

• 讲座 •

乳腺癌干细胞研究进展

侯国芳 张瑾

随着女性对自身健康意识的不断提高和社会普查的广泛化,乳腺癌检出率逐年递增,呈现出低龄化的趋势。经过严格治疗后仍出现的复发、转移等情况成为目前临床治疗难以逾越的鸿沟。研究人员认为癌症的复发、转移同干细胞有密切关系。Bonnet 等^[1]于 1997 年首次分离出具有永久分化能力的细胞,并命名为干细胞。2003 年,Al-Hajj 等^[2]以 $CD44^+CD24^{-/low}$ lin-细胞表面标记分离出乳腺癌干细胞。现今,乳腺癌干细胞已成为乳腺癌研究方面的热点和难点。

1 乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSCs)

1997 年, Bonnet 等^[1]在研究急性髓性白血病成因的过程中发现白血病的发生及进展是由于一些具有永久分化能力的细胞存在所造成的,并将其命名为干细胞(stem cells, SCs)。随后,在乳腺癌、直肠癌、胰腺癌、前列腺癌等肿瘤中也发现了相似的细胞,它们具有自我更新、多系分化以及成瘤的能力。目前认为其来源可能有两个:(1)正常干细胞发生癌性转化;(2)分化后的细胞去分化获得自我更新等干细胞特性。乳腺癌作为高度异质性疾病,是否来源于同种肿瘤干细胞,目前尚无定论。研究发现乳腺癌易患基因 1(breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1)缺失的鼠乳腺癌细胞系中存在 $CD44^+CD24^-$ 和 $CD133^+$ 标记的两个亚群,由此认为 basal 型乳腺癌中存在肿瘤干细胞的异质性^[3]。相反,一些研究者认为所有的乳腺癌亚型拥有相同的肿瘤干细胞,但是数量上不同,从而造成了其在疾病进展和复发方面的差异^[4]。

2 BCSCs 的分离和鉴别

2.1 细胞标记

2003 年, Al-Hajj^[2]等人采用 $CD44^+CD24^{-/low}$ lin-表面标记分子分离出的乳腺癌细胞具有极强的成瘤能力。目前研究人员已将 $ESA^+CD44^+CD24^{-/low}$ 作为筛选 BCSCs 的主要标记。随着干细胞研究的深入,一些研究人员对于 ESA^+

CD44⁺CD24^{-/low}对肿瘤干细胞的代表性提出了质疑。研究人员发现 CD44⁺CD24⁻细胞在 basal 型乳腺癌和发生上皮间质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)的细胞中较多^[5],而其在 luminal 型乳腺癌中仅有不到 1%,且不是所有的 CD44⁺CD24⁻细胞均有同等的成瘤能力^[6]。这提示 CD44⁺CD24⁻细胞可能与乳腺癌的类型相关,并不能代表肿瘤中所有的干细胞。另有研究发现 EC(恩环类药物+环磷酰胺)方案化疗后 CD44⁺CD24⁻细胞比例降低^[7]。该实验质疑使用 CD44⁺CD24⁻作为干细胞标记的可靠性。此外,体内外试验均发现 CD176 和 CD44 共表达的比例很高。ELISA 实验证实结直肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌中,CD44 是 CD176 的载体分子^[8],以上研究表明单一细胞标记物不足以筛选出肿瘤干细胞,应当联合多种标记共同筛选。

2.2 乳腺微球

干/祖细胞能够在游离血清中悬浮生存并且生长,而分化后的细胞则凋亡或者死亡。因此,可以通过乳腺微球培养方式从正常乳腺组织中分离、扩增干/祖细胞^[9]。该种技术同样适用于乳腺癌。由乳腺癌细胞培养得到的乳腺微球中侧群细胞和 CD44⁺CD24^{-/low}lin⁻细胞比例增大,表明其富含干/祖细胞^[10]。乳腺微球中细胞大小并不均等,说明其来源可能不同。有研究认为体积较小的细胞来源于祖细胞,而体积较大的细胞来源于干细胞^[11]。

2.3 乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)

ALDH1 酶参与细胞内醛的氧化,可能通过氧化视黄醇参与干细胞的早期分化^[12],ALDEFLUOR 分析法可以将细胞内 ALDH1 活性高的细胞进行荧光标记,从而实现筛选。研究发现将癌症患者 ALDEFLUOR 阳性细胞导入 NOD/SCID 小鼠中可以成瘤,而 ALDEFLUOR 阴性细胞不具有该种表现。在众多 ALDH 亚型中,ALDH1A3 与肿瘤的大小、分期、转移有关^[13]。此外有一部分上皮细胞表达 ALDH1,但是却不表达 CD44,表明 ALDH1 不仅表达于干细胞,可能还表达于祖细胞或者分化后的细胞^[14]。因此,单一的以 ALDEFLUOR 阳性作为筛选干细胞的方法存在缺陷,应该联合其他方法以达到更好的效果。

此外还有侧亚群分离技术、有限稀释法、体内动物模型鉴定等方法用以分离、纯化肿瘤干细胞。近来试验人员发现将乳腺癌转移的细胞进行缺氧—再氧合的循环处理,乳腺癌干样细胞可以增殖,并且其后代在免疫抑制的小鼠中致瘤性很高,表现出干细胞表型和 EMT 表型。这提示可以用该方法来分离转移乳腺癌中的干细胞。

3 BCSCs 与上皮间质转化(EMT)

EMT 是指在特定的生理和病理情况下,具有极性的上皮细胞向在细胞基质间自由移动的间质细胞转化的现象,EMT 这一概念是 Greenburg 等^[15]在

1982 年提出的。上皮细胞表型的丧失和间质特性的获得是 EMT 发生的主要特征,其与肿瘤的关系十分密切。研究发现诱导人乳腺上皮细胞发生 EMT 后,可表达肿瘤干细胞表型^[16]。EMT 可促进多药耐药基因(multidrug resistance gene 1,MDR1)的表达,使细胞对阿霉素耐受,还可以通过抑制 P53 和 Rb 通路的关键物质干扰细胞凋亡^[17]。EMT 相关的转录因子也可以直接破坏抑制肿瘤的机制而参与肿瘤进展^[18],由此可见,EMT 与 BCSCs 的关系密切,同时与乳腺癌的治疗和预后也息息相关。

4 BCSCs 的微环境

干细胞微环境包绕干细胞,并且保持其干细胞特性,阻止其分化。它包括干细胞、信号转导细胞及特殊的细胞外基质。在激素刺激下乳腺增殖和修复过程中微环境起重要作用。一个著名的实验证明了微环境的重要性。该实验从人曲细精管中提取单个细胞然后与乳腺上皮细胞混合培养于处理后的鼠乳腺脂肪垫中。经过连续移植,这些重组的睾丸细胞能够重塑乳腺祖细胞^[19]。Weinberg 经过研究发现乳腺肿瘤微环境可以通过引发肿瘤干细胞表型的可逆性改变,从而促进肿瘤的转移和播散^[20]。肿瘤细胞中非致瘤性的细胞在适当的微环境中可能具有致瘤性^[21]。另有研究发现 SUM159 BCSCs 与人骨髓衍生的间充质干细胞共培养后,ALDEFLUOR 阳性细胞比例(14%)较 SUM159 BCSCs 单独培养的 ALDEFLUOR 阳性细胞率(4%)高。该实验表明两者之间的相互作用可以提高肿瘤干细胞的自我更新能力^[22]。抗肿瘤治疗除了其直接的毒性作用以外,后续的氧化应激和脂质过氧化作用影响肿瘤干细胞微环境的氧化平衡状态,可以进一步杀伤肿瘤细胞^[23]。以上试验说明微环境可以影响肿瘤干细胞的生存及改变其生物学特性。

5 针对肿瘤干细胞的治疗

肿瘤干细胞高表达 ABC 转运体从而将化疗药物泵出细胞外,可能是造成化疗抵抗的一部分原因。同时残留的肿瘤干细胞也成为复发的根源。Abraham 等^[24]认为,CD44⁺/CD24⁻乳腺癌细胞虽然与临床预后无明显关系,但是在转移方面存在一定的联系。因此降低甚至消除 SCs 的比例具有重要的临床和研究价值。

5.1 诱导肿瘤干细胞分化

肿瘤干细胞大部分处于静止期,因而对很多化疗药物耐受,可以通过诱导其分化,使其进入增殖期,达到治疗效果。研究发现游离的全反式维 A 酸和脂质体全反式维 A 酸对 BCSCs 具有诱导分化的作用^[25],对乙酰氨基酚也有促 BCSCs 分化的作用^[26]。

5.2 消除肿瘤干细胞

当前研究集中在肿瘤细胞特异标记物和信号通路,希望借此寻找到相应的靶点消除肿瘤干细胞,例如赫赛汀针对 HER-2/neu。除此以外,有些基因(如 Oct4、Nanog、Sox2)表达的调控机制也与肿瘤形成相关。如果逆转这些基因的表达,可能消除肿瘤干细胞^[27]。

5.3 抑制分子信号通路及药物转运蛋白

干细胞和肿瘤干细胞均高表达 BRCP-ABCG2(ATP-binding cassette superfamily G member 2,乳腺癌耐药蛋白)和 ABCB1/MDR1。这些药物转运蛋白是造成肿瘤干细胞耐药的一部分原因。联合 ABC 转运蛋白抑制剂,可以提高化疗药物杀灭癌细胞的效率。与干细胞自我更新相关的通路主要有 Wnt、Notch 和 HH 等。抑制 Wnt 通路可以降低乳腺癌细胞增殖能力和肿瘤形成,同时抑制 EMT 转录因子表达如 Twist 和 slug 等^[28]。抑制 Notch 通路可以抑制 HER-2 阴性 BCSCs 的生存^[29]。

5.4 免疫介导杀伤肿瘤干细胞

研究发现免疫系统可以识别并且消除肿瘤,树突状细胞(dendritic cells, DCs)在免疫过程中发挥了重要作用。DC 介导的疫苗接种策略主要包括两方面:抗原确定的疫苗和多价疫苗。一项研究认为与 Notch 和 Numb 相关的原发性和继发性免疫可能对处于静止期的肿瘤干细胞有效^[30]。

6 结语

尽管 BCSCs 的研究已经取得了一定的进展,但其对放化疗及内分泌治疗的耐受仍然没有有效的办法克服,从而造成复发和转移。研究发现长期的抗雌激素治疗后 MCF7S 细胞仍然保持自我更新能力,^[31]这提示长期的抗激素治疗对 BCSCs 的抑制作用不明显。柔红霉素(0.5 $\mu\text{mol/L}$)对侧群(side population, SP)细胞和非 SP 细胞的抑制率分别为 25.8%、47.6%,当联合 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 他莫昔芬用药时两者的抑制率分别升高到 69.8% 和 69.7%。在脂质体柔红霉素和脂质体他莫昔芬联合使用中也得到相似的结果^[32]。可见单一的内分泌治疗和化疗对肿瘤干细胞的抑制作用均不显著,联合应用后效果明显提高。当前治疗方式为二者序贯使用,同时使用是否疗效更显著尚没有临床数据支持。本文对 BCSCs 特征、与 EMT 及微环境之间的相互作用以及可能的消除方法进行了阐述,希望借此找到更有效的方法提高患者的生存率和生存质量。

【关键词】 乳腺肿瘤;干细胞;上皮间质转化;微环境;治疗

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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):3983-8.
- [3] Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, et al. Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics [J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(10):1186-1196.
- [4] Al-Ejeh F, Smart CE, Morrison BJ, et al. Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(5):650-658.
- [5] Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, et al. The CD44⁺/CD24⁻ phenotype relates to "triple-negative" state and unfavorable prognosis in breast cancer patients [J]. Med Oncol, 2011, 28(3):745-752.
- [6] Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, et al. CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties an early step necessary for metastasis [J]. Breast Cancer Res, 2006, 8(5):59-72.
- [7] Aulmann S, Waldburger N, Penzel R, et al. Reduction of CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells by conventional cytotoxic chemotherapy [J]. Human Pathol, 2010, 41(4):574-581.
- [8] Lin WM, Karsten U, Goletz S, et al. Expression of CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on lung, breast and liver cancer-initiating cells [J]. Int J Exp Path, 2011, 92(2):97-105.
- [9] Charafe-Jauffret E, Monvillea F, Ginestier C, et al. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges [J]. Pathobiology, 2008, 75(2):75-84.
- [10] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties [J]. Cancer Res, 2005, 65(13):5506-5511.
- [11] Dey D, Saxena M, Paranjape AN, et al. Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture [J]. PLoS ONE, 2009, 4(4):5329-5341.
- [12] Sophos NA, Vasilou V. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update [J]. Chem Biol Interact, 2003, 143(144):5-22.
- [13] Marcatto P, Dean CA, Pan D, et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis [J]. Stem Cells, 2011, 29(1):32-45.
- [14] Neumeister V, Rimm D. Is ALDH1 a good method for definition of breast cancer stem cells? [J] Breast Cancer Res Treat, 2010, 123(1):109-111.
- [15] Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. J Cell Biol, 1982, 95(1):333-339.
- [16] Morel AP, Lievre M, Thomas C, et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition [J]. PLoS ONE, 2008, 3(8):e2888.
- [17] Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence [J]. Cancer Cell, 2008, 14(1):79-89.
- [18] Cheng GZ, Chan J, Wang Q, et al. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel [J]. Cancer Res, 2007, 67(5):1979-1987.
- [19] Boulanger CA, Mack DL, Booth BW. Interaction with the mammary microenvironment redirects spermatogenic cell fate *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(10):3871-3876.
- [20] Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis [J]. Nature, 2007;449(7162):557-563.
- [21] Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm [J]. Science, 2009, 324(5935):1670-1673.
- [22] Liu S, Ginestier C, Ou SJ, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks [J]. Cancer Res, 2011, 71(2):614-624.
- [23] Cipak A, Mrakovcic L, Ciz M, et al. Growth suppression of human breast carcinoma stem cells by lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal and hydroxyl radical-modified collagen [J]. Acta Biochim Pol, 2010, 57(2):165-171.
- [24] Abraham BK, Fritz P, McClellan M, et al. Prevalence of CD44⁺/CD24^{-/low} cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3):1154-1159.

- [25] Li RJ, Ying X, Zhang Y, et al. All-trans retinoic acid stealth liposomes prevent the relapse of breast cancer arising from the cancer stem cells[J]. J Control Release, 2011, 149(3):281-291.
- [26] Takehara M, Hoshino T, Namba T, et al. Acetaminophen-induced differentiation of human breast cancer stem cells and inhibition of tumor xenograft growth in mice[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(9):1124-1135.
- [27] Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome—components and functional correlates. Genes Dev, 2006, 20(23):3215-3231.
- [28] 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):5364-5373.
- [29] Hirose H, Ishii H, Mimori K, et al. Notch pathway as candidate therapeutic target in Her2/Neu/ErbB2 receptor-negative breast tumors[J]. Oncol Rep, 2010, 23(1):35-43.
- [30] Mine T, Matsueda S, Li YF, et al. Breast cancer cells expressing stem cell markers CD44⁺ CD24^{low} are eliminated by Numb-1 peptide-activated T cells[J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58(8):1185-1194.
- [31] Ao A, Morrison BJ, Wang H, et al. Response of estrogen receptor-positive breast cancer tumorspheres to antiestrogen treatments[J]. PLoS ONE, 2011, 6(4):188-199.
- [32] Guo J, Zhou J, Ying X, et al. Effects of stealth liposomal daunorubicin plus tamoxifen on the breast cancer and cancer stem cells[J]. J Pharm Pharmaceut Sci, 2010, 13(2):136-151.

(收稿日期:2011-12-16)

(本文编辑:刘军兰)

侯国芳,张瑾. 乳腺癌干细胞研究进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2012,6(4):441-446.