

• 国外医学报道 •

高通量筛选法鉴定肿瘤干细胞选择性抑制因子

研究表明肿瘤干细胞 (CSCs) 促使肿瘤的生长和复发。CSCs 对目前多种化疗和放射治疗耐受, 这表明虽然许多抗肿瘤治疗能够杀死大量肿瘤细胞, 但最终仍会失败, 原因在于这些治疗不能根除引起肿瘤再生的 CSCs。原则上, 使用自动筛选技术能够鉴定出杀伤 CSCs 的因子。但由于 CSCs 在肿瘤细胞群中仅占少数, 使用标准高通量细胞存活分析法无法检测出 CSCs 特异毒性的因子。所以, 筛选专杀 CSCs 的因子需要在体外能稳定繁殖、富集 CSCs 的细胞群。然而, 目前对于实体瘤中 CSCs 而言是不可能的。有研究表明, 诱导正常或成瘤乳腺上皮细胞群发生上皮间质化 (EMT) 会导致具有干细胞样特性的细胞富集。

在 2009 年第 4 期《Cell》杂志上, Gupta 等以“Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening”为题报道了他们的研究结果: 正常细胞和癌细胞群被诱导发生 EMT 后, 对化疗药物耐受能力增强。由此, 他们使用高通量筛选方法鉴定上皮 CSCs 特异毒性的因子。此研究主要分以下几部分进行。

1 诱导发生 EMT 的乳腺癌细胞群中 CSCs 数量增加

通过 shRNA 介导, 抑制编码 E 钙黏蛋白 (E-cadherin) 的人 CDH1 基因, 对 HMLER 乳腺癌细胞进行改良。shEcad 载体触发 EMT 后获得间质表型。HMLER 乳腺癌细胞在 EMT 诱导后, 带有 CD44^{high}/CD24^{low} 人乳腺 CSCs 表型的细胞比例增加。

HMLER^{shEcad} 细胞形成肿瘤微球的能力较 HMLER^{shCtrl} 细胞高 100 倍。同样, 在小鼠中 1000 个 HMLER^{shEcad} 细胞能够成瘤, 是 HMLER^{shCtrl} 细胞需要量的 1%。HMLER^{shEcad} 表现出增加 CSC 活力的同时, 其增殖较 HMLER^{shCtrl} 更慢。HMLER 乳腺癌细胞群经过 EMT 后, CSCs 比例明显高于对照组。

2 正常细胞和成瘤细胞被诱导发生 EMT 后其耐药性增强

此研究发现, HMLER^{shEcad} 细胞与 HMLER^{shCtrl} 相比, 对紫杉醇和多柔比星更耐药。

癌细胞基因改变一般不明确, 其中一些有助于在诱导 EMT 后增强耐药性。因而作者检测了未经转化的上皮细胞发生 EMT 后, 是否同样表现出耐

药性增强。HMLE 细胞是永生化乳腺上皮细胞,没有致瘤性。当 shRNA 抑制 E-cadherin 表达时, HMLE^{shEcad} 细胞发生 EMT, CD44^{high}/CD24^{low} 细胞比例较 HMLE^{shCtrl} 提高 80 倍。HMLE^{shEcad} 细胞对紫杉醇和多柔比星的耐药性比未发生 EMT 的细胞高出 10~20 倍。

3 用高通量筛选法鉴别 EMT 特异毒性的化合物

对 16 000 种化合物进行筛选,发现只有 32 种(占总库的 0.2%)表现对 HMLE^{shEcad} 细胞有选择性毒性。100 种常用化疗药物中,仅有 3 种对 HMLE^{shEcad} 细胞有选择性毒性。

基于可用性,选择 32 种化合物中的 8 种作进一步研究,再次检测显示 8 种化合物中有 4 种始终表现出对 HMLE^{shEcad} 细胞有选择性毒性。其中 3 种化合物(依托泊甙、盐霉素和阿巴克丁)具有中度到强度的选择性;第 4 种为尼日利亚菌素,其选择性相对较低。盐霉素对致瘤细胞 HMLER^{shEcad} 的选择性毒性较高,阿巴克丁、依托泊甙和尼日利亚菌素选择性毒性较低。

4 盐霉素选择性杀伤乳腺 CSCs

首先分析盐霉素对带有 CD44^{high}/CD24^{low} 抗原表型的乳腺癌细胞的作用效果。盐霉素作用组 CD44^{high}/CD24^{low} 比例是紫杉醇作用组的 1/360。

盐霉素、紫杉醇或 DMSO(对照组)作用后,检测 HMLER 乳腺癌细胞形成肿瘤微球的能力。相对于对照组,盐霉素作用后,肿瘤微球的数量下降了 10%。紫杉醇作用后,肿瘤微球形成的数量没有影响,肿瘤微球的体积反而明显增大。

为什么紫杉醇没有提高肿瘤微球的数量?推测原因可能是在该组中 HMLER 乳腺癌细胞系的 CSCs 比率已经很高。为解释这一问题,作者把诱导发生 EMT 和未发生 EMT 的细胞相混合,这样,在一个细胞群(称为 HMLER_{Mx} 细胞)中,对影响 CSC 数量的正、负作用都可以进行检测。

盐霉素作用 HMLER_{Mx} 细胞后 CD44^{high}/CD24^{low} 的比率为紫杉醇作用组的 1/16;同样,盐霉素作用于永生化非致瘤 HMLE_{Mx} 细胞后,CD44^{high}/CD24^{low} HMLE_{Mx} 细胞比率降低了 4%,而紫杉醇作用后提高了 4 倍。

盐霉素作用 HMLER_{Mx} 细胞后,肿瘤微球数量较对照组下降了 13%。相反,紫杉醇作用 HMLER_{Mx} 细胞后,肿瘤微球数量增加了 2 倍。紫杉醇同样也明显增加 HMLER_{Mx} 肿瘤微球的体积。

对于非成瘤 HMLE_{Mx} 细胞群,盐霉素作用后,乳腺微球的形成降低了 10%。相反,紫杉醇对 HMLE_{Mx} 乳腺微球的数量没有影响。

5 盐霉素和紫杉醇对肿瘤播种、生长及转移的作用

体外经化合物作用后,用评估体内成瘤能力的方法评估 CSCs 功能。作者观察到,与紫杉醇预处理相比,盐霉素预处理后 HMLER 和 4T1 细胞系的肿瘤播种能力下降更多。

对常位注射 SUM159 人乳腺癌细胞的老鼠,每日给予紫杉醇(5 mg/kg)、盐霉素(5 mg/kg)以及赋形剂(vehicle)。紫杉醇和盐霉素组延迟形成肿瘤。盐霉素组肿瘤小于赋形剂组。癌细胞注射后 4 周,用体外肿瘤微球形成分析法分析 CSCs 存活情况。分析显示,相对于盐霉素组和赋形剂组,紫杉醇组肿瘤微球形成增加 2 倍。

有研究证实,CSCs 与第二器官转移扩散有关。体外经盐霉素预处理的 4T1 细胞,体内 3 周转移成瘤的能力与经赋形剂处理的细胞相比降低了 4%。相反,经紫杉醇预处理的 4T1 细胞,相对于赋形剂组,转移成瘤的能力提高了 2 倍。

对荷 4T1 转移瘤动物的肺组织进行染色,用上皮细胞分化(E-cadherin)和 EMT(vimentin)进行标记。结果表明,紫杉醇和盐霉素对乳腺癌细胞分化有反作用。紫杉醇诱导增加间质化,而盐霉素诱导上皮分化。

6 盐霉素作用后与 CSCs 相关的基因表达降低

采用比较全基因表达分析法,分析经盐霉素和紫杉醇作用的 3 个 HMLER 乳腺癌细胞群。运用基因组富集分析法(gene set enrichment analysis, GSEA)检测分析。

第一个被测试的基因组(gene set),称侵袭性基因标记。该标记与四种不同类型肿瘤的无转移生存和总生存率负相关。GSEA 显示,与紫杉醇相比,盐霉素作用后基因表达显著下降。第二个基因组,称 CD44 比 CD24 基因组。此基因组中有 41 个基因在 CD44^{high} 细胞中高表达,同样对临床乳腺癌患者有预后价值。GSEA 显示,与紫杉醇相比,盐霉素作用后此基因组中的基因表达显著下降。第三个为乳腺微球基因组(31 个基因)。GSEA 显示,盐霉素作用组中乳腺微球特异基因表达低于紫杉醇作组。盐霉素作用后,这三种基因组水平降低表明乳腺上皮细胞和成瘤 CD44^{high} CD24^{low} 细胞、乳腺微球以及 EMT 过程中基因表达有重叠。

在非致瘤细胞中筛选用于鉴定的化合物,同样对 CSCs 有作用,这说明了 EMT 和 CSCs 之间的联系。而且,这一结果提出了抗肿瘤治疗的新途径。未来的治疗既要考虑基因的变化,也要考虑到肿瘤细胞的分化状态。

盐霉素作为钾离子载体抗生素,对乳腺 CSCs 产生特异毒性的机制尚不清楚,仍需要进一步研究来明确钾跨膜电位和 CSCs 生物学间的联系。

CSCs不但能够提高肿瘤播种潜能(tumour seeding potential),还对多种化疗药物和放射治疗耐受。紫杉醇治疗实际上对CSCs的存活和扩增有作用。因此,癌症治疗如果要长期有效,必须包括针对CSCs的治疗,防止新生癌细胞群再生。

肿瘤内CSCs发生率可能很低,但却重要;消除肿瘤内CSCs也不会导致肿瘤完全消退。这是因为不含CSCs的肿瘤虽然侵袭能力较低,但仍然能够长时间维持已形成的肿瘤。解决问题的策略是:寻找一种既针对CSCs,又针对非CSCs的因子。较好的选择是研发联合治疗方案,使用的药物对CSCs及不含CSCs的细胞群均有毒性。

此研究表明,重复检验后大约30%初筛样本显示EMT特异性毒性。因此,认为扩大筛选的广度和范围可能发现其他的治疗因子。

(唐振宁 摘编 赵彬 审校)

(收稿日期:2009-06-23)

(本文编辑:明佳)

唐振宁 摘译.高通量筛选法鉴定肿瘤干细胞选择性抑制因子[J/CD].中华乳腺病杂志:电子版,2009,3(5):570-753.