

文章编号: 1004-0374(2010)08-0801-05

肿瘤干细胞对恶性肿瘤辅助治疗的影响

查 郎, 王子卫*

(重庆医科大学附属第一医院普外三科, 重庆 400016)

摘 要: 放化疗是目前恶性肿瘤治疗的重要手段, 但是迄今为止, 除了手术以外, 几乎没有能单独根治恶性肿瘤的治疗方法, 甚至一些恶性肿瘤在手术、化疗或放疗后会出现再生和侵袭能力增强, 被称为恶性肿瘤治疗后再增殖, 这可能是恶性肿瘤治疗失败的主要原因, 其主要机制可能是肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)对放化疗的耐受, 以及放化疗导致肿瘤细胞的上皮细胞间质化, 继而提高了肿瘤侵袭性。该文将从CSCs的角度重新探讨放化疗等辅助治疗对恶性肿瘤的影响。

关键词: 恶性肿瘤; 辅助治疗; 肿瘤干细胞

中图分类号: R730.58; R730.21 **文献标识码:** A

The effect of cancer stem cells on adjunctive therapy of malignant tumor

ZHA Lang, WANG Zi-wei*

(Department of Gastrointestinal Surgery, Key Laboratory of General Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Chemotherapy and radiotherapy are very important treatments for malignant tumors, but there is no single way to radically cure malignant tumors except for operation. Indeed, there is a well-recognized phenomenon about the repopulation and progression of tumors after anticancer therapy, such as chemotherapy, radiotherapy and surgery. Maybe it is an important cause of treatment failure. The treatment resistance of cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transitions promoted by chemotherapy and radiotherapy may be underlying mechanisms. This review will focus on the effect of cancer stem cells on adjunctive therapy of malignant tumor.

Key words: malignant tumor; adjunctive therapy; cancer stem cells

放疗和化疗是目前恶性肿瘤治疗的重要手段, 且已经证实可以抑制肿瘤生长, 延长部分患者的生存时间。放化疗不仅可以在手术前缩小肿瘤的体积, 增加手术切除率, 还可以作为术后的辅助治疗手段, 根除术中残留的癌细胞及潜在的转移灶。同时, 由于癌症是一种全身性疾病, 化疗作为一种全身性的治疗手段, 在癌症的治疗中也有相当重要的地位。在胃癌、肺癌、乳腺癌和大肠癌等恶性肿瘤中, 放化疗确实可以提高部分患者的生存时间。

近年来, 随着越来越多的新化疗药物和放疗技术应用临床, 对于恶性肿瘤的治疗手段也更加丰富, 但是我们并没有发现在恶性肿瘤治疗研究中有任何实质性的飞跃。迄今为止, 单纯的放化疗能根

治恶性肿瘤的报道鲜有耳闻, 而普遍存在的放化疗副作用却严重影响了患者的生活质量。某些恶性肿瘤虽然在术后辅助化疗的帮助下提高了5年生存率, 但是进一步研究发现在5年之后的随访中, 那些使用辅助化疗患者的死亡率变得比对照组更高^[1], 甚至, 一些恶性肿瘤在接受某些抗肿瘤治疗之后出现了再生和侵袭能力增强, 这可能是恶性肿瘤治疗失败的主要原因^[2]。放化疗治疗恶性肿瘤的作用是否被高估, 在对恶性肿瘤缺乏有效治疗手段的今

收稿日期: 2010-01-26; 修回日期: 2010-03-05

*通讯作者: E-mail: Wangziwei571@sina.com; Tel: 023-89011172

天, 放化疗是否被当成了“救命稻草”。由于放化疗的作用已深入人心和医学伦理的制约, 这些问题使得那些传统理论上需要放化疗的患者, 设置不使用放化疗的对照组比较困难。因此, 我们可能需要更多的从细胞生物学及分子生物学的角度来研究放化疗对于恶性肿瘤的作用。随着肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)理论的兴起和上皮细胞间质化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)在肿瘤侵袭转移中的作用机制的深入研究, 放化疗在治疗癌症时的利与弊可能需要被重新评估。

1 肿瘤干细胞理论对于放化疗的影响

1.1 肿瘤干细胞的特性

2001年Reya等^[3]提出“肿瘤干细胞假说”, 该假说认为肿瘤组织是由异质性的细胞群体组成, 其中有极少数具有干细胞性质的肿瘤细胞具有无限的自我更新能力和多分化潜能。随后, 进一步研究发现CSCs还具有异体成瘤和对放化疗耐受等特性^[4,5], 并认为CSCs的这些特性是恶性肿瘤治疗失败的主要原因, 这些新的发现对于恶性肿瘤的治疗理念产生了巨大的冲击。

1.2 CSCs对化疗耐受的机制

1.2.1 ABC转运蛋白的表达

CSCs对于化疗耐受的主要机制可能与CSCs上的ABC转运蛋白有关。目前, 已经发现在正常组织、造血干细胞和一些CSCs上都有ABC转运蛋白的表达。它主要包括P-糖蛋白、多药耐药相关蛋白和乳腺癌耐药蛋白, 它们属于同一家族, 具有保守的功能结构域和多样化的生物学功能。其中ABCG2、ABCC1和ABCB1等蛋白的研究较多, 这类跨膜转运蛋白可以利用水解ATP产生能量, 把进入细胞内的毒素和药物泵出细胞外, 避免细胞受到伤害^[5]。ABCG2蛋白是最晚发现的ABC转运蛋白, 它能将荧光染色剂Hoechst33342泵出细胞外, Zhou等^[6]研究发现, *MDR1*+/*BCRP1*-基因敲除的小鼠骨髓和骨骼肌侧群细胞的数量明显减少, 甚至消失, 证明ABCG2蛋白在CSCs耐药中发挥重要作用。目前ABC转运蛋白的这种能将荧光染料泵出细胞外的特性已经被广泛用于CSCs的分选和肿瘤多耐药性的研究。

1.2.2 抗凋亡基因高表达

*Bcl-2*是一种原癌基因, 能抑制细胞凋亡, Wang^[7]等研究发现, 干细胞和肿瘤细胞中*Bcl-2*家族蛋白明显高于分化成熟的细胞。而CD133⁺肝癌

细胞(被公认为许多CSCs的标志物)可以通过优先活化Akt/PKB和*Bcl-2*通路抵制化疗药物的作用^[8]。*Bcl-2*蛋白家族包括三个亚家族, 在肿瘤的分化、增殖和凋亡方面发挥重要作用, 其机制目前尚不清楚, 可能与其具有离子通道蛋白和吸附/锚定蛋白的双重特性有关。

1.2.3 长期处于静止期

CSCs虽然有自我更新的能力, 但是CSCs的细胞周期一般都比其他成熟肿瘤细胞慢^[9], 而大部分的化疗药物只对增殖活跃的细胞有效, CSCs长时间处于G₀期, 在化疗之后, 在药物刺激、血供改善和修复损伤机制的加强等因素作用下, 那些逃逸的CSCs通过自身所具备的自我更新和分化的能力, 使肿瘤再生, 导致治疗失败。

1.3 CSCs对放射治疗的耐受机制

1.3.1 CSCs的DNA损伤修复效率更高

CSCs对放射治疗的耐受程度可能与肿瘤中CSCs的含量有关, 肿瘤干细胞是肿瘤放射治疗耐受的关键。Bao等^[10]研究发现, 对神经胶质瘤进行射线照射后, 肿瘤中CD133⁺细胞的百分比增加了2~4倍, 但是它的绝对数量变化不大, 说明经照射之后的肿瘤组织中CSCs被富集了。进一步研究发现, 射线在CD133⁺和CD133⁻肿瘤细胞中所致的DNA损伤没有明显的差别, 但是CD133⁺肿瘤细胞的DNA损伤修复效率更高, 凋亡更少。继而推测CSCs对于电离辐射的耐受可能是因为它能活化DNA损伤检控点, 更有效地修复DNA损伤。

1.3.2 Wnt/ β -catenin信号通路活化

Mercy等^[11]用2 Gy射线照射从COMMA-D_b-geo细胞株中分离出来的Sca1⁺细胞后发现, 内源性的b-catenin表达水平明显升高, survivin表达水平也选择性上调。聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1[poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1]和Ku70与b-catenin竞争Tcf-4的结合位点, Tcf-4介导了Wnt信号通路的许多效应。正常情况下, PARP-1可与之结合而增加其转录活性, 但是在DNA受损后, 这种结合被抑制, 取而代之的是Ku70与Tcf-4结合, 从而抑制活化的转录复合物产生, 包括b-catenin和Tcf-4复合物^[12]。因此, b-catenin优先而稳定的表达促进DNA损伤修复, 并能使CSCs提高DNA修复的效率, 抑制凋亡。

1.3.3 活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)

Diehn等^[4]发现, ROS是放疗所介导的DNA伤

害的重要媒介, 由于CSCs中自由基清除系统活性增强, CSCs中活性氧簇含量明显低于那些子代、分化成熟的细胞, 在缺少ROS这一重要的媒介的CSCs中, 放疗所致的DNA损伤也相应减少, 这也可能是CSCs放疗耐受的另一个重要原因。

2 放化疗对于肿瘤生物学特性影响的新观点

2.1 放化疗可能促进上皮细胞间质转化

EMT是一种常见的生理病理现象, 与胚胎发育、伤口愈合及肿瘤侵袭转移等过程密切相关, 主要表现为上皮细胞失去极性, 细胞之间紧密连接和黏附连接下降, 而获得了浸润性和游走迁移能力, 演变为具有间质细胞形态和特性的细胞。由于EMT参与大多数恶性肿瘤的侵袭转移过程, 所以近年来在肿瘤侵袭转移方面成为研究的热点^[13]。有研究发现, 一些药物作用于肿瘤细胞后, 肿瘤细胞会出现明显的EMT现象, 经过化疗药物处理后的肿瘤细胞出现了形态学上的转化, 而且上皮标志物E-cadherin和盘状蛋白明显减少, 间质组织标志物波形蛋白上调。EMT的发生可能在肿瘤细胞逃避化疗药物及放射线的攻击方面发挥重要作用^[14]。EMT和干细胞在胚胎发育时都发挥着关键作用, 更加值得关注的是那些经历了EMT之后的肿瘤细胞出现了类似如CSCs的特性, 如自我更新和异体成瘤等, 而且那些有CSCs特性的细胞出现了间质标志物上升及上皮标志物减少的特点^[15]。CSCs和EMT之间可能存在着千丝万缕的联系, 而这种放化疗后出现的同时具有转移和再生能力的EMT细胞可能是恶性肿瘤远处转移的关键。

2.2 放化疗上调TGF- β 的表达

Biswas等^[16]发现, 小鼠在经受放疗和化疗后, 血液循环中TGF- β 的含量明显上调, 而且肿瘤的肺转移也明显增加。TGF- β 可以通过丝氨酸/苏氨酸激酶磷酸化, 激活Smad, 继而通过非组蛋白HMGA2上调其下游的目标基因*Snail*、*Twist*和*Slug*等表达, 作为*E-cadherin*基因转录的抑制。E-cadherin表达下调会造成细胞间极性丧失而诱发EMT^[17]。在放疗导致肺泡损伤或者手术后, 血液循环中TGF- β 表达也会上调, 因此推测TGF- β 表达上调可能与组织的损伤修复增强有关, 但具体的机制目前仍不清楚。此外, TGF- β 可以上调*HMGA2*的表达, *HMGA2*编码一种非组蛋白染色质蛋白, 最近被认为是一种新型癌基因, 在多数恶性肿瘤和胚胎组织中高表

达, 而在正常组织中不表达。Yu等^[18]发现*HMGA2*可以保持乳腺肿瘤起源细胞(breast tumor-initiating cells, BT-IC)的分化潜能, 而沉默*HMGA2*基因可以减少未分化细胞的比例。因此, 可以说TGF- β 通过*HMGA2*间接的发挥维持CSCs分化潜能的作用, 放化疗在杀死普通肿瘤细胞的同时又通过上调TGF- β 使CSCs停滞于G₀, 从而使CSCs逃避攻击, 这可能是CSCs对放化疗耐受的另外一个重要原因。

2.3 放化疗后肿瘤再增殖现象与CSCs的关系

一些肿瘤在手术、化疗或放疗后会出现再生和侵袭能力增强, 而且再生之后的肿瘤表现出更大的治疗抵抗力, 这一现象被称为肿瘤治疗后再增殖。CSCs自我更新和对放化疗耐受可能是肿瘤治疗后再增殖的重要原因。众所周知, 许多恶性实体肿瘤在生长过程中会因为缺氧而出现瘤内坏死, 而这一特性在CSCs含量较多的肿瘤中表现的更为突出, 甚至在同一肿瘤中缺氧坏死区域的CSCs含量明显升高^[19];进一步研究发现, 在体外缺氧的环境下, 成神经管细胞瘤中CD133⁺的细胞比例升高^[20], 而且缺氧还能使人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hES)保持一种未分化的状态^[21], CSCs与hES有许多相似性, 因此缺氧可能对CSCs具有同样的作用。一般情况下, 那些缺氧坏死的区域同样得不到充足的血液供应, 因此化疗时, 那些肿瘤边缘血供良好的癌细胞会被大量的杀伤, 而那些位于中心区域的CSCs却因为本身的耐药性和药物浓度不足而被富集, 甚至在化疗药物的刺激下出现EMT, 导致肿瘤的转移。更有甚者, 肿瘤边缘的癌细胞被大量杀伤之后, 使得中心缺氧区血供增加, 此区域内的CSCs细胞由于失去了缺氧对其分化的抑制, 可能会出现更快的增生和分化, 导致肿瘤的加速再生。

3 从CSCs的角度看新辅助化疗和新辅助放疗

2009年ASCO年会上的一项有关胃癌新辅助化疗研究, 拟纳入260例局部进展期胃癌患者, 但因无显著生存获益, 研究提前终止。实际纳入144例患者, 随机予以2个周期顺铂加、亚叶酸钙加氟尿嘧啶方案术前化疗后手术或单纯手术治疗, 结果显示, 两组中位总生存期均超过36个月, 但无显著性差异^[22]。Li等^[23]发现经受新辅助化疗的乳腺癌患者的肿瘤组织标本中, 那些被认为有CSCs特性的CD44⁺/CD24^{-/low}细胞比例增加, 而且形成细胞球的能力也增强了。毫无疑问, 对于一些手术切除有困难的患者进行新辅助放疗或者化疗, 可以使肿瘤的

体积缩小, 增加进行根治性手术的机会; 但是, 从CSCs的角度来看, 我们除了警惕放化疗对于免疫、造血和神经等系统的副作用外, 现在需要把目光更多地放在肿瘤本身, 我们需要了解那些被放化疗所富集的CSCs是否会带来更大的危害。因此, 需要进行更大规模和多中心的临床试验, 从循证医学的角度论证新辅助化疗是否真的能使大多数患者受益。

4 CSCs及相关的恶性肿瘤治疗趋势

4.1 ABC转运蛋白抑制剂

在化疗前或者化疗中使用ABC蛋白抑制剂可以防止化疗药物被泵出细胞外, 增加细胞内的药物浓度, 达到杀伤CSCs的作用。维拉帕米和环孢菌素A可以抑制ABCB1蛋白, CF120981和RX9576可以抑制ABCG2蛋白, 但是效率均不高。对于新型的ABC转运蛋白抑制剂的研发是逆转CSCs耐药的热点。

4.2 促进CSCs进入细胞周期

长期处于G₀期的CSCs可以躲避放化疗的攻击, 使用药物促使CSCs进入细胞周期可以更高效地杀伤CSCs。目前发现粒细胞集落刺激因子G-CSF可以刺激乳腺癌干细胞进入细胞周期, 增强CSCs对化疗药物的敏感性^[24]。开发更加特异性的细胞诱导分化药物也是未来恶性肿瘤辅助治疗的重要方向。

4.3 规避辅助治疗对恶性肿瘤的不良影响

对于那些必须经辅助治疗的患者, 如晚期肿瘤患者或不能一期手术根治的患者, 可以采用相应的分子靶向药物对EMT及治疗后加速再生等现象进行干预。在动物试验中^[16], TGF- β 抑制剂2G7可以减少放化疗后肺转移和循环中肿瘤细胞的数量, 其机制可能是2G7通过TGF- β 抑制了EMT的信号通路, 阻止肿瘤细胞获取转移能力和干细胞特性。此类药物尚未进入临床试验, 但是在消除辅助治疗对恶性肿瘤不良影响方面有一定价值。

4.4 干细胞抑制剂

和其他干细胞一样, CSCs的分化、增殖和更新也需要一系列的分子信号通路激活其表面的受体。对于这些通路中某些重要环节的干预可以调节CSCs的分化和增殖, 从而达到治疗的目的。已经有人发现了少数对CSCs有选择性抑制的药物, 如环王巴明、盐霉素(salinomycin)^[25]和拉帕替尼(lapatinib)^[23]等, 在相关的体外试验和动物实验中表现出对CSCs明显的抑制作用。当前, 一些CSCs细胞的相关分子机制尚不清楚, 需要进一步的研究其分子

机制, 寻找最适合、最安全和最高效的靶点。

5 结语

在过去的20年中, 随着人们对恶性肿瘤的发生发展机制的深入了解, 以及各种实验技术和研究方法的日新月异, 越来越多新的治疗手段应用于恶性肿瘤的临床治疗, 在恶性肿瘤的综合治疗中发挥重要作用; 但是随着CSCs理论的兴起, 人们逐渐发现对具有永生性的CSCs的针对性治疗可能才是恶性肿瘤治疗的关键。筛选对CSCs有选择性抑制的药物不仅可以减少放化疗对于肿瘤细胞EMT等不良生物学特性的刺激作用, 而且还有可能从源头上对恶性肿瘤生长、浸润和转移产生抑制, 这可能会成为恶性肿瘤研究和治疗新的热点。如果说普通的放化疗对于部分患者恶性肿瘤的治疗产生了“打草惊蛇”的不良影响的话, 那么对于CSCs细胞的特异性治疗可能会发挥“擒贼先擒王”的作用。因此, 如果从CSCs理论的角度重新审视恶性肿瘤的治疗时, 对于辅助放化疗, 特别是新辅助放化疗的应用可能需要更加个体化。

[参 考 文 献]

- [1] Besse B, Le Chevalier T. Adjuvant chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a fading effect. *J Clin Oncol*, 2008, 26(31): 5014-7
- [2] Kim JJ, Tannock IF. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(7): 516-25
- [3] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-11
- [4] Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 780-3
- [5] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4): 275-84
- [6] Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, et al. *Bcrp1* gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(19): 12339-44
- [7] Wang S, Yang D, Lippman ME. Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists. *Semin Oncol*, 2003, 30(5 Suppl 16): 133-42
- [8] Ma S, Lee TK, Zheng BJ, et al. CD133⁺ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*, 2008, 27(12): 1749-58
- [9] Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy.

- Breast Cancer Res, 2008, 10(2): R25
- [10] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006, 444(7120): 687-8
- [11] Chen MS, Woodward WA, Behbod F, et al. Wnt/ β -catenin mediates radiation resistance of $Scal^+$ progenitors in an immortalized mammary gland cell line. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 3): 468-7
- [12] Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, et al. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate β -catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 911-8
- [13] Wu Y, Zhou BH. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin: Shanghai*, 2008, 40(7): 643-50
- [14] Yang AD, Fan F, Camp ER, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(14Pt1): 4147-53
- [15] 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
- [16] Biswas S, Guix M, Rinehart C, et al. Inhibition of TGF- β with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1305-13
- [17] Thuault S, Valcourt U, Petersen M, et al. Transforming growth factor- β employs HMG2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 2006, 174(2): 175-83
- [18] 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
- [19] Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res*, 2007, 67(19): 8980-4
- [20] Blazek ER, Foutch JL, Maki G. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133⁻ cells, and the CD133⁺ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 67(1): 1-5
- [21] Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O_2 tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(13): 4783-8
- [22] Schuhmacher C, Schlag P, Lordick F, et al. Neoadjuvant chemotherapy versus surgery alone for locally advanced adenocarcinoma of the stomach and cardia: Randomized EORTC phase III trial #40954. *J Clin Oncol*, 2009, 27(15): 4510
- [23] Li X, Lewis MT, Huang J, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(9): 672-9
- [24] Altundag K, Altundag O, Elkiran ET, et al. Addition of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) to adjuvant treatment may increase survival in patients with operable breast cancer: interaction of G-CSF with dormant micrometastatic breast cancer cells. *Med Hypotheses*, 2004, 63(1): 56-8
- [25] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, 2009, 138(4): 645-59