

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.018

ALDH1 与干细胞和肿瘤干细胞的分选鉴定

Application of ALDH1 in isolation and identification of stem cells and cancer stem cells

董华英, 吴诚义(重庆医科大学附属第一医院 内分泌外科, 重庆市乳腺癌中心, 重庆 400016)

[摘要] 乙醛脱氢酶 1(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)是一种可以将醛类氧化为乙酸的胞质溶酶,其在胚胎干细胞和成体干细胞中表达增高,对维持干细胞(stem cell, SC)的“干性”中起着重要作用。近年发现,ALDH1 在肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)中表达也升高。基于 ALDH1 活性的 Aldefluor[®]分析法已成功分选和鉴定造血干细胞、乳腺干细胞和神经干细胞等多种 SC,也已成功分选和鉴定白血病干细胞、乳腺癌干细胞、肺癌干细胞、膀胱癌干细胞和头颈部肿瘤干细胞等多种 CSC。免疫组化原位染色能有效检测 ALDH1 活性,从而也可鉴定 SC 和 CSC,目前正在研究将此方法应用于临床评估肿瘤患者的预后。ALDH1 已成为分选和鉴定 SC 和 CSC 的通用标志物之一,是 SC 研究的得力工具。

[关键词] 乙醛脱氢酶 1;干细胞;肿瘤干细胞;Aldefluor[®]分析法;分选;鉴定

[中图分类号] Q279; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0682-04

乙醛脱氢酶 1(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)是乙醛脱氢酶家族成员之一,其可以将醛类氧化为乙酸,将视黄醇氧化为视黄酸,在哺乳动物的发育及体内稳态维持中起着重要作用。ALDH1 在干细胞(stem cells, SC)中表达增高,在 SC 的“干性”维持和分化中起着重要作用,同时可以保护 SC 免受内源性和外源性药物与毒物的伤害。随着肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)研究的兴起,发现 ALDH1 在 CSC 中表达亦增高,并与 CSC 的放化疗抵抗相关。Aldefluor[®]分析法利用 SC 和 CSC 的 ALDH1 高活性,通过流式细胞术分选、鉴定活细胞中的 SC 和 CSC 亚群;免疫组化技术可以原位检测 ALDH⁺的 SC 和 CSC。这两种方法为 SC 和 CSC 的研究提供了便利手段。本文就 ALDH1 在 SC 和 CSC 分选与鉴定中的应用做一综述。

1 基于 ALDH1 活性的 Aldefluor[®]分析法

ALDH1 为细胞内蛋白,用其来分选活细胞存在一定的困难。1999 年 Storms 等^[1]应用一种叫做 Aldefluor[®](BODIPY aminoacetaldehyde, BAAA)的荧光染料联合维拉帕米通过流式细胞术检测 ALDH1 的活性,分选到 Lin⁻、CD34⁺CD38^{low}细胞以及其他表型的造血祖细胞。后来多项研究表明,ALDH1 是 SC 和 CSC 的分选和鉴定的可靠标记物。Aldefluor[®]分析法的原理为:不带电荷的 BAAA 可以通过扩散的方式进入活细胞,被细胞内的 ALDH 转化为带负电荷的反应产物氟硼荧-氨基乙酸(BODIPY aminoacetate, BAA⁻),BAA⁻滞留在细胞内,使细胞呈现明亮的荧光,而对照组加入了 ALDH 阻断剂二乙基

氨基偶氮苯(N,N-diethylaminoazobenzene, DEAB),使其不能形成荧光产物 BAA⁻。带荧光的细胞可以通过流式细胞仪的绿色通道检测出来,分选出的细胞通常标记为:ALDH⁺、ALDH(high)、ALDH^{hi}和 ALDH^{br}等。美国 Stem Cell 公司开发出了专门用于 SC 和 CSC 鉴定与分选的 Aldefluor[®]试剂盒,使得利用 ALDH 活性研究 SC 和 CSC 变得简单易行^[2-3]。

2 Aldefluor[®]法对 SC 的分选和鉴定

ALDH1 在胚胎干细胞、造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)、乳腺干细胞、神经干细胞等多种 SC 中表达,是 SC 生长、分化的重要物质。利用 ALDH1 活性可以分选和鉴定各种 SC,是目前 SC 通用标记物之一。

2.1 造血干细胞

早在 20 世纪 90 年代人们就发现 HSC 具有很高的 ALDH 活性^[4-5]。研究^[6]证实,ALDH1 在 HSC 中的主要功能与类视黄醇代谢有关,细胞所处的分化阶段及环境不同,类视黄醇所发挥的作用也存在差异。在富含造血干/祖细胞的未成熟细胞中,类视黄醇能够促进 HSC 的自我更新;而另一项研究^[7]证实类视黄醇能够促进小鼠晚期造血前体细胞的终末分化。Chute 等^[8]研究发现,阻断 ALDH 和类视黄

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研项目(No. 06-2-028)。Project supported by the Scientific Research Program of Medicine from Chongqing Municipal Health Bureau (No. 06-2-028)

[作者简介] 董华英(1977-),男,河北省邢台市人,医学博士,主要从事乳腺肿瘤的基础与临床研究。E-mail: shijiazhuanggt@126.com

[通信作者] 吴诚义(WU Cheng-yi, corresponding author), E-mail: NFMWK1192@hospital-cqmu.com

醇信号通路会引起人 HSC 在 SCID 小鼠体内扩增。以上研究表明,ALDH1 活性是 HSC 在特定环境条件下分化的必要条件。2004 年 Armstrong 等^[9]从小鼠骨髓中分离出了 Lin⁻ ALDH^{br}的 HSC 亚群。近年来证实,ALDH^{br} CD133⁺ Lin⁻ 亚群细胞含有更高比例的 HSC,SP/ALDH(Br)方法联合从 Lin⁻ CD34⁺ CD38⁻ 表型细胞中筛选细胞,可以进一步纯化造血干/祖细胞^[10-11],提示 ALDH 联合细胞表面分子标记物或 SP 分选方法可以提高 HSC 的分选效率。

2.2 乳腺干细胞

Giustini 等^[12]通过机械分离和酶解的方法从 14 例缩乳术标本中获取乳腺上皮细胞悬液,利用 Aldefluor[®]分析法检测其 ALDH 活性,发现正常乳腺上皮细胞中 ALDH⁺ 细胞平均占 8%。ALDH⁺ 细胞在体外悬浮培养条件下可形成富含乳腺干细胞(breast stem cells, BSC)的乳腺球(mammospheres, MSs),并且可以连续传代形成新的 MSs,相对于未分选细胞具有较高的 MSs 形成率,而 ALDH⁻ 细胞不能在该培养体系中形成 MSs。在分化培养条件下,ALDH⁺ 细胞可以产生 ALDH⁺ 和 ALDH⁻ 细胞,向乳腺导管上皮和肌上皮方向分化。500 个 ALDH⁺ 细胞在小鼠的乳腺脂肪垫内能够形成新生物,免疫组化证实新生物表达乳腺导管上皮和肌上皮标记物,形成新生物的能力 10 倍于未分选细胞,而 50 000 个 ALDH⁻ 细胞也不能在小鼠脂肪垫内形成新生物。以上体外和体内实验表明,ALDH⁺ 细胞中含有较高比例的 BSC。Liu 等^[13]利用 ALDH 活性分选 BSC,发现 BRCA1 在 ER⁻ 乳腺干/祖细胞向腔上皮分化的过程中起着重要作用,BRCA1 的缺失会导致 BSC 遗传不稳定性累积,使其成为进一步癌变事件的首要靶标。

2.3 神经干细胞

Cai 等^[14]发现,胚胎鼠神经干细胞(neural stem cells, NSC)与 HSC 相似,具有较高的乙醛脱氢酶活性。Corti 等^[15]利用 Aldefluor[®]分析法从小鼠的神经球(neurospheres)和新鲜解离脑组织中分离原始的 NSC,流式细胞术分离出的 SSCALDH^{br} 亚群细胞具有自我更新能力,在体外能够连续传代形成神经球,并且具有多能性,在分化条件下可以产生神经元细胞和胶质细胞。将 SSCALDH^{br} 细胞移植到小鼠脑内可在皮质和皮质下区域发现成熟的神经元细胞。另一项研究^[16]中将 ALDH^{br}SSC 表型的 NSC 移植到脊髓性肌萎缩伴呼吸窘迫症 I 型(spinal muscular atrophy with respiratory distress 1, SMARD1)的 Nmd 大鼠模型神经鞘内,可以在脊髓腹角产生运动

神经元,延缓 SMARD1 疾病的进展。

3 Aldefluor[®]法对 CSC 的分选和鉴定

ALDH1 最早被用来分选鉴定白血病干细胞。随着实体肿瘤干细胞研究的增多,ALDH1 被广泛用于实体肿瘤 CSC 的分选和鉴定,目前已成功在白血病、乳腺癌、肺癌、头颈肿瘤、膀胱癌、肝癌、胆管上皮癌、胰腺癌和结肠癌等肿瘤细胞中分选出了 ALDH1⁺ 的 CSC。

3.1 白血病干细胞

Pearce 等^[17]利用 Aldefluor[®]分析了 19 例急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)外周血中 ALDH1 高活性细胞的数量,将其分为 3 种类型:(1)稀少型(rare pattern),占 37% (7/19)。该型 ALDH1⁺ 细胞含量很低,与脐血中造血干细胞数量相当,具有干/祖细胞典型的散射特性,将其植入亚致死量照射的 NOD/SCID 小鼠体内可以重建造血系统。(2)众多型(numerous pattern),占 37% (7/19)。该型 ALDH1⁺ 细胞含量较多,与正常干/祖细胞相比具有较高的侧向角散射(side scatter),植入亚致死量照射的 NOD/SCID 小鼠体内后仅产生髓系细胞,而不产生淋巴细胞,相当于白血病干细胞。(3)缺失型(negative pattern),约占 25% (5/19)。该型不含有 ALDH1⁺ 细胞。Ran 等^[18]证实,AML 患者骨髓中存在 ALDH^{br}和 CD34⁺ 表型的白血病干细胞,两种表型细胞在白血病细胞中的含量与临床预后较差具有显著相关性。以上研究证实,利用 ALDH 活性可以分选和鉴定白血病患者的 CSC,并可根据 ALDH⁺ 细胞含量评价患者的预后。

3.2 乳腺癌干细胞

Giustini 等^[12]利用 Aldefluor[®]分析法首次分选和鉴定乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSC),发现乳腺癌细胞中存在大约 5% 的 ALDH1⁺ 细胞,具有自我更新和多向分化的潜能。进一步利用 ALDH1 联合 BCSC 的经典标记物 CD44⁺ CD24⁻ 分选 BCSC,发现 ALDH1⁺ 细胞和 CD44⁺ CD24⁻ 细胞存在一部分重合,并且 ALDH1⁺ CD44⁺ CD24⁻ 细胞具有极高的致瘤性,20 个该表型的细胞即可在小鼠体内重建乳腺肿瘤。而 ALDH1⁻ CD44⁺ CD24⁻ 细胞不具有致瘤性,说明 CD44⁺ CD24⁻ 表型的细胞并不完全是 BCSC。在其后续的工作中证实视黄醇信号通路在调控 ALDH1⁺ 的 BCSC 分化过程中起着重要作用,阻断该信号通路可能成为靶向 BCSC 的新方法^[19]。Croker 等^[20]用 ALDH1 联合 CD44 和 CD133 筛选 BCSC,研究 BCSC 的侵袭转移能力,发现乳腺

癌细胞株 MDA-MB-231 中的 ALDH^{hi} CD44⁺ CD24⁻ 亚群和乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 中的 ALDH^{hi} CD44⁺ CD133⁺ 亚群与其各自的 ALDH^{lo} CD44^{lo} 亚群相比,在体内外均具有很强的侵袭转移能力,成功建立了研究 BCSC 侵袭转移能力的模型。Charafe-Jauffret 等^[21]发现 ALDH1⁺ 的 BCSC 介导了炎性乳腺癌的侵袭转移,ALDH1 的表达可以预测炎性乳腺癌的转移,并与较差的临床预后相关。由此可见,ALDH1 是 BCSC 分选和鉴定的有力工具,ALDH1 联合其他分选 BCSC 的方法可以提高 BCSC 的分选效率,并且可以评估乳腺癌的预后。

3.3 肺癌干细胞

2009 年 Jiang 等^[22]在肺癌细胞株 H460、H125、H322 和 H358 中发现存在平均约 2% 的 ALDH1⁺ 细胞,具有自我更新和多向分化的潜能,对化疗药物耐药,并且表达 CSC 标记物 CD133。ALDH1⁺ 细胞可以在裸鼠体内重建与亲代肿瘤相同的肿瘤,恢复肿瘤细胞的异质性。免疫组织化学分析表明,ALDH1 表达与肿瘤临床病理分期和组织学分级呈正相关,并且与早期肺癌患者预后不良有关。同年,Ucar 等^[23]在肺癌细胞株 H125 中分选出 ALDH1^{br} 和 ALDH1^{lo} 两个细胞亚群,发现 ALDH1^{br} ALDH1^{br} 细胞在体外生长较慢,可产生 ALDH1^{lo} 细胞,形成不同的群体,恢复与亲代肿瘤相似的异质性。ALDH1^{br} 细胞和 ALDH1^{lo} 细胞均能在 NOD/SCID 小鼠体内形成肿瘤,第一代移植肿瘤 ALDH1^{br} 细胞的成瘤能力弱于 ALDH1^{lo} 细胞,随着移植次数的增加,第二代和第三代 ALDH1^{br} 细胞成瘤能力明显高于 ALDH1^{lo} 细胞,前者成瘤速度快,形成的肿瘤体积大。该研究证实 ALDH1^{br} 细胞具有干细胞的休眠及慢分裂等特性,肿瘤的生长需要 ALDH1^{lo} 细胞的维系。

3.4 头颈肿瘤干细胞

Chen 等^[24]首先从头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell cancer, HNSCC)原代细胞中分离出 ALDH1⁺ 亚群,证实 ALDH1 可能是 HNSCC 的 CSC 特异性标记物。Clay 等^[25]也从 6 例 HNSCC 原代细胞中分选出了少量的 ALDH^{hi} 细胞,其比例为 1.00% ~ 7.8%。500 个 ALDH^{hi} 细胞能在 53% (24/45) 的动物体内形成肿瘤,而 ALDH 细胞成瘤率仅为 8% (3/37),证实利用 ALDH 活性可以分选 HNSCC 中的肿瘤干细胞。

3.5 膀胱癌干细胞

Su 等^[26]利用 Aldefluor[®] 实验在膀胱癌中分选出了 ALDH1A1⁺ 细胞,并通过体外和体内实验研究其干细胞特性。发现在体外 ALDH1A1⁺ 细胞比其

起亲代细胞具有更强的致瘤能力,并且可以在动物体内形成与亲代肿瘤病理特征相似的肿瘤,同时恢复亲代肿瘤细胞的异质性,证实膀胱癌中存在 ALDH1A1⁺ 的 CSC。

另外在肝癌、胰腺癌等肿瘤中也存在 ALDH1⁺ 的干细胞样致瘤性亚群^[27-28],ALDH1 已经成为目前最具潜力的 CSC 通用标记物。

4 免疫组化原位染色法对 ALDH1 表达的检测

将组织或细胞固定后,用免疫组织化学技术检测 ALDH1A1 的表达情况,可以鉴定 SC 和 CSC,而且可以评估肿瘤患者的预后,临床应用前景广阔。Ginestier 等^[12]通过 Aldefluor[®] 分析法将正常乳腺细胞分选成 ALDH1⁺ 和 ALDH1⁻ 两个亚群,将细胞固定后用 ALDH1 单抗染色,发现 ALDH1⁺ 细胞染色,而 ALDH1⁻ 亚群细胞不染色,证实免疫组化技术可用于检测细胞涂片中的 ALDH1⁺ 细胞。免疫染色后在正常乳腺组织切片和体外培养的 MSs 内均发现了 ALDH1⁺ 细胞的存在。同时,Ginestier 等^[12]采用免疫组织化学技术检测了 2 组共 481 例乳腺癌组织标本中 ALDH1 的表达情况,发现 19% ~ 30% 的乳腺癌标本表达 ALDH1,ALDH1⁺ 患者的预后较差,发生远处转移的风险是 ALDH1⁻ 患者的 1.76 倍。

5 结 语

利用 ALDH1 通过 Aldefluor[®] 分析法和免疫组化技术分选和鉴定 SC 和 CSC 的研究已经广泛开展,并取得了一定成果。但是,目前有许多问题尚未解决,如:虽然干/祖细胞具有很高的 ALDH1 活性,但是 ALDH1⁺ 细胞并不全是干/祖细胞,如何从 ALDH1⁺ 细胞中纯化 SC 和 CSC 尚待解决;少数肿瘤细胞中并不含有 ALDH1⁺ 表型细胞,或者含有该表型细胞但不具备 CSC 的特征,其 CSC 标记物有待确定;ALDH1⁺ 细胞与其他分子表型的 SC 和 CSC 之间的关系尚需进一步明确;ALDH1⁺ 细胞在干细胞工程及 CSC 靶向治疗中的应用有待深入研究等。相信在不久的将来,ALDH1 将被用来分选和鉴定更多组织中的 SC 和肿瘤组织中的 CSC,使其成为 SC 和 CSC 研究的得力工具。

[参 考 文 献]

[1] Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(16): 9118-9123.

- [2] Moreb JS. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2008, 3(4): 237-246.
- [3] Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a Functional Marker of Cancer Stem and Progenitor Cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(1): 17-25.
- [4] Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, et al. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells [J]. *Blood*, 1990, 75(10): 1947-1950.
- [5] Jones RJ, Barber JP, Vala MS, et al. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells [J]. *Blood*, 1995, 85(10): 2742-2746.
- [6] Purton LE. Roles of retinoids and retinoic Acid receptors in the regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation [J]. *PPAR Res*, 2007, 2007: 87934.
- [7] Purton LE, Bernstein ID, Collins SJ. All-trans retinoic acid delays the differentiation of primitive hematopoietic precursors (lin-c-kit + Sca-1(+)) while enhancing the terminal maturation of committed granulocyte/monocyte progenitors [J]. *Blood*, 1999, 94(2): 483-495.
- [8] Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(31): 11707-11712.
- [9] Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, et al. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1142-1151.
- [10] Pierre-Louis O, Clay D, de la Grange PB, et al. Dual SP/ALDH functionalities refine the human hematopoietic Lin-CD34⁺ CD38⁻ stem/progenitor cell compartment [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(10): 2552-2562.
- [11] Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells [J]. *Blood*, 2006, 107(5): 2162-2169.
- [12] 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.
- [13] Liu S, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, et al. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(5): 1680-1685.
- [14] Cai J, Cheng A, Luo Y, et al. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells [J]. *J Neurochem*, 2004, 88(1): 212-226.
- [15] Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 975-985.
- [16] Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Transplanted ALDH^{hi} SSClo neural stem cells generate motor neurons and delay disease progression of nmd mice, an animal model of SMARD1 [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(2): 167-187.
- [17] Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(6): 752-760.
- [18] Ran D, Schubert M, Pietsch L, et al. Aldehyde dehydrogenase activity among primary leukemia cells is associated with stem cell features and correlates with adverse clinical outcomes [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(12): 1423-1434.
- [19] Ginestier C, Wicinski J, Cervera N, et al. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(20): 3297-3302.
- [20] 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.
- [21] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(1): 45-55.
- [22] 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.
- [23] Ucar D, Cogle CR, Zucali JR, et al. Aldehyde dehydrogenase activity as a functional marker for lung cancer [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 178(1-3): 48-55.
- [24] Chen YC, Chen YW, Hsu HS, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 385(3): 307-313.
- [25] Clay MR, Tabor M, Owen JH, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase [J]. *Head Neck*, 2010, 32(9): 1195-201.
- [26] Su Y, Qiu Q, Zhang X, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(2): 327-337.
- [27] Ma S, Chan KW, Lee TK, et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(7): 1146-1153.
- [28] Dembinski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26(7): 611-623.
- [收稿日期] 2011 - 08 - 28 [修回日期] 2011 - 10 - 16
- [本文编辑] 韩丹