

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.020

肺癌干细胞的研究进展

Research advancement of lung cancer stem cells

易亭伍 综述; 卢铀 审阅(四川大学华西医院胸部肿瘤科, 四川成都 610041)

[摘要] 肺癌干细胞(lung cancer stem cell, LCSC)是肺癌组织中一小群具有自我更新及分化潜能,并且具有耐药性的特殊细胞。LCSC是目前肺癌研究中的热点。研究者通过对肺癌中CD133阳性细胞侧群(side population, SP)细胞及耐药存活细胞(drug surviving cell, DSC)的研究,证实了LCSC的存在;而乙醛脱氢酶1(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)、八聚体结合转录因子-4(octamer-binding transcription factor 4, Oct-4)及CD44可能是鉴定LCSC的新标志物。Notch、Wnt及Hedgehog信号通路与LCSC的发生及维持关系密切,靶向阻断这些信号通路可以减少肺癌组织中LCSC的比例,可能成为肺癌靶向治疗的新策略。

[关键词] 肺癌干细胞;标志物;信号转导通路

[中图分类号] R734.2;Q279

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)02-0326-04

肿瘤干细胞学说认为,恶性肿瘤中存在极少量的一群细胞,它们具有自我更新及分化潜能等干细胞特征,并对放化疗有抵抗作用,可在免疫抑制动物模型中产生与原发肿瘤相似的异质性肿瘤,这群细胞即是肿瘤干细胞^[1]。目前已有研究^[2-6]认为,肺癌中存在肺癌干细胞(lung cancer stem cell, LCSC),它可能是肺癌复发转移及耐药的根源。因此,特异性鉴定LCSC及针对LCSC的靶向治疗,具有重要的临床潜在价值。本文将对LCSC的发现、LCSC标志物及LCSC相关信号转导通路等研究进展作一综述。

1 LCSC的发现

早在1982年,研究^[2]发现,肺癌中存在一小部分能够在软琼脂克隆实验中形成克隆的细胞群体,其能够在免疫抑制小鼠体内形成与原发肿瘤相似的移植瘤。当时虽未提出肿瘤干细胞的概念,但这一小群细胞与肿瘤干细胞的功能性定义是相吻合的。近年来,很多研究者利用流式细胞术及免疫磁珠分离等技术证明了LCSC的存在。

1996年,Goodell等^[3]在小鼠骨髓中分离出小部分富含干细胞的细胞群体,其可将进入细胞核的荧光染料Hoechst 33342排出胞外,将其命名为侧群(side population, SP)细胞。2007年,Ho等^[4]利用流式细胞仪对6种人类肺癌细胞系(H460、H23、HTB-58、A549、H441、H2170)进行SP细胞的分选,相比于非SP细胞,SP细胞具有更强的在裸鼠皮下形成移植瘤的能力,以及耐受化疗药物的能力,而SP细胞的人类端粒逆转录酶(human telomerase reverse

transcriptase, hTERT)mRNA的表达水平较之非SP细胞升高,hTERT与肿瘤细胞维持其永生性及正常细胞发生恶性变有关,提示SP细胞可能是肿瘤细胞的来源,研究者由此提出SP细胞具有肿瘤干细胞的特征。

2008年,Eramo等^[5]发现,在成人新鲜肺癌组织标本中持续存在CD133阳性细胞,其比例高于正常肺组织,研究者通过流式细胞仪对肺癌组织标本进行无菌分选后,在无血清培养基添加特定生长因子,进行体外培养,发现只有CD133阳性细胞能形成所谓的“肿瘤干细胞球”,并且将其移植到免疫缺陷小鼠皮下,可以形成与原发肿瘤相似的移植肿瘤,符合肿瘤干细胞的功能学定义。

相比于分化的肿瘤细胞对化疗具有不同程度的敏感性,肿瘤干细胞具有高度的耐药性。2008年,Levina等^[6]使用多柔比星、顺铂、依托泊苷对体外培养的肺癌细胞株H460进行处理,1周后耐药存活的细胞(drug surviving cell, DSC)能在无血清培养条件下形成干细胞球,而移植到免疫抑制小鼠体内可形成异质性肿瘤,DSC具有自我更新和分化的潜能,说明DSC具有肿瘤干细胞的特征。此外,DSC高表达CD117、阶段特异性胚胎抗原-3(stage-specific embryonic antigen 3, SSEA-3)及八聚体结合转录因子-4

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30870734, No. 81172131, No. 81101698)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30870734, No. 81172131, No. 81101698)

[作者简介] 易亭伍(1986-),男,四川省乐山市人,硕士生,主要从事肿瘤的放射及生物治疗的研究。E-mail: 21201800@qq.com

[通信作者] 卢铀(LU You, corresponding author), E-mail: radyoulu@hotmail.com

(octamer-binding transcription factor 4, Oct-4) 等干细胞标志物,而 DSC 的上皮细胞标志物角蛋白 8 (cytokeratins 8, CK8)、角蛋白 18 (cytokeratins 18, CK18) 表达的降低进一步说明其未分化状态。

综上,无论是肺癌中的 SP 细胞还是 DSC、CD133 阳性细胞,均具有肿瘤干细胞的特征,该 3 类细胞富集了一定程度的 LCSC,进一步证明了 LCSC 的存在。

2 LCSC 标志物

CD133 及 SP 细胞作为分离 LCSC 的标志物受到了不少肿瘤干细胞研究者的认同,但近来越来越多的学者对其提出了质疑。首先,在一些相关研究中,并非所有的肺癌标本均可检测到 CD133 阳性细胞,提示其敏感性可能有限^[7-8]。而 Meng 等^[9]发现,在 A549 和 H446 两种肺癌细胞株中,CD133 阳性和 CD133 阴性细胞均表现出肿瘤干细胞的特性,提示 CD133 作为 LCSC 标志物的特异性有限。此外,一些学者对于通过 Hoechst 33342 来分离 SP 细胞的方法提出了质疑,因为 Hoechst 33342 是一种 DNA 结合染料,细胞之所以不能将其排出胞外可能与其细胞核受到损伤有关^[10]。因此,越来越多研究者希望寻找到更加特异的 LCSC 标志物,近来醛脱氢酶 1 (aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)、Oct-4、CD44 等越来越受到研究者的关注。

2.1 ALDH1

ALDH 家族广泛分布于人体内多种器官,参与醛类化合物的代谢。近来研究^[11]显示,ALDH1 高表达的肿瘤细胞具有肿瘤干细胞的特性。Jiang 等^[12]通过对肺癌细胞株的研究发现,ALDH1 阳性细胞在多次传代过程中可以分化为 (52 ± 2.6)% 的 ALDH1 阳性细胞和 (48 ± 2.2)% 的 ALDH1 阴性细胞,而 ALDH1 阴性细胞在同样的培养条件下则不能分化为 ALDH 阳性细胞,这提示 ALDH1 阳性细胞在体外培养的过程中可能发生了干细胞特征性的不对称分裂,产生了包含分化成熟的子代和具有干细胞特性的子代细胞。Liang 等^[13]发现,肺癌细胞株 SPC-A1 在无血清培养基添加特定生长因子的条件下进行体外培养,所形成的肿瘤干细胞球,高表达 ALDH1,较之 ALDH1 阴性细胞,ALDH1 阳性细胞具有高度的增殖潜能、侵袭性及成瘤能力,符合肿瘤干细胞的功能学定义。

2.2 Oct-4

Oct-4 是 POU 家族的转录因子,在维持胚胎干细胞和生殖细胞自我更新及多能性中起到关键作

用。Hochedlinger 等^[14]利用强力霉素诱导成年鼠各器官(胃肠道、皮肤等)发生 Oct-4 的异位激活,发现这些部位出现不同程度的异型性变,说明 Oct-4 的激活可能与肿瘤发生有关。Hochedlinger 还发现 Oct-4 的异位表达会导致 β -链蛋白 (β -catenin) 水平的升高,而 Wnt/ β -catenin 通路涉及肿瘤干细胞的产生及肿瘤细胞的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[15]。目前已有研究^[16]通过诱导乳腺癌细胞发生 EMT 来获得乳腺癌干细胞,提出 EMT 与肿瘤干细胞的发生密切相关。Chen 等^[17]的研究发现,肺癌组织中 CD133 阳性细胞的 Oct-4 都明显高于 CD133 阴性细胞,而在利用 RNA 干扰 CD133 阳性细胞的 Oct-4 的表达后,其形成肿瘤干细胞球的能力会明显下降,并有向 CD133 阴性细胞分化的趋势,可见 Oct-4 可能是 LCSC 维持其特性的关键因子。Hu 等^[18]将 Oct-4 作为肿瘤干细胞的标志物,通过 RNA 干扰的方法降低 Oct-4 的表达来研究肿瘤干细胞与其的依存关系,实验发现 RNA 干扰处理后的肿瘤细胞发生不同程度的凋亡,其生长速度也有所降低。

2.3 CD44

CD44 是一种分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白,近来研究^[19]认为其与肿瘤浸润转移关系密切,并对非小细胞肺癌患者的预后评价有关。CD44 目前已经成为分离乳腺癌干细胞的重要标志物之一^[20],近来其在分离 LCSC 中所发挥的作用逐渐受到研究者的重视。Leung 等^[21]利用流式细胞仪对 H1650、H1299、H23、HCC827 等 6 种肺癌细胞株进行了 CD44 阳性细胞的分选研究,发现 CD44 阳性细胞在无血清培养的条件下具有比未分选的细胞更强的形成肿瘤干细胞球的能力,而 CD44 阴性细胞在无血清培养下不能形成肿瘤干细胞球。研究者还发现 CD44 阳性细胞具有对顺铂耐药的特性,这些特性在 CD44 阴性细胞都几乎不能检测到。目前对于 CD44 阳性细胞富集 LCSC 的研究尚浅,CD44 是否为 LCSC 特异性的标志物还有待进一步研究确定。

3 LCSC 相关信号转导通路及其潜在的临床价值

肿瘤干细胞与普通干细胞均具有自我更新及分化的能力,普通干细胞的这种能力是受到多种信号转导通路的调控的,因此研究者提出肿瘤干细胞也受到相似的信号转导通路的调控^[22]。目前发现与 LCSC 关系密切的信号转导通路主要包括 Notch 通路、Wnt 通路和 Hedgehog 通路等。

Notch 通路系统是一种广泛分布于多种细胞表

面的跨膜信号系统,影响发育过程中多种器官的分化、增殖和凋亡。哺乳动物中 Notch 通路具有 4 种受体(Notch 1 ~ Notch 4),当配体(Delta, Jagged)与其接合后,受体发生一系列包括 γ -分泌酶介导的受体裂解等事件,形成活化的胞内区(Notch intracellular domain, NICD),NICD 进入细胞核与 DNA 结合转录因子 CSL 形成异二聚体,诱导下游基因的表达。虽然其下游的转录过程目前尚未完全明确,但已证实其中包括 Hes 家族的合成,Hes 家族被发现参与其下游成神经细胞特异性转移因子(achaete-scute homolog like-1, ASCL1)的合成^[10]。小细胞肺癌组织中 CD133 阳性细胞的成瘤能力的维持依赖 ASCL1 的表达,间接提示 Notch 通路与 LCSC 之间的相关性^[23]。Sullivan 等^[24]发现,利用 γ -分泌酶抑制剂抑制 Notch 通路可以导致肺癌 ALDH 阳性细胞的显著减少,并伴有肿瘤细胞增殖能力的降低,不仅进一步证实了 Notch 通路与 LCSC 之间的依存关系,还提示 Notch 通路可以作为 LCSC 靶向治疗的潜在靶点。

Wnt 信号通路同样参与多种细胞发育过程,并且与多种肿瘤的发生有关。Wnt 信号通路具有多种激活方式,其中经典 Wnt 通路与肿瘤发生的关系最为密切。目前已有很多研究报道 Wnt 通路在肺癌细胞株及人类肺癌组织中异常激活,其下游成分(如 β -catenin, Dvl 等)过度表达^[25-26]。 β -catenin 是经典 Wnt 信号转导通路的关键因子,介导 Wnt 信号从膜至细胞核的转导,其中涉及下游癌基因 c-myc 的表达^[25],而利用 RNA 干扰技术阻断 β -catenin 的表达,可以减慢肺癌细胞的生长^[26]。近来 Wnt 通路被发现参与诱导肿瘤发生 EMT,EMT 被认为是肿瘤细胞从原发灶转移至远隔部位的起始步骤,Wnt 通路参与 EMT 可能与 β -catenin 诱导 E-钙粘蛋白(E-cadherin)的丢失及激活 EMT 相关基因(例如 E-钙粘蛋白抑制基因 SLUG 等)有关^[15]。研究者发现经过顺铂处理后的 A549 细胞株,其 DSC 高表达 β -catenin,而抑制 Wnt 信号通路可以降低 A549 细胞株中 Oct-4 的表达。由于 Oct-4 是 LCSC 的标志物之一,研究者提出 Wnt 信号通路参与调控 LCSC,而靶向抑制 Wnt 信号通路可以消除 LCSC 的作用,可能成为治疗肺癌的新策略^[27]。

Hedgehog(Hh)通路主要由配体 Hedgehog(包括 sonic hedgehog、indian hedgehog 和 desert hedgehog 三种)、跨膜受体 Patched(PTCH)和 Smoothened(SMO),及其下游的转录因子 Gli(Gli1、Gli2 和 Gli3)组成。已有研究^[28]证实,肺癌组织中 Hh 通路

相关成分表达水平增高,并且有研究者发现肺癌细胞株(A549、H2030)在经过转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)诱导发生 EMT 后,其 Gli 的表达明显升高,而通过靶向抑制 Hh 通路后,其 EMT 相关标志物(如 ZEB1 等)表达降低,同时伴有增殖能力及侵袭性的下降,说明 Hh 通路与 EMT 关系密切^[29]。鉴于 EMT 与肿瘤干细胞的相关性^[15],Hh 通路可能在 LCSC 的产生中起到一定的作用。除此之外,Salcido 等^[30]研究发现,小细胞肺癌细胞株中的 SP 细胞过表达 Hh 通路相关基因。人工合成的 Hh 通路抑制剂 GDC-0449 已经成为肿瘤干细胞靶向治疗的热点,Tian 等^[31]发现,GDC-0449 不仅可以抑制肺腺癌细胞株 HCC 及肺小细胞肺癌 H1339 生长,而且显著减少 SP 细胞的比例,由此提出 GDC-0449 阻碍肺癌细胞生长的机制可能与其靶向作用于 LCSC 有关。

4 问题与展望

LCSC 的研究是目前肺癌研究中的热点和难点,由于肿瘤干细胞的高度耐药性,化疗药物在杀死对药物敏感的肿瘤细胞的同时,可能会导致体内肿瘤干细胞的累积,最终可能导致化疗的失败^[6],因此清除肺癌中的 LCSC 可能是治疗肺癌的关键。目前有研究^[32]发现,3 种不同基因类型(Kras 突变不伴 p53 突变、Kras 突变伴 p53 突变、EGFR 突变)的肺腺癌小鼠模型中,其 LCSC 的表型各不相同,由此提出原发肿瘤的基因类型可能是 LCSC 表型的决定因素。因此在针对 LCSC 的靶向治疗研究中,应当把肿瘤的基因类型作为研究中重要的参考标准。

然而目前对于 LCSC 的研究主要停留在细胞水平,而对于 LCSC 的定义主要是从功能性上进行定义,而 LCSC 究竟是来源于正常干细胞的突变还是来源于普通的肺癌细胞,目前尚有争议,这些问题均需要从分子水平对 LCSC 进行深入的研究。其次,目前对于 LCSC 的研究仅仅是将其作为一个孤立的个体进行研究,而 LCSC 与周围微环境之间的关系目前的研究尚浅。另外,目前对于 LCSC 相关信号通路的研究仅仅是单独对其中某一条信号通路进行研究,而没有考虑各条信号通路之间的联系。总之,LCSC 具有巨大的研究潜质,但是目前仍有不少问题尚待解决,有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] Carney DN, Gazdar AF, Bunn PA Jr, et al. Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cells from lung cancer patients [J]. *Stem Cells*, 1982, 1(3): 149-164.
- [3] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(4): 1797-1806.
- [4] Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 4827-4833.
- [5] Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3): 504-514.
- [6] Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, et al. Drug-selected human lung cancer stem cells: Cytokine network, tumorigenic and metastatic properties [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e3077.
- [7] Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small cell lung cancer [J]. *European J Cardio-thorac Surg*, 2009, 36(3): 446-453.
- [8] Li F, Zeng H, Ying K. The combination of stem cell markers CD133 and ABCG2 predicts relapse in stage I non-small cell lung carcinomas [J]. *Med Oncol*, 2010, 28(4): 1458-1462.
- [9] Meng X, Li M, Wang X, et al. Both CD133⁺ and CD133⁻ subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(6): 1040-1046.
- [10] Sullivan JP, Minna JD, Shay JW. Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(1): 61-72.
- [11] Alison MR, Guppy NJ, Lim SM, et al. Finding cancer stem cells: Are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? [J]. *J Pathol*, 2010, 222(4): 335-344.
- [12] 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.
- [13] Liang D, Shi Y. Aldehyde dehydrogenase-1 is a specific marker for stem cells in human lung adenocarcinoma [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 633-639.
- [14] Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues [J]. *Cell*, 2005, 121(3): 465-477.
- [15] Brabletz T, Jung A, Spaderna S, et al. Opinion: Migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression [J]. *Nature*, 2005, 5(9): 744-749.
- [16] Morel AP, Lièvre M, Thomas C, et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2888.
- [17] Chen YC, Hsu HS, Chen YW, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells [J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2637.
- [18] Hu T, Liu S, Breiter DR, et al. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6533-6540.
- [19] Ko YH, Won HS, Jeon EK, et al. Prognostic significance of CD44s expression in resected non-small cell lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2011, doi: 10.1186/1471-2407-11-340.
- [20] 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.
- [21] Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e14062.
- [22] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111.
- [23] Jiang T, Collins BJ, Jin N, et al. Achaete-scute complex homologue 1 regulates tumor-initiating capacity in human small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 845-854.
- [24] Sullivan JP, Spinola M, Dodge M, et al. Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9937-9948.
- [25] Mazieres J, He B, You L, et al. Wnt signaling in lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2005, 222(1): 1-10.
- [26] Uematsu K, He B, You L, et al. Activation of the Wnt pathway in non-small cell lung cancer: Evidence of dishevelled overexpression [J]. *Oncogene*, 2003, 22(46): 7218-7221.
- [27] Teng Y, Wang X, Wang Y, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 392(3): 373-379.
- [28] Huang S, Yang L, An Y, et al. Expression of hedgehog signaling molecules in lung cancer [J]. *Acta Histochemica*, 2011, 113(5): 564-569.
- [29] Maitah MY, Ali S, Ahmad A, et al. Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16068.
- [30] Salcido CD, Larochelle A, Taylor BJ, et al. Molecular characterization of side population cells with cancer stem cell like characteristics in small-cell lung cancer [J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(11): 1636-1644.
- [31] Tian F, Mysliwicz J, Ellwart J, et al. Effects of the Hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 on lung cancer cell lines are mediated by side populations [J]. *Clin Exp Med*, 2012, 12(1): 25-30.
- [32] Curtis SJ, Sinkevicius KW, Li D, et al. Primary tumor genotype is an important determinant in identification of lung cancer propagating cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 127-133.

[收稿日期] 2012-01-03 [修回日期] 2012-04-18

[本文编辑] 韩丹