

乳腺癌干细胞研究的新进展

罗维远¹ 黄正接² 综述 罗琪² 审校

摘要 肿瘤是由肿瘤干细胞异常增殖、分化而形成,常规放化疗仅能消灭增殖期的非致瘤性肿瘤细胞,使肿瘤缩小甚至消失。然而,肿瘤干细胞和普通干细胞一样,对放化疗等方法具有较高的抵抗能力,当治疗停止后,肿瘤干细胞可再次增殖形成肿瘤。目前研究已证实乳腺癌中存在乳腺癌干细胞,并且乳腺癌干细胞在乳腺癌的发生、发展中起着关键作用。乳腺癌干细胞不但介导乳腺癌组织对放化疗的抵抗,还关系到乳腺癌的转移和复发,所以有必要针对乳腺癌干细胞进行深入研究。因此,本文就乳腺癌干细胞的分离鉴定、相关信号通路的调控及其治疗方面的新进展作一综述。

关键词 乳腺肿瘤 肿瘤干细胞 研究进展

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.23.015

Advances in Research on Breast Cancer Stem Cells

Weiyuan LUO¹, Zhengjie HUANG², Qi LUO²

Correspondence to: Qi LUO, E-mail: luoqixmzsh@126.com

¹Xiamen University Medical School, Xiamen 361005, China

²Department of Surgical Oncology, The First Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China

Abstract The cancer stem cell hypothesis suggests that tumors originate from the abnormal proliferation and differentiation of cancer stem cells. Conventional therapies, such as radiotherapy and chemotherapy, only kill the non-tumorigenic tumor cells at the proliferative phase, resulting in the minification or even the disappearance of tumors. However, like normal stem cells, tumor stem cells are highly resistance to radio-chemotherapy, and they may proliferate again to develop the tumor upon cessation of treatment. Cancer stem cells are present in breast cancer and play a key role in the carcinogenesis and progression of breast cancer. They not only mediate resistance to chemotherapy and radiotherapy of the breast cancer, but also correlate with metastasis and the recurrence of cancer. Therefore, extensive studies on breast cancer stem cells are needed. The current study summarizes the progress in the isolation and identification of signal pathways and related therapies related to breast cancer stem cells.

Keywords Breast neopasm; Tumor stem cell; Research progress

随着对肿瘤研究的深入,发现同正常组织起源于干细胞一样,肿瘤也可能起源于相应的干细胞,即肿瘤干细胞。这部分细胞虽然只占少部分,但具备高度增殖、自我更新及多向分化的潜能,是肿瘤发生发展的关键。近几年来,肿瘤干细胞的研究已成为热点,在多种肿瘤组织中已发现了肿瘤干细胞,但尚缺乏公认的肿瘤干细胞模型及肿瘤干细胞标志。乳腺癌是严重影响女性健康的恶性肿瘤之一,乳腺癌干细胞的发现为实体瘤中存在肿瘤干细胞提供了有力证据。本文就目前乳腺癌干细胞的标记、分离鉴定方法、信号通路调控以及针对乳腺癌干细胞的治疗等方面的研究现状及新进展进行综述。

1 乳腺癌干细胞的发现

1997年Bonnet等^[1]发现急性髓细胞性白血病细胞中一小部分表面标志为CD34⁺CD38⁻的细胞具有类似干细胞的自我更新能力,是急性髓细胞性白血病

的起始细胞。随后,Reya等^[2]认为除了造血系统肿瘤外,实体肿瘤组织中也可能存在极少量的肿瘤细胞充当干细胞的角色,具有无限增殖的潜能,在实体瘤的发生发展中起决定性作用。2003年Al-Hajj等^[3]经研究发现表面标志为CD44⁺CD24^{-low}ESA⁺的乳腺癌细胞具有很强的致瘤能力,仅100个这种表型的乳腺癌细胞接种到非肥胖性糖尿病/重度联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠体内就能形成肿瘤,其移植瘤的细胞组成与原发灶肿瘤相同,在经过多次传代后还具有较强的致瘤性,表明这类细胞亚群在乳腺癌中起着干细胞的作用,将其称为乳腺癌干细胞。

2 乳腺癌干细胞的标志

目前,比较公认的乳腺癌干细胞的标志是CD44⁺CD24^{-low}。近期研究表明,除了CD44⁺CD24^{-low}表型之外,乙醛脱氢酶-1(ALDH-1)高活性的细胞也被证实具有干细胞特性。Ginestier等^[4]检测乳腺正常细胞及

作者单位:①厦门大学医学院(福建省厦门市361005);②厦门大学附属第一医院肿瘤外科

通信作者:罗琪 luoqixmzsh@126.com

乳腺癌细胞内的 ALDH-1 活性后发现,ALDH-1 活性高(ALDH-1^{hi})的细胞仅占乳腺癌细胞总数的 5%,但其具有自我更新及多向分化的能力,500 个 ALDH-1^{hi} 的乳腺癌细胞接种到 NOD/SCID 小鼠体内就能形成肿瘤,而接种 ALDH 低活性(ALDH-1^{low})的乳腺癌细胞数量即使达到 50 000 个亦未能形成肿瘤;另外,该研究发现 ALDH-1^{hi} 细胞群和 CD44⁺CD24⁻Lin⁻ 细胞群有部分重叠,接种 20 个 ALDH-1^{hi}CD44⁺CD24⁻Lin⁻ 乳腺癌细胞就可以形成肿瘤,提示联合多个细胞标志可得到更加接近纯化的乳腺癌干细胞。Aktas 等^[5] 研究发现转移性乳腺癌患者的血液中肿瘤细胞 ALDH-1 呈过表达。可见,ALDH-1^{hi} 不仅有望成为肿瘤干细胞的标志,还与肿瘤的转移密切相关。Crocker 等^[6] 研究发现 ALDH^{hi}CD44⁺CD24⁻ 和 ALDH^{hi}CD44⁺CD133⁺ 细胞在体外的增殖、克隆形成、黏附、迁移、侵袭等能力以及体内的致瘤能力和转移能力均明显强于 ALDH^{low}CD44⁻ 细胞;但几种干细胞标志在乳腺癌细胞系 MCF-7 中未见表达。Xu 等^[7] 从乳腺癌细胞系 MCF-7 中分离出高表达 CD55(CD55^{hi})的亚群,其克隆形成效率高于低表达 CD55(CD55^{low})的细胞,且 CD55^{hi} 细胞具有进一步分化的能力,该实验提示 CD55^{hi} 亚群细胞可能是一群具有肿瘤干细胞样性质的细胞。

上述研究结果提示各细胞系之间的肿瘤干细胞标志可能并不相同,甚至细胞系与原代细胞之间的干细胞标志可能也不同,因为细胞系在长期体外培养过程中,表面抗原标志有可能会发生改变。与 CD44⁺CD24⁻ 相比,由于检测的是 ALDH-1 的活性,ALDH-1 不像细胞表面标志一样容易受微环境等因素的影响,在识别和分离干细胞方面具有一定的优越性。另外, Park 等^[8] 运用免疫组化的方法检测了不同病理类型乳腺癌中 CD44、CD24 及 ALDH-1 等 12 种蛋白的表达,发现不同恶性程度及不同病理类型的乳腺癌细胞之间细胞标志物的表达各有不同,表明与乳腺癌干细胞相关的细胞表面标志具有异质性。

3 乳腺癌干细胞的分离方法

目前,分离乳腺癌干细胞的方法主要有表面标志分选、侧群分选和无血清培养 3 种:1) 表面标志分选是利用细胞表面标志与相应抗体相结合的原理通过流式细胞仪或免疫磁珠法分选出细胞。如前所述,目前人们利用干细胞体外培养技术和异种移植模型已发现多种乳腺癌干细胞标志,但特异性标志物还有待进一步研究。2) 侧群分选利用干细胞能将结合 DNA 的荧光染料 Hoechst 33342 泵出细胞的特性,通过流式细胞仪将淡染的干细胞筛选出来,由于这部分细胞在流式细胞仪分析时分布于左下角,所

以被称为侧群(side population, SP)细胞。侧群分选最初是用于正常干细胞的研究,近几年开始被应用于肿瘤干细胞的富集。Patrawala 等^[9] 利用侧群分选技术从胶质瘤 U-373、乳腺癌 MCF-7 及前列腺肿瘤 LAPC-9 细胞系中分选出的侧群细胞较相应的非侧群细胞高表达干细胞相关基因,具有更强的致瘤性,且可传代并生成非侧群细胞,提示侧群细胞具有肿瘤干细胞的特性,可以通过侧群分选的方法富集肿瘤干细胞。但是,由于 Hoechst 33342 对细胞具有一定毒性,用其分选出来的肿瘤干细胞的性质可能会受到影响。有研究^[10] 显示经 Hoechst 33342 分选过的细胞,尤其是在非侧群细胞内,部分基因的表达呈 Hoechst 33342 剂量依赖性下调。侧群细胞分选富集乳腺癌干细胞的方法还具有一定的局限性,仍有待于进一步的研究。3) 无血清培养,在添加了表皮生长因子、成纤维细胞生长因子等的无血清培养基中,分化细胞逐渐凋亡,而未分化细胞可进行不对称分裂,实现自我更新、维持未分化状态,并扩增形成由同一克隆起源的干细胞和祖细胞构成的细胞集落,以细胞球的形式悬浮生长。Ponti 等^[11] 通过无血清培养的方法证明了乳腺癌干细胞能够在体外生长传代,但在原代培养中,仅雌激素受体阳性的乳腺癌细胞经无血清培养后形成的悬浮细胞球能在体外传代超过 40 代。无血清培养的方法为肿瘤干细胞的体外培养、扩增及进一步研究提供了可能,但是,这样培养的肿瘤干细胞往往不能在体外长期传代并保持未分化状态,如何让肿瘤干细胞在体外长期存活并保持未分化状态还需要更深入地研究。

上述方法虽然可以分离乳腺癌干细胞,但严格意义上说只是富集了乳腺癌干细胞,并不能用来对其进行鉴定。Clarke 等^[12] 曾提出,动物体内连续移植成瘤是鉴定肿瘤干细胞的金标准,虽然这种方法还存在一定的局限性,但其最能检测自我更新和分化的能力,从而在功能上对肿瘤干细胞进行鉴定。

4 乳腺癌干细胞的信号通路调控

目前多项研究已证实,在正常干细胞中起作用的一些信号通路,在乳腺癌干细胞中也起重要作用。Harrison 等^[13] 比较乳腺癌干细胞和分化的乳腺癌细胞之间 Notch 受体的活性,发现乳腺癌干细胞中 Notch4 信号活性明显高于分化的细胞,而 Notch1 信号活性却低于分化的细胞;抑制乳腺癌干细胞中的 Notch4 能明显抑制其形成肿瘤,表明 Notch4 在乳腺癌干细胞的调控中起一定作用,将其作为靶点治疗乳腺癌明显优于 Notch1。Wnt 信号通路在乳腺干细胞和早期祖细胞的转化、乳腺癌生成过程中起重要作用^[14],而 Wnt 的共受体 Lrp5 缺陷的小鼠可以抵抗

Wnt1的致癌作用^[15]。Tanaka等^[16]检测了乳腺癌细胞中CD44⁺CD24^{-low}亚群和侧群细胞中Hedgehog信号通路相关基因的表达,发现Hedgehog信号通路相关基因在这两个亚群细胞中表达明显增加,抑制Hedgehog信号通路可导致其致癌能力和增殖能力下降,表明Hedgehog信号通路在乳腺癌干细胞中起重要作用,有望成为乳腺癌干细胞靶向治疗的靶点。

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸转化为前列腺素的限速酶,其同工酶之一COX-2在静息时不表达,仅在细胞受到刺激时迅速合成,参与多种病理过程。最新研究^[17]发现乳腺癌干细胞在转染COX-2之后,其染色体畸变的比例、抗凋亡蛋白Bcl-2的表达增加,对阿霉素的抗药性及克隆形成能力也明显增强,提示COX-2在乳腺癌干细胞的发生发展中起作用,有可能成为乳腺癌研究及治疗的一个靶点。Piwi2与干细胞的自我更新、RNA沉默和翻译等相关。有研究^[18]显示Piwi2在乳腺癌干细胞中高表达,在90%的侵袭性乳腺癌和81%的乳腺原位癌中也呈高表达;将其沉默后抑制细胞的增殖和抗凋亡,表明Piwi2可增强乳腺癌干细胞的增殖和抗凋亡能力。另外,IL-6^[19]、TNF- α ^[20]、Klf4^[21]等对乳腺癌干细胞也具有调控作用。

5 针对乳腺癌干细胞的治疗

按照肿瘤干细胞理论的观点,常规的化疗等方法仅能消灭增殖期的非致瘤性肿瘤细胞,使肿瘤缩小甚至消失,当治疗停止后,具有耐药性的肿瘤干细胞可再次增殖形成肿瘤。所以,针对乳腺癌干细胞的治疗才是根治乳腺癌的关键。1)清除乳腺癌干细胞:Pece等^[22]报道乳腺癌干细胞含量与乳腺癌的分化程度等相关。而Lagadec等^[23]的研究表明分次的放射治疗不仅不能消灭乳腺癌起始细胞,还能使其从静止状态进入到细胞周期,使乳腺癌起始细胞的数量增加。Connolly等^[24]发现eIF-4G过表达在乳腺癌的放疗抵抗方面起着重要作用,将其沉默能增加非致瘤性乳腺上皮细胞的放疗敏感性,但并不能增加乳腺癌细胞SUM-149的放疗敏感性,原因是沉默eIF-4G会导致乳腺癌干细胞数量增加。上述研究表明乳腺癌干细胞的数量关系到乳腺癌的恶性程度及其对治疗的敏感性,减少乳腺癌干细胞的数量甚至将其完全清除是关键。Eriksson等^[25]研究证明溶瘤腺病毒能通过感染的方式杀死具有干细胞特性的CD44⁺CD24^{-low}乳腺癌细胞,而不受肿瘤干细胞抗化疗药机制的影响。Cirenajwis等^[26]研究发现抗肿瘤药PG-11047可以通过降低自我更新能力、诱导间质上皮化相关蛋白的表达、降低游走能力等机制作用于乳腺癌干细胞。有研究^[27]显示二甲双胍可以有效杀

灭乳腺癌干细胞。Vazquez-Martin等^[28]认为二甲双胍通过作用于上皮间质化的转录调节来抑制乳腺癌干细胞。另外,阻断乳腺癌干细胞信号通路的治疗研究也在进行,如Hedgehog通路的阻滞剂、Notch通路的阻滞剂及靶向表皮生长因子受体的小分子抑制剂等均能抑制乳腺癌干细胞^[16, 29]。2)诱导乳腺癌干细胞分化:通过诱导分化剂诱导乳腺癌干细胞凋亡或分化,使其丧失增殖、侵袭和迁移的能力,目前这种方法多用于造血系统肿瘤。近来,有研究^[30]显示对乙酰氨基酚可以通过诱导乳腺癌干细胞分化来辅助治疗乳腺癌。另外,Rennstam等^[31]研究显示Numb蛋白的表达水平与CD44⁺CD24⁻干细胞表型呈负相关,Numb表达减少或缺失是肿瘤具有侵袭性的标志,且与远期预后不良有关,提示Numb表达量的改变,可能会导致乳腺癌干细胞分化为不同亚型的乳腺癌细胞。Numb是调控干细胞的不对称分裂的关键蛋白之一,进一步明确Numb的作用机制,探索上调或抑制Numb的表达能否影响乳腺癌干细胞分化为不同亚型的乳腺癌细胞,甚至将其逆转为正常乳腺细胞,可能是研究的一个新方向。最近有研究表明^[26, 28]上皮间质化在乳腺癌干细胞的发生发展中起一定作用,抑制上皮间质化或者诱导间质上皮化可对乳腺癌干细胞起到抑制作用。另有研究^[32]显示,在细胞因子TGF- β 及TNF- α 共同作用下,乳腺癌细胞可以通过上皮间质化而被诱导成为具有乳腺癌干细胞特性的细胞。这一结果为乳腺癌干细胞的获得提供了新的思路,相信也将成为乳腺癌干细胞体外研究新的热点。

综上所述,乳腺癌干细胞关系着乳腺癌的发生发展及转移等生物学行为,建立靶向乳腺癌干细胞的治疗策略,从根源上治疗乳腺癌,是彻底治愈乳腺癌的新方向。因此,确立分离乳腺癌干细胞的有效方法,深入研究乳腺癌干细胞的基因调控机理,探索寻找彻底清除乳腺癌干细胞的有效方法,是广大医学研究者们探索的目标与方向。

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 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
- 3 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983-3988.
- 4 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[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(5): 555-567.

- 5 Aktas B, Tewes M, Fehm T, et al. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(4): R46.
- 6 Croker AK, Goodale D, Chu J, et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 2236-2252.
- 7 Xu JX, Morii E, Liu Y, et al. High tolerance to apoptotic stimuli induced by serum depletion and ceramide in side-population cells: High expression of CD55 as a novel character for side-population[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(9): 1877-1885.
- 8 Park SY, Lee HE, Li HL, et al. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(3): 876-887.
- 9 Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2(+) and ABCG2(-) cancer cells are similarly tumorigenic[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6207-6219.
- 10 Christgen M, Geffers R, Ballmaier M, et al. Down-regulation of the Fetal Stem Cell Factor SOX17 by H33342: a mechanism responsible for differential gene expression in breast cancer side population cells[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9): 6412-6418.
- 11 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.
- 12 Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9339-9344.
- 13 Harrison H, Farnie G, Howell SJ, et al. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 709-718.
- 14 Liu BY, McDermott SP, Khwaja SS, et al. The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(12): 4158-4163.
- 15 Lindvall C, Evans NC, Zylstra CR, et al. The Wnt signaling receptor Lrp5 is required for mammary ductal stem cell activity and Wnt1-induced tumorigenesis[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(46): 35081-35087.
- 16 Tanaka H, Nakamura M, Kubo M, et al. Development of novel breast cancer stem cell therapy targeting hedgehog signaling pathway[J]. *Breast*, 2009, 18(Suppl 1): S20.
- 17 Singh B, Cook K, Vincent L, et al. Cyclooxygenase-2 induces genomic instability, BCL2 expression, doxorubicin resistance, and altered cancer-initiating cell phenotype in MCF7 breast cancer cells[J]. *J Surg Res*, 2008, 147(2): 240-246.
- 18 Lee JH, Jung C, Javadian-Elyaderani P, et al. Pathways of proliferation and antiapoptosis driven in breast cancer stem cells by stem cell protein piwi2[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4569-4579.
- 19 Sansone P, Storci G, Tavolari S, et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12): 3988-4002.
- 20 Li YC, Kong LH, Yang Y, et al. Mutant TNF alpha negatively regulates human breast cancer stem cells from MCF7 in vitro[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(9): 1480-1489.
- 21 Yu F, Li J, Chen H, et al. Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion[J]. *Oncogene*, 2011, 30(18): 2161-2172.
- 22 Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content[J]. *Cell*, 2010, 140(1): 62-73.
- 23 Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, et al. Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment[J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(1): R13.
- 24 Connolly EP, Silvera D, Badura ML, et al. Inflammatory breast cancer radio-resistance and its cancer stem cell population are oppositely controlled by translation factor eIF4G[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 78(3): S221.
- 25 Eriksson M, Guse K, Bauerschmitz G, et al. Oncolytic adenoviruses kill breast cancer initiating CD44(+)CD24(-/Low) cells[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(12): 2088-2093.
- 26 Cirenajwis H, Smiljanic S, Honeth G, et al. Reduction of the putative CD44(+)CD24(-) breast cancer stem cell population by targeting the polyamine metabolic pathway with PG11047[J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21(10): 897-906.
- 27 Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7507-7511.
- 28 Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreras C, Cuff S, et al. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(18): 3807-3814.
- 29 Farnie G, Clarke RB, Spence K, et al. Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: Role of notch and epidermal growth factor receptor signaling pathways[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(8): 616-627.
- 30 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.
- 31 Rennstam K, McMichael N, Berglund P, et al. Numb protein expression correlates with a basal-like phenotype and cancer stem cell markers in primary breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 122(2): 315-324.
- 32 Asiedu MK, Ingle JN, Behrens MD, et al. TGF beta/TNF alpha-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13): 4707-4719.

(2011-06-09 收稿)

(2011-09-21 修回)

(邢颖校对)