

# CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>表型的宫颈癌Siha细胞对顺铂的耐药及机制研究

刘红<sup>1</sup>, 王玉净<sup>2</sup>, 边磊<sup>2</sup>, 黎海莉<sup>2</sup>, 房朝晖<sup>1</sup>, 吴小华<sup>3</sup>, 程建新<sup>2</sup>

1. 河北医科大学第四医院妇瘤科, 河北 石家庄 050011;
2. 河北医科大学第四医院妇科, 河北 石家庄 050011;
3. 白求恩国际和平医院妇科, 河北 石家庄 050082

**[摘要]** 背景与目的: 肿瘤干细胞的存在是肿瘤细胞抗拒化疗的原因之一。该研究探讨CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>宫颈癌Siha细胞对顺铂的耐药性及相关机制。方法: 体外培养Siha细胞, 流式荧光激活细胞分选仪分选CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>Siha细胞, 噻唑蓝(thiazolyl blue, MTT)法检测不同浓度顺铂对细胞的体外抑制情况, 采用流式细胞仪检测10 μg/mL顺铂作用于CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞24、48和72 h时的细胞凋亡率, 实时定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)和蛋白[质]印迹法(Western blot)检测CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞中Oct-4、ABCG2、Bcl-2的表达, 同时设立亲代Siha细胞作为对照。结果: 不同浓度顺铂(0.1、1、5、10、15和20 μg/mL)对CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞的增殖抑制作用较亲代Siha细胞小[(88.4 ± 1.5)% vs (92.9 ± 1.5)%, (79.9 ± 1.0)% vs (84.7 ± 1.1)%, (69.8 ± 0.8)% vs (75.1 ± 2.9)%, (59.0 ± 0.7)% vs (65.8 ± 2.7)%, (49.6 ± 0.9)% vs (52.1 ± 0.5)%, (45.1 ± 0.7)% vs (48.8 ± 1.0)%, P<0.05]; 与亲代细胞相比, 当10 μg/mL顺铂作用于CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞时, 发现在24、48和72 h时的细胞凋亡率均较小[(3.05 ± 0.16)% vs (5.17 ± 0.27)%, (17.94 ± 2.02)% vs (32.60 ± 4.28)%和(40.14 ± 3.01)% vs (56.62 ± 5.32)%, P<0.05]。qRT-PCR和Western blot实验均显示CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞高表达Oct-4、ABCG2和Bcl-2, 与亲代Siha细胞比较差异有统计学意义(P=0.015)。结论: CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞可以抵抗顺铂诱导的细胞凋亡, 具有化疗抵抗性, 并且高表达肿瘤干细胞表面标志物如Oct-4和ABCG2, 该结果在宫颈癌肿瘤干细胞的有效分选以及肿瘤靶向治疗方面有深远意义。

**[关键词]** 宫颈癌; 肿瘤干细胞; CD44<sup>+</sup>; CD24<sup>+</sup>; 顺铂; 耐药; 凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.10.005

中图分类号: R737.33; R73-36+1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)10-0785-06

**Study on the chemoresistance of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells to cisplatin and its mechanisms** LIU Hong<sup>1</sup>, WANG Yujing<sup>2</sup>, BIAN Lei<sup>2</sup>, LI Haili<sup>2</sup>, FANG Zhaohui<sup>1</sup>, WU Xiaohua<sup>3</sup>, CHENG Jianxin<sup>2</sup> (1.Department of Gynecological Tumor, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2.Department of Obstetrics and Gynecology, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 3.Department of Obstetrics and Gynecology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei, China)

Correspondence to: CHENG Jianxin E-mail: jianxin\_cheng@263.net

**[ Abstract ] Background and purpose:** One of the reasons why cancer cells are resistant to chemotherapy is the existence of cancer stem cells. The purpose of this study was to investigate the chemoresistance of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells to cisplatin and its mechanisms. **Methods:** Siha cells were cultivated *in vitro*. The CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells were sorted out by fluorescence activated cell sorter (FACS) and *in vitro* proliferation was detected by MTT assay after treatment with the different concentrations of cisplatin. The cell apoptosis rate was detected by flow cytometry after 10 μg/mL cisplatin acted on CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells for 24, 48 and 72 h. The relative mRNA and protein expressions of Bcl-2, Oct-4 and ABCG2 were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot, respectively. **Results:** The survival rates of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells treated with different concentrations of cisplatin (0.1, 1, 5, 10, 15 and 20 μg/mL) were higher than those of their parental Siha cells [(88.42 ± 1.51)% vs (92.87 ± 1.5)%, (79.94 ± 1.05)%

vs (84.72 ± 1.09)%, (69.78 ± 0.81)% vs (75.13 ± 2.86)%, (58.97 ± 0.70)% vs (65.79 ± 2.71)%, (49.60 ± 0.88)% vs (52.10 ± 0.52)%, (45.13 ± 0.69)% vs (48.84 ± 1.02)%,  $P < 0.05$ ]. Compared with their parental Siha cells, the apoptosis rates of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells were lower after 10 μg/mL of cisplatin acting on them for 24, 48 and 72 h, respectively [(3.05 ± 0.16)% vs (5.17 ± 0.27)%, (17.94 ± 2.02)% vs (32.60 ± 4.28)% and (40.14 ± 3.01)% vs (56.62 ± 5.32)%,  $P < 0.05$ ]. The results from both qRT-PCR and Western blot indicated that Oct-4, ABCG2 and Bcl-2 were highly expressed on CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells. A significant difference was found in Oct-4, ABCG2 and Bcl-2 expression between CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells and their parental cells ( $P = 0.015 < 0.05$ ). **Conclusion:** CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells could be resistant to apoptosis induced by cisplatin and expressed high levels of cancer stem cell markers such as Oct-4 and ABCG2. This study lays the basis for useful isolation and further targeted therapy of cervical cancer stem cells.

[ **Key words** ] Cervical cancer; Cancer stem cells; CD44<sup>+</sup>; CD24<sup>+</sup>; Cisplatin; Drug resistance; Apoptosis

宫颈癌在我国妇女恶性肿瘤中的发病率及病死率均仅次于乳腺癌, 位居第二位, 是一种严重危害着广大女性身体健康的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。近年来, 随着宫颈脱落细胞学检查、HPV(人乳头状瘤病毒)检测及阴道镜病理活检的广泛应用, 我国在宫颈癌的早期发现、早期治疗方面均取得了很大进展, 但晚期宫颈癌及复发性宫颈癌对放化疗不敏感、治疗效果差仍是宫颈癌治疗中急需解决的难题。肿瘤干细胞被认为是肿瘤组织中具有自我更新和多向分化潜能的一小部分干细胞样细胞, 在肿瘤发展、复发和转移中均起着关键作用<sup>[2]</sup>。有学者认为肿瘤干细胞对传统治疗方法的抵抗可以解释治疗失败的原因, 虽然放化疗可以杀灭绝大部分肿瘤, 但不能防止残存的肿瘤干细胞会继续发生作用<sup>[3]</sup>。我们在实验中发现耐放疗宫颈癌Siha细胞系中CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>细胞所占比例明显增高, 基于此, 本研究拟探讨CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>Siha细胞的顺铂耐药性及其细胞表面肿瘤标志物的表达情况, 旨在明确CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞是否具有抵抗顺铂引起的细胞凋亡和高表达Oct4、ABCG2肿瘤干细胞表面标志物的特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 药物及试剂

RPMI-1640购自美国GIBCO公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 胰蛋白酶-EDTA消化液(0.25%)购自北京索来宝公司, Anti-Human/Mouse CD44 PE、Rat IgG2b K control PE、Anti-Human CD24 FITC、FITC Mouse IgG1K Isotype

Control 均购自美国eBioscience公司, MTT购自德国Sigma公司, DMSO购自美国Amresco公司, Redzol(一步法总RNA提取试剂)购自北京赛百盛生物技术公司, 超纯RNA提取试剂盒 CWbio. Co. Ltd (Cat# CW0581)、HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒 CWbio. Co. Ltd (Cat# CW0744)、UltraSYBR Mixture(With ROX) CWbio. Co. Ltd (Cat# CW0956)、5 × RNA Loading Buffer CWbio. Co. Ltd (Cat# CW0611A)、反转录系统试剂盒购自中国Fermentas公司, 兔抗人Oct-4 多克隆抗体、兔抗人ABCG2 多克隆抗体、兔抗人Bcl-2 多克隆抗体均购自美国Bioware公司, β-actin抗体购自美国Santa Cruz公司, 琼脂糖购自北京凌飞科技有限公司, DEPC购自北京赛百盛生物技术公司, PVDF膜购自美国Gentest公司, 低相对分子质量蛋白Marker购自美国Gentest公司, PI凋亡检测试剂盒购自上海晶美生物公司, Oct-4、ABCG2、Bcl-2、GAPDH引物均购自上海捷瑞技术有限公司。

### 1.2 细胞及其培养

人宫颈癌Siha细胞株(鳞癌)由河北医科大学第四医院科研中心细胞库馈赠。用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的RPMI-1640培养基, 于37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%培养箱中培养, 以胰蛋白酶-EDTA消化液消化细胞传代, 取处于对数生长期的细胞用于实验。

### 1.3 流式荧光激活细胞分选仪(fluorescence-activated cell sorting, FACS)分选CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>表达阳性Siha细胞

处于对数生长期的Siha细胞, 用0.25%的胰

蛋白酶-0.02%EDTA消化并机械吹打成单细胞悬液, 167.85 × g离心5 min去除细胞碎片, PBS洗涤2次, 台盼蓝染色计数, 以PBS调整细胞密度为每管1 × 10<sup>4</sup>/μL, 抗体置于冰上保存, 按产品说明书, 分别加入CD44-anti-PE (0.625 μL/test)和CD24-anti-FITC(0.25 μL/test)抗体, 同时每种抗体设同型对照, 常温避光温育30 min, 167.85 × g离心5 min去上清液, PBS至少洗2次, 200目细胞网筛过滤, 加入500 μL PBS液重悬, 上机。

#### 1.4 MTT实验

将分选的CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞重悬后调整细胞密度为5 × 10<sup>4</sup>/mL, 接种于96孔培养板, 每孔加入100 μL, 每组设4个复孔。然后置37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%、饱和湿度培养箱培养24 h。弃培养液, 每组分别加入含不同质量浓度顺铂(0.1、1、5、10、15、20 μg/mL)和10%胎牛血清的RPMI-1640培养液200 μL。移入培养箱中, 37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数5%、饱和湿度条件下继续培养。48 h后, 每孔加入20 μL MTT液(5 g/L), 置于培养箱中继续培养4 h。吸弃上层培养基, 每孔加入150 μL的DMSO液, 置于振荡仪上室温振荡10 min, 使结晶物充分溶解。酶标仪上测定490 nm处的吸光度值(*D*值), 以只加培养基的空白对照孔调零。同时设立亲代Siha细胞为对照组。计算细胞存活率, 细胞存活率= $D_{\text{加药组}}/D_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。实验重复3次。

#### 1.5 流式细胞仪测定细胞凋亡率

将分选的CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞接种于6孔板中, 待细胞长至60%密度, 同步化培养24 h, 再更换为用3%胎牛血清稀释最终顺铂质量浓度为10 μg/mL的培养基, 同时以未加顺铂的培养基为阴性对照组, 分别在24、48、72 h后收集细胞于离心管中, 167.85 × g离心5 min, 弃上清液, 预冷的PBS洗涤2次后, 用-20 °C的75%乙醇固定, 于4 °C放置备用。测定前用4 °C PBS洗细胞2次, RNA酶(终质量浓度为50 μg/mL)消化, 加PI染液(终质量浓度为50 μg/mL)1 mL, 室温避光染色30 min。300目尼龙膜过滤后流式细胞仪(FACS Calibur, 美国BD公司)检测, 同时

设立亲代Siha细胞为对照组。每组重复3次。用CellQuest软件分析SubG1峰。

#### 1.6 实时定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)实验

用TRIzol法分别提取CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞、亲代Siha细胞的总RNA行qRT-PCR。20 μL的反应体系为: 2 × UltraSYBR Mixture: 10 μL, 上游引物(10 μm/μL): 0.4 μL, 下游引物(10 μm/μL): 0.4 μL, 模板(cDNA): 2 μL, DEPC ddH<sub>2</sub>O: 7.2 μL, 反应条件: 95 °C 15 s; 60 °C 20 s, 共循环45次。数据收集及分析采用Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6.1序列检测系统。 $\Delta C_t$ 值是每个样本目的基因的循环阈值(*C<sub>t</sub>*)与内参*C<sub>t</sub>*的差异, 以*GAPDH*为内参基因, 采用 $\Delta C_t(C_{t_{\text{目的}}}-C_{t_{\text{内参}}})$ 法进行相对定量分析, 以 $2^{-\Delta C_t} \times 10^4$ 作为目的基因mRNA的相对表达量。

表1 各qRT-PCR引物及产物长度

Tab. 1 The sequences for the primers of qRT-PCR

Gene	Primer sequence (5' to 3')	Product size/bp
Oct-4	F: CAGAAGGGCAAGCGATCAAG R: GGGCCAGAGGAAAAGGACACT	100
ABCG2	F: CCTTCTCGTTATGATGTTTACCCTTAT R: ATCATAAACACAAAACAGATGGTCA	133
Bcl-2	F: GCCTTCTTTGAGTTCCGGTGGG R: TGCCGGTTCAGTACTCAGTCATC	107
GAPDH	F: CCTCTGACTTCAACAGCGACAC R: TGGTCCAGGGGTCTTACTCC	174

#### 1.7 蛋白[质]印迹法(Western blot)实验

收集细胞, 加入细胞裂解液, 冰上放置15 min后, 24 170.4 × g离心15 min, 取上清液, 紫外分光光度计定量后置-80 °C备用。灌制10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 常规电泳, 转膜, 封闭, 兔抗人Oct-4、ABCG2、Bcl-2多克隆抗体, 用PBST稀释, 稀释比为1:300, β-actin抗体稀释比为1:5 000, 4 °C过夜; PBST洗膜3次, 二抗(1:2 000), 室温温育1 h, ECL显色。

#### 1.8 统计学处理

采用SPSS21.0统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较、两总体方差相等用

Levene检验,方差不等用 $t'$ 检验,各组间多个均值比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 MTT法检测结果

不同浓度顺铂作用于CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha和亲代Siha细胞时,两组细胞存活率均随顺铂剂量的增加而减小。MTT实验结果显示,当两组细胞分别给予顺铂0.1、1、5、10、15、20  $\mu\text{g/mL}$ 作用24 h后发现,相同的药物浓度作用相同时间内,顺铂对CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞存活率影响较对亲代Siha细胞的小。两组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中10  $\mu\text{g/mL}$ 顺铂作用两组细胞24 h,细胞存活率差异最大,CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha组为(65.79  $\pm$  2.71)%,亲代Siha细胞组为(58.97  $\pm$  0.70)% (图1,  $P = 0.042$ )。

### 2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率

10  $\mu\text{g/mL}$ 顺铂分别作用于CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞和亲代Siha细胞,用流式细胞仪在24、48和72 h时测得细胞凋亡率分别为(3.05  $\pm$  0.16)%、(5.17  $\pm$  0.27)%、(17.94  $\pm$  2.02)%、(32.60  $\pm$  4.28)%和(40.14  $\pm$  3.01)%、(56.62  $\pm$  5.32)%。两组间比

较,差异均有统计学意义( $P = 0.043$ 、0.008、0.012,图2)。

### 2.3 qRT-PCR检测结果

CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞和亲代Siha细胞中Bcl-2 mRNA的相对表达量分别是34.34  $\pm$  5.25、2.23  $\pm$  0.16,两组间比较,差异有统计学意义( $P = 0.000$ ); Oct-4 mRNA的相对表达量分别是30.16  $\pm$  6.35、2.79  $\pm$  0.75,两组间比较,差异有统计学意义( $P = 0.000$ ); ABCG2 mRNA的相对表达量分别是41.26  $\pm$  7.23、4.23  $\pm$  1.12,两组间比较,差异有统计学意义( $P = 0.001$ ,图3)。

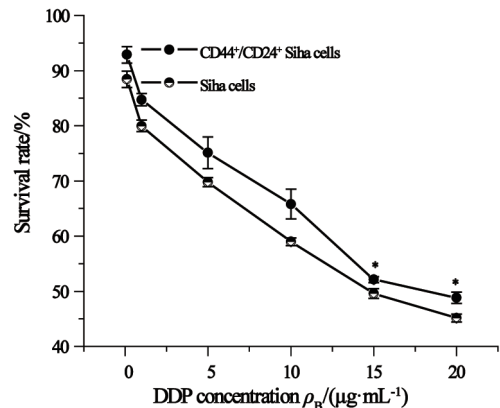


图1 顺铂对CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha和Siha细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of DDP on cell survival rates of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells and Siha cells

\*:  $P < 0.05$ , compared with the Siha group

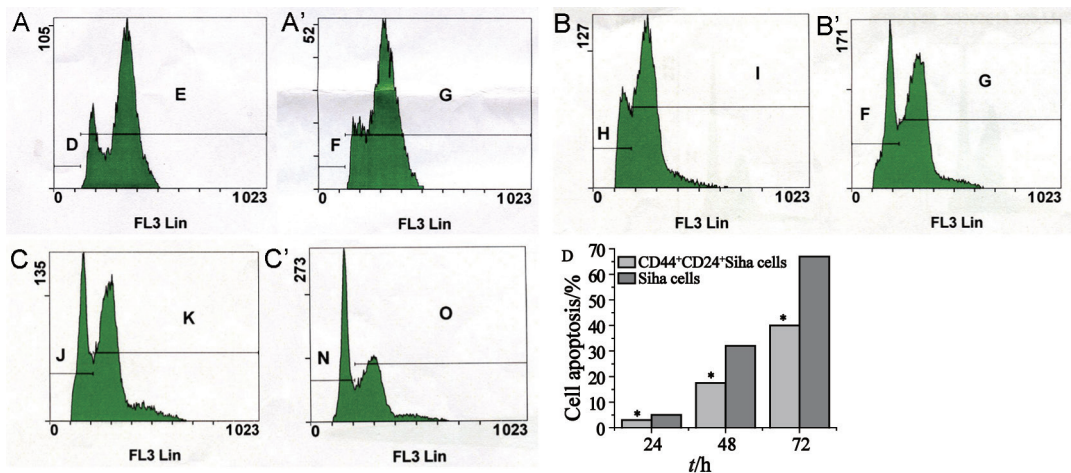


图2 顺铂对CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha和Siha细胞凋亡率的影响

Fig. 2 Effects of DDP on cell apoptotic rates of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells and Siha cells

A: Cell apoptosis of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cell at 24 h; A': Cell apoptosis of Siha cell at 24 h; B: Cell apoptosis of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cell at 48 h; B': Cell apoptosis of Siha cell at 48 h; C: Cell apoptosis of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cell at 72 h; C': Cell apoptosis of Siha cell at 72 h; D: Cell apoptotic rate of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells and Siha cells. \*:  $P < 0.05$ , compared with the Siha group

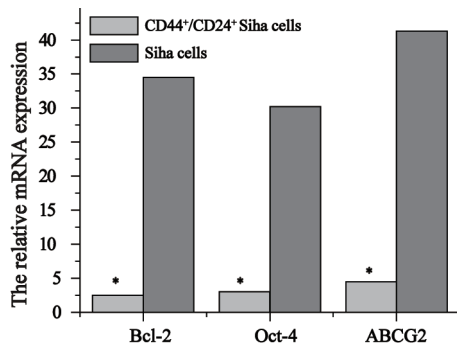


图3 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha和Siha细胞中Bcl-2、Oct-4和ABCG2 mRNA表达的影响

Fig. 3 The expressions of Bcl-2, Oct-4 and ABCG2 mRNA in CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells and Siha cells

\*:  $P < 0.05$ , compared with the Siha group

## 2.4 Western blot检测

采用Western blot检测CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞和Siha细胞中Bcl-2、Oct-4和ABCG2蛋白的表达。结果显示,在CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞中Bcl-2、Oct-4和ABCG2蛋白的表达均较Siha细胞高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图4)。

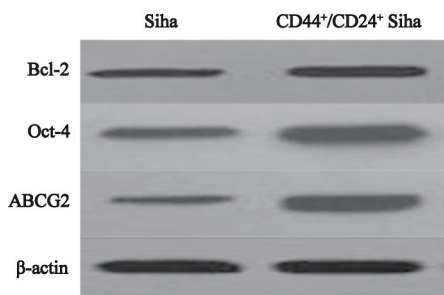


图4 Bcl-2、Oct-4和ABCG2蛋白在CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞和Siha细胞中的表达

Fig. 4 The expressions of Bcl-2, Oct-4 and ABCG2 in CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha cells and Siha cells

## 3 讨论

宫颈癌传统治疗方法早期以手术治疗为主,中晚期以放射治疗为主。研究表明,尽管以顺铂为基础的同步放化疗在早期高危宫颈癌、中晚期宫颈癌及复发性宫颈癌的治疗中疗效明显<sup>[4-6]</sup>,但仍有部分宫颈癌患者会出现复发和转移,其主要原因是在治疗过程中,宫

颈癌细胞对化疗和放疗产生了原发性或继发性抵抗,从而导致患者预后不良。肿瘤干细胞理论认为,在肿瘤组织或肿瘤细胞系中存在一小部分具有自我更新、多向分化潜能的细胞,在肿瘤的发生、发展中起主要作用,并抵抗放疗<sup>[7]</sup>。这说明宫颈癌细胞抵抗放化疗的机制可能与肿瘤干细胞有关。

本研究前期实验发现,耐放疗宫颈癌Siha细胞系中CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>细胞所占比例增高,我们采用流式细胞分选仪分选得到CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞,利用MTT法测得顺铂可以不同程度抑制两组细胞的体外增殖且有一定的量效关系。当相同浓度的顺铂分别作用于CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞和其亲代细胞时,发现顺铂对CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞存活率的影响较对亲代Siha细胞小,表明CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞对顺铂有一定抵抗性。将10 μg/mL顺铂作用于两组细胞,分别在24、48和72 h时利用流式细胞仪检测细胞的凋亡率,实验结果显示顺铂对两组细胞凋亡率的影响均随时间递增而增强,表明顺铂对细胞凋亡率的影响有一定的时间依赖性;但同一浓度顺铂在相同时间内对CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞凋亡率的影响较亲代Siha细胞的小,说明CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞可以抵抗顺铂诱导的细胞凋亡。Bcl-2是重要的抗凋亡基因之一,其作用机制是抑制线粒体中细胞色素c的释放,并使凋亡蛋白前体Apaf-1固定于线粒体膜上来阻断Caspase通路介导的细胞凋亡<sup>[8-9]</sup>。本实验从基因水平和蛋白水平检测两组细胞中Bcl-2的表达,结果显示与亲代Siha细胞相比,Bcl-2在CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞中的表达水平明显上调。

Oct-4属于POU转录因子家族,是维持肿瘤干细胞自我更新、多向分化潜能的重要转录因子之一。许多研究已证实Oct-4存在于多种不同类型的肿瘤干细胞中<sup>[10]</sup>。曹浩哲等<sup>[11]</sup>研究显示,Oct-4在正常宫颈组织中几乎不表达,但在宫颈癌组织中表达,且与肿瘤细胞的分化程度呈负相关。目前已有相关实验证实,Oct-4基因可以引发肿瘤细胞去分化,促使向肿瘤干细胞方向发展,敲除未分化细胞的Oct-4基因后

肿瘤干细胞表面标志物及其获得的干细胞特性会明显减少。类似结论已在黑素瘤、头颈鳞癌研究中得到证实<sup>[12-13]</sup>。ATP-binding cassette transporter G2 subfamily三磷酸腺苷结合转运蛋白G2(ABCG2),是一类跨膜蛋白,主要分布于某些肿瘤和干细胞膜中,具有排除细胞毒性物质的能力,进而产生抗化疗的效应,是肿瘤干细胞耐药的主要原因<sup>[14]</sup>。本实验通过qRT-PCR和Western blot检测两组细胞中Oct-4和ABCG2的表达,结果显示CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>Siha细胞较亲代Siha细胞高表达Oct-4和ABCG2。CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞抗拒顺铂诱导的细胞凋亡机制可能与CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞高表达*Bcl-2*基因和*ABCG2*基因有关,而CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Siha细胞高表达肿瘤干细胞样表面标志物Oct-4,说明其可能具备部分肿瘤干细胞的特性,而CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>是否为宫颈癌肿瘤干细胞的标志物还有待进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA: Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] CLEVERS H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges [J]. Nature Med, 2011, 17(3): 313-319.
- [3] 刘明明, 杨 恭. 乳腺癌干细胞的研究进展 [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 624-636.
- [4] 余 健, 张国楠, 樊 英. 同步放化疗治疗中晚期宫颈癌50例临床疗效观察 [J]. 实用妇产科杂志, 2007, 23(5): 287-289.
- [5] TIRINO V, DESIDERIO V, PAINO F, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization [J]. FASEB J, 2013, 27(1): 13-24.
- [6] 李从铸, 许少榆, 周 莉, 等. 术前同步放化疗在局部晚期宫颈癌治疗中的应用 [J]. 中国肿瘤临床, 2010(21): 1242-1244.
- [7] WICHA M S, LIU S, DONTU G. Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift [J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 1883-1890.
- [8] 李晓丹. 细胞凋亡 [J]. 国外医学: 生理病理科学与临床分册, 1997, 17(3): 231-234.
- [9] 邢春瑶, 冷维春, 周家文. *Bcl-2*和*Survivin*在宫颈癌中的研究进展 [J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(1): 167-169.
- [10] 郑鹏生, 曹浩哲. Oct4 基因的研究进展 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010, 31(5): 521-526.
- [11] 曹浩哲, 冀 静, 郑鹏生. Oct4 基因在宫颈癌中的表达及其意义 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010 (1): 17-21.
- [12] KUMAR S M, LIU S, LU H, et al. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation [J]. Oncogene, 2012, 31(47): 4898-4911.
- [13] KOO B S, LEE S H, KIM J M, et al. Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells [J]. Oncogene, 2015, 34(18): 2317-2324.
- [14] MAUGERI-SACCÀ M, VIGNERI P, DE MARIA R. Cancer stem cells and chemosensitivity [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(15): 4942-4947.

(收稿日期: 2015-07-06 修回日期: 2015-08-29)