

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.003

· 研究快报 ·

抗HSP90抗体通过内化eHSP90抑制人胃癌干细胞并提高顺铂的抗癌效果

孙新, 张蕙雯, 孙立新, 刘军, 遇琰, 孙力超, 冉宇靓(中国医学科学院 北京协和医学院肿瘤医院, 国家癌症中心 国家肿瘤临床医学研究中心, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

[摘要] **目的:** 探索抗HSP90单克隆抗体28C10通过靶向肿瘤干细胞促进顺铂(cisplatin, DDP)对人胃癌细胞PAMC82恶性生物学行为的抑制效果及其可能的作用机制。**方法:** 28C10单独或与DDP联合处理人胃癌细胞PAMC82, 采用不同实验方法检测该细胞的无血清成球能力、迁移和侵袭能力与克隆形成能力, CCK-8法检测28C10对PAMC82细胞恶性生物学行为和协同DDP抗癌能力的影响。采用细胞免疫荧光及流式细胞术检测PAMC82细胞中HSP90及eHSP90(extracellular HSP90)的表达、定位、eHSP90⁺亚群比例, 以及28C10处理后对ALDH⁺、CD44⁺、eHSP90⁺细胞亚群的影响。采用WB实验检测28C10作用后PAMC82细胞中HSP90、干性相关蛋白以及PI3K/AKT/mTOR信号通路蛋白表达的变化。**结果:** 胃癌细胞PAMC82膜表面表达eHSP90, 具有2%~3%的eHSP90⁺细胞亚群, 且eHSP90⁺细胞多为与ALDH⁺或CD44⁺共阳性细胞。28C10处理能显著抑制PAMC82细胞的成球、克隆形成、增殖、耐药、迁移及侵袭能力, 而且和DDP联用的效果更明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。流式细胞术分析发现28C10处理显著抑制PAMC82细胞的eHSP90⁺、ALDH⁺和CD44⁺亚群数量(均 $P<0.01$)。免疫荧光实验发现28C10作用后eHSP90发生内吞, WB实验结果显示eHSP90、CD44、ALDH和干性相关蛋白OCT4、SOX2表达量均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:** 抗HSP90单克隆抗体28C10可靶向胃癌PAMC82细胞的ALDH⁺、CD44⁺肿瘤干细胞相关亚群、内化eHSP90且降低细胞总HSP90的水平、抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路, 从而有效地抑制PAMC82细胞的干性、耐药和其他恶性生物学行为, 协同DDP显著提高抗癌效果。

[关键词] 胃癌; PAMC82细胞; 肿瘤干细胞; eHSP90; 28C10; 靶向治疗; 顺铂

[中图分类号] R735.2; R730.554; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)04-0284-10

Anti-HSP90 antibody promotes the anticancer effect of cisplatin by inhibiting human gastric cancer stem cells through internalizing eHSP90

SUN Xin, ZHANG Huiwen, SUN Lixin, LIU Jun, YU Long, SUN Lichao, RAN Yuliang (State Key Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Center/National Cancer Clinical Medical Research Center/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the promotive effect of anti-HSP90 monoclonal antibody mAb 28C10 on Cisplatin (DDP) inhibiting malignant biological behavior of human gastric cancer PAMC82 cells by targeting tumor stem cells and the possible mechanisms of action. **Methods:** Human gastric cancer PAMC82 cells were treated with 28C10 alone or in combination with DDP. Then, the serum-free pellet-forming ability, clone-forming ability, migration and invasion ability of PAMC82 cells were detected by different experiments, and the effects of 28C10 on the malignant biological behaviors of PAMC82 cells and the synergistic anti-cancer effect of 28C10 and DDP were detected by CCK-8 method. The expression, localization, eHSP90⁺ subgroup ratio of HSP90 and eHSP90 (extracellular HSP90) in PAMC82 cells and the effects of 28C10 on ALDH⁺, CD44⁺, eHSP90⁺ subgroups of PAMC82 cells were detected by cellular immunofluorescence and flow cytometry. The changes in HSP90, stemness-related proteins and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in PAMC82 cells treated with 28C10 were detected by WB. **Results:** eHSP90 was expressed on the membrane surface of gastric cancer PAMC82 cells, and there were about 2%-3% of eHSP90⁺ subgroup cells. eHSP90⁺ cells were mostly co-positive with ALDH⁺ or CD44⁺ cells. 28C10 significantly inhibited the ability of pellet formation, clone formation, proliferation, drug resistance, migration and invasion of PAMC82 cells; moreover, the effect was more obvious when combined with DDP (all $P<0.05$ or $P<0.01$). Flow cytometry analysis showed that 28C10 treatment significantly inhibited the number of eHSP90⁺, ALDH⁺ and CD44⁺ subgroups of PAMC82 cells (all $P<0.01$). Immunofluorescence assay showed that endocytosis of eHSP90 occurred after 28C10 treatment. WB results showed that the expression levels of eHSP90, CD44, ALDH and the expression of stemness-related proteins

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目资助(No.81773170; No.82073278); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(No. 2021-I2M-1-067); 北京自然科学基金面上项目资助(No.7222012)

[作者简介] 孙新(1995—), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤干细胞及肿瘤发生发展机制的研究, E-mail: 18331052172@163.com

[通信作者] 冉宇靓, E-mail: ran_yuliang@126.com

OCT4 and SOX2 were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** 28C10 can target ALDH⁺ and CD44⁺ tumor stem cell-related subgroups of gastric cancer PAMC82 cells, internalize eHSP90, reduce the level of total HSP90, and inhibit PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, thereby effectively inhibiting stemness, drug resistance and other malignant biological behaviors of PAMC82 cells and synergistically improving the anticancer effect of DDP.

[Key words] gastric cancer; PAMC82 cell; cancer stem cell; eHSP90; 28C10; targeted therapy; cisplatin

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(4): 284-293. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.003]

胃癌的发病率位居世界第五,为第三大致命癌症^[1];全球每年约有100万新增病例和60万病死病例^[2-3]。由于胃癌具有较强的转移性、侵袭性、化疗耐药性,导致胃癌患者的5年生存率不到30%^[4]。胃癌干细胞是肿瘤发生转移和复发的关键因素之一^[5]。TAKAISH等^[6]在2009年首次在胃癌细胞系中成功分离并鉴定出胃上皮细胞来源的胃癌干细胞。随后的一系列研究表明,胃癌干细胞具有不断自我更新和多向分化的潜能,与胃癌的发生发展密切相关^[7],更是引起胃癌细胞侵袭性、耐药性和转移性的关键原因^[8-11]。因此,针对胃癌干细胞进行的靶向治疗对胃癌患者的临床治疗具有重要意义。据已有的研究结果^[12-14]表明,在肿瘤的发生发展过程中,不同亚群的肿瘤干细胞在各自的恶性表型中发挥作用,且肿瘤干细胞的不同亚群之间具有可塑性,不同的肿瘤干细胞亚群可进行相互转化从而降低其受到的药物抑制效果,因此,针对胃癌干细胞进行靶向治疗需要同时关注不同亚群胃癌干细胞在治疗前后的变化和影响,才能更有效地通过抑制胃癌干细胞来达到协同化疗提高胃癌治疗效果的目的。

HSP90是一种高度保守的应激性分子伴侣蛋白,其在多种肿瘤中高表达,可存在于细胞内、细胞外及胞膜上,且在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用^[15-18]。多项研究结果显示,肿瘤患者血清中HSP90的表达显著上升,并与不良预后相关,显示血清HSP90的含量可以作为肿瘤诊断中的一个参考指标^[19-21];并同时提示了eHSP90可能在肿瘤的转移、复发、抵抗化疗中发挥了关键的促进作用^[22-24]。在乳腺癌^[25]、前列腺癌^[24-26]、胶质母细胞瘤^[27]中的研究均提示处理eHSP90⁺细胞有显著的干细胞特性。eHSP90可能具有作为胃癌治疗中针对胃癌干细胞靶向治疗的新靶点的巨大潜力,但目前特异靶向eHSP90的研究较少,相关机制还不清楚。因此本研究将尝试通过前期制备的一株HSP90单克隆抗体28C10靶向处理eHSP90,探讨其对胃癌干细胞的作用和机制,以期该抗体能协同化疗显著提高疗效,从而探索胃癌精准靶向联合治疗的新策略。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌PAMC82细胞由中国医学科学院肿瘤医院细胞及分子生物学实验室保存,抗HSP90抗体为本课题组实验筛选得到的特异性识别HSP90的杂交瘤单抗28C10。AldefluorTM检测试剂盒购于加拿大Stem cell Technologies公司,FITC-CD44抗体购于eBioscience公司,抗体ab13492、ab115641、ab51037均购于Abcam公司,抗体2890S、4900S、4249S、4228S、2920S、4060S、2983S、5536S均购于CST公司。抗体10162R购于博奥森公司,基质胶购于美国BD公司,Transwell小室购于美国Millipore公司,0.1%结晶紫溶液购于北京索莱宝科技有限公司,甲基纤维素购于Sigma公司,CCK-8试剂购于日本同仁化学所,bFGF、B27、EGF均购于Invitrogen公司。

1.2 流式细胞术与免疫荧光共聚焦显微镜检测HSP90在PAMC82细胞中的表达

将对数生长期PAMC82细胞制成单细胞悬液,调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,将1 μ g一抗ab115641加入1 mL细胞悬液中,室温避光处理30 min,离心清洗3次,以500 μ L PBS重悬,流式细胞仪分析细胞。

取对数生长期PAMC82细胞制成单细胞悬液,调整细胞密度至 7.5×10^4 个/mL,以200 μ L/孔接种于铺好爬片的24孔板(1.5×10^4 个/孔),实验组、对照组各一板,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中培养24 h。实验组加200 μ L/孔的一抗ab13492(1:200稀释),置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中2 h。对照组加200 μ L/孔的PBS,置于4 $^{\circ}$ C冰箱中2 h。加入5% BSA 37 $^{\circ}$ C处理30 min,加入甲醛(提前拿到室温)200 μ L/孔,室温固定15 min, PBS洗涤3 min $\times$ 3次,0.2% TritonX-100(现配:200 μ L+100 mL PBS)200 μ L/孔透化15 min, PBS洗涤3 min $\times$ 3次,羊抗鼠荧光二抗488(1:200稀释)200 μ L/孔室温避光40 min, PBST洗涤3 min $\times$ 3次(现配), PBS洗涤3 min $\times$ 3次, DIPA封片,室温放置10 min,共聚焦显微镜观察并拍照。活细胞免疫荧光eHSP90染色在细胞固定打孔前完成。

1.3 流式细胞术检测PAMC82细胞中eHSP90⁺分别与ALDH⁺、CD44⁺亚群共染情况

取对数生长期PAMC82细胞制成单细胞悬液,调密度至 1×10^6 个/mL,对细胞悬液进行ALDH⁺亚群和eHSP90⁺亚群共染、CD44⁺亚群和eHSP90⁺亚群共染,流式细胞仪分析细胞。

1.4 无血清成球实验检测28C10对PAMC82细胞自我更新能力的影响

2 mL 0.8% 甲基纤维素培养基加入低黏附24孔板, 实验设DDP (0.5 $\mu\text{g/mL}$) 组、28C10 (40 $\mu\text{g/mL}$) 组、DDP (0.5 $\mu\text{g/mL}$) + 28C10 (40 $\mu\text{g/mL}$) 组和PBS对照组, 各自作用4 d后, 细胞均调为 5×10^4 个 (10 μL) / 孔的无血清单细胞悬液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养7 d后观察计数成球情况, 并在倒置荧光显微镜下拍照。

1.5 Transwell实验检测28C10对PAMC82细胞迁移和侵袭能力的影响

4组细胞药物作用4 d后, 将细胞制成无血清单细胞悬液, 调密度至 2.5×10^5 个/mL。迁移实验上室加200 μL 无血清单细胞悬液, 下室加650 μL 相应的10%完全培养基。侵袭实验提前将基质胶于4 $^{\circ}\text{C}$ 溶化, 将枪头、Transwell小室于-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷后在每小室上室加入100 μL 10%基质胶 (基质胶: 无双抗培养基为1:9), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 放置1~2 h, 吸出多余基质胶晾干, 其余操作同迁移实验。于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中迁移实验放置24 h、侵袭实验放置30 h后固定细胞并染色, 切下小室于载玻片上用中性树脂封片, 显微镜下观察计数并拍照。

1.6 克隆形成实验检测28C10对PAMC82细胞克隆形成能力的影响

4组细胞药物各自作用4 d后, 将细胞制成无血清单细胞悬液, 调密度至 5×10^4 个/mL, 100 mm培养皿中加入10 μL (500个细胞) 细胞悬液, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养2~3周后出现肉眼可见单克隆, 加入2 mL 4%多聚甲醛固定细胞30 min, PBS洗2次, 加入2 mL 0.1%晶紫染色30 min, 蒸馏水洗2次, 晾干, 统计每组细胞克隆数并拍照。

1.7 CCK-8实验检测28C10和DDP单独与联合处理对PAMC82细胞存活率及增殖能力的影响

取对数生长期PAMC82细胞制成单细胞悬液, 调密度至 2.5×10^4 个/mL, 按200 μL /孔接种于96孔板, 上述4组每组设3个平行孔。取4组分别在药物作用的0、24、48、72 h时间点加入CCK-8试剂, 2 h后在波长450 nm处测定光密度 (D) 值。设定对照组的存活率为100%, 计算其他3组细胞在各时间点存活率, 分析28C10对DDP的协同化疗作用, 绘制不同组别的协同抑制细胞生长曲线。

1.8 CCK-8实验检测28C10和DDP单独与联合处理对PAMC82细胞恶性潜能的抑制

同1.7方法接种细胞至96孔板, 每组设3个平行孔, 各组药物处理72 h, 加CCK-8试剂2 h后分别测处理0、24、48、72、96 h时细胞在波长450 nm下的 D 值。

1.9 CCK-8实验检测PAMC82细胞经28C10处理后

对顺铂耐药性变化

同1.7方法接种细胞至96孔板中, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养12 h, 分别设0.05、0.1、0.5、1、5 $\mu\text{g/mL}$ DDP单独组及与28C10 (40 $\mu\text{g/mL}$) 联合组, 每组设5个复孔, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养细胞至80%汇合度时, 吸出原培养基, 加入10% CCK-8试剂 (100 μL /孔), 2 h后在波长450 nm下测定 D 值, 绘制各组细胞的耐药曲线并计算DDP的 IC_{50} 值。

1.10 流式细胞术检测28C10对PAMC82细胞干性表型的影响

28C10处理4 d后, 取对数生长期的PAMC82细胞制成 2×10^5 个/mL单细胞悬液, 每组两管分别为“CON”、“test”。将细胞悬液1 mL加到“test”管, 加5 μL DEAB试剂到“CON”管中, 立即盖盖。在“test”管中加入5 μL 活化的ALDEFLUOR™试剂, 混匀后立即将500 μL 混合物转移至“CON”管中。将“CON”、“test”管放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中45 min, 取出两试管离心5 min, 弃上清, 用分析缓冲液500 μL 重悬, 使用流式细胞仪分析细胞。

1.11 WB法检测28C10对PAMC82细胞中干细胞相关蛋白表达的影响

取28C10处理4 d后的PAMC82细胞, 对PAMC82细胞进行无血清低黏附培养, 收集富含肿瘤干细胞的细胞球, 将其细胞裂解并提取总蛋白, 用SDS-PAGE分离蛋白, 转膜后次日TBST洗膜4次, 每次8 min。分别加入一抗 (OCT4单抗2890S以1:1 000稀释; SOX2单抗4900S以1:1 000稀释; ALDH单抗10162R以1:300稀释; CD44单抗ab51037以1:1 000稀释) 及其对应的二抗 [SOX2、ALDH: 过氧化物酶结合亲和纯山羊抗小鼠IgG Fc以1:5 000稀释; CD44、OCT4: 过氧化物酶结合亲和纯山羊抗兔IgG (H+L) 以1:5 000稀释], 室温放置1 h, TBST洗膜4次、每次8 min, 显色。信号通路WB检测同上, 一抗PI3K单抗4249S以1:1 000稀释, p-PI3K单抗4228S以1:1 000稀释, AKT单抗2920S以1:2 000稀释, p-AKT单抗4060S以1:2 000稀释, mTOR单抗2983S以1:1 000稀释, p-mTOR单抗5536S以1:1 000稀释; 对应的二抗为AKT: 过氧化物酶结合亲和纯山羊抗兔IgG (H+L) 以1:5 000稀释, PI3K、p-PI3K、p-AKT、mTOR、p-mTOR过氧化物酶结合亲和纯山羊抗兔IgG (H+L) 以1:5 000稀释。

1.12 免疫荧光法检测28C10作用前后cHSP90亚细胞定位变化

取对数生长期PAMC82细胞制成 7.5×10^4 个/mL单细胞悬液, 24孔板中提前放入匹配的爬片, 每孔加入200 μL 细胞悬液。实验组加入28C10 (40 $\mu\text{g/mL}$)

后, 37 °C、5% CO₂ 培养 2 h; 对照组加等量 PBS 后, 4 °C 培养 2 h。后续操作同 1.2 中固定细胞免疫荧光实验。

1.13 统计学处理

1.2~1.11 实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 19.0 统计学软件, 正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用 *F* 检验; 计数资料以百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

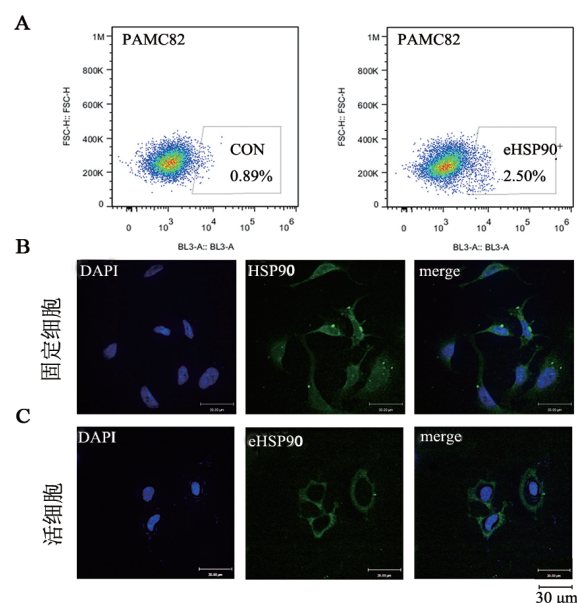
2.1 胃癌细胞 PAMC82 中 HSP90 的表达情况

流式细胞术检测结果(图 1A)显示, 在 PAMC82 细胞中有 (2.502±0.013)% 的 eHSP90⁺ 亚群细胞。固定细胞免疫荧光显示, PAMC82 细胞膜上可见微量 HSP90, 而胞质中有大量 HSP90 染色且染色均匀, 呈正常的胞质蛋白染色特征(图 1B); 活细胞免疫荧光(图 1C)显示, PAMC82 细胞膜上及邻近膜局部有呈颗粒状的 HSP90 染色, 呈绕核分布状态, 也可见少量靠核染色, 呈膜蛋白初步内化后的染色特征, 但染色特征依然与固定细胞胞质蛋白染色的特征模式(图 1B)有明显差别, 表明 PAMC82 细胞膜上确实存在 eHSP90。

2.2 PAMC82 细胞中 ALDH⁺、CD44⁺ 亚群的比例及其各自与 HSP90⁺ 共阳性细胞比例

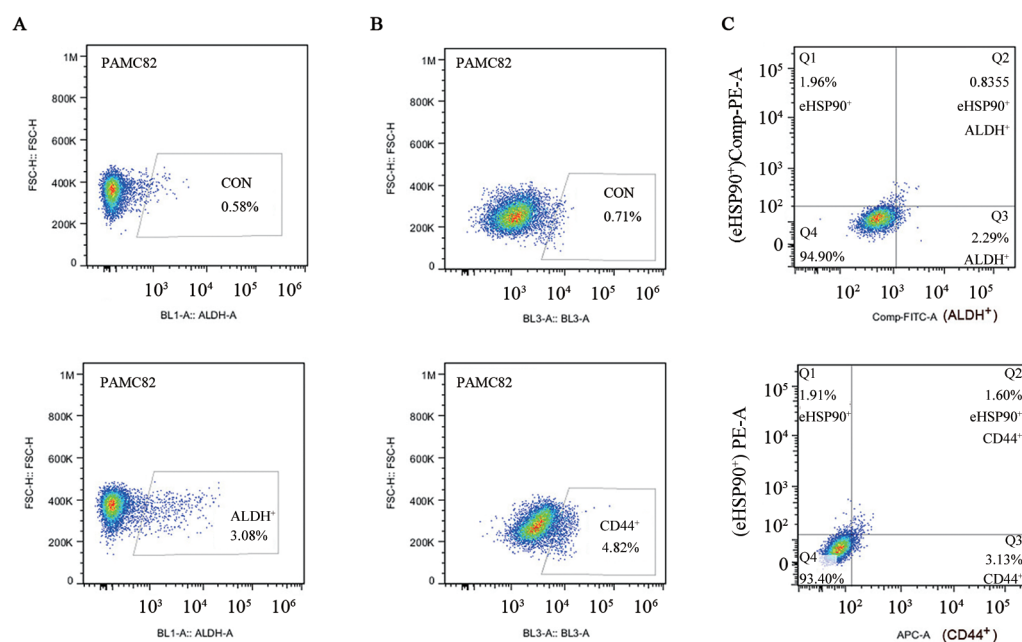
流式细胞术结果(图 2)显示, PAMC82 细胞中有 (3.08±0.07)% ALDH⁺ 细胞(图 2A), 有 (4.84±0.07)% CD44⁺ 细胞(图 2B)。ALDH⁺ 与 HSP90⁺ 共染细胞比例

为 (31.24±0.62)%, 即 HSP90⁺ 细胞中约有 31% ALDH⁺ 细胞; CD44⁺ 与 HSP90⁺ 共染比例为 (46.68±0.89)%, 即 HSP90⁺ 细胞中约有 47% CD44⁺ 细胞(图 2C)。由于 ALDH⁺、CD44⁺ 细胞被认为代表两种不同的胃癌肿瘤干细胞亚群, 而 ALDH⁺、CD44⁺ 又分别可与 HSP90⁺ 细胞共染, 所以上述结果证明细胞膜上高表达的 eHSP90 可能也可作为肿瘤干性相关标志物。



A: PAMC82 细胞中 eHSP90⁺ 亚群比例; B: PAMC82 细胞中固定细胞染色 HSP90 表达情况(细胞质中表达显著, 比例尺: 30 μm); C: PAMC82 细胞中活细胞染色 eHSP90 表达情况(细胞膜上表达显著, 比例尺: 30 μm)

图 1 PAMC82 细胞中 HSP90 的表达情况



A: PAMC82 细胞中 ALDH⁺ 亚群比例; B: PAMC82 细胞中 CD44⁺ 亚群比例; C: PAMC82 细胞中 ALDH⁺ 与 eHSP90⁺ 共染情况及 CD44⁺ 与 eHSP90⁺ 共染情况
图 2 PAMC82 细胞中 ALDH⁺、CD44⁺ 及其两者分别与 HSP90 共阳性细胞的比例

2.3 28C10 明显抑制 PAMC82 细胞的干性及相关特性并提高 DDP 的抑癌效果

经 28C10 处理后, PAMC82 细胞成球能力明显减少 ($P<0.01$, 图 3A), 与 DDP 联合处理后减少更明显 ($P<0.01$, 图 3A); PAMC82 细胞的迁移、侵袭和克隆形成能力在 28C10 处理后明显降低 ($P<0.01$, 图 3B、C), 在 28C10 和 DDP 联合处理后降低更为明显 ($P<0.01$, 图 3B、C)。结果表明, 28C10 可显著抑制胃癌细胞 PAMC82 的自我更新、迁移侵袭和增殖能力, 与 DDP 联合后显著协同抑制 PAMC82 的自我更新和增殖潜能。将两药联合直接持续处理 PAMC82 细胞时发现, DDP+28C10 联合治疗能显著抑制细胞增殖能力 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图 3D)。进一步采用两药联合处理 72 h 后撤药, 发现 DDP+28C10 联合治疗显著抑制细胞增殖潜能的时间持续至 96 h ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图 3E)。以上结果表明, 28C10 可以使 PAMC82 细胞干性相关功能下降, 不仅可协同 DDP 抑制胃癌细胞增殖, 还可在停药后持续地抑制细胞的恶性增殖潜能。

2.4 28C10 与 DDP 协同处理显著提高胃癌细胞 PAMC82 对 DDP 的敏感性

连续用药 48 h 后检测细胞生长曲线, 以 CON 组存活率为 100% 作为参照, DDP 组存活率为 $(83.8\pm1.26)\%$ 、28C10 组存活率为 $(91.60\pm0.56)\%$; DDP+28C10 组存活率为 $(68.50\pm0.84)\%$ ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图 4A)。药敏曲线显示, 28C10 ($40\text{ }\mu\text{g/mL}$) 的协同作用可将 DDP 对 PAMC82 细胞的 IC_{50} 由 $0.470\text{ }\mu\text{g/mL}$ 大幅下降至 $0.049\text{ }\mu\text{g/mL}$ ($P<0.05$, 图 4B)。结果表明, 28C10 可显著增敏化疗, 协同 DDP 提高治疗效果。

2.5 28C10 处理后胃癌细胞 PAMC82 干性相关蛋白表达和干性表型细胞数量均下降

28C10 ($40\text{ }\mu\text{g/mL}$) 作用 4 d 后, 将对 PAMC82 细胞进行无血清低黏附培养, 收集富含肿瘤干细胞的细胞球, 提取蛋白后进行 WB 分析, 结果显示, 与对照组相比, 细胞中干性相关蛋白 OCT4、SOX2 表达量明显下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图 5A), 干性标志物 ALDH、CD44 表达量也明显下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图 5B)。28C10 作用 4 d 后对 PAMC82 细胞进行流式细胞术检测, 结果显示, ALDH⁺ 细胞 [CON 组为 $(3.08\pm0.073)\%$, 28C10 组为 $(1.40\pm0.017)\%$; $P<0.01$]、CD44⁺ 细胞 [CON 组为 $(4.84\pm0.067)\%$, 28C10 组为 $(1.37\pm0.032)\%$; $P<0.01$] 数量均显著下降 (图 5C)。结果说明, 28C10 可同时靶向抑制 PAMC82 细胞 ALDH⁺、CD44⁺ 胃癌干细胞亚群, 抗 eHSP90 处理可以使 PAMC82 细胞干性相关蛋白表达下降、干性表型细胞数量也下降。

2.6 28C10 作用后 PAMC82 细胞的 eHSP90⁺ 表型变

化及其内化情况

28C10 ($40\text{ }\mu\text{g/mL}$) 作用 PAMC82 细胞 4 d 后, 流式细胞术检测结果 (图 6A) 显示, eHSP90⁺ 细胞比例显著下降 [CON 组为 $(2.96\pm0.49)\%$, 28C10 组为 $(1.36\pm0.55)\%$; $P<0.01$], 与 ALDH⁺、CD44⁺ 细胞亚群比例的变化一致, 提示 28C10 可能通过影响 eHSP90⁺ 细胞而导致 ALDH⁺、CD44⁺ 亚群变化。在 28C10 作用 2 h 后, 使用免疫荧光染色共聚焦实验检测 PAMC82 细胞膜上 eHSP90 是否内化, 结果可观察到活细胞状态下加入 28C10, 一开始仅结合细胞膜上的 eHSP90, 在作用一段时间后可与溶酶体标志物 LAMP 在细胞质中共定位, 表明 eHSP90 与 28C10 结合后可发生内化 (图 6B)。WB 法检测结果进一步显示, PAMC82 富含干细胞的亚群中总 HSP90 表达量也相应地明显下降, 相对表达量由 (0.45 ± 0.09) 降至 (0.27 ± 0.06) ($P<0.01$, 图 6C)。结合前述免疫荧光检测结果, 提示 28C10 作用导致内化的 eHSP90 可能已被降解, 从而使 PAMC82 细胞中总 HSP90 表达量和 eHSP90⁺ 细胞亚群均下降。

2.7 28C10 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路影响 PAMC82 细胞的干性

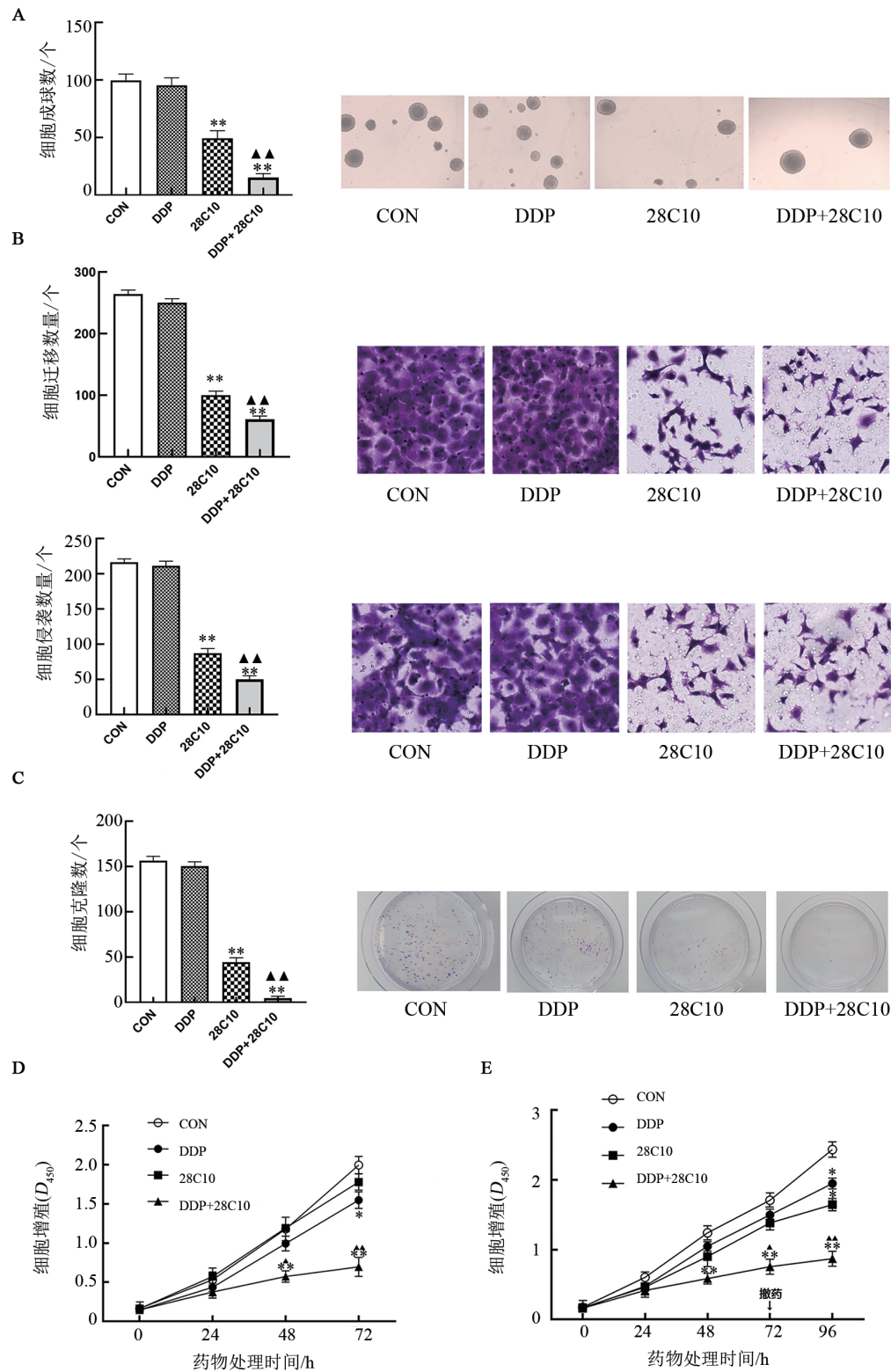
28C10 ($40\text{ }\mu\text{g/mL}$) 作用 4 d 后, 将 PAMC82 细胞进行无血清低黏附培养, 收集富含肿瘤干细胞的细胞球并提取蛋白进行 WB 分析, 发现 28C10 作用后, 与对照组相比, p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 表达量显著下降 (图 7A), 尤其是 p-mTOR 表达量降低最甚 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图 7B)。以上结果提示, 28C10 可能是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路进而影响肿瘤细胞 PAMC82 的干性。

3 讨论

胃癌是一种受幽门螺杆菌感染、不良饮食、遗传等多种因素影响的胃黏膜癌变, 有较高的发病率和病死率。由于其早期临床症状和良性胃病并无显著差异, 致使多数患者就诊时处于胃癌的中晚期, 错过最佳治疗时机^[28]。手术治疗是针对具体特定病灶的切除, 对出现转移的中晚期胃癌患者来说手术效果并不理想, 而且还有可能成为复发的根源。因此, 对于中晚期胃癌患者, 必要的辅助治疗十分重要。化疗作为一种恶性肿瘤的常规辅助疗法, 对中晚期癌症患者进行治疗的目的是抑制肿瘤细胞的增殖和扩散, 从而达到有效延长患者生存期的目的。但是, 越来越多的研究结果^[29]发现, 传统化疗方式都出现了明显耐药现象, 使得中晚期胃癌患者的治疗再次陷入窘境。同时也发现在肿瘤化疗耐药过程中, 肿瘤干细胞起着重要作用^[30]。因此随着对肿瘤干细胞亚群

研究的不断深入, 对其进行靶向治疗必将逐步发展并应用于临床。本研究通过HSP90单抗对胃癌细胞PAMC82不同干细胞亚群进行靶向治疗和协同DDP

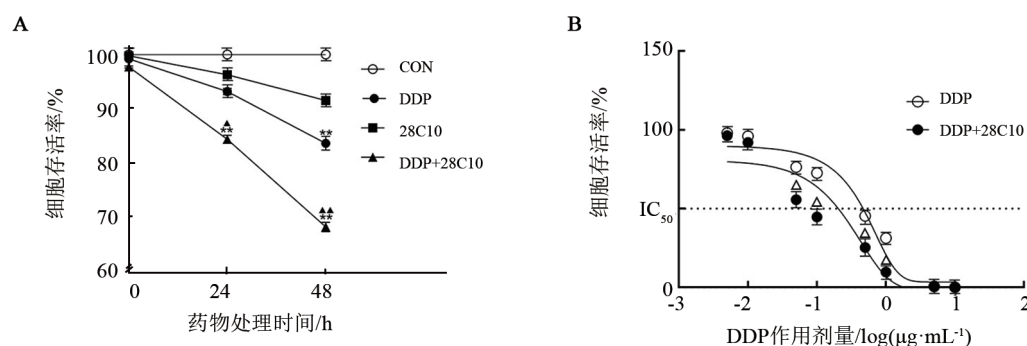
联合治疗, 观察治疗效果并初步探索其靶向治疗可能涉及的分子机制。



与CON组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与28C10组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

A:不同处理组PAMC82细胞的无血清甲基纤维素成球实验(200个细胞/孔 $\times 50$);B:不同处理组PAMC82细胞的迁移和侵袭实验($\times 20$);C:不同处理组PAMC82细胞克隆形成实验;D:不同处理组PAMC82细胞生长能力抑制曲线(药物处理72 h);E:不同处理组PAMC82细胞生长潜能抑制曲线(药物处理72 h后撤药并观察至96 h)

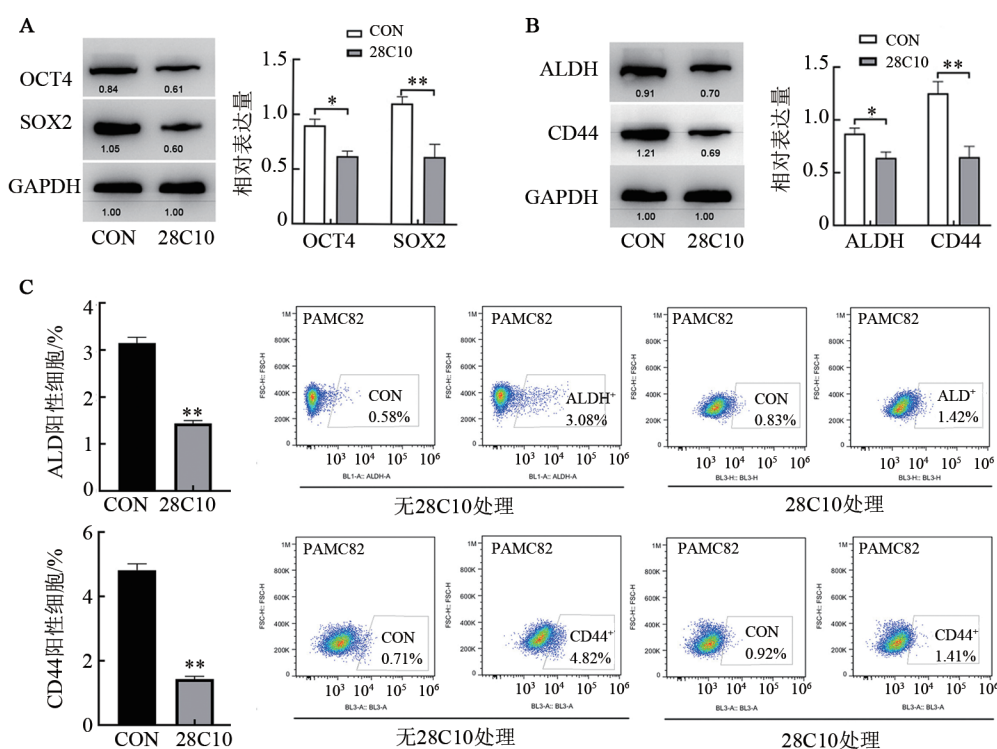
图3 28C10和DDP单独或两者联合处理对PAMC82细胞干性功能的影响



与CON组比较, ** $P < 0.01$; 与28C10组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与DDP组比较, $\Delta P < 0.05$

A: 不同处理组PAMC82细胞的存活曲线; B: 不同处理组的 IC_{50}

图4 28C10与DDP联合处理提高胃癌细胞PAMC82对DDP的敏感性



与CON组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: 28C10处理4 d后PAMC82细胞中干性相关蛋白表达变化; B: 28C10处理4 d后PAMC82细胞中ALDH、CD44表达变化;

C: 28C10处理4 d后PAMC82细胞中ALDH⁺、CD44⁺亚群数量变化情况

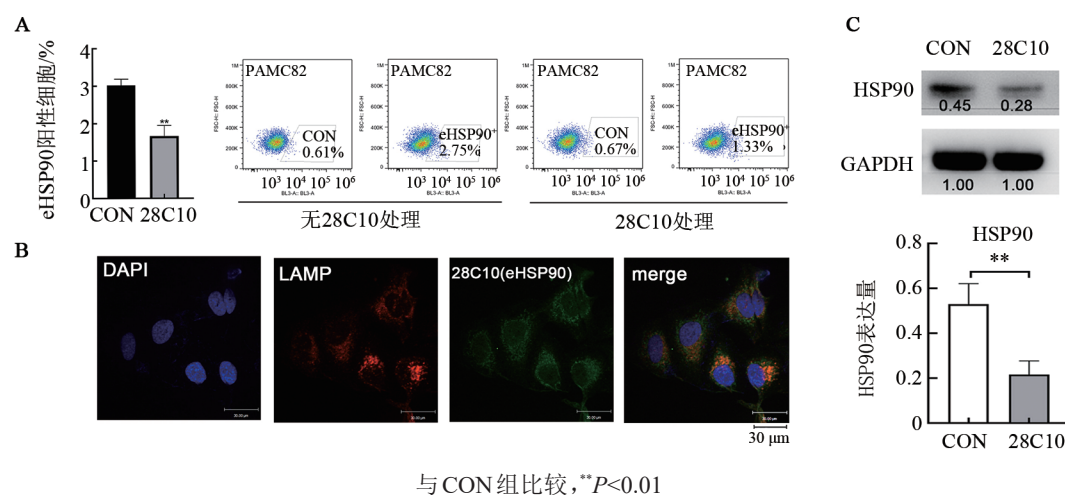
图5 28C10处理对PAMC82干性相关蛋白表达和细胞干性表型的影响

多项研究发现eHSP90在肿瘤干细胞的生物学活动中发挥着重要作用,但其对不同肿瘤干细胞亚群的作用及相关机制仍未明确。在前列腺癌中,eHSP90参与重要的EMT过程,而这一过程又在肿瘤干细胞的适应并耐受恶性生存环境中发挥着重要作用,EMT可使得上皮型、间质型肿瘤干细胞在面对危机时互相转化以适应环境、抵抗治疗,进而促使肿瘤的转移复发。eHSP90和epha2在配体依赖情况下显示出分子协同效应,进而调控细胞形态和细胞骨架运动^[23]。eHSP90在大分子的穿膜运输中发挥作用^[31]。本研究首先发现在PAMC82细胞中,eHSP90⁺

细胞亚群与ALDH⁺细胞亚群和CD44⁺细胞亚群均存在显著共染色重叠。在胃癌中ALDH⁺、CD44⁺细胞被认为代表两种不同的肿瘤干细胞亚群^[32-37],而HSP90⁺细胞又多为ALDH⁺或CD44⁺细胞,所以膜eHSP90也可作为胃癌细胞干性相关的潜在标志物,通过靶向eHSP90⁺细胞亚群可以有效地靶向胃癌肿瘤干细胞。本研究进一步证实,28C10处理后可显著抑制PAMC82细胞的自我更新成球能力、增殖能力、迁移和侵袭能力,同时显著抑制ALDH⁺、CD44⁺、eHSP90⁺亚群细胞,大幅提高了PAMC82细胞对DDP的敏感性。通过相关作用机制研究,结果显示28C10作用

后,原本位于胃癌细胞膜上的一部分eHSP90发生了内化,并因此导致了这些细胞的总HSP90量显著下降,这可能是28C10发挥作用的主要机制之一。另外,本研究将28C10作用4 d后的PAMC82细胞进行低黏附培养,收集富含肿瘤干细胞的细胞球并提取蛋白进行WB分析,结果显示,肿瘤干细胞中的干性相关蛋白OCT4、SOX2表达量显著下降,PI3K/AKT/mTOR信号通路相关关键蛋白p-PI3K、p-AKT、p-mTOR表达量显著下降,PI3K/AKT/mTOR通路受到显著抑制。综上所述,在胃癌PAMC82细胞中,有部分细胞表面有eHSP90;eHSP90可作为PAMC82细胞的一种

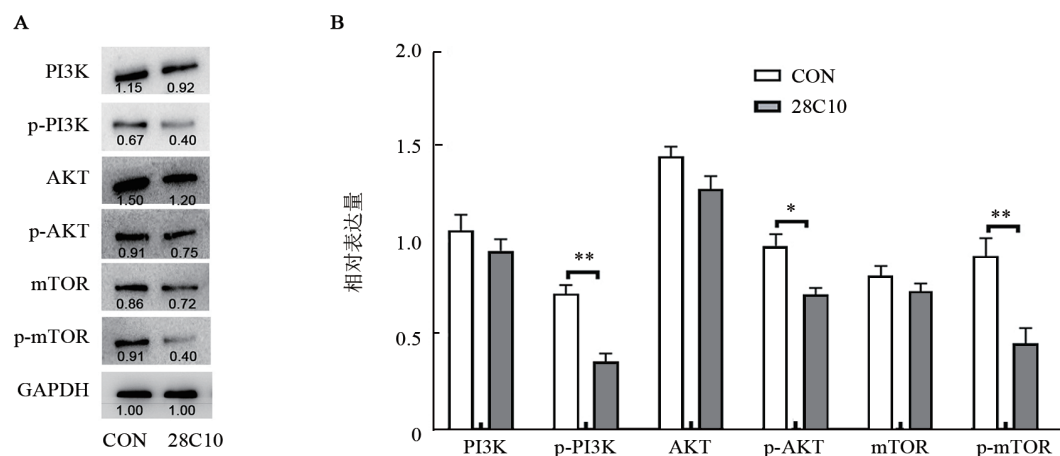
潜在的肿瘤干细胞相关标志物,以eHSP90为靶点,抗HSP90单抗28C10可靶向eHSP90⁺细胞,通过使eHSP90内化而下调HSP90的总量,使eHSP90⁺细胞及ALDH⁺、CD44⁺细胞数量下降,进而影响PAMC82细胞的肿瘤干性、干细胞比例和增殖、耐药等恶性潜能,显著增强DDP的抗癌效果。本研究首次报道了28C10靶向HSP90后可以增敏DDP化疗效果的联合治疗新策略,其机制可能与导致ALDH⁺、CD44⁺亚群细胞比例下降,影响PI3K/AKT/mTOR信号通路,进而影响干性基因有关。



与CON组比较, ** $P < 0.01$

A: 28C10处理4 d后PAMC82细胞中eHSP90⁺亚群比例变化情况; B: 28C10处理2 h后PAMC82细胞中eHSP90亚细胞定位变化情况; C: 28C10处理4 d后PAMC82细胞中HSP90表达量变化情况

图6 28C10作用后PAMC82细胞的eHSP90⁺细胞数量变化及eHSP90内化情况



与CON组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: 28C10处理4 d后PAMC82细胞中干性相关信号蛋白PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR表达的WB分析;

B: 28C10处理4 d后PAMC82细胞中干细胞PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR表达量的变化

图7 28C10作用4 d后信号通路蛋白p-PI3K、p-AKT、p-mTOR的表达量明显下降

因此,eHSP90可作为一个有潜力的胃癌干细胞治疗特异的新靶点,通过单抗药物特异靶向eHSP90⁺亚群细胞进行治疗,可能比现有的靶向所有细胞的

HSP90治疗策略具有更好的安全性。据研究结果^[38-39]显示,eHSP90通过低密度脂蛋白受体相关蛋白1 (low-density lipoprotein-receptor-related protein 1,

LRP1)向AKT通路发出信号,在淋巴管形成过程中上调CXC18的表达和分泌。药物抑制AKT可显著延缓对ganetespib(一种HSP90小分子抑制剂)的获得性抵抗。本课题组在今后的工作中,将结合上述线索进一步探讨并确定膜eHSP90在胃癌中发挥作用的具体分子机制。

[参考文献]

- [1] BANIAK N, SENGER J L, AHMED S, *et al.* Gastric biomarkers: a global review[J/OL]. *World J Surg Oncol*, 2016, 14(1): 212[2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4982433/>. DOI:10.1186/s12957-016-0969-3.
- [2] ZHAO Y, FENG F, ZHOU Y N. Stem cells in gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(1): 112-123. DOI:10.3748/wjg.v21.i1.112.
- [3] JEAN M. Medicine. Bone marrow cells: the source of gastric cancer? [J]. *Science*, 2004, 306(5701): 1455-1457. DOI: 10.1126/science.306.5701.1455a.
- [4] HARTGRINK H H, JANSEN E P, VAN GRIEKEN N C, *et al.* Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2009, 374(9688): 477-490. DOI:10.1016/S0140-6736(09)60617-6.
- [5] ZHANG L, HOU Y H, ZHANG J, *et al.* Experimental study on the combined killing effect of DC and CIK cells on gastric cancer stem cells[J]. *Biomed Sci*, 2021, 7(1): 20[2021-07-30]. <https://doi.org/10.11648/j.bs.20210701.14>. DOI:10.11648/j.bs.20210701.14.
- [6] TAKAISHI S, OKUMURA T, WANG T C. Gastric cancer stem cells [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(17): 2876-2882. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.2603.
- [7] WANG G, SUN Q K, ZHU H, *et al.* The stabilization of yes-associated protein by TGF β -activated kinase 1 regulates the self-renewal and oncogenesis of gastric cancer stem cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(14): 6584-6601. DOI:10.1111/jcmm.16660.
- [8] WEN Z Z, CHEN M, GUO W H, *et al.* ROR β suppresses the stemness of gastric cancer cells by downregulating the activity of the Wnt signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2021, 46(2): 180[2021-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34278502/>. DOI: 10.3892/or.2021.8131.
- [9] XIA Y W, LV J L, JIANG T L, *et al.* CircFAM73A promotes the cancer stem cell-like properties of gastric cancer through the miR-490-3p/HMGA2 positive feedback loop and HNRNP-mediated β -catenin stabilization[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 103[2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7972245/>. DOI:10.1186/s13046-021-01896-9.
- [10] YOON C, LU J, YI B C, *et al.* PI3K/Akt pathway and Nanog maintain cancer stem cells in sarcomas[J]. *Oncogenesis*, 2021, 10(1): 12[2021-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33468992/>. DOI:10.1038/s41389-020-00300-z.
- [11] YANG T, SHU X, ZHANG H W, *et al.* Enolase 1 regulates stem cell-like properties in gastric cancer cells by stimulating glycolysis [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 870[2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7567818/>. DOI: 10.1038/s41419-020-03087-4.
- [12] YU H C, HE J, SU G Y, *et al.* Fluid shear stress activates YAP to promote epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Mol Oncol*, 2021, 15(11): 3164-3183[2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8564657/>. DOI:10.1002/1878-0261.13061.
- [13] KANTAPAN J, PAKSEE S, DUANGYA A, *et al.* A radiosensitizer, gallotannin-rich extract from *Bouea macrophylla* seeds, inhibits radiation-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells[J/OL]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 189 [2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8254241/>. DOI:10.1186/s12906-021-03363-6.
- [14] ALQAHTANI T, ALSWIED A, SUN D. Selective antitumor activity of datelliptium toward medullary thyroid carcinoma by downregulating RET transcriptional activity[J]. *Cancers*, 2021, 13(13): 3288[2021-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34209165/>. DOI: 10.3390/cancers13133288.
- [15] EPP-DUCHARME B, DUNNE M, FAN L Y, *et al.* Heat-activated nanomedicine formulation improves the anticancer potential of the HSP90 inhibitor luminespib *in vitro*[J/OL]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 11103[2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8160139/>. DOI:10.1038/s41598-021-90585-w.
- [16] WANG R J, ALVAREZ D A, CROUCH B T, *et al.* Understanding the sources of errors in *ex vivo* Hsp90 molecular imaging for rapid-on-site breast cancer diagnosis[J]. *Biomed Opt Express*, 2021, 12(4): 2299-2311. DOI:10.1364/BOE.418818.
- [17] ZHANG Y Y, NI L G, LI Q Q, *et al.* Diagnostic, clinicopathologic, therapeutic and prognostic value of plasma heat shock protein 90 levels in patients with advanced gastrointestinal carcinoma[J]. *J Cancer*, 2020, 11(20): 5890-5899. DOI:10.7150/jca.46343.
- [18] AL-KAABI M, BAKIR W I, GAIDAN H. Immunohistochemical expression of interleukin10 (IL10) and heat shock protein-90 (HSP-90) in prostatic carcinoma[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2020, 63(2): 230[2021-07-30]. https://doi.org/10.4103/ijpm.ijpm_460_19. DOI:10.4103/ijpm.ijpm_460_19.
- [19] BUDVYTYTE R, MILASIUTE A, VITKUS D, *et al.* Tethered lipid membranes as a nanoscale arrangement towards non-invasive analysis of acute pancreatitis[J/OL]. *Biomedicines*, 2021, 9(7): 755[2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8301313/>. DOI: 10.3390/biomedicines9070755.
- [20] PAWLIK-GWOZDECKA D, GÓRSKA-PONIKOWSKA M, ADAMKIEWICZ-DROŻYŃSKA E, *et al.* Serum heat shock protein 90 as a future predictive biomarker in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cent Eur J Immunol*, 2021, 46(1): 63-67. DOI:10.5114/ceji.2020.95114.
- [21] ZHAI E T, LIANG W, LIN Y, *et al.* HSP70/HSP90-organizing protein contributes to gastric cancer progression in an autocrine fashion and predicts poor survival in gastric cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2): 879-892. DOI:10.1159/000490080.
- [22] BAKER-WILLIAMS A J, HASHMI F, BUDZYŃSKI M A, *et al.* Co-chaperones TIMP2 and AHA1 competitively regulate extracellular HSP90: client MMP2 activity and matrix proteolysis [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(7): 1894-1906. e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.07.045.
- [23] DAOUD A, GOPAL U, KAUR J, *et al.* Molecular and functional crosstalk between extracellular Hsp90 and ephrin A1 signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(63): 106807-106819. DOI:10.18632/oncotarget.

- 22370.
- [24] NOLAN K D, KAUR J, ISAACS J S. Secreted heat shock protein 90 promotes prostate cancer stem cell heterogeneity[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19323-19341. DOI:10.18632/oncotarget.14252.
- [25] STIVAROU T, STELLAS D, VARTZI G, *et al.* Targeting highly expressed extracellular HSP90 in breast cancer stem cells inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(8): 799-812. DOI:10.1080/15384047.2016.1195041.
- [26] NOLAN K D, FRANCO O E, HANCE M W, *et al.* Tumor-secreted Hsp90 subverts polycomb function to drive prostate tumor growth and invasion[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(13): 8271-8282. DOI: 10.1074/jbc.M115.637496.
- [27] GOPAL U, BOHONOWYCH J E, LEMA-TOME C, *et al.* A novel extracellular Hsp90 mediated co-receptor function for LRP1 regulates EphA2 dependent glioblastoma cell invasion[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17649[2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3050925/>. DOI:10.1371/journal.pone.0017649.
- [28] FAN X H, QIN X X, ZHANG Y, *et al.* Screening for gastric cancer in China: Advances, challenges and visions[J]. *Chin J Cancer Res*, 2021, 33(2): 168-180. DOI:10.21147/j.issn.1000-9604.2021.02.05.
- [29] DENG P, SUN M, ZHAO W Y, *et al.* Circular RNA circVAPA promotes chemotherapy drug resistance in gastric cancer progression by regulating miR-125b-5p/STAT3 axis[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(6): 487-500. DOI:10.3748/wjg.v27.i6.487.
- [30] NI H W, QIN H, SUN C, *et al.* miR-375 reduces the stemness of gastric cancer cells through triggering ferroptosis[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 325[2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8180146/>. DOI:10.1186/s13287-021-02394-7.
- [31] KIM H, SEO E H, LEE S H, *et al.* The telomerase-derived anticancer peptide vaccine GV1001 as an extracellular heat shock protein-mediated cell-penetrating peptide[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): E2054[2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5187854/>. DOI:10.3390/ijms17122054.
- [32] JIANG Y X, SIU M K Y, WANG J J, *et al.* Ascites-derived ALDH⁺CD44⁺ tumour cell subsets endow stemness, metastasis and metabolic switch *via* PDK4-mediated STAT3/AKT/NF- κ B/IL-8 signalling in ovarian cancer[J]. *Br J Cancer*, 2020, 123(2): 275-287. DOI:10.1038/s41416-020-0865-z.
- [33] KEYSAR S B, LE P N, MILLER B, *et al.* Regulation of head and neck squamous cancer stem cells by PI3K and SOX2[J/OL]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(1): djw189 [2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5025278/>. DOI:10.1093/jnci/djw189.
- [34] MASCIARE V, GRISENDI G, BANCHELLI F, *et al.* CD44⁺/EPCAM⁺ cells detect a subpopulation of ALDH high cells in human non-small cell lung cancer: a chance for targeting cancer stem cells? [J]. *Oncotarget*, 2020, 11(17): 1545-1555. DOI: 10.18632/oncotarget.27568.
- [35] LEE J S, KIM W G. Cutaneous metastases of breast cancer during adjuvant chemotherapy correlates with increasing CD44⁺/CD24⁻ and ALDH-1 expression: a case report and literature review [J]. *Stem Cell Investig*, 2018, 5: 7[2021-07-30]. <https://doi.org/10.21037/sci.2018.03.04>. DOI:10.21037/sci.2018.03.04.
- [36] YOE J, KIM D, KIM S, *et al.* *Capicua* restricts cancer stem cell-like properties in breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2020, 39(17): 3489-3506. DOI:10.1038/s41388-020-1230-7.
- [37] KHAMMANIVONGA, GOPALAKRISHNANR, DICKERSON E B. SMURF1 silencing diminishes a CD44-high cancer stem cell-like population in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 260[2021-07-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25471937/>. DOI:10.1186/1476-4598-13-260.
- [38] HOU Q Y, CHEN S H, AN Q, *et al.* Extracellular Hsp90 α promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7747[2021-07-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8305043/>. DOI:10.3390/ijms22147747.
- [39] EYERMANN C E, HALEY J D, ALEXANDROVA E M. The HSP-RTK-Akt axis mediates acquired resistance to Ganetespib in HER2-positive breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 126 [2021-07-30]. <https://www.nature.com/articles/s41419-021-03414-3>. DOI:10.1038/s41419-021-03414-3.

[收稿日期] 2022-01-17

[修回日期] 2022-03-22

[本文编辑] 沈志超,王润蓓