

## • 综述 •

# 乳腺干细胞和乳腺癌干细胞研究现状

李伟东 崔力方 谷峰 付丽

干细胞是机体内具有自我更新和多向分化潜能的细胞群体,并能通过分化产生特定组织的成熟细胞,理论上一个干细胞可以发育成为完整的生物个体或组织器官<sup>[1]</sup>。关于干细胞的概念,目前最广泛接受的是,干细胞是可以进行对称和非对称分裂的未分化的细胞群:分裂发生时,一个干细胞产生两个子细胞,一个与母细胞完全一致,具有母细胞同样的特征;另一个细胞可以分化形成不同的成熟细胞株。乳腺干细胞的主要功能包括:能产生乳腺组织生长发育过程中的所有细胞,在妊娠、授乳、退化周期中维持乳腺的生长与重建,在组织损伤时有修复功能<sup>[2]</sup>。随着对肿瘤研究的深入,人们发现肿瘤细胞同正常组织源于组织干细胞一样,肿瘤组织也可能起源于相应的干细胞——肿瘤干细胞(tumour stem cell)。鉴于目前缺乏公认的肿瘤干细胞模型和肿瘤干细胞标记物,人们所获得的这些肿瘤干细胞实际上还只能说是具有干细胞特性或干细胞样的肿瘤细胞,有的学者将之描述为肿瘤起始细胞(tumor initiating cells)或肿瘤前体细胞(cancer precursor cells)<sup>[3]</sup>。乳腺癌是妇女中高发的恶性肿瘤,现综述目前乳腺干细胞及乳腺癌干细胞的研究进展。

## 1 乳腺干细胞的存在及分离鉴定

虽然“干细胞”的概念在数十年前就已有认识,但是直到目前,仍然无法从形态或表型界定,而只能根据其功能定义。众所周知,正常的上皮细胞贴壁生长,它们在悬浮培养的情况下会出现凋亡现象,即失巢凋亡(anoikis)。神经细胞经悬浮培养形成包含干细胞的球状克隆,在此基础上,Dontu 等<sup>[4]</sup>推测在人乳腺中存在具有干细胞特征的一小群细胞,该细胞可以在悬浮的情况下生长。新鲜的人乳腺上皮细胞经悬浮培养后,大多数细胞出现凋亡现象,而少数细胞生长并增殖形成了不贴壁(悬浮)的球状克隆,将其命名为乳腺小球(mammospheres)。这些细胞具有强大的增殖能力,能分化为成熟乳腺的所有细胞并可以自我更新,这些现象提示在球状克隆中存在乳腺干细胞。另外,在女性的妊娠和月经周期过程中乳腺组织增殖程度的变化以及细胞通过更新

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470667); 教育部长江学者奖励计划“中国女性乳腺癌发生、转移机制及防治的研究”创新团队  
作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院乳腺病理科 教育部乳腺癌研究重点实验室  
通信作者:付丽, E-mail:fuliyb@hotmail.com

保持组织完整性的现象均提示可能存在乳腺干细胞。

长期以来,人们一直在寻找确定乳腺干细胞的可靠方法。目前已经有一些分子作为干细胞的标记物,但其特异性还有待于研究。有学者利用溴脱氧尿苷(bromodeoxyuridine BrdU)和氚-胸腺嘧啶脱氧核苷( $^3\text{H}$ TdR)标记小鼠乳腺细胞,发现存在标记时间很长的乳腺上皮细胞(标记滞留细胞, label retentive cells),这些细胞具备干细胞的特征:细胞以非对称的方式增殖,细胞周期长<sup>[2,5-6]</sup>。在干细胞表型标记和功能特性研究中,Goodell 等<sup>[7-8]</sup>发现小鼠骨髓中部分细胞可以将荧光染料 Hoechst 33342 或 Rhodamin123 泵出细胞外而淡染。这些具有造血干/祖细胞特性的细胞被称为侧群细胞(side population cells, SP),被认为是普遍的干细胞表型,在人和小鼠乳腺内也分离出具有同样特征的侧群细胞。干细胞抗原-1(stem cell antigen, Sca-1)是造血干细胞的标记物,目前也用于分离小鼠乳腺干细胞。此外,在电镜下研究小鼠乳腺的超微结构时,Chepko 等<sup>[9]</sup>认为位于乳腺基底部未分化的小亮细胞(small light cell, SLC)为乳腺干细胞。最近的研究发现,具有干细胞特征的人乳腺上皮细胞醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase ALDH)活性增加,且 ALDH1 的表达与乳腺癌的不良预后相关<sup>[10]</sup>。

Stingl 等<sup>[11]</sup>从小鼠乳腺中筛选出表达  $\text{CD45}^- \text{TER119}^- \text{CD31}^- \text{CD49f}^{\text{high}} \text{CD24}^{\text{med}}$  的细胞,这些细胞既具有自我更新能力,又可以在小鼠清除乳腺上皮细胞的脂肪垫中生长并形成完整的乳腺结构,提示这些细胞为乳腺干细胞。而这些细胞为 Sca-1 阴性并只有一小部分具有染料外排功能。Shackleton 等<sup>[12]</sup>利用流式细胞仪从小鼠乳腺内分选出的表型为  $\text{Lin}^- \text{CD29}^{\text{high}} \text{CD24}^+$  的细胞群体具有干细胞的诸多特征。CD29( $\beta 1$ -整合素)是皮肤干细胞标记物。CD24 是一种热稳定抗原,用来分离神经组织干细胞,在乳腺癌中也有表达。作者的实验结果证实,表达  $\text{Lin}^- \text{CD29}^{\text{high}} \text{CD24}^+$  的细胞群体富含标记滞留细胞,并联合表达 CD49f( $\alpha 6$ -整合素)。但是这些细胞不含高表达 Sca-1 的细胞和具有染料 Hoechst 33342 外排功能的细胞。

以上两个实验室的发现与以往研究者<sup>[5-8]</sup>发现的乳腺干细胞特点如染料外排功能和 Sca-1 阳性相矛盾,他们认为 SP 细胞和 Sca-1 阳性细胞群体只占干细胞群体的一小部分。因为  $\text{Lin}^- \text{CD29}^{\text{high}} \text{CD24}^+$  细胞和  $\text{CD45}^- \text{TER119}^- \text{CD31}^- \text{CD49f}^{\text{high}} \text{CD24}^{\text{med}}$  细胞与标记滞留细胞相吻合,滞留细胞标记分子和 CD29, CD24, CD49f 很可能是最为可靠的四种乳腺干细胞标记物<sup>[13]</sup>。

## 2 乳腺干细胞与乳腺癌的发生

大量证据表明肿瘤发生过程中干细胞或祖细胞是恶性转化的靶点。参与调节自我更新的信号转导通路如 Notch、Wnt、Hedgehog 通路<sup>[14-18]</sup>的异常会

导致正常乳腺干细胞的恶性转化,从而导致乳腺癌的发生。其它的因素还包括 Oct-4、Bmi-1、转化生长因子(TGF) $\beta$ 、磷酸酶和强力蛋白同系物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)、白血病抑制因子(LIF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、催乳素或生长素、雌激素受体(ER)或孕激素受体(PR)<sup>[19-20]</sup>。

Notch 作为一种跨膜受体蛋白表达在多种干细胞或祖细胞的表面,通过与表面或分泌型配体结合调节细胞的生长分化。Notch 途径的激活会导致细胞命运的改变,例如细胞分化受阻,未分化细胞增殖或走上异常分化的道路<sup>[14]</sup>。Notch 与乳腺癌的发生密切相关,转导了 Notch4 胞内段基因的小鼠,其乳腺结构不能发育正常,也不能在孕期产生分泌小叶,而最终进展为乳腺肿瘤<sup>[15]</sup>。干细胞中 Wnt 信号转导通路异常与肿瘤相关最直接的证据来自上皮干细胞,在转基因的小鼠中 Wnt 信号转导途径的激活促进了上皮干细胞向上皮癌转化<sup>[1]</sup>。Li 等<sup>[16]</sup>发现在 Wnt1 转基因小鼠的乳腺癌中干细胞的表面标记 Keratin6 和 Sca-1 的表达明显上调,而在其它转基因(Neu, Ras 和 PyMT)小鼠中均无上调。这说明乳腺干细胞可能是 Wnt 基因转化的靶细胞。Liu 等<sup>[17]</sup>通过体外培养和小鼠移植实验发现 Hedgehog 和 Bmi-1 在乳腺干细胞和乳腺癌干细胞的自我更新中起重要作用, Hedgehog 信号通路在 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>Lin<sup>-</sup>的细胞中被激活。Hedgehog 信号途径中的许多分子已经被作为癌基因或抑癌基因所认识,PTC1 或 Smo 的激活突变可导致人基底细胞癌、横纹肌肉瘤、胰腺癌、肺癌等发生。有研究<sup>[18]</sup>发现 Hedgehog 信号通路在大多数乳腺癌中被激活,过度表达 PTC1 和 GLI1(Hedgehog 信号通路激活标记物)。

干细胞也可以解释“区域性癌变”(field cancerization),此观点认为癌前区域细胞可能来源于一个祖细胞的一次突变,如肿瘤抑制基因的丢失。这种突变虽然在表型上是沉默的,但可以促进此区域内的所有细胞发生癌变,仅仅一个干细胞的一次突变就可以产生肿瘤易感区域,进而促进邻近区域发生独立的肿瘤。癌前区域的细胞比区域外的细胞更易癌变,但同时需要额外的突变打击。在研究乳腺导管上皮和肌上皮细胞基因突变时,有证据表明一个普通干细胞的一次突变就可以产生子代细胞的突变区域<sup>[21]</sup>。

### 3 乳腺癌干细胞的发现及鉴定

肿瘤研究要解决的一个基本问题就是证实何种细胞维持肿瘤的恶性生长,这种细胞的表面标志物是什么。乳腺癌干细胞表面标记物的研究还处于初级阶段,普通干细胞和肿瘤干细胞的分子区别还不清楚,目前仅仅是在鼠乳腺干细胞研究上获得较多数据,对于人的方面,所知甚少。另外,乳腺癌存在



多种病理组织学分型和分子分型,提示可能存在不同的乳腺癌干细胞或祖细胞。

实体瘤干细胞分离成功的报道,最早见于乳腺癌的研究。Al-Hajj 等<sup>[22]</sup>从人乳腺癌组织中分离出表面标志为  $CD44^{+}CD24^{-/low}ESA^{+}Lin^{-}$  的细胞,将 100 个这样的细胞移植入免疫缺陷小鼠的乳腺中就可以形成肿瘤,而且具有所有原发肿瘤的病理组织学特征,而其它表型的细胞数以万计的数量都不能成功致瘤,提示乳腺癌中存在促进肿瘤发展的肿瘤干细胞。表型为  $CD44^{+}CD24^{-/low}ESA^{+}Lin^{-}$  的细胞能够连续传代,生成的新肿瘤不仅含有新生的  $CD44^{+}CD24^{-/low}ESA^{+}Lin^{-}$  细胞也包含其他混合表型的非致瘤细胞。Al-Hajj 等<sup>[23]</sup>还发现,干细胞的比例与肿瘤生长速度有关,干细胞比例最小的肿瘤细胞移植入小鼠体内后生长也最为缓慢,由此推断干细胞的比例越高,预后越差。Kondo 等<sup>[24]</sup>尝试从多种肿瘤细胞株中分选 SP 细胞,包括 C6、B104、Hela 和人乳腺癌细胞株 MCF-7,其中 SP 细胞在 MCF-7 中比例约为 2%。

Ponti 和 Grimshaw 等<sup>[3, 25]</sup>先后从人乳腺肿瘤及乳腺癌患者胸膜渗出液中分离和培养乳腺癌干/祖细胞(progenitor cell),并通过细胞表面标记物鉴定了细胞的分化状态。分离得到的球状克隆中细胞是未分化的,因为这些细胞未表达乳腺上皮特异性标记 CK14、CK18、上皮细胞黏附分子(epithelial cellular adhesion molecule, ESA)和 CD10(common acute lymphoblastic leukemia antigen)。在改变细胞的培养方法后细胞贴壁生长并分化,它们形态类似上皮细胞并表达成熟肌上皮标记 CK14、 $\alpha$ SMA 和腺上皮或导管上皮标记 CK18、MUC-1。 $CD44^{+}CD24^{-}$  细胞在小鼠体内的致瘤能力是 MCF-7 细胞的 1000 倍。通过对小鼠体内生成肿瘤的 HE 染色分析发现,乳腺癌干或祖细胞与 MCF-7 细胞相比具有强大的血管生成能力,此结论也通过蛋白水平和 mRNA 水平检测细胞中的血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)和 VEGF-C 的表达情况得以验证。最新的研究表明, $CD44^{+}CD24^{-}$  细胞在基底样型乳腺癌中表达较多<sup>[26]</sup>,并与乳腺癌易感基因-1(breast cancer susceptibility gene-1, BRCA-1)突变有关,这可能也是这些类型乳腺癌预后不好的原因之一。

#### 4 乳腺干细胞与乳腺癌干细胞

乳腺癌与乳腺干细胞的关系是目前研究的热点,最重要的问题之一是肿瘤干细胞是否起源于正常成熟的乳腺上皮干细胞,或正常乳腺中的转化或始祖细胞。当前主要有两种假说:(1)肿瘤干细胞来源于相应组织正常干细胞的突变和自我更新机制出现异常;(2)某些已经开始分化的原始细胞或成熟细胞再次激活干细胞的程序,即去分化的结果。目前,多数研究者认可前一种观

点。大量研究表明肿瘤干细胞包括乳腺癌干细胞可能源于自我更新机制出现异常的正常干细胞:干细胞可以长期生存且增殖能力巨大,更有机会在分裂过程中发生多次突变并累积传代最终导致肿瘤的发生,而正常体细胞存活时间短,在发生癌变以前通常已经凋亡<sup>[27]</sup>;肿瘤干细胞与干细胞有相似的生长调控机制,而正是其中的某些信号调节通路如 Wnt、Hedgehog、Notch 等传导异常最终导致了肿瘤的发生;肿瘤干细胞与干细胞都具有端粒酶活性及扩增的端粒重复序列,而人类终末分化的体细胞不具有端粒酶活性。

也有研究表明肿瘤干细胞与正常干细胞存在着区别:(1) 干细胞的自我更新有反馈机制调节,该机制对一定数量的成熟细胞有反应,并调控细胞分裂率;而在肿瘤细胞中这一机制并不存在,肿瘤干细胞是基因突变的结果其增殖是无序的和失控的;(2) 肿瘤干细胞没有分化为成熟细胞的能力,说明肿瘤干细胞分化程序异常,这与有着正常分化程序的干细胞不同;(3) 肿瘤干细胞除了具有干细胞增殖与分化特性外,还获得了对化疗药物的耐受性和对放疗的抵抗性<sup>[28]</sup>。乳腺肿瘤干细胞可能源于正常的干细胞也可能来自其下游的中间过度细胞即祖细胞(progenitor cells),肿瘤因来源不同的干细胞或祖细胞而产生了不同的组织学类型<sup>[29]</sup>。

## 5 结语

如果肿瘤的生长和转移是由肿瘤干细胞驱使的,就可以解释为何当前以消除实体瘤为目的疗法会失败。虽然药物能暂时缩小肿瘤,但并不能延长病人的生存期,原因之一是肿瘤在演进过程中对药物产生了耐药性,另一原因可能是这些药物不能有效的杀死肿瘤干细胞<sup>[30]</sup>。由肿瘤干细胞的遗传特性可知,它往往表现为相对静止的细胞,多处于 G0 期,而大多数细胞毒性药物治疗癌症的靶点都是处于 S、M 或 G1 期的细胞,虽然可以消灭大量的肿瘤细胞,但肿瘤干细胞却可以逃避药物的杀伤作用<sup>[16]</sup>;而且由于肿瘤干细胞高表达 Bcl-2 家族和转运蛋白及多药耐药蛋白,使得它们对凋亡更具抵抗性,以致整个肿瘤对传统的化疗药物会产生抵抗。因此,针对肿瘤干细胞的治疗方法将是抗肿瘤研究的新靶点,新的治疗策略是诱导肿瘤干细胞分化,同时需致力研究和寻找乳腺干细胞的特异标记,既要杀灭肿瘤干细胞又要保护正常的干细胞。

肿瘤干细胞在肿瘤组织中的含量较少,其特异性细胞表面识别标志也不确切,对大部分肿瘤组织中的肿瘤干细胞的鉴定、分离技术尚不成熟,这将是当前科研的主要工作之一。如果证实乳腺癌是由乳腺癌干细胞转化而来,把乳腺癌干细胞作为治疗靶点,在一定程度上可以预防乳腺癌的发生<sup>[31]</sup>。乳腺干细胞和乳腺癌干细胞的发现及分离鉴定标志着对乳腺癌的研究进入了一个

新的里程。乳腺癌干细胞是理解乳腺癌起源的关键,针对乳腺癌干细胞设计靶向治疗,杀死肿瘤干细胞,将使未来的乳腺癌化疗发生革命性变化,我们期待着乳腺癌干细胞研究早日取得更大突破并应用于临床。

【关键词】 乳腺干细胞;乳腺癌干细胞

【中图法分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

### 参考文献

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414: 105-111.
- [2] Woodward WA, Chen MS, Behbod F, et al. On mammary stem cells. *J Cell Sci*, 2005, 118: 3585-3594.
- [3] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and In vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 2005, 65: 5505-5511.
- [4] Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*, 2003, 36(Suppl1): 59-72.
- [5] Welm BE, Tepera SB, Venezia T, et al. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol*, 2002, 245: 42-56.
- [6] Smith GH. Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Development*, 2005, 132: 681-687.
- [7] Goodell MA. Multi-potential stem cells and 'side population' cells. *Cytotherapy*, 2002, 4: 507-508.
- [8] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 1996, 183: 1797-1806.
- [9] Chepko G, Smith GH, Chepko G, et al. Ultra-structure of the putative stem cell niche in rat mammary epithelium: three division-competent structural-distinct cell populations contribute to larine mammary epithelial renewal. *Tissue Cell*, 2003, 35: 83-93.
- [10] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 2007, 1: 555-567.
- [11] Stingl J, Eirew P, Ricketson I, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*, 2006, 439: 993-997.
- [12] Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 2006, 439: 84-88.
- [13] Wang RH. The new portrait of mammary gland stem cells. *Nature*, 2006, 2: 186-187.
- [14] Krause DS. Regulation of hematopoietic stem cell fate. *Oncogene*, 2002, 21: 3262-3269.
- [15] Soriano JV, Uyttendaele H, Kitajewski J, et al. Expression of an activated Notch4 (int-3) oncoprotein disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in mammary epithelial cells in vitro. *Int J Cancer*, 2000, 86: 652-659.
- [16] Li Y, Welm B, Podsypanina K, et al. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100: 15853-15858.
- [17] Liu S, Dontu G, Mantle ID, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res*, 2006, 66: 6063-6071.
- [18] Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, et al. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res*, 2004, 64: 6071-6074.
- [19] Cariati M, Purushotham AD. Stem cells and breast cancer. *Histopathology*, 2008, 52: 99-107.
- [20] Kalirai H, Clarke RB. Human breast epithelial stem cells and their regulation. *J Pathol*, 2006, 208: 7-16.
- [21] Smalley M, Ashworth A. Stem cell and breast cancer; a field in transit. *Nature*, 2003, 3: 832-844.
- [22] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito HA, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3983-3988.
- [23] Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 2004, 23: 7274-7282.
- [24] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line.

Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101:781-786.

- [25] Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, et al. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. Breast Cancer Res, 2008, 10:R52.
- [26] Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, et al. The CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> phenotype is enriched in basal-like breast tumors. Breast Cancer Res. 2008, 10:R53.
- [27] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmark of cancer. Cell, 2000, 100:57-70.
- [28] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radio resistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature, 2006, 444:756-760.
- [29] Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, et al. Breast cancer stem cells: an overview. Euro J Cancer, 2006, 42: 1219-1224.
- [30] Li X, Lewis MT, Huang J, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. J Natl Cancer Inst, 2008, 100:672-679.
- [31] Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. J Clin Oncol, 2008, 26:2813-2820.

(收稿日期:2008-10-28)

(本文编辑:陈莉)

李伟东,崔力方,谷峰,等. 乳腺干细胞和乳腺癌干细胞研究现状[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2010, 4(4):440-446.