

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.02.002

· 研究快报 ·

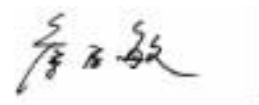
## 抗肝癌干细胞功能性单克隆抗体的研制

孙力超, 赵璇<sup>▲</sup>, 遇琬, 韩璐璐, 刘彤, 胡海, 孙立新, 杨治华, 冉宇靓(中国医学科学院北京协和医学院肿瘤研究所 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

**专家点评** 目前临床上治疗肝癌已有手术、化疗、介入治疗、肝移植等多种手段,但肝癌患者5年生存率仍仅有14%~30%,其根本原因是肝癌的转移和复发率高,且现有治疗措施对转移、复发疗效甚微。近年来肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)已成为肿瘤研究的新热点,CSC是肿瘤转移、复发和耐药的根源。因此,建立靶向CSC的治疗新策略,对于治疗肿瘤转移、复发可能会有新突破。

本期刊登了孙力超等人的论文,作者在前期成功分离获得人肝癌组织中CSC的基础上,采用独特的技术制备了大容量功能性单抗库,通过对2964个杂交瘤克隆的筛选,获得了116株能与入肝癌干细胞样细胞膜结合的阳性单抗。其中有33株能识别SP分选的CSC,6株还能识别CD133<sup>+</sup>CSC和含高比例CSC的成球细胞。裸鼠体内致瘤性研究发现,其中4株单抗分选的阳性细胞的致瘤性较单抗阴性细胞高100倍,证明了这4株单抗是抗肝癌CSC的单抗。此外,体外功能研究还证明,这些单抗能显著抑制SP分选的CSC和成球CSC的增殖与成球生长。该研究不仅具有很强的创新性,而且还有重要的理论和实际意义。其创新和意义在于:(1)用肝癌干细胞样细胞免疫小鼠直接研制抗CSC单抗的报道很少,有关抗肝癌CSC单抗的研究未见有报道;(2)首次获得了多株抗人肝癌CSC单抗,为阐明肝癌CSC在肝癌转移、复发、耐药中的作用及机制奠定了重要基础,同时还可用这些单抗筛查肝癌CSC新的标志物或重要相关分子;(3)初步证明了4株单抗是具有显著抑制肝癌CSC增殖和成球生长的功能性单抗,提示这些功能性单抗将可能为靶向肝癌CSC的治疗提供有应用潜力的候选药物。

教育部长江学者、分子肿瘤学国家重点实验室主任  
国家“863”计划专家组组长、“973”计划首席科学家  
中国医学科学院副院长、中国协和医科大学副校长



**[摘要]** 目的:研制抗肝癌干细胞的功能性单克隆抗体,为肝癌干细胞的靶向治疗提供候选抗体药物。方法:从人肝癌组织中分离人肝癌干细胞样细胞(human liver cancer stem-like cells, hLCSLCs),免疫BALB/c裸鼠,采用脾细胞融合法制备大容量单抗库。应用细胞免疫荧光、无血清成球培养、裸鼠皮下成瘤等方法筛选、鉴定特异识别肝癌干细胞的单克隆抗体。流式细胞仪分选hLCSLCs侧群细胞(hLCSLCs side population cells, hLCSLCs-SP),无血清悬浮培养法和CCK-8法检测杂交瘤单抗对hLCSLC-SP自我更新和增殖能力的影响。结果:细胞融合后获得2964株杂交瘤克隆,在能与hLCSLCs反应的237株克隆中,有116株单抗能与hLCSLCs的细胞膜结合,其中的33株杂交瘤单抗只与hLCSLC-SP反应(阳性率为2%~5%)、不与非hLCSLC-SP反应。该33株单抗中有6株能与CD133阳性细胞有不同比例的共染,并且与无血清悬浮培养的成球细胞呈阳性反应(阳性率为3%~26%),明显高于hLCSLCs-SP。裸鼠皮下接种 $1 \times 10^4$ 个15D2单抗阳性的hLCSLCs,成瘤率为100%。功能性筛选实验发现,6株单抗中的4株能显著抑制hLCSLC-SP的增殖和成球生长,其抑制率分别为24%~42%和13%~50%。结论:采用自建的大容量单克隆抗体库技术,筛选获得了4株特异性识别hLCSLC-SP的功能性单抗,为肝癌干细胞的抗体靶向治疗奠定了基础。

**[关键词]** 肝肿瘤;肿瘤干细胞;单克隆抗体;靶向治疗

**[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2010)02-0121-07

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(No. 2009CB521804)。Project supported by the Major Basic Research and Development Program (973 Program) of China(No. 2009CB521804)

**[作者简介]** 孙力超(1980-),男,山西省太原市人,博士,主要从事肿瘤分子靶向治疗方面的研究,E-mail: sunlichao\_1980@hotmail.com。  
赵璇(1983-),女,北京市人,硕士,主要从事肿瘤分子靶向治疗方面的研究。<sup>▲</sup>并列第一作者

**[通信作者]** 冉宇靓(RAN Yu-liang, corresponding author),E-mail: ran\_yuliang@126.com

## Preparation of functional monoclonal antibodies against human liver cancer stem cells

SUN Li-chao, ZHAO Xuan<sup>▲</sup>, YU Long, HAN Lu-lu, LIU Tong, HU Hai, SUN Li-xin, YANG Zhi-hua, RAN Yu-liang (State Key Laboratory of Molecular Oncology, Institute of Oncology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

[ Abstract ] **Objective:**To prepare functional monoclonal antibodies( McAbs ) against liver cancer stem cells, so as to provide candidate antibody drugs for stem cell-targeted therapy of liver cancer. **Methods:** Human liver cancer stem-like cells ( hLCSLCs ) were separated from human hepatocarcinoma tissues and were used to immunize BALB/c nude mice. Spleen cells from hLCSLCs-immunized mice were fused with SP2/0 cells to prepare large monoclonal antibody library. Hybridoma McAbs recognizing hLCSLCs were screened and identified by immunofluorescence, sphere formation culture and *in vivo* tumor formation assays. hLCSLCs side population cells ( hLCSLCs-SP ) were sorted by flow cytometry. The effects of hybridoma McAbs on self-renewal and proliferation of hLCSLCs-SP were identified by serum-free suspension culture and CCK-8 assay. **Results:** A total of 2 964 McAb clones were obtained by fusing immunized spleen cells with SP2/0 cells, and 237 McAbs could interact with hLCSLCs as detected by fixed-cell immunofluorescence; 116 of the 237 McAbs interacted with the membrane of hLCSLCs, and 33 McAbs specifically reacted with hLCSLCs-SP but not with non-hLCSLCs-SP, with positive rates being 2% -5%. Six of the 33 McAbs co-stained with CD133 on hLCSLCs-SP. Further investigation showed that the positive rates of these 6 McAbs were 3% -26% with sphere cells after serum-free suspension culture, which were significantly higher than those with hLCSLCs-SP. Tumor formation rate was 100% when  $1 \times 10^4$  hybridoma clone 15D2-positive hLCSLCs were injected into nude mice. Functional study showed that 4 of these 6 McAbs significantly suppressed the proliferation and sphere formation ability of hLCSLCs-SP, with the inhibitory rates being 24% -42% and 13% -50% , respectively. **Conclusion:** We have successfully constructed the large McAb library against hLCSLCs, from which 4 hybridoma McAbs can specifically react with hLCSLCs-SP, laying a foundation for cancer stem cell-based antibody-targeted therapy for liver cancer.

[ Key words ] liver neoplasms; cancer stem cell; monoclonal antibody; targeted therapy

[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17(2): 121-127 ]

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其病死率居恶性肿瘤的第3位<sup>[1-2]</sup>,肝癌患者5年生存率仅有14%~30%<sup>[3]</sup>。肝癌的复发、转移是肝癌治疗失败甚至死亡的主要原因。已有研究<sup>[4-5]</sup>报道,肿瘤干细胞在恶性肿瘤的复发、转移中发挥着关键性作用,而现有的治疗手段无法针对肿瘤干细胞这一导致肿瘤治疗失败、复发和转移的主要原因<sup>[6-7]</sup>。因此,针对肿瘤干细胞的靶向治疗有望克服临床上现有治疗手段的缺陷,改善肝癌患者的预后<sup>[8-9]</sup>。本研究利用本室建立的大容量功能性单克隆抗体库,筛选、鉴定能识别并且对肝癌干细胞具有抑制作用的功能性单克隆抗体,以期对靶向肿瘤干细胞的肝癌治疗提供有应用前景的功能性单克隆抗体。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验动物、细胞和主要试剂

4~6周龄 BALB/c( nu/nu )裸鼠购自北京联通

利华实验动物技术公司[ 实验动物合格证号 SCXK(京)2007-0001 ]。DMEM-E 培养液购自 Gibco 公司,DAPI 购自 Sigma 公司,进口胎牛血清为 Hyclone 公司生产。CD133 抗体购自 Abcam 公司,生物素-马抗小鼠 IgG/IgM 购自 Vector 公司,FITC-羊抗小鼠 IgG/IgM、Cy3-羊抗小鼠 IgG/IgM、Cy2-羊抗兔 IgG 和 Cy3-亲和素购自 Jackson 公司。单抗亚类检测试剂盒购自 Southem Biotech 公司,CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学所。低黏附 6 孔板购自 Costar 公司。小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 为本室保藏。SP2/0 细胞和杂交瘤细胞均培养在含 10% 进口胎牛血清的 DMEM 培养液中,筛选杂交瘤细胞时加入 HAT( Sigma 公司 )选择培养液。

#### 1.2 肝癌干细胞样细胞的分离和培养

人肝癌干细胞样细胞( human liver cancer stem cells, hLCSLCs )的分离、培养按文献[ 10 ]的方法进行。将从肝癌患者手术标本获得的肝癌组织以 PBS

冲洗后剪成  $1 \text{ mm}^3$  大小的小块,用 0.1% 胰酶和 0.025% I 型胶原酶在  $37^\circ\text{C}$  下消化 30 min,150 目滤网过滤, $4^\circ\text{C}$  下  $500 \times g$  离心 5 min。将获得的细胞移至培养瓶中,加入含 10% FBS、100 g/ml 牛脑抽提物、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 DMEM-E 培养基中培养 48 h,弃上清,洗掉未贴壁细胞继续培养,1 周后挑取多个形成的集落,混匀,移入培养瓶培养,命名为 hLCSLCs。

### 1.3 动物免疫

将 hLCSLCs 注射于 BALB/c (nu/nu) 小鼠腹部皮下(共 6 只),每只小鼠注射  $1 \times 10^6$  个 hLCSLCs,每 2 周 1 次,连续免疫 12 个月。

### 1.4 免疫荧光法检测免疫血清的效价

固定细胞免疫荧光检测:将 hLCSLCs 接种于 96 孔培养板, $1 \times 10^4$  个/孔, $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h。PBS 分次洗涤,经 4% 多聚甲醛固定 15 min、0.2% Triton-100 通透 5 min 后,每孔加入免疫血清或对照一抗,室温反应 1 h,用含 1% BSA 的 PBST 洗涤 5 min  $\times$  5 次;每孔加入 100  $\mu\text{l}$  生物素标记的 IgG/IgM (1:300 稀释),室温反应 30 min,洗涤同前。再加入 100  $\mu\text{l}$  Cy3-亲和素(1:900 稀释),室温避光反应 30 min 后,用 1% BSA 的 PBS 洗涤 5 min  $\times$  4 次,然后用 PBS 洗涤 5 min  $\times$  2 次。最后用含 10 g/ml DAPI 及 50% 甘油的 PBS 封闭。

活细胞免疫荧光检测:PBS 洗涤 96 孔板中细胞后,每孔加免疫血清或对照一抗,室温反应 1 h,用含 1% BSA 的 PBST 洗涤 5 次。为避免细胞丢失,与免疫血清反应的细胞再用 4% 多聚甲醛固定 15 min。以后的操作步骤同固定细胞免疫荧光检测。

### 1.5 免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞的融合

待 hLCSLCs 免疫小鼠血清滴度达到 1:50 000 且不再升高时,取  $1 \times 10^8$  个免疫小鼠脾细胞与  $2 \times 10^7$  个对数生长期的 SP2/0 细胞融合,并接种于含有 HAT 的甲基纤维素培养皿中,培养 8~12 d,挑取孤立的、较大的细胞集落,即杂交瘤细胞,接种于 96 孔板继续培养。

### 1.6 流式细胞仪分选 hLCSCLCs-SP

将 hLCSCLCs 制成单细胞悬液,加入 Hoechst 33342 染料(终质量浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ );对照组加入维拉帕米(终质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。 $37^\circ\text{C}$  孵育 90 min,弃上清,用预冷 PBS 洗 3 次,加入 PI 至终质量浓度 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,流式细胞仪检测并分选其中的侧群细胞(side population cells, SP),即为 hLCSCLCs-SP。

### 1.7 杂交瘤上清对 hLCSLCs 成球能力的影响

将 hLCSLCs 接种于低黏附的 6 孔培养板中,用

含 EGF(20 ng/ml)、bFGF(20 ng/ml)、B27 添加剂(1:50)、LIF(leukemia inhibitory factor, 10 ng/ml)、LG(L-glutamine, 2 mmol/l)和 40 U/ml 肝素的 DMEM-F12 培养基(SFM),在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养,7~10 d 形成细胞球。将其用胰酶-EDTA 消化,并机械吹打成单细胞悬液。计数后重悬于 SFM 培养基中,以  $1 \times 10^3$  个细胞接种于低黏附的 6 孔板中,连续传代 3 次,每孔加入杂交瘤上清,记录 hLCSLCs 成球的时间及成球个数。

### 1.8 杂交瘤上清识别的 hLCSLCs 裸鼠成瘤实验

消化 hLCSLCs,并以  $3 \times 10^6/\text{ml}$  重悬于 50 ml 离心管中,每管 10 ml,同时加入 10 ml 杂交瘤细胞培养上清, $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h,PBS 洗涤 3 遍,弃上清,加入 FITC-羊抗小鼠 IgG/IgM (1:50 稀释),通过流式细胞仪分选出杂交瘤上清单抗阳性以及杂交瘤上清单抗阴性的细胞。将阳性细胞按  $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  个/只分别接种于 BALB/c 裸鼠右侧背部皮下;阴性细胞按  $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$  个/只接种裸鼠的左侧背部皮下,每组 6 只。接种后观察细胞成瘤情况。

### 1.9 ELISA 法检测抗 hLCSLCs 单抗的类型

采用 Southern Biotech 的单抗类型 ELISA 检测试剂盒测定杂交瘤单克隆抗体的类型,操作按照试剂盒说明书进行。

### 1.10 CCK-8 法检测 hLCSLCs 的增殖

将对数生长期的 hLCSLCs 按  $1 \times 10^3$  个接种到 96 孔板中,培养 24 h 后吸弃培养液,加入抗 hLCSLCs 杂交瘤上清。培养 3 d 后换液 1 次,继续培养 3 d,吸弃上清,每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8,测定光密度(D)值。实验以 SP2/0 细胞培养上清为阴性对照。按照以下公式计算细胞增殖抑制率:抑制率(%) = (对照组 D - 实验组 D)/对照组 D  $\times$  100%。

### 1.11 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  形式表示,采用 SPSS12.0 软件分析,组间差异采用 t 检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 动物免疫及大容量单抗库的制备

本实验室在前期的研究中,从人肝癌手术标本中分离并建立了 hLCSLCs。本研究将 hLCSLCs 免疫 6 只小鼠,在免疫 12 个月时,采用固定细胞免疫荧光法检测每只免疫小鼠血清与 hLCSLCs 细胞的反应,其中 2 号小鼠免疫血清滴度最高,其滴度大于 1:50 000。同时采用固定细胞免疫荧光法检测小鼠免疫血清与

hLCSLC-SP 的反应, 结果显示, 免疫血清与 hLCSLC-SP 反应的滴度为 1:4 000, 提示免疫小鼠血清中含有识别肝癌干细胞的抗体(图 1)。继续免疫 2 次后, 小鼠血清效价不再明显提高, 取 2 号免疫小鼠脾脏细胞, 与 SP2/0 细胞融合后, 接种于 200 个含有甲基纤维素培养基的培养皿。6~12 d 后, 从上述培养皿中挑取单个细胞集落, 接种 45 块 96 孔板, 经 8~14 d 培养, 有 2 964 个孔有杂交瘤克隆生长, 从而建立了含有 2 964 个克隆的大容量单抗库。

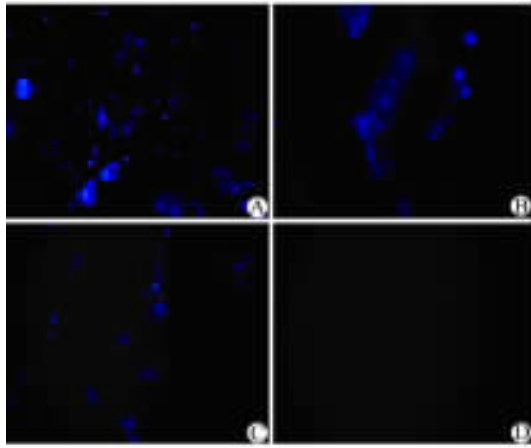


图 1 细胞免疫荧光法检测 2 号小鼠免疫血清与 hLCSLC-SP 的反应(×100)

Fig. 1 Interaction of immune serum of 2# mouse with hLCSLCs-SP as detected by immunofluorescence staining(×100)

A: 1:1 000 immune serum; B: 1:2 000 immune serum; C: 1:4 000 immune serum; D: Normal mouse serum

### 2.2 抗 hLCSLCs 杂交瘤单抗的筛选

将 hLCSLCs 接种 96 孔板, 用 SFM 培养基培养 30 h 后, 采用固定细胞免疫荧光法检测单抗库中 2 964 个杂交瘤上清与 hLCSLCs 的反应, 其中显示荧光阳性反应的杂交瘤单抗有 237 株。采用活细胞免疫荧光法筛检这 237 株阳性单抗, 获得了特异与 hLCSLCs 细胞膜结合的阳性杂交瘤单抗 116 株。用经流式细胞仪分选出的 hLCSLC-SP 和非 hLCSLC-SP 检测这 116 株单抗, 结果显示, 有 33 株单抗只与 hLCSLC-SP 呈阳性反应, 提示这些杂交瘤单抗中有抗肝癌干细胞的特异单抗。表 1 列出了部分杂交瘤单克隆抗体与 hLCSLC-SP 的免疫荧光染色结果。

### 2.3 抗肝癌干细胞样细胞杂交瘤单抗的鉴定

2.3.1 杂交瘤单抗与 CD133 共定位 CD133 是肝癌干细胞的标志物之一<sup>[11-12]</sup>。为了进一步鉴定上述 33 株与 hLCSLC-SP 阳性反应的杂交瘤单抗中识别特异肝癌干细胞的杂交瘤单抗, 采用双色免疫荧

光法检测 hLCSLC-SP 以及非 hLCSLC-SP 中杂交瘤单抗与 CD133 共表达情况。结果显示, 其中 6 株杂交瘤单抗 15D2、3H9、3G7、10F6、15H7 和 11A7 与 CD133 同时识别 hLCSLC-SP, 表现为红色荧光(杂交瘤单抗)和绿色荧光(抗 CD133 单抗)的双色免疫荧光共染(表 2), 表明这 6 株杂交瘤单抗能够特异识别肝癌干细胞。

表 1 固定细胞免疫荧光检测杂交瘤单抗与 hLCSLC-SP 的结合

Tab. 1 Fixed-cell immunofluorescence staining in detection of interaction between hybridoma monoclonal antibodies and hLCSLCs-SP

McAb	hLCSLCs-SP		Non-hLCSLCs-SP
	Stain intensity	Positive rate (%)	Stain intensity
3H9	++	1	-
12F4	+	3	-
8C7	+	5	-
3G7	++	5	-
10B6	+	7	-
15H7	++	7	-
10F6	++	8	-
11A7	+++	8	-
15D2	++	12	-

表 2 免疫荧光染色检测杂交瘤单抗、CD133 与 hLCSLC-SP 的结合(×100)

Tab. 2 Immunofluorescence staining in detection of interaction between hybridoma monoclonal antibodies, CD133 and hLCSLCs-SP

McAb	McAb		CD133	
	Stain intensity	Positive rate (%)	Stain intensity	Positive rate (%)
3H9	++	1	+	2
3G7	++	6	++	4
15H7	++	7	+	3
10F6	++	9	+	5
11A7	+++	8	+	2
15D2	++	14	+	3

2.3.2 杂交瘤单抗识别成球细胞中的肝癌干细胞 已有研究证明, 干细胞能够在无血清培养基中成

球生长,是肿瘤干细胞的标志之一<sup>[13-14]</sup>。流式分选出的 hLCSLC-SP 经无血清培养基培养后,免疫荧光检测发现,6 株杂交瘤单抗识别的细胞比例增加(表 3),进一步提示这些单抗能够特异识别肝癌干细胞。

表 3 免疫荧光检测杂交瘤单抗与成球培养后 hLCSLC-SP 的结合

Tab. 3 Immunofluorescence staining in detection of interaction between hybridoma monoclonal antibodies and hLCSLCs-SP after sphere culture

McAb	Staining intensity	Positive rate ( % )
3H9	+	3
3G7	++	16
15H7	++	12
10F6	+++	10
11A7	+++	12
15D2	+++	26

2.3.4 杂交瘤 15D2 单抗阳性 hLCSLCs 的裸鼠成瘤实验 已有的研究表明肿瘤干细胞的特征之一是具有极高的致瘤性<sup>[15-16]</sup>。为了进一步证明筛选出的杂交瘤单抗可特异识别肝癌干细胞,从 6 株杂交瘤单抗中随机选取一株识别 hLCSLC-SP 以及无血清悬浮成球培养后细胞的杂交瘤单抗 15D2。经过流式分选出杂交瘤单抗 15D2 识别的 hLCSLCs,接种裸鼠,检测其致瘤能力。结果如表 4 所示,接种  $1 \times 10^4$  个 15D2 阳性的 hLCSLCs 的裸鼠 2 个月开始成瘤,3 个月的成瘤率为 100%;而 15D2 阴性 hLCSLCs 至少需接种  $1 \times 10^6$  个细胞 2 个月后方可成瘤。15D2 阳性 hLCSLCs 的致瘤能力远强于 15D2 阴性 hLCSLCs,说明杂交瘤单抗 15D2 能够特异识别肝癌干细胞。

2.4 抗肝癌干细胞样细胞杂交瘤单抗的类型

采用 Southern Biotech 公司生产的单抗类型检测试剂盒,对 6 株杂交瘤单抗进行类型检测。结果显示,6 株杂交瘤单抗均是 IgM 类抗体,没有发现复合类型的克隆(表 5)。

2.5 杂交瘤单抗对 hLCSLC-SP 增殖的影响

采用 CCK-8 法检测 6 株杂交瘤单抗对 hLCSLC-SP 增殖的影响,结果显示,6 株杂交瘤单抗均能抑制 hLCSLC-SP 的增殖,其抑制率为 0.6% ~ 42%(图 2),提示该 6 株杂交瘤单抗均是具有抑制肝癌干细胞增殖的功能性单抗。

表 4 杂交瘤 15D2 单抗阳性 hLCSLCs 的裸鼠成瘤能力  
Tab. 4 Tumorigenic capacity of 15D2-positive hLCSLCs in nude mice

hLCSLCs	Number	Tumorigenic capability		
		1 month	2 months	3 months
15D2 <sup>+</sup>				
	$5 \times 10^3$	0/6	0/6	0/6
	$1 \times 10^4$	0/6	3/6	6/6
	$1 \times 10^5$	0/6	6/6	6/6
15D2 <sup>-</sup>				
	$1 \times 10^4$	0/6	0/6	0/6
	$5 \times 10^5$	0/6	0/6	0/6
	$1 \times 10^6$	0/6	4/6	6/6

表 5 6 株单克隆抗体的类型

Tab. 5 Subtypes of 6 monoclonal antibodies

McAb	Heavy chain	Light chain
15D2	IgM	-
3H9	IgM	-
15H7	IgM	-
10F6	IgM	-
3G7	IgM	-
11A7	IgM	-

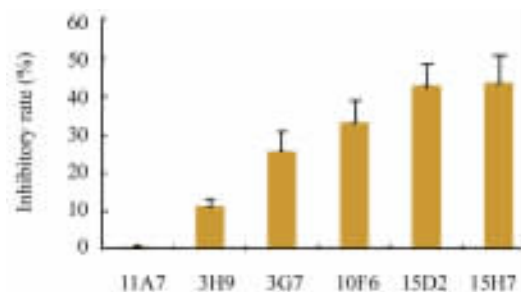


图 2 CCK-8 法检测杂交瘤单抗对 hLCSLC-SP 增殖的抑制率

Fig. 2 Inhibitory rates of monoclonal antibodies on proliferation of hLCSLC-SP as detected by CCK-8 assay.

2.6 杂交瘤单抗抑制 hLCSLC-SP 的成球能力

采用干细胞成球培养法,将 hLCSLC-SP 接种于

无血清培养基中进行成球培养, 并加入 6 株杂交瘤培养上清或 SP2/0 培养上清, 检测杂交瘤单抗对 hLCSLC-SP 成球能力的作用。结果发现, 6~8 d 时, 加入杂交瘤上清的 hLCSLC-SP 形成的细胞球较小、数目较少; 而加入 SP2/0 培养上清的细胞可见由数十个到数百个细胞组成的较大的圆形细胞球体。6 株杂交瘤单抗对 hLCSLC-SP 在无血清悬浮培养所形成细胞球的抑制率为 3%~50% (图 3), 提示筛选出的 6 株杂交瘤单抗是能够抑制肝癌干细胞自我更新的功能性单抗。

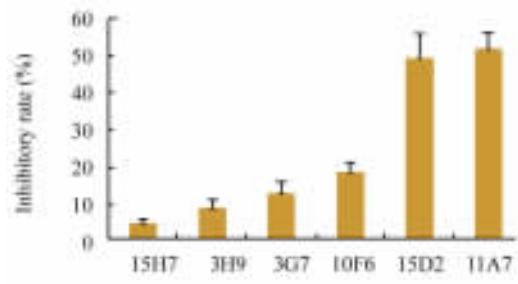


图 3 6 株杂交瘤单抗抑制 hLCSLC-SP 的成球能力  
Fig. 3 Inhibitory effects of 6 monoclonal antibodies on sphere formation ability of hLCSLC-SP

### 3 讨论

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 病死率高, 全世界每年约有 125 万人死于肝癌。复发和转移是影响肝癌预后的最主要因素<sup>[17]</sup>。已有的研究<sup>[18-19]</sup>报道, 肿瘤干细胞是肿瘤复发、转移的主要原因, 而现有的治疗手段主要是通过不同方式抑制或杀灭肿瘤组织内的癌细胞, 对肿瘤干细胞无能为力, 从而导致肿瘤复发、转移以及临床治疗的失败。目前分子靶向治疗是肿瘤治疗领域的一个重大突破, 如曲妥珠单抗<sup>[20-21]</sup>、利妥昔单抗<sup>[22]</sup>、伊马替尼<sup>[23]</sup>等分子靶向药物在肿瘤治疗中获得了良好的临床治疗效果。如果能获得特异性靶向肝癌干细胞的功能性单抗及分子靶标, 建立以肿瘤干细胞为靶的分子靶向治疗新方案, 必将显著降低和减少肝癌的复发、转移, 改善患者的预后, 提高 5 年生存率。

本室前期在研究肺癌<sup>[24]</sup>、胃癌<sup>[25]</sup>、食管癌<sup>[26]</sup>分子靶标的过程中建立了大容量功能性单抗库技术平台。为了建立大容量的抗肝癌干细胞样细胞的功能性单抗库, 本研究从肝癌组织中分离、鉴定了含有肝癌干细胞的 hLCSLC<sup>[10]</sup>, 并免疫 BALB/c 裸鼠。固定细胞免疫荧光检测显示, 免疫小鼠血清在高滴度时(1:4 000)仍能够与 hLCSLCs-SP 呈阳性反应, 其

阳性细胞比例约为 8%, 提示用该免疫小鼠脾细胞融合制备的大容量杂交瘤单抗库中含有识别肝癌干细胞的单抗。将免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合后接种 200 个铺有甲基纤维素培养基的培养皿, 培养后从中挑取了 4 216 个单克隆细胞, 再接种 96 孔板, 最终获得了 2 964 个克隆生长的单抗库。采用高通量固定细胞免疫荧光法筛选该单抗库, 获得了 237 个能识别 hLCSLCs 的阳性单抗克隆株; 进一步用活细胞免疫荧光法筛选, 其中 116 株单抗能与 hLCSLCs 的细胞膜结合。

为了鉴定并获得能与肝癌干细胞结合的单抗, 采用流式术分选出 hLCSLC-SP 和非 hLCSLC-SP。进一步用免疫荧光法检测上述 116 株杂交瘤上清, 结果显示, 其中 33 株只与 hLCSLC-SP 呈阳性反应, 而不与非 hLCSLC-SP 反应; 并能识别更高比例的无血清培养基培养后的成球细胞, 其阳性比例为 3%~26%, 明显高于 SP 阳性细胞反应的比例(1%~12%)。双色免疫荧光法检测发现, 其中 6 株杂交瘤上清能与肝癌干细胞标志物 CD133 有不同比例的共染。小鼠皮下成瘤实验表明, 抗肝癌干细胞单抗阳性 hLCSLCs 具有高致瘤性,  $1 \times 10^4$  个单抗阳性的 hLCSLCs 接种后, 2~3 个月所有裸鼠均能成瘤。这些结果表明, 本研究至少获得了 6 株抗肝癌干细胞的杂交瘤单抗。增殖实验及成球实验结果显示, 6 株单抗中有 4 株杂交瘤单抗能显著抑制 hLCSLC-SP 的生长、增殖和成球生长, 表明这 4 株杂交瘤单抗是具有功能的抗肝癌干细胞单抗。目前国、内外尚未见到针对肝癌干细胞的特异性功能性单抗的报道。

本研究筛选、鉴定抗肝癌干细胞的功能性单抗采用了本室前期建立的大容量功能性单抗库技术平台。该技术已成功用于筛选、鉴定肺癌、胃癌、食管癌细胞的功能性单抗, 证明能获得高比例(占库容的 5%~10%)的功能性单抗。但本研究获得的抗肝癌干细胞的功能性单抗的比例相当低, 仅占库容的 0.1%~0.2%。因此, 要获得抗肝癌干细胞单抗必须制备足够大的抗体库, 此外还需建立快速、高通量的筛选技术。目前本研究所还在进一步优化这一技术平台, 希望能提高获得功能性抗肿瘤干细胞单抗的比例。

在此基础上, 本课题组正在进行这些单抗的其他功能性研究, 包括体内抑制肝癌生长、转移的研究, 以及与肝癌发生、发展、分期、转移、复发、耐药及预后的相关性研究, 最终希望为靶向肿瘤干细胞治疗肝癌及其复发、转移提供靶向候选药物。在功能性单抗体内外鉴定的基础上, 本课题组还将分离获

得相应的功能性分子靶标,从而为筛选靶向肝癌干细胞的其他药物奠定基础。

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Yang L, Parkin DM, Li L, Chen Y. Time trends in cancer mortality in China: 1987-1999 [ J ]. *Int J Cancer*, 2003, 106( 5 ): 771-783.
- [ 2 ] Zhao P, Dai M, Chen W, Li N. Cancer trends in China [ J ]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010 [ Epub ahead of print ].
- [ 3 ] Lau WY, EC Lai. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances [ J ]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008, 7( 3 ): 237-257.
- [ 4 ] Hall JM, Bar Hoover MA, Kazmin D, McDonnell DP, Greenlee WF, Thomas RS. Activation of the aryl-hydrocarbon receptor inhibits invasive and metastatic features of human breast cancer cells and promotes breast cancer cell differentiation [ J ]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24( 2 ): 359-369.
- [ 5 ] Sullivan J, Minna J, Shay J. Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy [ J ]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29( 1 ): 61-72.
- [ 6 ] Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumor genesis and metastasis [ J ]. *J Cell Physiol*, 2010, 222( 2 ): 268-277.
- [ 7 ] Eaton CL, Colombel M, van der Pluijm G, Cecchini M, Wetterwald A, Lippitt J, *et al.* Evaluation of the frequency of putative prostate cancer stem cells in primary and metastatic prostate cancer [ J ]. *Prostate*, 2010 [ Epub ahead of print ].
- [ 8 ] Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, *et al.* CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells *in vitro* and in xenografts [ J ]. *J Clin Invest*, 2010, 120( 2 ): 485-497.
- [ 9 ] Salnikow AV, Groth A, Apel A, Kallifatidis G, Beckermann BM, Khamidjanov A, *et al.* Targeting of cancer stem cell marker EpCAM by bispecific antibody EpCAMxCD3 inhibits pancreatic carcinoma [ J ]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13( 9B ): 4023-4033.
- [ 10 ] 赵璇, 冉宇靓, 遇珑, 孙力超, 胡海, 李春, 等. 人肝癌组织中肿瘤干细胞样细胞的分离培养及鉴定 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16( 5 ): 436-441.
- [ 11 ] Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells [ J ]. *Gastroenterology*, 2007, 132( 7 ): 2542-2556.
- [ 12 ] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133<sup>+</sup> hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351( 4 ): 820-824.
- [ 13 ] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, *et al.* Identification of human brain tumor initiating cells [ J ]. *Nature*, 2004, 432( 7015 ): 396-401.
- [ 14 ] Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Yamasaki M, Kanemura Y, Shizuko IT, *et al.* Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in mongolian gerbils [ J ]. *J Neurosci Res*, 2004, 78( 2 ): 215-223.
- [ 15 ] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice [ J ]. *Nature*, 2007, 445( 7123 ): 106-110.
- [ 16 ] Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G, *et al.* The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer [ J ]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009, 36( 3 ): 446-453.
- [ 17 ] Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Tateishi R, Yoshida H, Kaneko J, *et al.* Postoperative surveillance with monthly serum tumor markers after living-donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma [ J ]. *Hepatol Res*, 2010 [ Epub ahead of print ].
- [ 18 ] Lee TK, Castilho A, Ma S, Ng IO. Liver cancer stem cells: implications for a new therapeutic target [ J ]. *Liver Int*, 2009, 29( 7 ): 955-965.
- [ 19 ] Chanda D, Isayeva T, Kumar S, Hensel JA, Sawant A, Ramaswamy G, *et al.* Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in prostate cancer bone metastasis [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15( 23 ): 7175-7185.
- [ 20 ] Bravo Marques JM. Treatment of brain metastases in patients with HER2<sup>+</sup> breast cancer [ J ]. *Adv Ther*, 2009, 26( Suppl 1 ): S18-S26.
- [ 21 ] Toi M, Iwata H, Fujiwara Y, Ito Y, Nakamura S, Tokuda Y, *et al.* Lapatinib monotherapy in patients with relapsed, advanced, or metastatic breast cancer: efficacy, safety, and biomarker results from Japanese patients phase II studies [ J ]. *Br J Cancer*, 2009, 101( 10 ): 1676-1682.
- [ 22 ] Riaz W, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Czuczman MS. Strategies to enhance rituximab anti-tumor activity in the treatment of CD20-positive B-cell neoplasms [ J ]. *Immunol Res*, 46( 1/2/3 ): 192-205.
- [ 23 ] Zoubir M, Tursz T, Menard C, Zitvogel L, Chaput N. Imatinib mesylate ( Gleevec<sup>®</sup> ): targeted therapy against cancer with immune properties [ J ]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2009 [ Epub ahead of print ].
- [ 24 ] 胡海, 冉宇靓, 陈立钊, 遇珑, 孙立新, 杨治华. 采用抗体库技术筛选抑制肺癌的功能性抗体 [ J ]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34( 6 ): 395-398.
- [ 25 ] 赵西路, 陈立钊, 冉宇靓, 胡海, 孙立新, 遇珑, 等. 抑制胃癌增殖功能性单抗的制备、筛选及鉴定 [ J ]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18( 6 ): 1013-1015.
- [ 26 ] 遇珑, 潘健, 周转, 冉宇靓, 胡海, 娄晋宁, 等. 抑制食管癌与肺血管内皮黏附的功能性抗体的制备 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13( 5 ): 332-337.

[ 收稿日期 ] 2010-02-25

[ 修回日期 ] 2010-03-18

[ 本文编辑 ] 徐红梅