

文章编号: 1004-0374(2010)05-0444-05

CD44⁺CD24^{-/low} 与 ALDH1⁺ 作为乳腺癌干细胞标志物之异同

韩明利¹, 吴诚义^{1*}, 王艺梦²

(1 重庆医科大学附属第一医院内分泌外科, 重庆 400016; 2 重庆医科大学附属第一医院急诊科, 重庆 400016)

摘要: 越来越多的研究表明, CD44⁺CD24^{-/low} 与 ALDH1⁺ 都是乳腺癌干细胞标志物。CD44⁺CD24^{-/low} 细胞与 ALDH1⁺ 细胞具有很多相同的性质, 但又有不同的性质和特点。该文主要就 CD44⁺CD24^{-/low} 与 ALDH1⁺ 之间的相同点、两者在乳腺癌干细胞特性方面的差异及其与乳腺癌基因亚型、预后、转移和耐药之间的不同关系等方面作一综述。

关键词: CD44; CD24; ALDH1; 乳腺癌; 肿瘤干细胞

中图分类号: R737.9; Q813 **文献标识码:** A

A comparison between CD44⁺CD24^{-/low} and ALDH1⁺ as the markers of breast cancer stem cells

HAN Ming-li¹, WU Cheng-yi^{1*}, WANG Yi-meng²

(1 Department of Endocrine Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2 Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Breast cancer cells that express CD44⁺CD24^{-/low} have been described as cancer stem cells (CSCs). Breast cancer cells expressing elevated levels of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) are also described as CSCs with ALDH1⁺CD44⁺CD24^{-/low} subpopulation displaying highest tumorigenic potential in NOD/SCID models. CD44⁺CD24^{-/low} subpopulation and ALDH1⁺ subpopulation have many similarities, and also have many different properties and characteristics. Herein, we review and compare the available data reporting utilization of CD44⁺CD24^{-/low} and ALDH1⁺ as the markers of breast cancer stem cells.

Key words: CD44; CD24; aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1); breast cancer; cancer stem cells (CSCs)

实体肿瘤(包括乳腺癌)内有少数肿瘤细胞具有自我更新能力、多向分化能力以及强大的体内成瘤能力等“干性(stemness)”,被称为“肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)”。CSCs的分选是其研究的关键之一,细胞表面标志物的表达被广泛应用于CSCs分选。在乳腺癌干细胞的研究中,CD44⁺CD24^{-/low}与ALDH1⁺都已被公认为乳腺癌干细胞标志物^[1-12]。两者既有共同点,又有显著的差异之处。现就CD44⁺CD24^{-/low}与ALDH1⁺作为乳腺癌干细胞标志物之异同作一综述。

1 CD44⁺CD24^{-/low} 与 ALDH1⁺ 是乳腺癌干细胞标志物

1.1 CD44⁺CD24^{-/low}作为乳腺癌干细胞标志物

2003年,Al-Hajj等^[1]最先分离出人“乳腺癌干细胞”,这为实体肿瘤内存在CSCs提供了最直接的证据。他们将8例癌性胸水和1例原发病灶的标本制成单细胞悬液,根据4种细胞表面标志物(黏附

收稿日期: 2009-11-17; 修回日期: 2009-11-26

*通讯作者: E-mail: wuchengyi1192@163.com

分子CD44和CD24,以及乳腺癌/卵巢癌特异性标志物B38.1和上皮特异性抗原(ESA)的表达将乳腺癌细胞进行分类,并使用谱系标志Lin⁻来排除非乳腺癌细胞。然后,将不同的细胞亚群以不同数目注射到NOD/SCID小鼠的乳腺脂肪垫,以说明只有乳腺癌干细胞具有生成所有乳腺癌细胞亚群的能力。结果显示,所有注射 2×10^5 个CD44⁺B38.1⁺CD24^{-/low}细胞的小鼠在12周内均生成可触及的肿瘤,而注射 8×10^5 个CD44⁻或B38.1⁻细胞的小鼠未见肿瘤生成;Lin⁻ESA⁺CD44⁺CD24^{-/low}细胞,约占乳腺癌细胞总数的2%,但注射200个此表型细胞在NOD/SCID鼠体内经5~6个月就能形成约1 cm大小的肿瘤,而1万个其他表型细胞也不能或极少产生肿瘤,其成瘤能力约是未分类细胞的50倍;ESA⁺CD44⁺CD24^{-/low}细胞可以在小鼠体内连续传代,每次生成的新肿瘤都与来源肿瘤一样含有各种细胞表型的肿瘤细胞,恢复了其不均一性,证实了ESA⁺CD44⁺CD24^{-/low}细胞具有自我更新和多向分化的能力。目前,具有CD44⁺CD24^{-/low}表型的乳腺癌细胞已经被公认为乳腺癌干细胞^[1-7]。

1.2 ALDH1⁺作为乳腺癌干细胞标志物

2007年,Ginestier等^[4]发现乳腺癌组织中ALDH1⁺细胞也具有CSCs特性。他们将577份乳腺癌组织标本分为U.M组和I.P.C组,两组共有481例标本(U.M组136例,I.P.C组345例)通过免疫组织化学技术进行了ALDH1检测,结果U.M组有24例(18%)表达ALDH1;I.P.C组有102例(30%)表达ALDH1。ALDH1⁺乳腺癌细胞只占乳腺癌细胞总数的5%,但具有自我更新、少数细胞成瘤以及多向分化的能力。他们用ALDH1⁺细胞进行成瘤实验,只用500个ALDH1⁺细胞就能形成肿瘤,而即使用5万个ALDH1⁻细胞也不能形成肿瘤,说明ALDH1⁺细胞具有很高的成瘤能力。上述研究结果提示ALDH1⁺细胞是乳腺癌干细胞,ALDH1⁺是乳腺癌干细胞的标志物。迄今ALDH1⁺也被公认为乳腺癌干细胞标志物^[4-12]。

2 CD44⁺CD24^{-/low}与ALDH1⁺的相同点

乳腺癌干细胞在乳腺癌的发生、发展和转移中发挥着至关重要的作用,而且是肿瘤逃避常规治疗导致最终复发的根源。CD44⁺CD24^{-/low}与ALDH1⁺的检测都能从乳腺癌组织中分离出乳腺癌干细胞,兼之检测手段均多种多样(免疫组织化学技术、western印迹法、流式细胞分析技术和显微荧光技术等),

使得它们都成为乳腺癌干细胞检测和分选的重要工具。

Ginestier等^[4]利用CD44⁺CD24^{-/low}与ALDH1⁺的联合检测发现能在小鼠体内成瘤的乳腺癌细胞均是ALDH1⁺细胞,ALDH1⁺CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌细胞只需20个就能形成肿瘤,其成瘤性最高;ALDH1⁺/non-CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌细胞需要1500个才能形成肿瘤,他们认为此表型细胞亚群可能含有具有有限增殖潜能的祖细胞;而ALDH1⁻CD44⁺CD24^{-/low}则不能成瘤。这就意味着不是所有的CD44⁺CD24^{-/low}细胞都是CSCs,也不是所有的ALDH1⁺细胞都是乳腺癌干细胞。即CD44⁺CD24^{-/low}与ALDH1⁺乳腺癌干细胞亚群仍具有异质性。事实上,Crocker等^[6]已经使用CD44、CD24和CD133将ALDH1⁺乳腺癌干细胞进一步分类,发现ALDH1⁺CD44⁺CD24^{-/low}和ALDH1⁺CD44⁺CD133⁺乳腺癌细胞显示出最大的致瘤性和转移潜能。这是首次将既定标志物获得的CSCs使用另外的标志物进一步划分为转移性细胞亚群和不转移性细胞亚群的研究^[13]。由于ALDH1⁺CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌细胞是迄今为止成瘤能力最高的细胞亚群,并能克服与异种器官移植相关的许多障碍^[5],因此,Balicki^[5]认为ALDH1⁺与CD44⁺CD24^{-/low}相结合是乳腺癌干细胞研究领域的一个里程碑。

3 CD44⁺CD24^{-/low}与ALDH1⁺的不同点

3.1 CSCs特性方面的差异

分选CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌干细胞需要使用多个标志物(CD44、CD24、B38.1、ESA等),而分选ALDH1⁺乳腺癌干细胞只需使用单个标志物(ALDH1),所以与CD44⁺CD24^{-/low}相比,ALDH1⁺作为乳腺癌干细胞标志物更简便易行。

CD44⁺是一个CSCs通用标志物(common marker),而CD44⁺CD24^{-/low}作为CSCs标志物则具有组织特异性^[13]。例如,具有自我更新、多向分化以及无限增殖能力等“干性”的胰腺癌细胞表达CD44⁺CD24⁺ESA⁺^[14],而不是像乳腺癌干细胞一样表达CD44⁺CD24^{-/low}。与CD44⁺CD24^{-/low}不同,ALDH1⁺被认为是乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、眼癌、结直肠癌干细胞的通用标志物^[4,14-19]。然而,在转基因小鼠中,ALDH1表达缺失并不影响造血过程和造血干细胞的功能以及ALDEFLUOR染色^[20],究其原因可能是其他ALDH同工酶(特别是细胞质同工酶)对维持造血干细胞功能和ALDEFLUOR染色起作用^[13]。

3.2 与基因亚型之间的相关性差异

不同基因亚型乳腺癌的乳腺癌干细胞群体可能不一样,从而造成了不同基因亚型乳腺癌基因表达、侵袭、转移、治疗以及预后的差异。多数研究认为,CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌干细胞与basal-like型乳腺癌密切相关^[7,21]。basal-like型乳腺癌可进一步分为basal-like A型和basal-like B型,basal-like B型更多表达间叶细胞样标志物^[22]。研究表明,CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌干细胞与basal-like B型乳腺癌密切相关,并且能通过相关基因诱导上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)来显示其癌细胞表型^[23]。basal-like型乳腺癌细胞诱导EMT的相关基因可以使non-CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌上皮细胞表达CD44⁺CD24^{-/low}^[7,24]。HER2过表达型乳腺癌细胞很少表达CD44⁺CD24^{-/low},主要以表达CD24⁺为主^[21]。而ALDH1⁺表型乳腺癌干细胞与basal-like型以及HER2过表达型乳腺癌均相关^[4,5]。HER2过表达能增加ALDH1⁺表型乳腺癌干细胞的百分比,但这种表型乳腺癌干细胞比例增加与ER表达无关^[25]。

3.3 与乳腺癌预后、转移以及耐药之间的相关性差异

CD44⁺CD24^{-/low}和ALDH1⁺与乳腺癌预后、转移以及耐药之间的相关性目前并不十分明确。Liu等^[3]通过分析Lin⁻ESA⁺CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌干细胞亚群与正常乳腺上皮细胞亚群的基因谱差异,发现了与生长、发育、分化、代谢和凋亡等相关的186个基因,称之为“侵袭性基因信号(invasiveness gene signature, IGS)”。他们把284例已给予化疗患者分为IGS⁻组(60例)和IGS⁺组(224例),前者13%发生了转移,10年无转移率为81%;后者41%发生了转移,10年无转移率为57%;把185例未给予化疗患者同样分为IGS⁻组(42例)和IGS⁺组(143例),前者10年复发率为12%;后者10年复发率为43%。此结果表明,与CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌干细胞有关的IGS表达对于判定乳腺癌患者能否从化疗中受益具有指导意义。他们还发现IGS与乳腺癌患者的无转移生存率和总生存率明显相关($P < 0.001$),并且IGS是独立的预后因子,其表达程度高的乳腺癌患者预后较差。Sheridan等^[23]对13株乳腺癌细胞株研究发现,CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌干细胞比例高的细胞株较其比例低的细胞株更高表达促侵袭相关基因,体外侵袭试验也提示侵袭能力更强。Abraham等^[26]却发现大多数情况下,石蜡包埋肿瘤组织标本中的CD44⁺CD24^{-/low}细胞少于10%,这种表型既不

与临床病理特征相关,也不与临床结果(无事件生存率和总生存率)相关,但可能与远处转移相关。值得一提的是,Mylona等^[27]发现CD44⁺CD24^{-/low}乳腺癌干细胞与淋巴结转移呈负相关($P = 0.019$),并和临床分期负相关($P = 0.068$)。Balic等^[28]研究发现,在50例早期乳腺癌患者骨髓标本中,72%的散播肿瘤细胞(disseminated tumor cells, DTCs)表达CD44⁺CD24^{-/low};而在原发肿瘤组织标本中,CD44⁺CD24^{-/low}的表达还不到10%。

Charafe-Jauffret等^[13]认为即使CD44⁺CD24^{-/low}是与basal-like型乳腺癌相关,或作为转移的第一步在散播肿瘤细胞中表达,但与无病生存率、无复发生存率、无转移生存率或总体生存率等临床结果可能无相关性;即使CD44⁺CD24^{-/low}是分选乳腺癌干细胞的有价值标志物,却不能广泛应用于临床。正如Dontu等^[29]指出,CD44⁺CD24^{-/low}作为乳腺癌干细胞标志物可能引起一系列重要问题,如CD44⁺CD24^{-/low}表型是否只在部分乳腺癌组织中与CSCs相关,主要是basal-like型或BRCA1相关性乳腺癌?不包含CD44⁺CD24^{-/low}细胞的乳腺癌是否由不同类别的CSCs引起?如果上一个问题的回答是肯定的,那么不表达CD44⁺CD24^{-/low}的CSCs是否有不同的来源?难道说CD44⁺CD24^{-/low}是一个动态的表型,如果其丧失,还可以通过遗传基因和环境的变化在乳腺癌进展过程中重新获得?因此,CD44⁺CD24^{-/low}的临床实际应用会出现意想不到的困难^[13]。

ALDH1⁺乳腺癌干细胞对化疗药物耐药,并与乳腺癌患者差的预后密切相关^[11]。为了验证ALDH1⁺乳腺癌干细胞对化疗的耐药性,Tanei等^[30]通过免疫组织化学技术检测了108例乳腺癌患者新辅助化疗前后肿瘤组织标本的ALDH1表达,发现ALDH1⁺乳腺癌患者病理完全缓解率显著低于ALDH1⁻患者;在78例没有取得病理完全缓解的患者中,9例患者的ALDH1⁺细胞比例在新辅助化疗后显著增加,其中3例由0增加到1⁺,2例由1⁺增加到2⁺,2例由1⁺增加到3⁺,2例由2⁺增加到3⁺,提示ALDH1⁺与乳腺癌化疗耐药性相关。他们还发现CD44⁺CD24^{-/low}的乳腺癌干细胞没有表现出显著性耐药,认为如果根据化疗耐药性相比较,ALDH1⁺是比CD44⁺CD24^{-/low}更好的乳腺癌干细胞标志物。Ginestier等^[4]通过5年总体生存率分析发现ALDH1⁺与乳腺癌患者差的预后正相关,并且是独立的预后因子,相对于ALDH1⁻患者,ALDH1⁺患者的死亡相对危险度为1.76。Morimoto等^[9]发现ALDH1⁺是乳腺癌生物学侵袭性行为的显

型,与ER⁻、PR⁻、HER2⁺、Ki67⁺和TOP2A⁺均正相关;但他们通过Cox比例风险模型分析后认为ALDH1不是独立的预后因子。转移是影响肿瘤患者预后的重要指标之一,转移潜能的大小是评价肿瘤患者预后的关键。Crocker等^[6]使用流式细胞技术检测了4株不同的人乳腺癌细胞株(MDAMB-435细胞株、MDA-MB-231细胞株、MDA-MB-468细胞株和MCF-7细胞株)的干细胞标志物ALDH1⁺和CD44⁺CD24^{-/low}的表达后发现:具有乳腺癌干细胞特征的细胞亚群(ALDH1⁺/CD44⁺CD24^{-/low})存在于除MCF-7之外所有细胞株;ALDH1^{high}CD44⁺CD24^{-/low}细胞比ALDH1^{low}CD44^{-/low}细胞表现较高的增殖能力、克隆形成能力、黏附能力、转移能力以及侵袭能力。这些表明具有乳腺癌干细胞“干性”的ALDH1^{high}CD44⁺CD24^{-/low}细胞是人乳腺癌侵袭和转移的重要因素。Charafe-Jauffret等^[8]通过异种移植的NOD/SCID小鼠脂肪垫标本的HE染色证实ALDH1⁺细胞形成的肿瘤主要含有恶性细胞,而ALDH1⁻细胞注射部位主要含有基底细胞、凋亡细胞和鼠源组织细胞。他们认为ALDH1⁺能使乳腺癌的侵袭性和转移潜能增加,并且发现IL-8能促进其自我更新、侵袭能力及趋化现象。Ginestier等^[12]利用乳腺球形成实验,证明类视黄醇信号能调控ALDH1⁺乳腺癌干细胞的自我更新和多向分化。利用基因集关联分析(GSEA)证明类视黄醇信号通路能调控乳腺癌干细胞生物学活性,其抑制剂可能为靶向ALDH1⁺乳腺癌干细胞提供新的治疗方法。

4 结语

总之,CD44⁺CD24^{-/low}和ALDH1⁺都是目前分离乳腺癌干细胞的重要工具,有助于推动我们缩短CSCs寿命的各项研究,也为今后的动物模型研究打下坚实的基础,为将来乳腺癌的新型预防和个体化疗法提供了光明前景。两者相比,ALDH1⁺在诸多方面更具有优越性。两者的结合更是CSCs研究领域的一个里程碑,为使用标志物组合进行治疗性应用的CSCs研究开辟了新天地。

[参 考 文 献]

- [1] 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
- [2] Creighton CJ, Li X, Landis M, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(33): 13820-5
- [3] Liu R, Wang X, Chen GY, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med*, 2007, 356(3): 217-26
- [4] 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. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 555-67
- [5] Balicki D. Moving forward in human mammary stem cell biology and breast cancer prognostication using ALDH1. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 485-7
- [6] Crocker 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 Cell Mol Med*, 2009, 13: 2236-52
- [7] Nakshatri H, Srour EF, Badve S. Breast cancer stem cells and intrinsic subtypes: controversies rage on. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2009, 4(1): 50-60
- [8] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1302-13
- [9] Morimoto K, Kim SJ, Tanei T, et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci*, 2009, 100(6): 1062-8
- [10] Aktas B, Tewes M, Fehm T, et al. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(4): R46
- [11] Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 2009, 15(12): 4234-41
- [12] Ginestier C, Wicinski J, Cervera N, et al. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle*, 2009, 8(20): 3297-302
- [13] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer*, 2009, 9: 202
- [14] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1030-7
- [15] 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 385(3): 307-13
- [16] Jiang F, Qiu Q, Khanna A, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(3): 330-8
- [17] Kim H, Lapointe J, Kaygusuz G, et al. The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res*, 2005, 65(18): 8118-24
- [18] Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, et al. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis*, 2005, 11: 729-37
- [19] Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon

- tumorigenesis. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3382-9
- [20] Levi BP, Yilmaz OH, Duester G, et al. Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems. *Blood*, 2009, 113(8): 1670-80
- [21] Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, et al. The CD44⁺/CD24⁻ phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(3): R53
- [22] Neve RM, Chin K, Fridlyand J, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 2006, 10(6): 515-27
- [23] Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, et al. CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 2006, 8(5): R59
- [24] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008, 133(4): 704-15
- [25] Korkaya H, Paulson A, Iovino F, et al. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*, 2008, 27(47): 6120-30
- [26] Abraham BK, Fritz P, McClellan M, et al. Prevalence of CD44⁺/CD24^{low} cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1154-9
- [27] Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakis E, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44⁺/CD24^{low} and CD44⁻/CD24⁺ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol*, 2008, 39(7): 1096-102
- [28] Balic M, Lin H, Young L, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(19): 5615-21
- [29] Dontu G. Breast cancer stem cell markers—the rocky road to clinical applications. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(5): 110
- [30] Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(12): 4234-41