

[文章编号] 1007-385X(2004)01-

## 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、预防和治疗均有重要意义。

**[关键词]** 肿瘤; 干细胞; 肿瘤干细胞

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 $10^6$ 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1/1000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1/1000或1/5000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(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,所以人们假设与致癌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>[3H]</sup>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> 细胞的小鼠基本没有肿瘤生长。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个重要特性: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 $\beta$  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,多种组织中存在着组织相关干细胞。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 aprimary 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, Nolta 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 efflux 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