

文章编号: 1004-0374(2009)05-0720-04

肿瘤干细胞与表观遗传学调控

许英晨, 岳文*, 裴雪涛*

(军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要: 关于恶性肿瘤发生、复发与转移机制的研究由来已久, 但目前的临床治疗方法依然不能克服肿瘤复发与转移的难题, 肿瘤患者的生存率并未得到显著改善。近年来的研究提示肿瘤的起源、复发与转移的真正原因可能是存在于肿瘤内的极少数具有干细胞特性的细胞, 即肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)。与此同时, 越来越多的研究表明, 对于肿瘤干细胞的发生与功能维持, 表观遗传学的调控机制可能发挥着极其重要的作用。该文简要综述目前肿瘤干细胞和表观遗传学相关领域的研究进展, 并对肿瘤干细胞形成及发展过程中表观遗传学的调控作用及机制进行重点介绍。

关键词: 干细胞; 肿瘤; 肿瘤干细胞; 表观遗传学

中图分类号: Q354; R730.231 **文献标识码:** A

Epigenetic regulation of cancer stem cells

XU Ying-chen, YUE Wen*, PEI Xue-tao*

(Stem Cell and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract: A long-standing goal of researchers is to understand how tumor origin and development and which tumor cells must be eliminated for treatment to be successful. Recent studies have suggested that a subpopulation of tumor cells possess distinct stem cell properties can proliferate extensively to form new tumors and are the real reason for tumor origin, recur and metastasis. At the same time, more and more studies have suggested that epigenetic regulation may play important roles in cancer stem cell development. Here we review the recent literature on cancer stem cells and epigenetics, as well as highlight the research progresses on epigenetics regulation on cancer stem cells.

Key words: stem cell; tumor; cancer stem cells; epigenetics

1 肿瘤干细胞

肿瘤是全球范围内危害程度最大的疾病, 严重影响着人们的健康和生活, 世界上每年因罹患肿瘤而丧失生命的人约占总死亡人数的五分之一。随着科学家们对原发肿瘤的生长、浸润以及组织微环境等因素研究的逐步深入, 肿瘤的诊断与治疗方法也取得了很大进展, 但目前的临床治疗方法还是不能解决肿瘤复发与转移的难题, 恶性肿瘤的治愈率仍很大程度上取决于肿瘤的组织学类型和临床分期, 肿瘤分化程度低的或者发生多器官转移的患者生存率极低。近年来, 越来越多的研究提示肿瘤的起源、复发与转移的真正原因可能是存在于肿瘤内的极少数具有干细胞特性的细胞, 即肿瘤干细胞

(cancer stem cells, CSC), 或称肿瘤始动细胞(tumor-initiating cells, TICs)。由于传统的肿瘤治疗不能针对肿瘤干细胞, 所以尽管可以在一定程度上抑制肿瘤生长, 但不能从根本上解决肿瘤转移与复发的问题^[1, 2]。

肿瘤干细胞是存在于肿瘤细胞中的一个具有高度自我更新和增殖能力并具有一定分化潜能的细胞

收稿日期: 2009-08-17

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2006AA02A107); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2009CB941100; 2009CB521702)

*通讯作者: 岳文, E-mail: wenyue26@yahoo.com; 裴雪涛, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

亚群。1994年, 科学家们首先从人急性粒细胞性白血病中分离出了具有以上特性的人白血病干细胞(leukemic stem cell, LSC)^[3]; 2003年又分离纯化出实体肿瘤干细胞——乳腺肿瘤干细胞^[4]。到目前为止, 已有脑肿瘤、前列腺肿瘤、肺癌、肝细胞癌、胃肠肿瘤、胰腺肿瘤等多种肿瘤干细胞得到分离和鉴定^[5-10]。具有干细胞特性的肿瘤干细胞具有高度自我更新能力, 是肿瘤发生、维持肿瘤细胞生长和参与肿瘤转移与复发的关键因素^[8, 11]。2005年发表在Nature上的研究表明, 能够有效缓解慢性粒细胞性白血病的药物Imatinib之所以停药后病情出现反跳, 其原因在于Imatinib虽然可以有效清除分化的白血病细胞, 但对白血病干细胞的生存并无影响^[12]。结果提示在肿瘤组织中, 并不是所有的肿瘤细胞都具有增殖、分化并产生新肿瘤的能力, 而是仅限于其中极少部分具有干细胞特性的肿瘤细胞才有这种能力, 只有针对肿瘤干细胞进行靶向治疗可能才是遏止肿瘤复发与转移的关键。

关于肿瘤干细胞的来源目前还存在争议, 科学家们认为存在以下两种可能性^[13, 14]: 其一是正常干/祖细胞发生某种突变而转化为肿瘤干细胞; 其二是分化细胞在某种机制的调控下经过重编程的过程进行去分化而转变为肿瘤干细胞。肿瘤干细胞的发生与维持机制从肿瘤干细胞这一概念提出之日起就成为科学家们高度关注的问题, 而在干细胞发育分化以及肿瘤发生发展过程中扮演着重要角色的表观遗传学被证明可能在肿瘤干细胞的发生与维持中扮演着重要角色。

2 表观遗传学与肿瘤的发生发展

表观遗传是在不改变基因组DNA序列的前提下, 通过DNA甲基化(methylation)、组蛋白修饰、染色体重塑以及非编码RNA调控等途径来影响和调节基因的表达和功能的发挥, 并且这种改变可以在细胞增殖和个体发育过程中发生稳定传递^[15]。近几年随着生命科学研究的不断深入, 表观遗传学的研究手段也得到了日新月异的发展, 与之相关的研究领域日益拓宽, 其在肿瘤发生与发展中的研究更是取得突破性的进展。

DNA甲基化是发生在CG位点的化学修饰, S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体, 在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMTs)的催化下, 胞嘧啶转变为5-甲基胞嘧啶。DNA甲基化是基因组DNA的一种主要表观遗传修饰方式, 也是调节基因功能

的重要手段。体内DNA甲基化状态有三种: 第一种是持续的甲基化状态, 如管家基因; 第二种是诱导的去甲基化状态, 如发育阶段的一些基因; 第三种是高度甲基化状态, 如女性的一条缢缩的X染色体。在基因组内, CG位点存在形式一般有两种, 一种分散于DNA中, 平时多以甲基化形式存在; 另一种成簇存在, 长度通常在1-2 kb, 称为CpG岛(CpG island)。CpG岛通常位于转录调控区附近, 在正常细胞中常处于非甲基化形式, 但是当肿瘤发生时, 在某些因子的作用下, CpG岛的DNA可能由非甲基化转变为高甲基化(hypermethylation), 而启动子区域的DNA高甲基化则会通过进一步影响转录因子结合、募集DNA甲基化结合蛋白以及改变组蛋白乙酰化的状态等因素造成其调控基因的表达沉默。目前已经发现许多重要的抑癌基因由于这种调控机制而表达丧失, 其中包括为我们大家所熟悉的*PI6*、*RASSF1A* (RAS association domain family protein 1A) 以及 *MGMT* (methylguanine-DNA methyltransferase) 等基因。除此之外, 越来越多肿瘤相关基因被发现受表观遗传学调控而在肿瘤发生与发展中下调或沉默^[16, 17]。2004年起, 我们曾系统筛选肿瘤发生发展过程中由于DNA甲基化而沉默的基因: *EFEMP1*、*Fibulin5* 等基因被发现在肿瘤的发生发展中由于DNA高甲基化而沉默, 并且进一步的研究表明这些基因分别在肿瘤的发生与转移中发挥极其重要的作用^[18-20]。除此之外, 关于DNA甲基化与肿瘤的关系方面的研究, 值得一提的还包括基因组内一些DNA重复序列, 如微卫星DNA、Alu顺序等, 如果发生广泛的低甲基化也会造成基因组DNA的不稳定, 最终也可能会导致肿瘤的发生, 这在肝细胞癌和尿道上皮细胞癌^[21, 22]等多种肿瘤中均有发现。

在肿瘤细胞的表观遗传学调控中, 目前越来越多的研究还表明, 非编码RNA的调控因素在肿瘤的发生发展中具有至关重要的作用。非编码RNA参与生命活动的多个步骤, 包括基因转录、RNA编辑、mRNA的稳定和翻译等。目前非编码RNA中的microRNA被越来越多的研究证明参与肿瘤的发生与转移。有研究证明, 患有B细胞慢性淋巴型白血病(CLL)的患者常有miR-15a和miR-16-1的表达下调或缺失。Weinberg研究小组^[23]证明在乳腺癌中, miR-31的低表达与肿瘤转移的发生率呈负相关, miR-31可以通过抑制RhoA的表达发挥其抑制肿瘤细胞转移的

作用,提示microRNA有可能作为肿瘤治疗的靶标。而Kota等^[24] 2009年发表在Cell上的文章则发现miR-26a的表达可以通过调节cyclins D2等靶基因影响对肿瘤细胞的周期,在肝细胞肝癌的动物模型中应用miR-26a的AAV (adeno-associated virus) 药物可以引发肿瘤细胞的特异性凋亡,但并不对正常细胞造成影响,提示了类似于miR-26a这种在正常组织中表达而在肿瘤细胞下调的microRNA作为药物用于肿瘤治疗的巨大潜力。

除此之外,组蛋白修饰、染色体重塑等表观遗传学的改变也被发现参与肿瘤的调控。例如组蛋白的乙酰化状态与肿瘤的关系极为密切,参与组蛋白乙酰化的组蛋白乙酰基转移酶(HATs)和组蛋白去乙酰化酶(HDACs)的突变在多种肿瘤的发生中具有重要作用^[25,26]。

3 肿瘤干细胞的表观遗传学调控

对于干细胞的发育与分化,学者们认为表观遗传学在其中的作用与遗传学相比,可能具有更为显著的意义。基因启动子区域甲基化、组蛋白乙酰化、microRNA表达等因素,单独或联合作用参与干细胞发育与分化等重要相关基因的表达调控。例如,在具有多向分化潜能的干细胞中,决定细胞分化的基因因启动子区域高甲基化而沉默,随着干细胞向成熟细胞的分化,这些基因的启动子区域发生去甲基化,从而导致相应的转录因子募集,基因开始表达;与此相反的是,许多在干细胞早期发育阶段表达的印迹基因或分化潜能相关基因却由于DNA的高甲基化等原因在成熟体细胞中向沉默转归。在体细胞重编程过程中,以上的表观遗传学调控机制更为关键,有研究表明由成纤维细胞到诱导性多能干细胞(iPS细胞),*Oct4*和*Naong*基因的启动子DNA区域去甲基化状态的改变至关重要。

如前所述,肿瘤干细胞可能来源于正常干/祖细胞,也可能来源于重编程后的分化细胞,表观遗传学在干细胞发育以及体细胞重编程中的重要作用提示其可能在肿瘤干细胞发生与发展中发挥作用。宋尔卫教授与哈佛医学院科学家合作研究表明,与普通肿瘤细胞相比,在乳腺癌肿瘤干细胞中,miRNA *let-7*的水平明显降低,miRNA *let-7*通过影响不同的靶基因对肿瘤干细胞的自我更新和分化能力进行调控。外源性表达miRNA *let-7*可以明显降低肿瘤细胞中未分化细胞的比例,抑制肿瘤细胞的增殖和转移^[27]。其实,除了microRNA外,DNA

甲基化和与之相关的组蛋白乙酰化等表观遗传学修饰亦被证明参与了肿瘤干细胞的发生与干性维持。2008年Lee等^[28]的研究表明,与正常的神经干细胞相比,恶性胶质细胞瘤干细胞的骨形态发生蛋白受体1B (bone morphogenetic protein receptor 1B, BMPR1B) 的表达因其启动子区域的DNA高甲基化而沉默,从而影响BMP和CNTF介导的神经干细胞向星形细胞分化的途径;而外源性BMP1B的表达可以增加胶质瘤肿瘤干细胞的分化能力并降低其成瘤性。

另外,Baba等^[29]从卵巢癌细胞中分选出以CD133分子作为标志物的卵巢癌干细胞,进一步的研究发现,*CD133*基因的转录受组蛋白修饰和启动子甲基化控制。CD133⁻卵巢癌细胞用DNA甲基转移酶和组蛋白去乙酰化酶抑制剂处理后发现细胞中有CD133蛋白表达,并且其P2启动子的DNA甲基化程度与CD133蛋白的转录呈负相关性,CD133⁺细胞的子代细胞中CD133⁻细胞亚群的*CD133*基因P2启动子甲基化增加,而CD133⁺细胞亚群,该启动子很少甲基化或者未甲基化。

4 问题与展望

肿瘤干细胞的起源以及肿瘤的最终形成是一个非常复杂的过程,涉及到体内一系列因素和自我保护机制的改变。表观遗传修饰在肿瘤形成中的作用毋庸置疑,而且一些表观遗传学的原理和方法已经在肿瘤的预防、诊断和治疗中起到实际的指导意义。比如在肿瘤的诊断方面,由于多数肿瘤都有特异性的CpG岛高甲基化现象,所以,应用甲基化特异性PCR检测患者的体液和活组织内的细胞的甲基化表达情况,可以作为肿瘤诊断的有力工具;在肿瘤治疗方面,利用DNMT和HDAC抑制剂使甲基化的抑癌基因去甲基化、启动子区去乙酰化的组蛋白重新乙酰化,从而恢复某些抑癌基因的表达和功能,发挥治疗癌症的作用。到目前为止,DNMT和HDAC抑制剂都有产品上市。DNMT抑制剂Vidaza和Dacogen(商品名)用于骨髓增生异常综合征(MDS)的治疗,HDAC抑制剂vorinostat用于皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)的治疗。还有很多天然或合成的HDAC抑制剂,如belinostat (PXD101)等已进入临床研究^[30]。那么,如果能够明确在肿瘤发生发展中起关键作用的肿瘤干细胞的表观遗传学的调控机制,无疑将对肿瘤的防治具有重要意义。

但是对于肿瘤干细胞的表观遗传学的调控,目

前还存在很多尚待解决的问题, 例如: 个别种类的肿瘤干细胞的表面标志目前尚未全部清楚; 表观遗传修饰导致肿瘤干细胞形成的直接证据还有待于进一步验证; 包括DNA甲基化、microRNA等因素在不同肿瘤干细胞的发生和维持中的作用及其调控机制还需要进一步的探讨与明确; 如何利用表观遗传学的改变获得针对肿瘤干细胞特异性的治疗靶标, 等等。以上问题的回答将有助于明确表观遗传修饰在肿瘤干细胞形成过程中的作用机制, 就使我们能够有的放矢的对可能发生肿瘤的靶点进行精确的阻断, 从而从根本上遏制肿瘤的发生、复发与转移。我们有理由相信, 肿瘤干细胞的表观遗传学调控研究将为揭开肿瘤形成的奥秘开辟一条新的道路, 并将为肿瘤的靶向治疗奠定更坚实的基础。

[参 考 文 献]

- [1] Li F, Tiede B, Massagué J, et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res*, 2007, 17(1):3-14
- [2] Mimeault M, Batra SK. Functions of tumorigenic and migrating cancer progenitor cells in cancer progression and metastasis and their therapeutic implications. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(1):203-14
- [3] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 1994, 367(6464):645-8
- [4] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7):3983-8
- [5] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004, 432(7015):396-401
- [6] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, 2005, 65(23):10946-51
- [7] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 2005, 121(6):823-35
- [8] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*, 2008, 13(2):153-66
- [9] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon cancer-initiating cells. *Nature*, 2007, 445(7123):111-5
- [10] Hermann PC, Huber SL, Tanja H. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3):313-23
- [11] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 2007, 445(7123):106-10
- [12] Zhao C, Chen A, Jamieson CH, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*, 2009, 458(7239):776-9
- [13] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859):105-11
- [14] Sell S, Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest*, 1994, 70(1):6-22
- [15] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003, 33(Suppl):245-54
- [16] Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004, 429(6990):457-63
- [17] Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 2007, 447(7143):425-32
- [18] Yue W, Sun Q, Landreneau R, et al. Fibulin-5 suppresses lung cancer invasion by inhibiting MMP-7 expression. *Cancer Res*, 2009, 69(15):6339-46
- [19] Yue W, Sun Q, Dacic S, et al. Downregulation of Dkk3 activates β -catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis*, 2008, 29(1):84-92
- [20] Yue W, Dacic S, Sun Q, et al. Frequent inactivation of RAMP2, EFEMP1 and dutt1 in lung cancer by promoter hypermethylation. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(15):4336-44
- [21] Wong N, Lam WC, Lai PB, et al. Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*, 2001, 159(2):465-71
- [22] Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, et al. DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J Urol*, 2005, 173(1):243-6
- [23] Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell*, 2009, 137(6):1032-46
- [24] Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*, 2009, 137(6):1005-17
- [25] Gibbons RJ. Histone modifying and chromatin remodelling enzymes in cancer and dysplastic syndromes. *Hum Mol Genet*, 2005, 14:R85-92
- [26] Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*, 2005, 37(4):391-400
- [27] Yu F, Yao H, Zhu P, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 2007, 131(6):1109-23
- [28] Lee J, Son MJ, Woolard K, et al. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell*, 2008, 13(1):69-80
- [29] Baba T, Convery PA, Matsumura N, et al. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133⁺ ovarian cancer cells. *Oncogene*, 2009, 28(2):209-18
- [30] Gimsing P, Hansen M, Knudsen LM, et al. A phase I clinical trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) in patients with advanced haematological neoplasia. *Eur J Haematol*, 2008, 81(3):170-6