚期患者,预后较差。因此,探索新的治疗策略至关重要。

肿瘤干细胞是存在于肿瘤组织或肿瘤细胞株中一小类异质性细胞群。这类细胞具有干细胞样表型,包括增强的自我更新及转移潜能、抵抗放化疗等。近年来的研究显示,肿瘤干细胞的存在可能是大多数肿瘤在治疗后转移复发的根源,而靶向肿瘤干细胞,减弱肿瘤干细胞的干性表型,甚至杀灭肿瘤干细胞,可明显抑制肿瘤进展^[10]。当前,针对肿瘤干细胞的鉴定富集并筛选具有靶向肿瘤干细胞的药物已成为基础及临床肿瘤研究的热点。

既往研究显示, CD133 可能是喉癌干细胞的标志物^[11]。基于此,我们通过流式细胞仪,以 CD133 标记喉癌细胞,分选出 CD133⁺ 喉癌干细胞,并采用干细胞培养基富集,我们发现, CD133⁺ 喉癌干细胞在喉癌细胞的比例为 $(3.50 \pm 0.34)\%$; 在培养富集后, CD133⁺ 喉癌干细胞的比例为 $(93.20 \pm 4.23)\%$ 。肿瘤干细胞的自我更新能力是当前抗瘤治疗后,肿瘤复发的主要原因之一^[12]。通过分析肿瘤球形成率,我们发现, CD133⁺ 喉癌干细胞的成球率明显高于贴壁培养的喉癌细胞。上皮间叶转换是细胞间相互作用的细胞及分子过程,它涉及了上皮细胞极性的失去及间叶细胞表型的获得,从而使细胞获得更强的运动及基膜侵袭能力。近年来,更多的实验数据亦证实上皮间叶转换是肿瘤干细胞的干性表型特征之一^[13]。通过 Transwell 迁移实验,我们发现, CD133⁺ 喉癌干细胞的迁移能力增强,间质表型标志物 N-cadherin 表达升高,上皮表型标志物 E-cadherin 表达下降,提示 CD133⁺ 喉癌干细胞具有更强的转移潜能。放化疗抵抗是肿瘤干细胞的另一重要的表型特征^[3]; 化疗药物 5-氟尿嘧啶及顺铂是临床上喉癌治疗的常用药物,本研究显示,与喉癌细胞相比, CD133⁺ 喉癌干细胞能抵抗上述化疗药物的细胞毒性作用。干性基因 CD133、ALDH1 及 Sox2 在维持肿瘤干细胞干性表型中扮演重要角色^[14]。通过免疫荧光染色, RT-qPCR 及 Western blot 检测,我们发现,在 CD133⁺ 喉癌干细胞中 CD133、ALDH1 及 Sox2 的表达水平明显高于贴壁培养的喉癌

细胞。

以上实验结果表明,流式细胞仪分选的 CD133⁺ 喉癌干细胞具有干性表型特征,包括增强的自我更新能力、转移潜能以及较强的抵抗化疗药物细胞毒性的作用;在干细胞培养基中能较好的富集喉癌干细胞,为我们后续的实验研究提供持续的、稳定的喉癌干细胞来源。

桑辛素被证实对多个癌肿具有细胞毒性作用,包括肺癌、肝癌及结肠癌等^[7,9]。然而,桑辛素对喉癌干细胞的作用未见相关文献报道。我们首先证实,桑辛素对 CD133⁺ Hep-2 细胞的增殖具有抑制作用;此外,桑辛素处理后的 CD133⁺ Hep-2 细胞,其肿瘤球形成率下降,提示桑辛素可减弱喉癌干细胞的自我更新能力;自我更新能力与肿瘤干细胞的干细胞标志物 CD133、ALDH1 及 Sox2 密切相关^[14];我们进一步发现,桑辛素处理 CD133⁺ Hep-2 细胞后, CD133、ALDH1 及 Sox2 的表达水平亦明显下调。上皮间叶转换在肿瘤发生转移的过程中扮演重要角色^[13]。既往的研究报道,天然产物诸如小麦草提取物,可有效抑制喉癌的转移^[15]。本研究亦发现,桑辛素可抑制 CD133⁺ Hep-2 细胞的迁移。E-cadherin 及 N-cadherin 与上皮间叶转换密切相关。有文献报道,喉癌细胞中, N-cadherin 表达下调, E-cadherin 表达上调,可减弱喉癌细胞转移能力^[16]。本研究发现,桑辛素可下调 N-cadherin 的表达,上调 E-cadherin 水平,进一步证实桑辛素对喉癌干细胞的迁移抑制效应。此外,本研究还发现,桑辛素可下调干细胞标志物 ABCG2 的表达。ABCG2 被认为与肿瘤干细胞耐药有关,其可通过对细胞毒性物质的外排,从而表现出抵抗化疗药物的作用^[17]。的确,我们发现,在桑辛素处理 CD133⁺ Hep-2 细胞后,增加了 CD133⁺ Hep-2 细胞对 5-氟尿嘧啶及顺铂细胞毒性的敏感性,提高了化疗药物的疗效。

综上所述, CD133⁺ Hep-2 细胞具有干性表型特征;桑辛素可减弱 CD133⁺ Hep-2 细胞的干性表型,包括抑制 CD133⁺ Hep-2 细胞的自我更新能力、转移潜能以及化疗抵抗,可能与其下调 CD133⁺ Hep-2 细胞的干细胞标志物密切相关。因此,桑辛素作为治疗喉癌的潜在新药,值得被进一步研究及开发利用。

参 考 文 献

- [1] SANDERSON R J, IRONSIDE J A. Squamous cell carcinomas of the head and neck. *BMJ*, 2002, 325(7368): 822-827.
- [2] TAGUCHI T, NISHIMURA G, TAKAHASHI M, *et al.* Treatment results and prognostic factors for advanced squamous cell carcinoma of the larynx treated with concurrent chemoradiotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72(4): 837-843.
- [3] BATLLE E, CLEVERS H. Cancer stem cell revisited. *Nat Med*, 2017,

- 23(10): 1124–1134.
- [4] WANG L, LIU Y Y, ZHOU Y L, *et al.* Zoledronic acid inhibits the growth of cancer stem cell derived from cervical cancer cell by attenuating their stemness phenotype and inducing apoptosis and cell cycle arrest through the Erk1/2 and Akt pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 93.
- [5] FUJIKI H, WATANABE T, SUEOKA E, *et al.* Cancer prevention with green tea and its principal constituent, EGCG: from early investigations to current focus on human cancer stem cells. *Mol Cells*, 2018, 41(2): 73–82.
- [6] PARK S H, SUNG J H, CHUNG N. Berberine diminishes side population and down-regulates stem cell-associated genes in the pancreatic cancer cell lines PANC-1 and MIA PaCa-2. *Mol Cell Biochem*, 2014, 394(1/2): 209–215.
- [7] PARK H J, MIN T R, CHI G Y, *et al.* Induction of apoptosis by morusin in human non-small cell lung cancer cells by suppression of EGFR/STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(1): 194–200.
- [8] GAO L, WANG L, SUN Z, *et al.* Morusin shows potent antitumor activity for human hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* through apoptosis induction and angiogenesis inhibition. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 1789–1802.
- [9] LEE J C, WON S J, CHAO C L, *et al.* Morusin induces apoptosis and suppresses NF-kappaB activity in human colorectal cancer HT-29 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(1): 236–242.
- [10] EUN K, HAM S W, KIM H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Rep*, 2017, 50(3): 117–125.
- [11] WEI X, HE J, WANG J, *et al.* MPEG-CS/Bmi-1RNAi nanoparticles synthesis and its targeted inhibition effect on CD133⁺ laryngeal stem cells. *J Nanosci Nanotechnol*, 2018, 18(3): 1577–1584.
- [12] STEINBICHLER T B, DUDAS J, SKUORTSOV S, *et al.* Therapy resistance mediated by cancer stem cells. *Semin Cancer Biol*, 2018, 53: 156–167.
- [13] INAN S, HAYRAN M. Cell signaling pathways related to epithelia mesenchymal transition in cancer metastasis. *Crit Rev Oncog*, 2019, 24(1): 47–54.
- [14] YU S S, CIRILLO N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 65–73.
- [15] SHAKYA G, BALASUBRAMANIAN S, HODA M, *et al.* Inhibition of metastasis and angiogenesis in Hep-2 cells by wheatgrass extract—an *in vitro* and *in silico* approach. *Toxicol Mech Methods*, 2018, 28(3): 205–218.
- [16] LIU F F, DONG L, YANG X, *et al.* KLF5 silence attenuates proliferation and epithelial-mesenchymal transition induction in Hep-2 cells through NF-kB signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(9): 3867–3875.
- [17] SBNIS N G, MILLER A, TITUS M A, *et al.* The efflux transporter ABCG2 maintains prostate stem cells. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(2): 128–140.

(2019 – 11 – 22收稿, 2020 – 07 – 07修回)

编辑 汤 洁