

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0070-03

## RNA 类药物在疾病治疗中的研究进展

彭艳<sup>1</sup>, 洪海燕<sup>2</sup>综述; 焦炳华<sup>1</sup>, 倪健<sup>2</sup>审阅(1. 第二军医大学生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 2. 上海富纯中南生物技术有限公司, 上海 201702)

**[摘要]** RNA 类小分子可作为治疗性药物应用于各类疾病的治疗。这类小分子主要包括基因表达抑制剂、基因修复剂、蛋白拮抗剂及 RNA 疫苗, 目前已有多种反义 RNA 和核酶作为基因表达抑制剂正在进行各期临床试验, 它们主要用于心血管疾病、肿瘤、药物代谢性疾病、病毒性肝炎和艾滋病等疾病的治疗。蛋白拮抗剂 aptamers 已作为治疗老年性黄斑和血栓药物进入临床 II, III 期试验。RNA 疫苗作为免疫调节剂治疗前列腺癌和肾癌的临床试验也在进行中。

**[关键词]** 反义 RNA; Aptamers; RNA 疫苗

**[中图分类号]** Q75 **[文献标识码]** A

有关 RNA 的研究成果连续 3 年被《科学》杂志(Science)列为世界十大科学成就之一,《自然》杂志(Nature)也将小 RNA 评为 2002 年重大科技成果之一。RNA 结构的多样性决定了其不仅在 DNA 和蛋白质之间起到桥梁作用,而且具有多种生物学功能,如独立携带遗传信息、遗传信息加工修饰、rRNA 加工、生物催化剂功能、调控功能、信号识别功能等。2000 年底提出了 RNA 组学(RNomics)的概念<sup>[1]</sup>,其内涵是指研究所有以 RNA 为终产物基因的时空表达谱和其生物学含义,再次兴起 RNA 研究的高潮。而 RNA 类小分子作为治疗性药物也越来越引起人们的关注,这类小分子包括基因表达抑制剂、基因修复剂、蛋白拮抗剂及作为免疫调节剂的 RNA 疫苗等,在肿瘤治疗和病毒控制等疾病中显示出了诱人的应用前景,同时也存在一些问题。下面对各方面的进展做一综述。

### 1 RNA 作为基因表达抑制剂

#### 1.1 反义 RNA(anti-sense RNA)

反义 RNA 的作用原理是与 mRNA 反向互补抑制蛋白质生物合成或与 mRNA 前体互补抑制 mRNA 成熟、促进 RNase 活力而降解 mRNA。

原核和真核细胞中的与 mRNA 互补的反义 RNA,可特异的与靶 RNA 结合并导致其降解或抑制其转录<sup>[2]</sup>,从而凋解细胞的基因表达,具有特异性强、操作简单的特点,可用来治疗由基因突变或过度表达导致的疾病和严重感染性疾病。

1998 年 ISIS 公司已有第一个产品,目前进入各期临床的二十种以上,主要用于治疗心血管狭窄症、癌症、多囊肾、药物代谢性疾病、胆固醇增高等疾病。虽然反义 RNA 治疗技术在肿瘤治疗和病毒控制等疾病中显示出了诱人的应用前景,但其自身的稳定性、给药途径及与非特异性杂交而出现对机体毒副作用等问题尚未最终解决,故其研究尚处于临床试验阶段<sup>[3]</sup>。

#### 1.2 核酶(ribozymes)

Altman 和 Cech 因发现了具有催化功能的核糖核酸分子—核酶而获得了 1989 年的诺贝尔化学奖。这种具有催化活性的核酶可以通过再循环,反复降解靶 RNA<sup>[4]</sup>。这类核酶被开发成治疗肿瘤或感染性疾病的药物,相继进行临床试验,现进入各期临床的有十多种<sup>[5]</sup>。以反式剪切核酶对肿瘤和艾滋病进行治疗的关键,就是选择适当的靶点(mRNA),并正确的将足够剂量的药物运送到目的地,并能使之保持足够长的作用时间。尽管一种用于治疗艾滋病的经过化学修饰的核酶衍生物在临床 II 期失败了<sup>[6]</sup>,但是其构思方法却很巧妙,值得借鉴,将作用于 HIV 病毒的 2 个靶位点的核酶转染自体 CD4<sup>+</sup> 细胞,再将细胞回输给病人,以基因治疗的方法来对抗艾滋病,但因为表达该酶的细胞存活周期很短,不能完成有效的治疗而在临床 II 期失败了。3 种治疗肿瘤的抗核酶酶的核酶正在进行临床试验,这些核酶是 mRNA 的定位信号,可以加强核酶的体内活性,影响试验成功的关键因素就是基因的运送系统,有鉴于此,将反式剪切核酶的给药方式改进为直接注射合成的基因。第一个进入临床试验的是针对 flt-1 基因的核酶<sup>[7]</sup>,flt-1 是乳腺癌患者特异性表达的基因,编码 VEGF 的高亲和力受体,以反式剪切核酶来对此疾病进行治疗,实验表明该方法可以显著降低靶蛋白的表达,目前正在进行乳腺癌和结肠癌的 II 期临床试验。与此同时,另外两个作用于乳腺癌其他靶点的反式剪切核酶也在进行临床试验。一个治疗慢性丙型肝炎的反式剪切核酶因为可能有副作用而停止试验<sup>[8]</sup>。

实验表明反式剪切核酶只能抑制 90% 的病毒复制。在最近的一项治疗结肠癌的临床 II 期实验发现,以反式剪切核酶配合传统的化疗,取得了意想不到的好疗效,同时在哮喘、心血管疾病等的研究也可能取得很好的疗效<sup>[9]</sup>。

#### 1.3 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)

RNAi 的最主要作用是可以特异性地使目的基因沉默,从而起到控制细胞的各种高级生命活动,具有专一性好、有效剂量低、比基因敲除更省时、可以在不同时期抑制基因表

达等优点。这为各种疾病如病毒病和肿瘤等的防治打开了一道全新的途径。RNAi 在哺乳动物中的研究从 1999 年才开始,但亦被认为是最有前途的核酸药物。

目前应用于疾病治疗的 RNAi 有 2 种方式:小分子干扰 RNA 介导的干扰和质粒载体介导的干扰。用小分子干扰 RNA 的方法治疗丙型肝炎获得了较好的疗效<sup>[10]</sup>。将小分子干扰 RNA 作用于 HCV 病毒基因的 5'端非翻译区,在体外与干扰素- $\alpha$  具有相同的功效,能够保护 Huh-7 细胞不被 HCV 病毒感染,当小分子干扰 RNA 的浓度为 2.5 nmol/L 时,能够在体内抑制 80% HCV 病毒的复制<sup>[11]</sup>。哈佛大学的学者也首次在活体动物中证明通过 RNA 干扰技术能治疗肝病。他们通过 RNAi 技术使 Fas 受体沉默,从而成功地在自身免疫性肝炎小鼠模型中预防了肝衰竭和肝纤维化。试验结果发现未接受 RNAi 治疗的小鼠有 40% 在 3 d 内死亡,而 40 只接受 RNAi 治疗的小鼠有 33 只活了下来,10 d 后研究人员检查这些小鼠的肝脏,发现完全正常<sup>[12]</sup>。以上实验均为非人体试验的结果,将 RNA 干扰技术用于临床治疗人类疾病还有许多研究工作要做。

## 2 RNA 作为基因修复剂

在 mRNA 水平上对基因的表达进行调控,就是以修正突变的 mRNA 来代替降解的方法。该方法是在转录后的剪切过程中,以正确的 mRNA 来替换突变的 mRNA,这种方法被称为反式剪切。已经在研究使用该方法来治疗脆性细胞病和肌萎缩<sup>[13]</sup>,因为引入的 RNA 有可能会影响到其他位置的 RNA,特异性不强,所以该方法还处于临床前研究。

## 3 RNA 作为蛋白拮抗剂 (aptamers)

目前越来越多的单克隆抗体和可溶性受体作为药物在临床上应用,其作用机理是作为拮抗剂,通过与靶蛋白结合而抑制该蛋白与相应的受体结合,从而抑制其功能的发挥而对疾病起到治疗的作用。研究发现一些小分子的 RNA 在形成三级结构后,也可以模拟蛋白拮抗剂与目的蛋白结合,并抑制他们的活性。目前,有多家公司都在合成这种可以折叠并能够与蛋白质结合的 RNA,将这种 RNA 称为 aptamers。有一种针对血管内皮细胞生长因子(VEGF)的 aptamer<sup>[14]</sup>(Eyetechn 制药公司的治疗药 Macugen)用来治疗渗出性老年黄斑变性(AMD),该药已进入临床 II、III 期试验。另有一个 aptamer 作为抗凝剂治疗血栓<sup>[15]</sup>,而且通过研究表明,可以合成一种小核苷酸片段,用来与该 aptamer 结合,破坏它的三级结构,使之不能与蛋白质相结合,从而起到“解毒剂”的作用。这个结果是令人兴奋的,因为这种组合可以解决因过度抗凝而造成的严重出血。该方法的优势在于:RNA 与目的蛋白亲和力很高,与抗原抗体的亲和力类似;RNA 可以用化学的方法大量合成;通过修饰可以提高 RNA 的半衰期,并降低体内的毒性和免疫原性。

## 4 RNA 疫苗

树突状细胞(dendritic cells, DC)是来源于患者外周血和

骨髓的专职的功能最强的抗原递呈细胞,体内淋巴细胞的作用,主要依赖于树突状细胞(dendritic cells, DC)提呈抗原产生提呈抗原产生抗体,以为攻击的靶点,但是在肿瘤的产生、发展过程中,由于机体的免疫耐受和肿瘤的抗原逃逸等多种复杂的原因,使 DC 无法对肿瘤相关抗原进行准确而有效的呈递,从而影响了淋巴系统对肿瘤细胞的攻击<sup>[16]</sup>。新近的研究发现,RNA 也可以用来刺激病人的免疫系统,间接杀死肿瘤。用 RNA 导入树突状细胞制成治疗性疫苗,发现疫苗所诱导出的特异性杀伤肿瘤细胞的杀伤率明显增加。从病人活检的肿瘤组织中分离的 mRNA 经扩增后,导入病人的 DC,该 mRNA 编码的蛋白质能够作为抗原提呈于细胞表面,增加肿瘤的免疫原性,是机体的免疫系统对肿瘤进行攻击<sup>[17]</sup>,因此,该 mRNA 可以作为自身疫苗输给病人。在前列腺癌的 I 期临床研究中,7 个病人中有 6 人获得了满意的疗效,同时治疗肾癌的临床试验也在进行当中<sup>[18]</sup>。

## 5 问题与展望

尽管 RNA 的研究取得了突破性进展,但仍存在许多问题,如何将 RNA 或能在细胞内生成 RNA 样转录物的质粒 DNA 或病毒载体安全、有效地导入靶组织或靶细胞就是一个必须解决的问题。RNA 自身的稳定性及与非特异性杂交而出现对机体毒副作用等问题也尚未最终解决。但大量的体内实验研究资料已经显现出 RNA 在基因功能研究中的应用前景和新药开发中的巨大潜力,RNA 研究将会在探索生命奥秘中和促进生物技术产业化中,做出巨大贡献。

## [参考文献]

- [1] Huttenhofer A, Kiefmann M, Meier ES, *et al.* RNomics: An experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse [J]. *EMBO J*, 2001, 20(11): 2943-2953.
- [2] Izant J G, Weintraub H. Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by anti-sense RNA [J]. *Science*, 1985, 229(4711): 345-52.
- [3] Opalinska JB, Gewirtz AM. Nucleic-acid therapeutics: Basic principles and recent applications [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(7): 503-514.
- [4] Cech TR. Ribozymes and their medical implications [J]. *JAMA*, 1988, 260(20): 3030-3034.
- [5] Usman N, Blatt LM. Nuclease-resistant synthetic ribozymes: Developing a new class of therapeutics [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(10): 1197-1202.
- [6] Amado RG, Mitsuyasu RT, Symonds G, *et al.* A phase I trial of autologous CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells transduced with an anti-HIV ribozyme [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(13): 2255-2270.
- [7] Pavco PA, Bouhana KS, Gallegos AM, *et al.* Antitumor and anti-metastatic activity of ribozymes targeting the messenger RNA of vascular endothelial growth factor receptors [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(5): 2094-2103.
- [8] Macejak DG, Jensen KL, Jamison SF, *et al.* Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes [J]. *Hepatology*, 2000, 31(3): 769-776.
- [9] Sullenger B. A, Giboa E. Emerging clinical applications of RNA

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2004 )01-0072-03

## 肿瘤干细胞研究进展

朱玉珍<sup>1</sup>, 王惠琴<sup>2</sup>综述; 孙卫民<sup>3</sup>审阅 ( 1. 陕西省宝鸡市卫生学校, 陕西 宝鸡 721008; 2. 上海医疗器械高等专科学校, 上海 200091; 3. 上海第二军医大学免疫学教研室, 上海 200433 )

[ 摘 要 ] 肿瘤研究的基本问题之一是哪些肿瘤细胞能够无限生长。传统理论认为肿瘤生长是所有肿瘤细胞一起增殖的结果。最近通过对造血系肿瘤的研究发现肿瘤细胞的生长繁殖和干细胞之间有许多惊人的相似之处, 提出了肿瘤干细胞学说, 认为肿瘤生长是肿瘤组织中极少量具有特殊细胞表面标志的肿瘤干细胞增殖的结果。研究证明人类急性髓性白血病( AML ) 中的肿瘤干细胞存在于 CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> 亚群中, 而人乳腺癌中的肿瘤干细胞属于 ESA<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> CD24<sup>-/low</sup> 亚群。肿瘤干细胞概念的提出, 提供了靶向性或选择性杀伤肿瘤干细胞从而根治肿瘤和防止肿瘤复发和转移的可能性。研究肿瘤干细胞特异性的生物学特点, 对肿瘤的发生、发展和转归的理论以及肿瘤的诊断、预防和治理均有重要意义。

[ 关键词 ] 肿瘤; 干细胞; 肿瘤干细胞

[ 中图分类号 ] Q279 [ 文献标识码 ] A

肿瘤研究的基本问题之一是哪些肿瘤细胞能够无限生长。传统理论认为肿瘤生长是所有肿瘤细胞一起增殖的结果。通过对造血系肿瘤的研究发现, 肿瘤细胞的生长繁殖和干细胞之间有许多惊人的相似之处, 提出了肿瘤干细胞学说<sup>[1]</sup>, 认为肿瘤生长是肿瘤组织中极少量的肿瘤干细胞增殖的结果。这一现象也在实体瘤中得到证实。这些研究将对肿瘤研究领域和肿瘤的治疗产生深远的影响, 本文对肿瘤干细胞的研究进展做一综述。

### 1 肿瘤干细胞概念的提出

自 1950 年以来, 一系列经典的动物自体移植瘤实验证明, 只有当肿瘤细胞数大于  $1 \times 10^6$  时才可以形成肿瘤, 将人的肿瘤细胞经皮下注射给小鼠也会引起同样的结果。在白

血病和多发性骨髓瘤中, 仅有 1/1 000 或 1/100 的肿瘤细胞集落能够在体外克隆增殖。将白血病细胞接种小鼠, 也仅有 1% ~ 4% 的细胞能形成脾集落。以上研究提示, 并不是所有肿瘤细胞都能够增殖, 可能只有小部分肿瘤细胞具有致瘤源性, 所以将这部分白血病细胞称为肿瘤干细胞<sup>[2]</sup>。早期对实体瘤( 卵巢癌、肺癌、神经母细胞瘤 ) 的研究中, Hamburger 等人<sup>[3]</sup>也发现仅有 1/1 000 或 1/5 000 的肿瘤细胞能在琼脂中形成克隆。

随着干细胞研究的不断深入, 人们发现干细胞和肿瘤干细胞具有许多共同的特性, 它们均具有自我更新能力和不定分化潜能, 它们还可能具有类似的细胞表面标志。提示肿瘤干细胞可能起源于正常干细胞, 这些细胞通过积累突变获得不确定的增殖能力而转化为肿瘤干细胞或称为肿瘤起始细胞

[ J ]. Nature, 2002, 418( 6894 ): 252-258.

[ 10 ] Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, *et al*. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs[ J ]. EMBO Rep, 2003, 4( 6 ): 602-608.

[ 11 ] Kapadia SB, Brideau-Andersen. A, Chisari. FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs[ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100( 4 ):2014-2018.

[ 12 ] Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference[ J ]. Nature, 2002, 418, 435-438.

[ 13 ] Liu XM, Jiang QS, Mansfield SG, *et al*. Partial correction of endogenous F508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing[ J ]. Nature Biotechnol, 2002, 20( 1 ): 47-52.

[ 14 ] Eulberg D, Klussmann S. Spiegelmers: Biostable Aptamers[ J ]. Chembiochem, 2003, 4( 10 ): 979-983.

[ 15 ] Drolet DW, Nelson J, Tucker CE, *et al*. Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer ( NX1838 ) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys[ J ]. Pharm Res, 2000, 17( 12 ): 1502-1510.

[ 16 ] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity[ J ]. Nature, 1998, 392( 3 ): 245-252.

[ 17 ] Richard DG, Ding WH, Ozawa H. Induction of Anti-Tumor Immunity with Epidermal Cells Pulsed with Tumor-Derived RNA or Intradermal Administration of RNA[ J ]. J Invest Dermatol, 2000, 114( 4 ): 632-636.

[ 18 ] Heiser A, Coleman D, Dannull J, *et al*. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors[ J ]. J Clin Invest, 2002, 109( 3 ): 409-417.

[ 收稿日期 ] 2003 - 10 - 21 [ 修回日期 ] 2003 - 12 - 20

(tumor-initiating cell, T-IC)。这些肿瘤干细胞的自我更新过程类似于正常干细胞而又不同于正常干细胞。实验证明肿瘤组织具有表型异质性,即是由表型或功能不同的细胞组成,这种异质性是由于在肿瘤形成过程中经历了不同的环境或积累了不同的突变所导致的。但无论环境因素还是突变因素都不会影响这些数量少、表型相对稳定的肿瘤干细胞增殖并形成肿瘤。

有两个假说试图对上述现象作出合理的解释<sup>[1]</sup>。随机(stochastic)假说认为肿瘤组织内的每个细胞都是潜在的 T-IC,它们以很小的几率、随机地进入细胞增殖周期。阶层(hierarchy)假说则认为肿瘤是不均一的(异质性),由不同状态的细胞群体(阶层)组成,只有其中少量细胞具有 T-IC 的功能;这些细胞数量虽少,但是引起肿瘤的频率却很高。尽管二者都认为肿瘤是由肿瘤组织中有限的细胞发展而形成的,但是其形成的生物学机制却完全不同。随机假说认为肿瘤是相对均一的成分,致瘤因素(信号途径和基因表达)对所有细胞都有同样作用, T-IC 随机出现。因此预测并鉴定 T-IC 是不可能的,只有对大量肿瘤细胞研究才能够了解肿瘤的主要特性。阶层假说则认为肿瘤是由功能不同的细胞组成,肿瘤组织里极少量 T-IC 不同于其他大多数细胞,致瘤途径对不同肿瘤细胞的作用也不一样。即使破坏了非 T-IC 细胞,使肿瘤缓解,但如果 T-IC 依然存在,肿瘤还会复发。要解决 T-IC 的问题需要对肿瘤细胞进行纯化并进行体内实验来发现具有 T-IC 的能力的细胞。因此有可能分离 T-IC 和非 T-IC。

## 2 白血病干细胞的证实

Dick 等<sup>[4]</sup>对白血病细胞的研究证明 T-IC 是可以分离的。他们原代克隆培养不同的白血病细胞,发现只有表面标志为 CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>的白血病细胞能够在体外形成集落,而其他细胞形成集落的能力很弱。这些细胞虽然比例很少(约 0.2%),但它们是唯一可以从病人转移给 NOD/SCID(nonobese diabetic/severe combined immunodeficient)小鼠,并形成人类急性髓性白血病(AML)的肿瘤细胞。Blair 等<sup>[5]</sup>也用同样方法证明,只有 CD34<sup>+</sup>/CD71<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>的白血病细胞属于 T-IC。尽管也有实验证明<sup>[6]</sup>AML 细胞的 CD34<sup>-</sup>亚群与 CD34<sup>+</sup>亚群中同样有 T-IC 存在,但目前普遍认为 CD34<sup>+</sup>细胞才是 T-IC。最近更证明<sup>[7]</sup>CD34<sup>+</sup>亚群的 AML 细胞对凋亡诱导因素的抵抗力比 CD34<sup>-</sup>亚群强,这种抵抗力与 CD34<sup>+</sup>亚群细胞表达较高水平的抗凋亡基因(Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 和 Pgp)和较低水平的凋亡基因(Bax)有关。

由于在 AML 中,肿瘤干细胞的表型与正常干细胞的表型相似,所以人们假设与致瘤相关的细胞学变化发生在原始干细胞阶段,而不是发生在定向的各系前体细胞阶段,因此在白血病细胞克隆中见到的异质性是由于不同白血病干细胞中相关基因特异性转化导致不同分化的结果<sup>[8]</sup>。Guan 等<sup>[9]</sup>用 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入实验研究 AML 细胞时发现, T-IC 均为静止的 G<sub>0</sub> 期细胞, G<sub>0</sub> 期细胞可在体外培养时进入细胞周

期,而进入细胞周期的前体细胞具有异质性,且各亚群中的前体细胞数量相对恒定。这些 AML 细胞能分泌 Steel 因子、Flt-3 配体、IL-3 和 GM-CSF 中至少 2 个因子,并以自分泌的方式增殖。Dao 等<sup>[10]</sup>用正常人骨髓细胞异种移植实验证明, CD34<sup>+</sup> 细胞可以在长期异种移植时产生 CD34<sup>-</sup> 细胞。van der Pol 等<sup>[11]</sup>用表型和功能等多指数分析了 27 例 AML 病人的骨髓细胞,发现 CD34<sup>+</sup> 细胞含量较少(0.02% ~ 0.7%)的 19 例中有 18 例的 CD34<sup>+</sup> 细胞是正常细胞;含量中等(1.6% ~ 3.5%)的 5 例中只有 1 例的 CD34<sup>+</sup> 细胞是正常细胞;而含量 > 5% 的 3 例中 CD34<sup>+</sup> 细胞均是恶性细胞(尽管其中 2 例的 CD34<sup>+</sup> 细胞有 0.15% 和 0.20% 是正常细胞)。以上实验结果均支持阶层假设。

## 3 乳腺癌干细胞的证实

最近对乳腺癌的研究进一步证明,实体瘤也有肿瘤干细胞存在。Al-Hajj 等<sup>[12]</sup>为了鉴定人类乳腺癌起始细胞(breast cancer initiating cells BrCa-IC),将人类乳腺癌组织的细胞接种到 NOD/SCID 小鼠的乳腺脂肪组织中,建立了一个敏感可靠的人 BrCa-IC 的体内实验模型。9 例病人(包括 8 例转移和 1 例原发乳腺肿瘤)的肿瘤细胞都可以在 NOD/SCID 小鼠中生长。用 4 种乳腺癌相关的细胞表面分子:CD44、CD24、乳腺/卵巢癌特异性标志(B38.1)和上皮细胞特异性抗原(ESA)作为鉴别标记,对表达或不表达,单独表达或共表达等进行分类,观察不同亚群 BrCa-IC 细胞在 NOD/SCID 小鼠体内的成瘤能力。由于乳腺肿瘤可能包含有造血细胞、上皮细胞、间皮细胞、成纤维细胞,故又用各种细胞的特异性表面标志(统称为 Lin,包括 CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64 和 CD140b)来区分正常细胞(Lin<sup>+</sup>)和乳腺癌细胞(Lin<sup>-</sup>)。结果表明,所有接种 CD44<sup>+</sup>, B38.1<sup>+</sup> 或 CD24<sup>-/low</sup> 细胞的 NOD/SCID 小鼠;在 12 周时均出现明显的肿瘤,接种 CD44<sup>-</sup> 或 B38.1<sup>-</sup> 细胞的小鼠没有肿瘤生长,接种 CD24<sup>+</sup> 细胞的小鼠几乎没有肿瘤生长。分离小鼠移植乳腺癌的细胞再接种小鼠乳腺脂肪垫,结果显示,未分类细胞需 5 × 10<sup>4</sup> 细胞才能再形成肿瘤;而 CD44<sup>+</sup> CD24<sup>-/low</sup> Lin<sup>-</sup> 细胞只需 10<sup>3</sup> 即能 100% 形成肿瘤,其致瘤活性增加 50 倍;CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> 细胞不能形成肿瘤。进一步分析表明,ESA<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> CD24<sup>-/low</sup> 细胞虽然只占小鼠移植乳腺癌细胞的 2%,但只需 200 个即可在小鼠乳腺中再形成肿瘤;而 ESA<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> CD24<sup>-/low</sup> 细胞不能形成肿瘤;这两类细胞的细胞周期状态并没有明显差异,它们与其他 Lin<sup>-</sup> 细胞之间也没有形态上的差异。

对第 1 次接种和第 2 次接种后形成的肿瘤进行表型分析,结果显示第 1 次接种后形成肿瘤的表型异质性与其中 ESA<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> CD24<sup>-/low</sup> 细胞或 Lin<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> CD24<sup>-/low</sup> 细胞第 2 次接种后形成肿瘤的表型异质性相似(resembled)。第 2 次接种后形成的肿瘤中,也仅 Lin<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> CD24<sup>-/low</sup> 细胞具有致瘤源性。在移植后可以重建肿瘤组织的不同成分的结果证明了 BrCa-IC 与干细胞相似的另一重要特性:具有自

我更新(形成另一个 BrCa-IC)和多向分化(子代细胞获得成熟标志失去形成肿瘤的能力)的能力。以上实验证明乳腺癌细胞是功能上不均一的成分,仅有少量表达特征性表面标志的 BrCa-IC 能在重复移植后重建乳腺癌细胞型。

#### 4 存在的问题和展望

通过对血液系肿瘤和实体瘤的研究,肿瘤干细胞概念日益引起人们的重视。这一概念的提出,提供了靶向性或选择性杀伤肿瘤干细胞从而根治肿瘤和防止肿瘤复发和转移的可能性。尽管现有治疗肿瘤的方法也能消除肿瘤,但主要是针对肿瘤组织内的大多数细胞,而不是肿瘤干细胞。因为不能有效地杀伤肿瘤干细胞,即使肿瘤组织消退了,剩余的肿瘤干细胞仍然可以重新形成肿瘤,故常有复发和转移,使治疗失败。研究发现肿瘤干细胞似乎对化学疗法的耐受力比来源于同一组织的其他细胞要强<sup>[8]</sup>。将来的治疗方案可能会明确针对肿瘤干细胞,或许能取得较好的治疗效果。

肿瘤干细胞概念也对目前肿瘤生物学的研究提出挑战。现代肿瘤的研究,仍然把肿瘤当作均一的细胞集团,而极少数的 T-IC 和大多数的非 T-IC 在生物学特性、信号传导途径等各方面可能不同,以前研究的大量资料需要被再评价。如能找到肿瘤干细胞特异性的生物学特点,对肿瘤的发生、发展和转归的理论以及肿瘤的诊断、预防和治疗均有重要意义。

目前对肿瘤干细胞的研究仅仅处于起始阶段,尽管 AML 和乳腺癌中的肿瘤干细胞已得到初步确定,但其他肿瘤的肿瘤干细胞尚未研究。肿瘤干细胞的概念是否能准确反映肿瘤中少量存在的 T-IC? 肿瘤干细胞是不是普遍现象? 这些均需要深入研究。另一个值得关注的问题是,肿瘤干细胞的来源。由于白血病干细胞与造血干细胞以及乳腺癌干细胞与乳腺干细胞之间有许多相似之处,提示肿瘤干细胞可能直接来源于组织中的干细胞<sup>[13]</sup>。近来有报道,多种组织中存在组织相关干细胞。例如视网膜组织中有极少量可排除 Hoechst 33342 荧光染料的称为侧亚群(side population, SP)的视网膜干/前体细胞<sup>[14]</sup>;同样方法证明前列腺肥大组织的上皮细胞中有 1.38% 是 SP 干/前体细胞<sup>[15]</sup>。在肝、胰腺和神经组织也发现有干细胞存在<sup>[16]</sup>。分离和研究这些干细胞为肿瘤干细胞起源和肿瘤发生机理的提供了可能性。

无论如何,对肿瘤干细胞的研究已成为当前肿瘤研究的热点,相信,随着对肿瘤干细胞研究的不断深入,在肿瘤细胞信号传导,细胞之间分子的比较,肿瘤发生途径,基因表达和药物研发等方面的研究重心都将转移到对肿瘤干细胞的研究上来,对肿瘤的治疗会产生深远的影响。

#### [参考文献]

[1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.

- [2] Park CH, Bergsagel DE, McCulloch E. A Mouse myeloma tumor stem cells a primary cell culture assay[J]. J Natl Cancer Inst, 1971, 46: 411-422.
- [3] Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells[J]. Science, 1977, 197: 461-463.
- [4] Bonnet D, Dick IE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature Med, 1997, 3(7): 730-737.
- [5] Blair A, Hogge DE, Sutherland HJ. Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo* have the phenotype CD34<sup>+</sup>/CD71<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>[J]. Blood, 1998, 92(11): 4325-4335.
- [6] Terpstra W, Prins A, Ploemacher RE, et al. Long-term leukemia-initiating capacity of a CD34<sup>-</sup> subpopulation of acute myeloid leukemia[J]. Blood, 1996, 87(6): 2187-2194.
- [9] van Stijn A, van der Pol MA, Kok A, et al. Differences between the CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukemia[J]. Haematologica, 2003, 88(5): 497-508.
- [10] Dick JE. Breast cancer stem cells revealed[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3547-3549.
- [11] Guan Y, Gerhard B, Hogge DE, et al. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML)[J]. Blood, 2003, 101(8): 3142-3149.
- [12] Dao MA, Arevalo J, Nolte JA. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution[J]. Blood, 2003, 101(1): 112-118.
- [13] van der Pol MA, Feller N, Roseboom M, et al. Assessment of the normal or leukemic nature of CD34<sup>+</sup> cells in acute myeloid leukemia with low percentages of CD34 cells[J]. Haematologica, 2003, 88(9): 983-993.
- [14] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100: 3983-3988.
- [15] Trosko JE, Chang CC. Isolation and characterization of normal adult human epithelial pluripotent stem cells[J]. Oncol Res, 2003, 13(6-10): 353-357.
- [16] Bhattacharya S, Jackson JD, Das AV, et al. Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye eflux assay[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(6): 2764-2773.
- [17] Bhatt RI, Brown MD, Hart CA, et al. Novel method for the isolation and characterisation of the putative prostatic stem cell[J]. Cytometry, 2003, 54A(2): 89-99.
- [18] Suzuki A, Zheng Yw YW, Kaneko S, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver[J]. J Cell Biol, 2002, 156(1): 173-184.

[收稿日期] 2003-12-10

[修回日期] 2004-02-08