

· 讲座 ·

乳腺癌干细胞

李华 综述 房林 审校

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,已位居女性恶性肿瘤发病率的首位^[1]。目前对乳腺癌发生、复发和转移尚无较好办法。10 多年前, Bonnet 等^[2]提出了肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)的假说,此后 Al-Hajj 等^[3]首次从实体乳腺癌组织中分离出 $CD44^+/CD24^{-/low}$ 乳腺肿瘤细胞亚群。这些细胞具有干细胞特性,其肿瘤形成能力增加了 10 ~ 50 倍,并将此群细胞命名为乳腺癌干细胞,从此乳腺癌治疗掀开了瞄准乳腺癌干细胞的新篇章。

1 乳腺癌干细胞与乳腺癌

乳腺癌干细胞较之乳腺干细胞有自身的特点。首先,乳腺癌干细胞增殖是无序的、失控的,其缺乏分化成熟的能力;其次,乳腺癌干细胞在体内生存时间长,具有积累复制错误的倾向,从而更有可能发生突变;乳腺癌干细胞存在多向分化的能力,增殖能力巨大。乳腺癌易感基因 1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA 1) 缺陷引起小鼠乳腺肿瘤细胞系中 $CD44^+CD24^-$ 细胞的数目增加。这些细胞可形成细胞球,仅需要 50 ~ 100 个 $CD44^+CD24^-$ 或 $CD133^+$ 细胞就可使非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(no obese diabetic/severe combined immunodeficiency, NOD/SCID) 小鼠发生肿瘤。干细胞相关基因,如 Oct4、Notch 1、Aldh 1、Fl 和 Sox1 基因等在 $CD44^+CD24^-$ 细胞中均高表达。从已建立的乳腺癌原代培养细胞系和 MCF-7 细胞系中鉴定分离 $CD44^+CD24^-$ 及 $Cx43^-$ 细胞,给 SCID 病小鼠乳腺脂肪组织内注射 1000 个体外培养的上述细胞就可产生新的肿瘤^[4],可见乳腺癌干细胞分化成乳腺癌细胞的能力极强。

2 乳腺癌干细胞的生物学标志、筛选与纯化分离

目前,从乳腺癌中提取的乳腺癌干细胞在小鼠中形成肿瘤所需的最低细胞数为 100 ~ 1000 个。Al-Hajj 等^[3]提取的 $CD44^+CD24^{-/low}$ 乳腺癌干细胞在 100 个细胞时仅使 6 只小鼠中的 1 只形成了肿瘤,表明这群细胞中并非所有都

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30940034)

作者单位:200092 上海,同济大学附属第十人民医院普外科

是乳腺癌干细胞,只有一部分是真正的乳腺癌干细胞。此外,乳腺癌干细胞具有多向分化能力,意味着乳腺癌干细胞既可分化成导管癌,也可分化成小叶癌等其他组织癌,但临床上导管癌发病率远远多于小叶癌等其他组织癌,可见乳腺癌干细胞存在不同亚群的可能,亚群之间的分化方向、侵袭性也有差异。因此,只有识别乳腺癌干细胞生物学标志、纯化乳腺癌干细胞、分离不同亚群,才能深入研究其细胞的特性,从分子水平找到其癌变的机制,研制出针对性的靶向药物,才能真正瞄准乳腺癌干细胞进行特异性治疗。

2.1 量点共轭抗体(quantum dot-conjugated anti-bodies, QDA)

Snyder 等^[5]发现在雌激受体阳性乳腺癌组织中乳腺癌干细胞以 CD44⁺为主,通过免疫组织化学技术发现在甲醛固定和石蜡包埋乳腺癌组织中,CD44 阳性细胞含有 CD44⁺、CD24⁻和 Ki67 抗原,可与其特异性 QDA 结合,以此可鉴别、分离 CD44⁺/CD24⁻乳腺癌干细胞。

2.2 蛋白 C 受体基因

蛋白 C 受体基因,即 PROCR(protein C receptor)基因,其编码一种细胞表面蛋白受体,表达有 CD44⁺细胞特异性。Shipitsin 等^[6]使用 PROCR 从原发侵袭性乳腺癌中分离出 CD44⁺/PROCR⁺细胞,发现 CD44⁺细胞和 PROCR⁺细胞在数目和生物学特性上十分相似,都表达许多干细胞特异性基因,与肿瘤细胞转移、血管生成等有关。

2.3 CD133⁺/CD49^{high}

CD133 近来被认为是肿瘤干细胞的表面标志,CD133⁺干细胞在肺、脑等肿瘤组织中被分离出来^[7]。Wright 等^[8]在 1-exon11/p53^{+/+}的鼠乳腺癌组织中分离得到 CD133⁺乳腺细胞,同样具有乳腺癌干细胞特性,并表达干细胞相关基因 Oct4、Notch 1、Aldh 1 等,但其数量与 CD44⁺/CD24⁻乳腺癌干细胞不相符合,表明乳腺癌干细胞可能存在不同亚型,表达不同表面标志;Stingl 等^[9]发现在成年乳腺癌干细胞中分离得到 CD49^{high}细胞,其不仅有干细胞特性,同时表达 keratin 8、18 和 19 转录体以及 keratin 6 蛋白,其可能是乳腺癌干细胞的一个亚群。

2.4 乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)

ALDH 是细胞内乙醛氧化脱氢酶。ALDH1 在干细胞分化早期氧化视黄醇形成视黄酸,鼠和人类的造血及神经干细胞中 ALDH1 高度表达。Hoechst 染色方法和 ALDH 活性已被用于纯化和鉴定鼠和人的造血干细胞。近来,肿瘤干细胞也可用 ALDH 活性来鉴定^[10]。另一研究显示,ALDH1 表达可能表

示乳腺上皮细胞具有干细胞特征, ALDH 活性增加的正常人和癌症患者的乳腺上皮细胞具有干/祖细胞特性, 含有高水平 ALDH 的正常乳腺上皮细胞群能形成乳腺球, 从中分离的细胞能自我更新。ALDH 高活性的乳腺癌细胞可以重现亲代肿瘤的杂合性, 说明 ALDH 高活性的乳腺癌细胞也包含干细胞群。Morimoto 等^[11]在乳腺癌组织中分离得到 ALDH(+) 乳腺癌干细胞, 这些细胞具有雌激素受体(estrogen receptor, ER) 阴性和人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor 2, HER2) 阳性的特点, 同时发现含有 ALDH(+) 乳腺癌干细胞的乳腺癌患者较 ALDH(-) 患者更易复发转移。

2.5 整合素 $\alpha 6$ (integrin- $\alpha 6$, ITGA6)

Stephanie 等^[12]报道: 在 MCF-7 人类乳腺癌细胞中含有 ITGA6 表达阳性的细胞亚群, 分离培养发现其具有极强的自我更新能力; 建立免疫缺陷小鼠模型时, 仅注入 1000 个该细胞即可使小鼠发生乳腺癌, 而敲出 ITGA6 基因后, 该组细胞生长速度明显减慢; ITGA6 可能是该乳腺癌干细胞亚群固定表达的蛋白, 且与其生长扩增有关, 可作为识别该亚群乳腺癌干细胞的标志。

2.6 CD(cluster of differentiation)29/CD61

CD29 和 CD61 是与细胞生长相关的表面蛋白。CD29 可区分 CD29^{low}/CD24⁺未分化成熟的乳腺上皮细胞和 CD29^{high}/CD24⁺乳腺干细胞^[13]。CD29^{low}/CD24⁺未分化成熟的乳腺上皮细胞可按 CD61 分为 CD61⁺干细胞和 CD61⁻成熟细胞两个亚群^[14]。在大鼠乳腺肿瘤病毒(murine mammary tumor virus, MMTV)与 Wnt-1 的转基因鼠乳腺癌模型中, CD61⁺乳腺癌干细胞的成瘤能力明显高于 CD61⁻细胞。

3 乳腺癌干细胞的信号传导机制

3.1 Wnt 信号传导通路

Wnt 信号是肿瘤发生的经典通路。研究发现其与多种干细胞维持自我更新有关^[15]。Korkaya 等^[16]报道, Wnt/ β -catenin 可激活乳腺癌原始细胞活化、增殖。在导入 Wnt1 基因的小鼠乳腺中 SP 细胞比例由 0.5% ~ 2.0% 上升 2 ~ 3 倍, 而导入 β -catenin 基因的小鼠乳腺 SP 细胞比例上升了 9 倍。Wnt1 转基因小鼠来源者和 β -catenin 转染的乳腺干细胞较对照组具更强的抗辐射能力, 且射线照射后激活的 β -catenin 在 Lin-CD29⁻CD24⁺表型细胞中选择性高表达。Wang 等^[17]发现 Wnt 信号在乳腺干细胞增殖和扩增中发挥作用, 可促进 Cyclin D1 和 Cyclin D2 依赖蛋白激酶的活化和 G₁/S 细胞周期的转变, 从而促

进始祖细胞无控制地扩增和增殖。

3.2 Notch 信号传导通路

Notch 是一种保守的膜蛋白,通过与临近细胞表面 Notch 配体作用,调节细胞的生长和分化。Wang 等^[18]报道 Notch 通过 Jagged-1 促使乳腺癌干细胞肿瘤化。导入 Notch 胞内段基因的小鼠不能发育成正常的乳腺分支结构,也不能在孕期产生分泌小叶结构,最终发展为低分化腺癌。Notch 激动肽可以使乳腺球生成明显增加,并使具有多向分化能力的细胞比例增加 10 倍以上,而这些作用可用 Notch4 抑制性抗体完全阻断。研究发现,Notch 信号通路与缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 相互作用维持缺氧状态,可阻止细胞分化^[19]。Zardawi 等^[20]在转基因小鼠模型中发现,大多数乳腺癌高表达 Notch1,并且 Notch1 的表达程度与肿瘤分化和预后成反比,Notch4 激活引起低分化乳腺癌产生。此外,Notch 3 和 Jagged-1 等相互作用被证明能促进人类于细胞自我更新^[19]。

3.3 Hedgehog 信号通路

在乳腺导管形态发生和乳腺上皮细胞静态平衡的过程中,H 信号参与了基质与乳腺上皮细胞之间的相互作用^[21],该途径成员包括 Shh (Sonic Hedgehog)、Patch1 受体转录因子 Gil1 等。Patch1、Gil1、Gil2 等 Hedgehog 通路成员在正常人乳腺干细胞或祖细胞中呈现高表达,当细胞被诱导出现分化时,Patch1、Gil1、Gil2 等出现表达下调。该信号通路的激活可增强乳腺干细胞自我更新和繁殖能力,阻断此信号激活可阻断乳腺干细胞的自我更新和繁殖能力的增强作用。Tanaka 等^[22]报道 hedgehog 信号激活打破乳腺癌干细胞稳定状态,促使干细胞分化、启动自我更新。Kasper 等^[23]发现 CD44⁺CD24⁻lowlin⁻乳腺癌干细胞中,Hh 信号通路激活,会引起 Patch1、Gil1 和 Gil2 mRNA 表达量异常升高,同时 Hedgehog 与乳腺癌干细胞的细胞间隔形成以及细胞与基质间的相互作用有关,为乳腺癌干细胞脱离基底膜和远处转移提供帮助。

4 乳腺癌干细胞相关抑癌基因

RB 基因 (retinoblastoma gene, RB gene) 是第一个被发现与乳腺癌复发侵袭相关的抑癌基因,敲出 RB 基因后,乳腺细胞呈现恶性增生和远处转移。除 RB 基因外,BRCA1 和乳腺癌易感基因 2 (breast cancer susceptibility gene 2, BRCA2) 与家族性乳腺癌、P53 基因突变与早期乳腺癌都有较大相关性^[24]。乳腺癌干细胞作为乳腺癌细胞的分化来源,其抑癌基因的突变、缺失与乳腺癌干细胞复制、增殖密切相关。研究乳腺癌干细胞相关抑癌基因,将有助于乳腺

癌筛查与乳腺癌早期复发的发现,同时也为研究乳腺癌干细胞放射治疗、化疗敏感性及耐药机制提供了方向。

4.1 RB 基因

RB 基因是第一个被发现与乳腺癌发生相关的基因。生物化学与分子生物学研究发现 RB 基因与细胞循环更新和染色体稳定性相关,20% ~ 35% 的乳腺癌组织有 RB 基因表达缺失^[25]。在乳腺癌干细胞系中,RB 基因的缺失使乳腺癌细胞无限度增生,其相关机制可能是 cyclin D1 基因的激活,使 D1/CDK4 复合物增加,从而使乳腺癌干细胞进入自我更新、无限增生复制的过程,同时 RB 基因缺失可增强乳腺癌抗药性,并使乳腺癌干细胞更易远处转移^[26]。

4.2 BRCA1 基因

乳腺癌患者中 5% ~ 10% 有家族性,其中约一半患者有 BRCA1 突变。BRCA1 的主要作用与 RB 相似,调控细胞循环,控制细胞自我更新复制。BRCA1 突变在遗传性乳腺癌家族中约占 45%,多见于移框(frameshift)突变或无义(nonsense)突变,突变引起蛋白产物变短^[27]。这些突变引起乳腺癌易感蛋白 BRCT(breast cancer susceptibility gene C terminus)重复序列或锌指功能域破坏,使 BRCA1 的肿瘤抑制活性下降^[27]。BRCA1 的表达和磷酸化在细胞周期中被调节,表达水平在 S 期最高,激酶分析提示 BRCA1 能被细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 2(cyclin-dependent kinase 2, CDK2)、周期素-A 和周期素-D 依赖激酶磷酸化^[28]。在对 DNA 损伤反应中,BRCA1 被过磷酸化。BRCA1 与 BRCA2、p53、DNA 修复蛋白 51(DNA repair protein 51, RAD51)等多种蛋白可发生作用,参与细胞生物周期的调控。同时,BRCA1 可使 MRE11-RAD50- Nibrin(meiotic recombination 11-DNA repair protein50- Nibrin)复合物上调以启动 DNA 修复过程,维护 DNA 双螺旋结构^[29]。

4.3 BRCA2 基因

BRCA2 基因除具有修复 DNA 完整结构的作用外,还可使乳腺癌干细胞产生易突变性,积累突变能力增强,同时其与乳腺癌细胞的耐药性密切相关。Edwards 等^[30]从乳腺癌细胞中分离出化疗抵抗株,基因分析表明其存在 BRCA2 异常突变,可增加乳腺癌细胞对顺铂为基础的化疗方案的抗药性。

4.4 P53 基因

P53 抑癌基因可以激活许多作用不同的靶基因,从而在细胞凋亡、调控细胞生物周期、DNA 修复、维持基因结构稳定、抑制肿瘤血管生成等方面发挥作用。Cicalese 等^[31]报道,在 HER-2 转基因乳腺癌模型中,敲除 P53 后乳腺癌干细胞呈恶性增殖状态,P53 可抑制乳腺癌干细胞自我更新复制、突变累积和远

处转移。

5 结语

目前,乳腺癌干细胞的研究尚处于初期,仍有许多问题待研究,如并非所有乳腺癌细胞都有 CD44⁺CD24⁻细胞, MCF-7、T47-D 乳腺癌细胞中 CD44⁺CD24⁻细胞表达为 0,而且在乳腺癌组织中并不是所有的样本体外培养都可形成微球体。由此,笔者推测不同亚型的乳腺癌干细胞群体,其基因表达、侵袭、转移、激素敏感性、预后等也有差异,需进一步研究明确。通过调节肿瘤干细胞应用于乳腺癌治疗,有望达到根治肿瘤的目的。认识和研究乳腺癌干细胞及其作用机制,寻找正常干细胞与乳腺癌干细胞的不同信号传导途径,以及能引起不同效应的同一信号传导途径,对于靶向杀伤肿瘤干细胞而不损伤正常干细胞具有重要的指导意义。

【关键词】 乳腺癌干细胞;生物标记;信号传导;抑癌基因

【中图法分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

参考文献

- [1] 孙艳,石远凯. 临床肿瘤内科手册[M]. 北京:人民卫生出版社. 1987:237.
- [2] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. Nat Med,1997,3(7):730-737.
- [3] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2003,100(7):3983-3988.
- [4] Watson CJ, Khaled WT. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment[J]. Development,2008,135(6):995-1003.
- [5] Snyder EL, Bailey D, Shipitsin M, et al. Identification of CD44⁺/CD24⁻ breast carcinoma cells in primary human tumors by quantum dot-conjugated antibodies[J]. Lab Invest,2009,89(8):857-866.
- [6] Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity[J]. Cancer Cell,2007,11(3):259-273.
- [7] Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer[J]. Eur J Cardio-thorac Surg,2009,36(3):446-453.
- [8] Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, et al. Brcal breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics[J]. Breast Cancer Res,2008,10(1):R10.
- [9] Stingl J, Eirew P, Ricketson I, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells[J]. Nature,2006,439(7079):993-997.
- [10] Jiang F, Qiu Q, Khanna A, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer[J]. Mol Cancer Res,2009,7(3):330-338.
- [11] Morimoto K, Kim SJ, Tanei T, et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression[J]. Cancer Sci,2009,100(6):1062-1068.
- [12] Pontier SM, Muller WJ. Integrins in mammary-stem-cell biology and breast-cancer progression - a role in cancer stem cells[J]. J Cell Sci,2009,122(Pt2):207-214.

- [13] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D, et al. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on[J]. BMC Cancer, 2009, 9(25): 202.
- [14] Vaillant F, Asselin-Labat ML, Shackleton M, et al. The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2008, 68(19): 7711-7717.
- [15] DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, et al. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(13): 5364.
- [16] Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/ β -catenin signaling[J]. PLoS Biol, 2009, 7(6): e1000121.
- [17] Wang XY, Yin Y, Yuan H, et al. Musashil modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin mediated activation of the Wnt and Notch pathways[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(11): 3859-3889.
- [18] Wang Z, Li Y, Banerjee S, et al. Emerging role of Notch in stem cells and cancer[J]. Cancer Letters, 2009, 279(1): 8-12.
- [19] Dando JS, Tavian M, Catelain C, et al. Notch/Delta 4 interaction in human embryonic liver CD34+ CD38- cells: positive influence on BFU-E production and LTC-IC potential maintenance[J]. Stem Cells, 2005, 23(4): 550-560.
- [20] Zardawi SJ, O'Toole SA, Sutherland RL, et al. Dysregulation of hedgehog, Wnt and Notch signalling pathways in breast cancer[J]. Histol Histopathol, 2009, 24(3): 385-398.
- [21] Harnes DC, DiRenzo J. Cellular quiescence in mammary stem cells and breast tumor stem cells: got testable hypotheses [J]. Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009, 14(1): 19-27.
- [22] Tanaka H, Nakamura M, Kameda C, et al. The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells[J]. Anticancer Res, 2009, 29(6): 2147-2157.
- [23] Kasper M, Jaks V, Fiaschi M, et al. Hedgehog signalling in breast cancer[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(6): 903-911.
- [24] Hwang-Verslues WW, Chang KJ, et al. Breast cancer stem cells and tumor suppressor genes[J]. Formos Med Assoc, 2008, 107(10): 10.
- [25] Vurusaner B, Poli G, Basaga H, et al. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions[J]. Free Radic Biol Med, 2011, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.035.
- [26] 刘艳丽, 张文, 安杰, 等. 多种耐药基因蛋白在乳腺癌和三阴乳腺癌中表达差别的研究[J]. 河北医药, 2010, 32(22): 3128-3130.
- [27] Tkocz D, Crawford NT, Buckley NE, et al. BRCA1 and GATA3 corepress FOXC1 to inhibit the pathogenesis of basal-like breast cancers[J]. Oncogene, 2011, doi: 10.1038/onc.2011.531.
- [28] Johnson N, Cai D, Kennedy RD, et al. Cdk1 participates in BRCA1-dependent S phase checkpoint control in response to DNA damage[J]. Mol Cell, 2009, 35(3): 327-339.
- [29] Ginestier C, Liu S, Wicha MS, et al. Getting to the root of BRCA1-deficient breast cancer [J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(3): 229-230.
- [30] Edwards SL, Brough R, Lord CJ, et al. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1111-1115.
- [31] Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, et al. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells[J]. Cell, 2009, 138(6): 1083-1095.

(收稿日期: 2009-10-26)

(本文编辑: 罗承丽)