

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.03.004

· 基础研究 ·

抗ENO1抗体联合二甲双胍通过靶向肿瘤干细胞逆转人非小细胞肺癌A549细胞对西妥昔单抗的抵抗

张蕙雯, 杨婷, 禹卓玥, 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:** 探究抗烯醇化酶1(enolase 1, ENO1)抗体、二甲双胍(metformin, MET)通过靶向肿瘤干细胞对西妥昔单抗(cetuximab, CTX)耐药型非小细胞肺癌A549细胞增殖、迁移、侵袭和干性的影响及其可能的作用机制。**方法:** 10 mmol/L MET联合40 µg/ml抗ENO1抗体处理CTX(35 µg/ml)耐药型非小细胞肺癌细胞A549, 4 d后通过增殖、克隆形成、迁移、侵袭、甲基纤维素成球实验等检测联合治疗对A549肺癌细胞的影响。同时通过流式细胞术检测CTX、MET和抗ENO1抗体分别以单药及三药联合处理对ALDH⁺和CD44⁺两种肺癌干细胞亚群的影响。**结果:** CTX、MET和抗ENO1抗体联合处理显著抑制A549细胞的增殖、迁移、侵袭能力及A549细胞的自我更新能力。流式细胞术分析发现MET可显著抑制ALDH⁺干细胞亚群, 而抗ENO1抗体可显著抑制CD44⁺干细胞亚群, 三药联合处理可同时显著抑制ALDH⁺和CD44⁺干细胞亚群。**结论:** MET和抗ENO1抗体分别靶向ALDH⁺和CD44⁺肿瘤干细胞亚群, 两者联合可有效逆转A549细胞对CTX的抗性, 从而更有效地抑制A549细胞的干性、增殖、迁移和复发。

[关键词] 西妥昔单抗; 二甲双胍; 抗烯醇化酶1抗体; 肺癌干细胞; A549细胞; 联合治疗

[中图分类号] R734.2; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)03-0239-08

Anti-ENO1 antibody combined with metformin reverses the resistance of human non-small cell lung cancer A549 cells to cetuximab by targeting cancer stem cells

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

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of anti-ENO1 (enolase 1) antibody and metformin (MET) treatment on the proliferation, migration, invasion and stemness of cetuximab (CTX) -resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) cells through targeting cancer stem cells and the possible mechanism. **Methods:** 10 mmol/L MET combined with 40 µg/ml anti-ENO1 antibody was used to treat CTX (35 µg/ml)-resistant NSCLC A549 cells for 4 d, and the effects of combined treatment on A549 cells were detected with proliferation experiment, colony formation assay, migration and invasion experiments and methylcellulose ball formation experiment. In the meanwhile, FCM was used to detect the effects of CTX, MET and anti-ENO1 antibody single-drug treatment as well as the three-drug combination treatment on ALDH⁺ and CD44⁺ lung cancer stem cell subsets. **Results:** CTX combined with MET and anti-ENO1 antibody treatment significantly inhibited the proliferation, migration, invasion and self-renewal capacity of A549 cells. FCM analysis found that MET could significantly inhibit ALDH⁺ stem cell subpopulations, while anti-ENO1 antibody could significantly inhibit CD44⁺ stem cell subpopulations, and the three-drug combination treatment could simultaneously suppress ALDH⁺ and CD44⁺ stem cell subpopulations. **Conclusion:** MET and anti-ENO1 antibody respectively target ALDH⁺ and CD44⁺ cancer stem cell subsets, and the combined treatment of MET and anti-ENO1 antibody can effectively reverse the resistance of A549 cells to CTX, and thereby more effectively inhibiting stemness, proliferation, metastasis of A549 cells and tumor recurrence.

[Key words] cetuximab (CTX); metformin (MET); anti-ENO1 antibody; lung cancer stem cell; A549 cell; combination therapy

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(3): 239-246. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.03.004]

[基金项目] 国家重点研发计划项目(No.2017YFC1308700); 国家自然科学基金面上项目(No.82073278); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(No.2016-I2M-3-013)。Project supported by the National Key R&D Program of China (No.2017YFC1308700), the National Natural Science Foundation of China (No.82073278), and the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (No.2016-I2M-3-013)

[作者简介] 张蕙雯(1996-), 女, 硕士, 主要从事肿瘤干细胞及肿瘤发生发展机制的研究, E-mail: zhanghuiwen526@163.com

[通信作者] 冉宇靓(RAN Yuliang, corresponding author), 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事肿瘤及肿瘤干细胞的研究, E-mail: ran_yuliang@126.com

肺癌(lung cancer)是目前发病率最高的癌症,每年有超过四分之一的癌症患者死于肺癌^[1]。超过85%的肺癌为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其5年生存率仅为17.8%^[2]。我国肺癌的EGFR突变达50%左右,显著高于欧美白种人,其中女性、不吸烟者的突变率更高,但只有25%~30%的患者适合手术切除^[3],因此研究其他治疗方法对EGFR突变型肺癌患者具有重要意义。西妥昔单抗(cetuximab, CTX)作为靶向EGFR突变的单克隆抗体,近15年来主要用于结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌和NSCLC的治疗^[4]。临床研究^[5]发现,联合化疗或放疗能显著延长EGFR高表达的晚期NSCLC患者的疾病进展时间和总体生存期,但只有10%~20%的患者对长期治疗有反应。已有研究^[6]发现,EGFR靶向药处理后肿瘤的转移、复发和化疗耐药可能与ALDH⁺肺癌干细胞比例上调密切相关。随着肿瘤干细胞假说的发展,肿瘤干细胞异质性抵抗放疗、化疗和靶向治疗的作用机制引起广泛关注,但肿瘤干细胞在CTX耐药过程中的作用仍较少报道。在肿瘤进展中,不同肿瘤干细胞亚群促进了不同的恶性表型。肿瘤干细胞亚群具有代谢可塑性,可通过相互转化适应代谢危机,因此协同抑制两种甚至更多的代谢途径才能更有效地抑制肿瘤复发和耐药。

二甲双胍(metformin, MET)是治疗II型糖尿病的一线治疗药物,其可通过抑制氧化磷酸化改善肿瘤微环境。已有研究^[7]证明,MET可单独或与靶向药联合通过靶向肿瘤干细胞发挥抗肿瘤作用。烯醇化酶1(enolase 1, ENO1)通过将2-磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸参与糖酵解过程,同时定位于细胞膜表面的ENO1作为纤溶酶原受体参与肿瘤细胞的侵袭和转移。以往发现抗ENO1抗体处理能够靶向CD44⁺胃癌干细胞,从而抑制胃癌细胞的迁移和侵袭。相关研究^[8]发现,MET联合2-脱氧葡萄糖等糖酵解抑制剂在抑制肺癌细胞生长时表现出较强的协同效应。因此推测MET和抗ENO1抗体联合治疗可作为一种联合治疗策略,其通过同时抑制氧化磷酸化和糖酵解途径靶向不同肿瘤干细胞亚群,从而应对EGFR靶向药处理后ALDH⁺干细胞比例上调导致的耐药现象。本研究探讨抗ENO1抗体联合MET治疗对CTX耐药型肺癌细胞A549增殖、迁移、侵袭、成球以及ALDH⁺和CD44⁺肿瘤干细胞亚群的影响,旨在为逆转CTX治疗的耐药探索新思路,并寻找EGFR突变型非小细胞肺癌的潜在精准治疗新策略。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌A549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,CTX(C225)购于德国Merck Serono公司,MET购于北京瑞京通达生物科技有限公司,抗ENO1抗体为本课题组前期实验筛选得到的特异性识别ENO1的杂交瘤单抗,CD44(rabbit)抗体购于Abcam公司,FITC-CD44抗体购于eBioscience公司,Aldefluor™检测试剂盒购于加拿大Stemcell Technologies公司,Transwell小室购于美国Millipore公司,Matrigel基质胶购于美国BD公司,甲基纤维素购于Sigma公司,0.1%结晶紫溶液购于北京索莱宝科技有限公司,CCK-8试剂购于日本同仁化学所,B27、EGF、bFGF均购于Invitrogen公司。

1.2 检测A549细胞对CTX和MET的耐药性能

取正常培养对数生长期A549细胞制成单细胞悬液,以200 μ l/孔接种于96孔板中(5×10^3 个/孔细胞),待细胞贴壁后分别加入含不同质量浓度CTX、MET的200 μ l(含0.1%血清)培养液中,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中培养96 h后,每孔加入100 μ l的10% CCK-8试剂,孵育2 h后在波长450 nm下测定光密度(D),分别绘制CTX和MET耐药曲线并计算其IC₅₀值。

1.3 CCK-8法检测药物处理对A549细胞增殖能力的影响

分别取CTX、MET、抗ENO1抗体单药处理组和三药联合处理组对数生长期的细胞制成单细胞悬液,以200 μ l/孔接种于96孔板中(3×10^3 个/孔),置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中分别培养0、24、48、72、96 h,加入100 μ l 10%的CCK-8试剂,孵育2 h后在波长450 nm下测定D值。

1.4 Transwell实验检测A549细胞的迁移和侵袭能力

分别取CTX、MET、抗ENO1抗体单药处理组和三药联合处理组处理96 h后的细胞制成单细胞悬液(2.5×10^5 个/ml),上室加入200 μ l无血清单细胞悬液,下室加入650 μ l 10%完全培养基,进行迁移实验。提前将基质胶置于4 $^{\circ}$ C溶化,将Transwell小室、枪头于-20 $^{\circ}$ C预冷。每个小室加入100 μ l 10%基质胶(基质胶:双无培养基=1:9),37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵育1~2 h,弃去多余基质胶并晾干,上室加入200 μ l无血清单细胞悬液,下室加入650 μ l 10%完全培养基,进行侵袭实验。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中培养48 h,固定染色后晾干,切下小室置于载玻片上用中性树脂封胶,然后在显微镜下观察计数细胞。

1.5 检测药物对A549细胞成球的影响

提前配制0.8%甲基纤维素培养基。将1~2 ml甲基纤维素培养基加入低黏附24孔板中,每孔分别加入10 μ l CTX、MET、抗ENO1抗体单药处理组和三药联合处理组的无血清单细胞悬液(5×10^4 个/ml)。置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养11 d后观察并统计成球情况,

倒置荧光管显微镜下拍照。

1.6 检测A549细胞的克隆形成能力

分别取CTX、MET、抗ENO1抗体单药处理组和三药联合处理组处理96 h后的细胞制成单细胞悬液(1×10^5 个/ml),倍比稀释至 1×10^3 个/ml。取200 μ l单细胞悬液接种于平皿中,轻轻晃动使细胞分散均匀,于孵箱培养2~3周,直到出现肉眼可见的克隆时停止。甲醛固定后用0.1%结晶紫染液染色,冲洗、晾干,统计克隆形成数。

1.7 流式细胞术检测药物处理对ALDH⁺和CD44⁺细胞比例的影响

CTX、MET、抗ENO1抗体单药处理组和三药处理组均设置“Test”和“CON”管。CON管中加入5 μ l Aldefluor™ deab(ALDH抑制剂),立即盖上盖子,防止挥发。Test管中加入1 ml单细胞悬液(1×10^6 个/ml),加入5 μ l活化的Aldefluor,混匀后立即转移0.5 ml到CON管,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵育45 min,250 $\times$ g离心5 min,加入0.5 ml Aldefluor缓冲液重悬。检测CD44⁺时加入100 μ l(1:400)CD44抗体4 $^{\circ}$ C孵育1 h,离心弃上清后洗2次,再加入500 μ l PBS重悬。利用流式细胞

仪进行ALDH⁺和CD44⁺细胞阳性率分析。

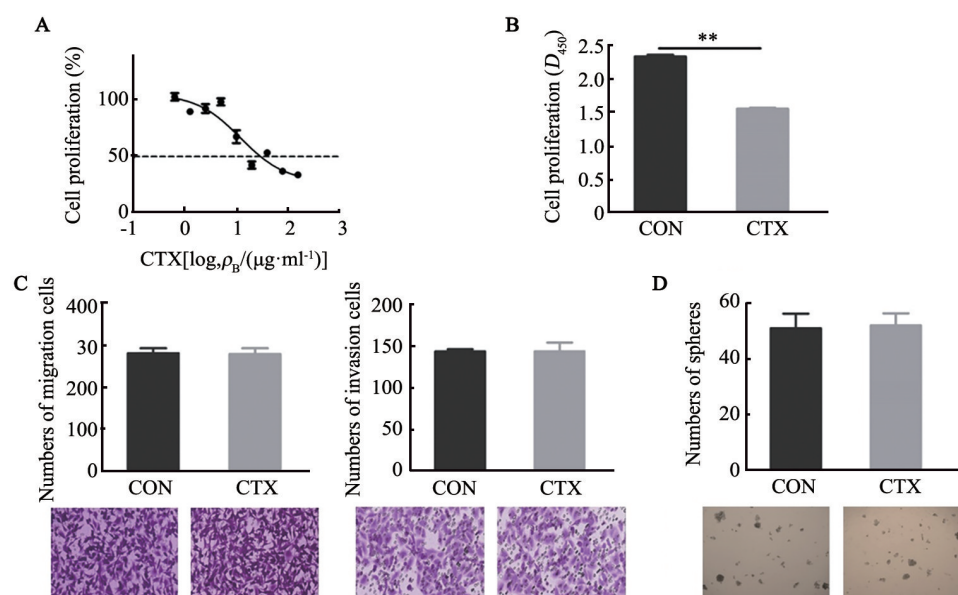
1.8 统计学处理

1.2~1.7实验均重复3次。所有数据采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 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 CTX抑制A549细胞增殖

A549细胞在递增质量浓度CTX处理下细胞增殖率逐渐下降, $IC_{50} = 38.47 \mu\text{g/ml}$ (图1A)。35 $\mu\text{g/ml}$ CTX处理A549细胞4 d后,细胞增殖能力(CON: $D_{450} = 2.34 \pm 0.03$; CTX: $D_{450} = 1.56 \pm 0.01$)受到显著抑制($P < 0.01$,图1B)。细胞的迁移和侵袭细胞数量无变化[migration: CON, (282 $\pm$ 11.7)个,CTX: (280 $\pm$ 13.6)个; invasion: CON, (144 $\pm$ 2.5)个; CTX, (144 $\pm$ 10.4)个。图1C];成球数量无显著变化[CON, (51 $\pm$ 5.3)个; CTX, (52 $\pm$ 4.4)个。图1D]。上述结果表明,CTX虽然能抑制A549细胞增殖,但对其自我更新、迁移和侵袭能力无显著抑制作用。



A: Results of CTX resistance of A549 cells; B: CTX inhibited the proliferation of A549 cells ($P < 0.01$); C: CTX did not affect the migration and invasion of A549 cells ($\times 200$); D: CTX did not affect the self-renewal capacity of A549 cells ($\times 5$)

图1 CTX对A549增殖、迁移、侵袭和自我更新能力的影响

Fig.1 Effects of CTX on the proliferation, migration, invasion and self-renewal capacity of A549 cells

2.2 CTX上调ALDH⁺肺癌干细胞比例

FCM检验CTX处理后ALDH⁺、CD44⁺肺癌干细胞比例的结果显示,ALDH⁺肺癌干细胞比例显著上调[CON: (5.78 $\pm$ 1.43)%; CTX: (11.85 $\pm$ 3.42)%, $P < 0.05$ 。图2A、C];CD44⁺肺癌干细胞无变化[CON: (97.00 $\pm$ 2.76)%; CTX: (95.33 $\pm$ 4.22)%。图2B]。结果

显示,35 $\mu\text{g/ml}$ CTX处理细胞4 d后ALDH⁺肺癌干细胞比例显著上调,肿瘤干性上升,这将可能进一步促进治疗后的转移和复发。

2.3 MET抑制A549细胞增殖能力并下调ALDH⁺肺癌干细胞比例

递增浓度MET作用下A549细胞增殖能力逐渐

下降, $IC_{50}=7.283$ mmol/L (图 3A)。10 mmol/L MET 处理 A549 细胞 4 d 后, 细胞增殖能力 (CON: $D_{450}=2.93\pm0.32$; MET: $D_{450}=0.57\pm0.13$) 受到显著抑制 ($P<0.01$, 图 3B)。同时, ALDH⁺ 肺癌干细胞的比例显著下调 [CON: $(9.17\pm1.86)\%$; MET: $(3.69\pm1.75)\%$,

$P<0.05$ 。图 3C]; 而 CD44⁺ 肺癌干细胞 [CON: $(94.20\pm9.86)\%$; MET: $(92.43\pm8.98)\%$ 。图 3D] 则无显著变化。结果表明, 10 mmol/L MET 处理抑制了 A549 细胞的增殖能力, 并显著下调了 ALDH⁺ 肺癌干细胞比例, 但对于 CD44⁺ 肺癌干细胞无明显的影响。

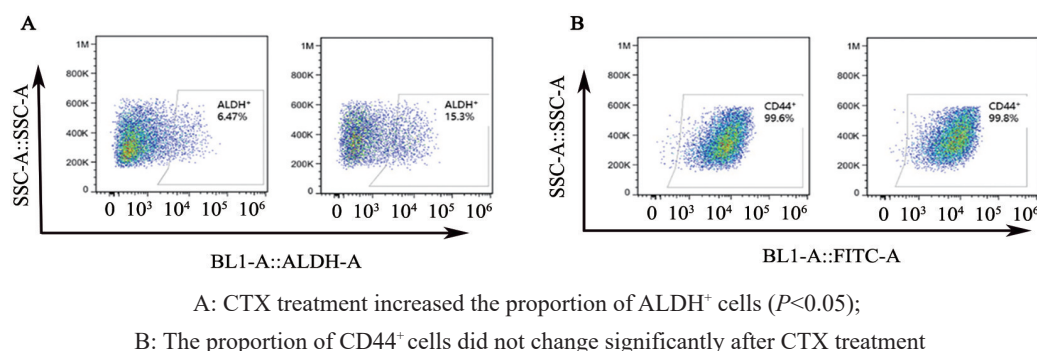


图 2 CTX 对 ALDH⁺、CD44⁺ 细胞比例变化的影响

Fig.2 Effects of CTX on ALDH⁺ and CD44⁺ cell proportion

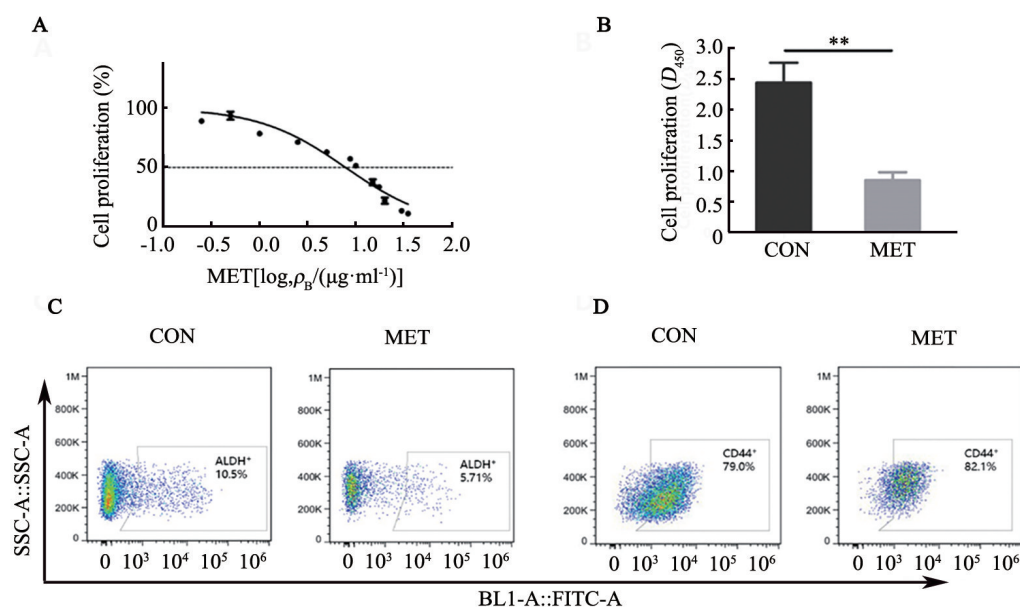


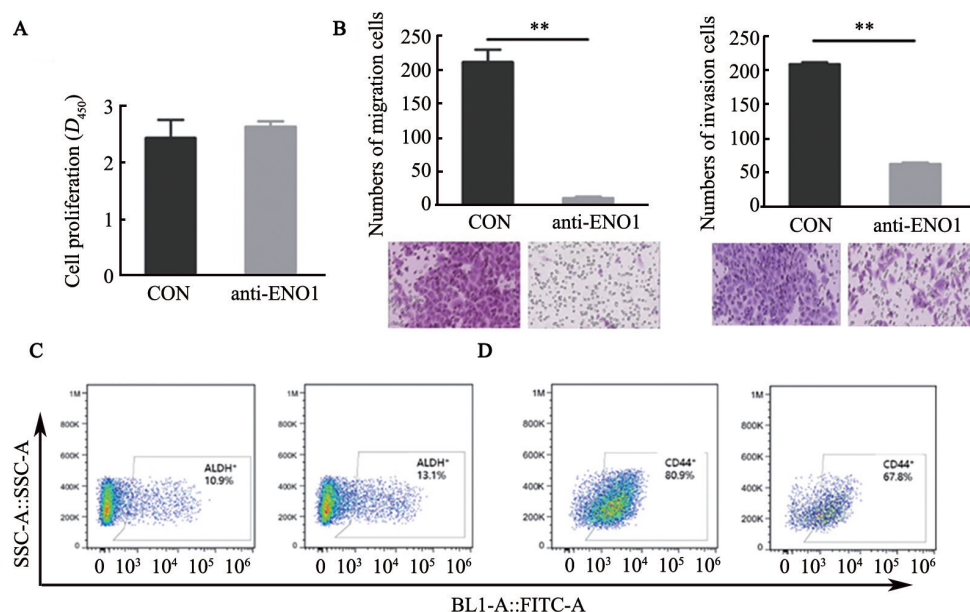
图 3 MET 对 A549 增殖能力及 ALDH⁺、CD44⁺ 细胞比例的影响

Fig.3 Effects of MET on the proliferation capacity of A549 cells and the proportion of ALDH⁺ and CD44⁺ cells

2.4 抗 ENO1 抗体抑制 A549 细胞迁移和侵袭并下调 CD44⁺ 肺癌干细胞比例

前期研究发现抗 ENO1 抗体可调控 CD44⁺ 胃癌干细胞从而抑制胃癌细胞的迁移和侵袭能力。本次实验显示, 处理后肺癌细胞增殖能力 (CON: $D_{450}=2.45\pm0.32$; anti-ENO1: $D_{450}=2.65\pm0.09$ 。图 4A) 无显著差异; 但迁移 [CON: (212 ± 18.2) 个; anti-ENO1: (12 ± 2.2) 个, $P<0.01$] 和侵袭 [CON: (209 ± 2.6) 个; anti-ENO1: (63 ± 2.1) 个, $P<0.01$ 。图 4B] 细胞数显著减

少。FCM 检测 40 μ g/ml 抗 ENO1 抗体处理 4 d 后 ALDH⁺、CD44⁺ 肺癌干细胞比例, 结果显示, 虽然 ALDH⁺ 肺癌干细胞比例 [CON: $(9.36\pm1.42)\%$; anti-ENO1: $(10.26\pm3.93)\%$ 。图 4C] 无显著变化, 但 CD44⁺ 肺癌干细胞比例却显著下调 [CON: $(78.75\pm3.04)\%$; anti-ENO1: $(68.65\pm1.20)\%$; $P<0.05$ 。图 4D]。结果表明, 抗 ENO1 抗体处理显著抑制了 CD44⁺ 肺癌干细胞比例, 并显著抑制肺癌细胞的迁移和侵袭能力。



A: Anti-ENO1 antibody did not affect the proliferation of A549 cells; B: Inhibition of migration and invasion of A549 cells by anti-ENO1 antibody treatment (migration, $P<0.01$; invasion, $P<0.01$, $\times 200$); C: The proportion of ALDH⁺ cells did not change significantly after anti-ENO1 antibody treatment; D: Anti-ENO1 antibody treatment downregulated the proportion of CD44⁺ cells ($P<0.05$)

图4 抗ENO1抗体对ALDH⁺、CD44⁺细胞比例变化的影响

Fig.4 Effects of anti-ENO1 antibody on ALDH⁺ and CD44⁺ cell proportion

2.5 CTX联合MET和抗ENO1抗体三药处理可抑制A549细胞增殖能力

三药联合处理4 d后细胞增殖实验结果(图5A)显示,细胞增殖能力受到显著抑制(time=96 h:CTX+MET+anti-ENO1, $P<0.01$),CTX、抗ENO1抗体单药处理细胞增殖能力反而有所增强(time=96 h:CTX, $P<0.01$; anti-ENO1, $P<0.01$),MET处理后细胞增殖能力没有显著变化(time=96 h, $P=2.631$)。克隆形成实验结果(图5B、C)显示,对照组、三药联合处理组、CTX处理组、MET处理组和抗ENO1处理组细胞的克隆形成数分别为(149 ± 6.1)、(2 ± 0.3)、(17 ± 2.8)、(8 ± 0)和(27 ± 3.5)个,三药联合处理组的克隆形成能力低于对照组($P<0.01$)、CTX处理组($P<0.05$)和抗ENO1抗体处理组($P<0.01$)。上述结果表明,CTX联合MET和抗ENO1处理能非常显著地抑制A549细胞的增殖能力。

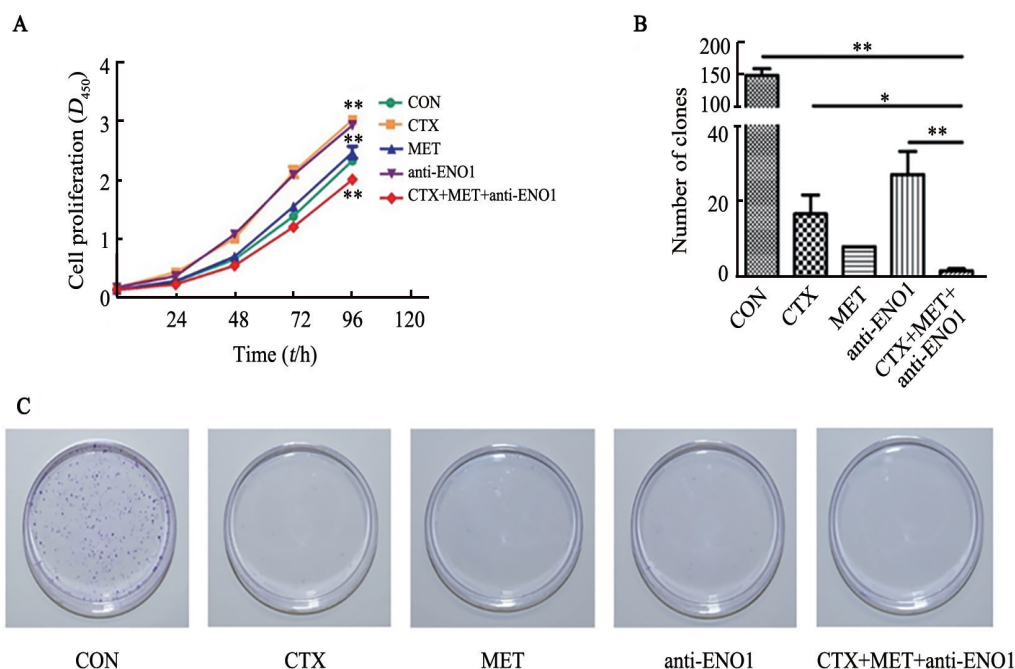
2.6 CTX联合MET和抗ENO1抗体三药处理抑制A549细胞迁移、侵袭和成球能力并下调ALDH⁺、CD44⁺肺癌干细胞比例

迁移和侵袭实验显示,三药联合处理组[migration: (7 ± 1.7)个, $P<0.01$; invasion: (8 ± 1.3)个, $P<0.01$]和抗ENO1抗体处理组[migration: (13 ± 1.5)个, $P<0.01$; invasion: (54 ± 5.4)个, $P<0.01$]迁移和侵袭细胞数显著减少,CTX处理组[migration: (242 ± 10.5)个; invasion: (135 ± 5.9)个]和MET组[migration: (221 ± 2.2)个; invasion: (121 ± 6.4)个]的迁移和侵袭细胞数无变化

(图6A、C)。成球实验结果显示(图6B、C),三药联合处理组[(2 ± 1.0)个, $P<0.01$]、MET组[(29 ± 4.4)个, $P<0.05$]细胞成球能力显著下降,而CTX处理组[(59 ± 3.5)个]和ENO1处理组[(55 ± 2.2)个]细胞成球能力没有显著差异。流式细胞术结果显示,CTX、MET和抗ENO1抗体三药联合处理组ALDH⁺细胞比例[CON: (4.10 ± 0.64)%; CTX+MET+anti-ENO1: (1.65 ± 0.24)%, $P<0.05$ 。图6D、E]、CD44⁺细胞比例[CON: (77.17 ± 6.18)%; CTX+MET+anti-ENO1: (59.20 ± 0.84)%, $P<0.05$ 。图6E、F]均显著下降。上述结果表明,三药联合处理可同时靶向ALDH⁺和CD44⁺肺癌干细胞亚群,从而抑制了人肺癌细胞A549的干性,降低了细胞对CTX的抗性,显著抑制了A549细胞的迁移、侵袭和成球能力。

3 讨论

本研究结果发现,CTX在抑制KRAS突变的A549细胞系的子代肿瘤细胞增殖的同时上调ALDH⁺肺癌干细胞的的比例,与之前报道^[9]的EGFR靶向药处理后ALDH⁺肺癌干细胞比例上调的结论一致。上调的ALDH⁺肺癌干细胞具有分化产生子代肿瘤细胞和肿瘤干细胞的特征,在CTX治疗抵抗过程中发挥重要作用。同时在结直肠癌中发现特异性靶向结直肠癌肿瘤干细胞使得耐CTX的KRAS突变结直肠癌细胞复敏^[10]。因此,提示靶向ALDH⁺肺癌干细胞亚群应能有效逆转A549细胞对CTX治疗的抵抗。



A: CTX combined with MET and anti-ENO1 antibody treatment inhibited the proliferation of A549 cells (time=96 h: CTX, $P<0.01$; anti-ENO1, $P<0.01$; CTX+MET+anti-ENO1, $P<0.01$); B: Number of A549 cell clones after treatment by CTX combined with MET and anti-ENO1 antibody (CTX: $P<0.05$; anti-ENO1: $P<0.01$; CTX+MET+anti-ENO1: $P<0.01$); C: CTX combined with MET and anti-ENO1 antibody treatment inhibited clone formation of A549 cells

图5 CTX联合MET和抗ENO1抗体处理对细胞增殖能力的影响

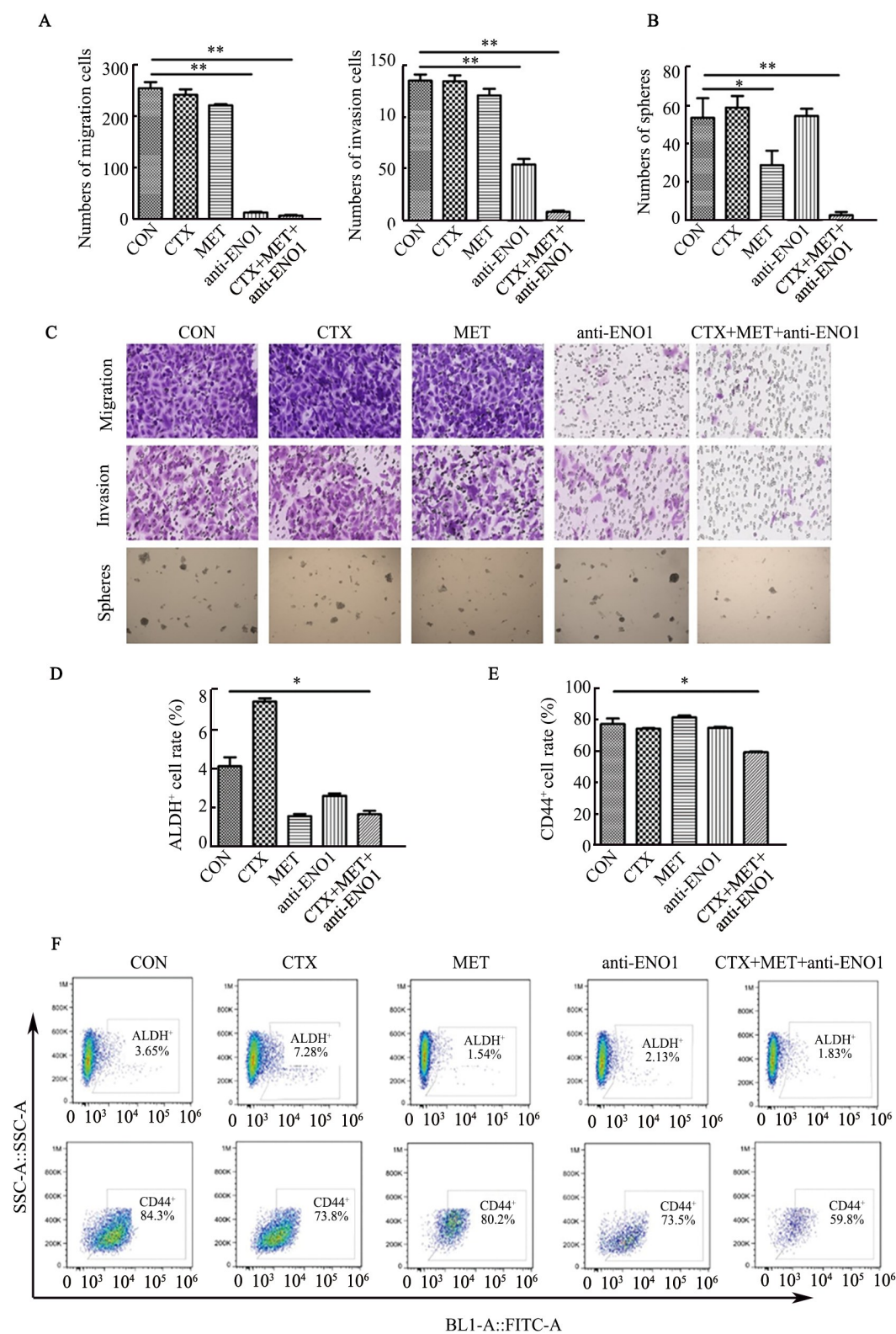
Fig.5 Effects of CTX combined with MET and anti-ENO1 antibody treatment on cell proliferation

MET通过直接作用于线粒体复合物I,抑制氧化磷酸化和ATP的产生,使肿瘤干细胞面临能量危机,增强肿瘤干细胞对传统治疗的敏感性^[11]。MET与化疗药物联合治疗下调ALDH⁺干细胞比例并诱导细胞凋亡^[12];与吉非替尼(gefitinib)联合顺铂治疗抑制ALDH⁺上皮型干细胞和CD44⁺/CD24⁺间质型干细胞,在体外有效抑制三阴性乳腺癌的复发^[13]。本研究用MET处理CTX处理后上调的ALDH⁺肺癌干细胞亚群,结果发现MET下调ALDH⁺肺癌干细胞并抑制肺癌细胞增殖,但对CD44⁺肺癌干细胞比例无显著影响。之前关于乳腺癌中存在分别更依赖于氧化磷酸化和糖酵解代谢途径的上皮细胞特征的ALDH⁺和间质细胞特征的CD24⁺CD44⁺两种干细胞亚群报道解释了上述现象,研究发现CD24⁺CD44⁺干细胞亚群肺转移能力显著强于CD24⁺/CD44⁺干细胞亚群^[14],单独使用一种抑制剂时会诱导两种亚群之间的相互转换^[15]。大量研究表明,肿瘤干细胞具有异质性和代谢可塑性,不同功能的肿瘤干细胞亚群之间相互转化使其能够躲避代谢危机,造成治疗后的转移和复发。只有同时靶向不同的肿瘤干细胞亚群才能阻断它们之间的相互转化,有效地清除肿瘤干细胞。

CD44是肿瘤坏死因子受体家族成员,可参与细胞生长和分化、运动、血管生成和细胞膜蛋白酶释放

等多种细胞过程^[2]。已在头颈癌^[16]、胃癌^[17]、神经胶质瘤^[18]、结直肠癌^[19]、肺癌^[20]等多种类型癌症中证明CD44⁺肿瘤干细胞具有更强的侵袭和转移能力。CD44诱导的干细胞特征被miR-302a抑制,使结直肠癌细胞对于CTX治疗复敏^[21]。

本实验室前期研究发现抗ENO1抗体可靶向CD44⁺胃癌干细胞。本次研究利用MET和抗ENO1抗体联合处理CTX耐药型肺癌细胞系,同时靶向ALDH⁺、CD44⁺肺癌干细胞亚群,结果发现MET联合抗ENO1抗体处理能够有效抑制CTX处理后的肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和成球能力,同时下调ALDH⁺和CD44⁺肺癌干细胞亚群比例。近期研究发现,MET联合乙酯利血平(syrosingopine)抑制单羧酸转运蛋白MCT1和MCT4,进而抑制胞内乳酸的外排,导致细胞内NAD⁺水平降低,从而使肿瘤细胞ATP生成受到抑制,产生协同致死效应^[22];提示MET和抗ENO1抗体可能通过同时抑制复合物I和烯醇化酶,降低NAD⁺的产生,造成ATP合成受阻,导致依赖于糖酵解途径的肿瘤干细胞的能量危机,而展示出协同的抗肿瘤效应,这也可能发展为一种通过同时抑制氧化磷酸化和糖酵解代谢途径而靶向不同的肿瘤干细胞亚群,从而有效清除肿瘤干细胞的新联合治疗策略。



A and C: Combined treatment of three drugs inhibited the migration and invasion ability of A549 cells (migration: anti-ENO1, $P < 0.01$; CTX+MET+anti-ENO1, $P < 0.01$. invasion: anti-ENO1, $P < 0.01$; CTX+MET+anti-ENO1, $P < 0.01$. $\times 200$); B and C: Combined treatment of three drugs inhibited the sphere formation of A549 cells (MET, $P < 0.05$; CTX+MET+anti-ENO1, $P < 0.01$); D and F: Combined treatment of three drugs downregulated the proportion of ALDH⁺ cells ($P < 0.05$); E and F: Combined treatment with three drugs downregulated the proportion of CD44⁺ cells ($P < 0.05$)

图6 CTX联合MET和抗ENO1抗体处理对A549细胞迁移、侵袭、自我更新能力及ALDH⁺、CD44⁺细胞比例变化的影响

Fig.6 Effects of CTX combined with MET and anti-ENO1 antibody on migration, invasion, self-renewal capacity and proportion of ALDH⁺ and CD44⁺ cells in A549 cells

综上所述,本研究发现CTX单独治疗不仅对于肿瘤细胞增殖的抑制效果不佳,而且更难以有效抑制肿瘤的转移;而MET和抗ENO1抗体联合CTX处理肺癌细胞,不仅能抑制子代肿瘤细胞,同时靶向ALDH⁺和CD44⁺肺癌干细胞亚群,从而更有效地抑制肿瘤的生长、转移和复发。结果提示,CTX和ENO抗体联合有效的抗肿瘤干细胞治疗可能作为一种应对非小细胞肺癌EGFR TKIs治疗耐药的潜在新策略,后续进一步研究三药同时处理时ALDH⁺和CD44⁺干细胞亚群之间的相互转化机制和抑制机制。

【参 考 文 献】

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A, et al. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30. DOI:10.3322/caac.21442.
- [2] MAIUTHEA, CHANTARAWONG W, CHANVORACHOTE P, et al. Lung cancer stem cells and cancer stem cell-targeting natural compounds[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(7): 3797-3809. DOI: 10.21873/anticancer.12663.
- [3] XU H, DONG L, BIN Z, et al. Supramolecular self-assembly of a hybrid 'hyalurosome' for targeted photothermal therapy in non-small cell lung cancer[J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 378-386. DOI: 10.1080/10717544.2020.1730521.
- [4] RAU A, LIEB W S, SEIFERT O, et al. Inhibition of tumor cell growth and cancer stem cell expansion by a bispecific antibody targeting EGFR and HER3[J]. 2020, 19(7): 1474-1485. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-19-1095.
- [5] HORN L, GETTINGER S, CAMIDGE D R, et al. Continued use of afatinib with the addition of cetuximab after progression on afatinib in patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib or erlotinib[J/OL]. *Lung Cancer*, 2017, (113): 51-58[2020-10-02]. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.08.014>. DOI:10.1016/j.lungcan.2017.08.014.
- [6] CHI Z, SONG D J, TIAN L, et al. Reconstruction of combined thumb amputation at the metacarpal base level and index amputation at the metacarpal level with pollicization and bilateral double toe composite transfer[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2017, 70(8): 1009-1016. DOI:10.1016/j.bjps.2017.05.032.
- [7] CAO N, LU Y, LIU J, et al. Metformin synergistically enhanced the antitumor activity of celecoxib in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1094-1100. DOI: 10.3389/fphar.2020.01094.
- [8] YAKISICH J S, AZAD N, KAUSHIK V, et al. The biguanides metformin and buformin in combination with 2-deoxy-glucose or wz-117 inhibit the viability of highly resistant human lung cancer cells[J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: (6254269). DOI:10.1155/2019/6254269.
- [9] LONDON M, GALLO E, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) involvement in epithelial-derived cancers and its current antibody-based immunotherapies[J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(6): 1267-1282. DOI:10.1002/cbin.11340.
- [10] LIN T J, LAI K C, LEE A S, et al. Novel antrodia cinnamomea extract reduced cancer stem-like phenotype changes and resensitized kras-mutant colorectal cancer via a microrna-27a pathway[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1657-1672. DOI:10.3390/cancers11111657.
- [11] MAYER M J, KLOTZ L H, VENKATESWARAN V, et al. Metformin and prostate cancer stem cells: A novel therapeutic target [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2015, 18(4): 303-309. DOI: 10.1038/pcan.2015.35.
- [12] HONJO S, AJANI J A, SCOTT A W, et al. Metformin sensitizes chemotherapy by targeting cancer stem cells and the mTOR pathway in esophageal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(2): 567-574. DOI:10.3892/ijo.2014.2450.
- [13] SULAIMAN A, MCGARRY S, CHAMBERS J, et al. Targeting hypoxia sensitizes TNBC to cisplatin and promotes inhibition of both bulk and cancer stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5788-5804. DOI: 10.3390/ijms21165788.
- [14] HU J, LI G, ZHANG P, et al. A CD44v(+) subpopulation of breast cancer stem-like cells with enhanced lung metastasis capacity[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2679[2020-10-02] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5386565/>. DOI:10.1038/cddis.2017.72.
- [15] LUO M, SHANG L, BROOKS M D, et al. Targeting breast cancer stem cell state equilibrium through modulation of redox signaling[J]. *Cell Metab*, 2018, 28(1): 69-86 e66. DOI:10.1016/j.cmet.2018.06.006.
- [16] HUANG C, YOON C, ZHOU X H, et al. Erk1/2-nanog signaling pathway enhances CD44(+) cancer stem-like cell phenotypes and epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinomas[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 266-280. DOI: 10.1038/s41419-020-2448-6.
- [17] SHU X, LIU H, PAN Y, et al. Distinct biological characterization of the CD44 and CD90 phenotypes of cancer stem cells in gastric cancer cell lines[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 459(1/2): 35-47. DOI: 10.1007/s11010-019-03548-1.
- [18] BROWN D V, FILIZ G, DANIEL P M, et al. Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172791[2020-10-02] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328356/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0172791.
- [19] HIRATA A, HATANO Y, NIWA M, et al. Heterogeneity of colon cancer stem cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1139: 115-126. DOI: 10.1007/978-3-030-14366-4_7.
- [20] HU B, MA Y, YANG Y, et al. CD44 promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5627-5633. DOI:10.3892/ol.2018.8051.
- [21] SUN L, FANG Y, WANG X, et al. MiR-302a inhibits metastasis and cetuximab resistance in colorectal cancer by targeting nfib and CD44[J]. *Theranostics*, 2019, 9(26): 8409-8425. DOI: 10.7150/thno.36605.
- [22] BENJAMIN D, ROBAY D, HINDUPUR S K, et al. Dual inhibition of the lactate transporters mct1 and mct4 is synthetic lethal with metformin due to nad⁺ depletion in cancer cells[J]. *Cell Rep*, 2018, 25(11): 3047-3058 e3044. DOI:10.1016/j.celrep.2018.11.043.

[收稿日期] 2020-11-01

[修回日期] 2021-01-25

[本文编辑] 沈志超