

DOI: 10.13376/j.cbls/2014112

文章编号: 1004-0374(2014)08-0790-09

肺癌干细胞生物学特性研究进展

安世民^{1,2}, 丁旭莘¹, 朱 亮^{1,2*}

(1 上海交通大学医学院药理学教研室, 上海 200025; 2 上海交通大学医学院转化医学协同创新中心, 上海 200025)

摘 要: 肺癌是具有高度侵袭性的一类恶性肿瘤, 传统以手术结合放化疗的治疗手段对肺癌的治疗效果不佳, 5 年生存率仅为 20%~30%, 其中重要原因之一是肺癌容易转移与复发。在与肺癌长期斗争的过程中, 人们发现肺癌组织中存在一小群肺癌干细胞 (lung cancer stem cells, LCSCs), 它们是肺癌难以治愈和复发的根本原因。从 LCSCs 的发现、相关的生物学特性和信号转导通路, 以及 LCSCs 与表皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 之间的关系等方面对 LCSCs 进行综述。

关键词: 肺癌干细胞; 标志物; 信号通路; 表皮-间质转化

中图分类号: R730.2; R734.2 **文献标志码:** A

Research advancement on biological characteristics of lung cancer stem cells

AN Shi-Min^{1,2}, DING Xu-Ping¹, ZHU Liang^{1,2*}

(1 Department of Pharmacology and Chemical Biology, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; 2 Collaborative Innovation Center for Translational Medicine, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China)

Abstract: Lung cancer is a highly invasive type of cancer. Therapy effect of traditional treatment with surgery in combination with chemoradiotherapy is not satisfying. Since lung cancer is easy to be metastasis and its recurrence rate is high, the overall 5-year survival rate is only about 20%~30%. Struggling with lung cancer for a long time, people realized the existence of lung cancer stem cells in lung cancer tissue, which is the major reason why lung cancer is difficult to be cured and has high recurrence rate. The present review addresses aspects including the finding of lung cancer stem cells, their relevant biological characteristics, signaling pathways and relationship with epithelial-mesenchymal transition.

Key words: lung cancer stem cells; biomarker; signaling pathway; epithelial-mesenchymal transition

肺癌是全球常见的恶性肿瘤之一, 发病率近年来逐年上升。目前我国, 肺癌死亡率已占所有恶性肿瘤的首位。绝大多数肺癌起源于支气管黏膜上皮。临床上将肺癌主要分为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC; 约占 80%) 和小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC; 约占 20%)。非小细胞肺癌中又有鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC)、腺癌 (adenocarcinoma, AC)、大细胞癌 (large cell carcinoma, LCC) 等组织类型。肺癌的发病原因尚不明确, 但吸烟、环境污染、肺部感染等因素与肺癌的发病密切相关。目前肺癌的临床治疗采取以外科手术为主、放化疗为辅的综合治疗, 然而 80%

的肺癌病例在明确诊断时已失去外科手术的机会, 因此放化疗是中晚期肺癌的主要治疗手段。然而, 由于肺癌对传统的化疗以及放疗不敏感, 导致中晚期肺癌的 5 年生存率仅为 10% 左右。近些年随着肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 研究的兴起, 人们发现 CSCs 是肿瘤治疗失败的根本原因。因此在肺癌治疗的研究中, 以肺癌干细胞 (lung cancer

收稿日期: 2013-11-20; 修回日期: 2014-02-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(81173084); 上海市自然科学基金项目(12ZR1415700)

*通信作者: E-mail: julianzhu@sjtu.edu.cn

stem cells, LCSCs) 作为靶点的治疗手段具有较好的临床前景。

1 LCSCs的发现及其标志物

人的机体中存在天然自我修复系统, 即存在部分的成体干细胞 (adult stem cells, ASCs), 这类 ASCs 在正常情况下处于休眠状态, 但在机体受到损伤或病变时可以启动更新分化程序对受损部位进行修复。与 ASCs 类似, CSCs 的假设也由此而来。根据 AACR 的定义, CSCs 是肿瘤中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的“种子”细胞。CSCs 通过不对称性分裂, 产生与父代细胞性质相同的 CSCs 和组成肿瘤大部分的非致瘤细胞。CSCs 这一特性使其在免疫缺陷宿主体内可产生与原发肿瘤相似的异质性肿瘤^[1]。

第一次对 CSCs 的认识来源于 Bonnet 和 Dick^[2] 在白血病细胞中分离的一群 CD34⁺CD38⁻ 白血病干细胞, 少量的这类亚群细胞即能够在 NOD/SCID 小鼠体内重建白血病, 并且这类细胞可以不断地在体内重复移植重建白血病。自此, 反复在免疫缺陷宿主体内重建肿瘤的能力成为判断 CSCs 的金标准。他们的研究工作开启了 CSCs 的研究序幕, 成为肿瘤研究的热门领域。CSCs 除具有正常干细胞自我更新和分化能力外, 还具有较强的致瘤性、耐药性及异质性的特点。为了更好地研究 CSCs 的生物学特性, 需要对 CSCs 进行分选与鉴定。CSCs 的分选通常根据其所具有的特异性标志物来使用流式细胞分选技术 (fluorescence activated cell sorting, FACS) 或磁性激活细胞分选技术 (magnetic activated cell sorting, MACS) 进行分选。不同肿瘤类型的 CSCs 在分子标志物上存在部分差异, 甚至相同类型肿瘤的 CSCs 在标志物上也可能存在一定的争议。LCSCs 作为 CSCs 的一种, 最早由 Kim 等^[3] 在樟脑丸诱导的小鼠肺损伤模型中发现, 可能起源于支气管肺泡干细胞。LCSCs 具有 CSCs 的大部分共性, 如较强的致瘤性、侵袭性、耐药性、抗辐射性等特性, 但与其他类型 CSCs 在标志物的表达上略有差异, 下面对具有代表性的标志物进行阐述。

1.1 SP细胞

LCSCs 标志物的研究起源于侧群细胞 (side population, SP) 表型的细胞亚群。1996 年, Goodell 等^[4] 首次在小鼠骨髓中观察到一群可以排斥 Hoechst 33342 荧光染料染色的细胞, 并命名为 SP 细胞。在这群细胞中, 只需要正常细胞千分之一的数量即可

重建骨髓造血系统。研究者进一步发现乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP/ABCG2) 是引起 SP 表型的机制。ABCG2 属于 ABC 转运蛋白 (ATP binding cassette transporter) 家族, 是一类跨膜蛋白, 有 48 个家族成员。该家族蛋白的特点是当底物与该蛋白结合后, 可以利用 ATP 水解产生的能量将底物排出胞外。ABC 转运蛋白与肿瘤细胞的多药耐药性密切相关, 而后者是肿瘤化疗中导致治疗失败的主要原因。ABC 家族中最为重要的有 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP) 及 ABCG2。这些 ABC 转运蛋白定位于细胞膜, 可以选择性地将 Hoechst 33342、Rhodamine 及药物排出细胞外。2007 年, Ho 等^[5] 从 6 种人类肺癌细胞株 (H460、H23、HTB-58、A549、H441、H2170) 中分选出 SP 细胞, 以确定 SP 表型是否与 LCSCs 相关。研究发现, 肺癌中 SP 细胞具有比非 SP 细胞更高的侵袭性和体内致瘤性, 并且对化疗药物耐受, 同时 SP 细胞具有较高的人端粒酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 活性和较低水平微小染色体维持蛋白 7 (minichromosome maintenance protein 7, MCM7) 的表达。hTERT 活性的升高意味着细胞具有较强的永生性特性, 而 MCM7 是细胞增殖的标记蛋白, 较低水平的表达意味着细胞处于静息期, 即 G₀/G₁ 期。类似的针对肺癌 SP 细胞的研究还有 Shi 等^[6] 在 H460 细胞系中利用流式细胞仪分选出 SP 细胞亚群, 发现该细胞亚群在体外培养可形成悬浮细胞球, 在 NOD/SCID 小鼠体内具有较强的致瘤能力, 同时该 SP 亚群细胞表达 ABCG2 和 Hedgehog 信号通路成员 Smoothed 跨膜蛋白 (Smo)。用 Smo 的抑制剂环巴胺处理 H460 细胞阻断 Hedgehog 通路, 可使 G₁ 期细胞增加而 S 期细胞减少, 这提示 Hedgehog 通路在类 LCSCs 的 SP 细胞中具有重要作用。另外, SP 细胞表型的维持近来被报道与 β -arrestin1 的表达紧密相关^[7]。 β -arrestin 介导胞内信号转导, 对于下游 Src 通路的激活及 MAPK 通路中 ERK 的激活具有重要作用。 β -arrestin1 的沉默使 SP 表型细胞数量和 ABCG2 的表达大幅降低, 而过表达 β -arrestin1 则促进 SP 表型细胞的产生。

1.2 CD133阳性细胞

CD133 作为 CSCs 的标志物, 在一系列不同类型肿瘤中得到验证。以 CD133 作为 LCSCs 的标志物的证据如下。Eramo 等^[8] 从肺癌肿瘤组织样本中

分选得到 CD133 阳性的细胞, 该细胞亚群不仅可以体外悬浮培养形成肿瘤球, 且可以分化为 CD133 阴性细胞。在 NOD/SCID 小鼠移植实验中显示, 只需要 1×10^4 CD133 阳性的细胞即可致瘤, 而 CD133 阴性的细胞 1×10^5 也难以致瘤。对 CD133 阳性 LCSCs 的进一步研究发现, 这类细胞表达干细胞全能性蛋白 OCT4, 而 OCT4 是参与调控胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 自我更新和维持其全能性最为重要的转录因子之一。

Hilbe 等^[9]对 79 例 NSCLC 临床标本研究发现, 63 例标本的 CD133 阳性细胞比例上升, 由此认为 CD133 作为 NSCLC 的标志物具有临床意义, 且 NSCLC 中 CD133 阳性细胞可能是促肿瘤血管形成和肿瘤生长的重要原因。但以 CD133 作为 LCSCs 的标志物依然存在一些争议。如 Wang 等^[10]在肺癌细胞系 LC-42 中分选出 CD133 高表达和低表达的细胞亚群, 这两类细胞亚群在克隆形成能力、致瘤能力及干性相关基因表达方面并没有显著差异, 因此认为 CD133 并不是 LC-42 肺癌细胞系 LCSCs 的标志物。Le 等^[11]认为, 尽管 CD133 阳性的 NSCLC 细胞与 CD133 阴性细胞相比, 表现出更强的致瘤性, 更高的药物抵抗性, 以及多能性基因 Oct4、Nanog 及耐药基因 MDR1 更高的表达水平, 但临床数据显示 CD133 的表达水平与患者的整体生存率等预后指标并没有相关性, 因此不能作为独立的预后指标。

1.3 ALDH1 阳性细胞

乙醛脱氢酶 1 (aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1) 属于乙醛脱氢酶家族, 通过将视黄醇氧化为视黄酸, 视黄酸再与视黄酸受体结合参与基因调控表达。Chute 等^[12]发现 ALDH1 在造血干细胞的早期分化中起到重要作用。在随后的研究中发现 ALDH1 在一系列的 CSCs 中高表达, 首先在白血病中被作为鉴定和分离白血病 CSCs 的标志物^[13], 随后在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌等 CSCs 中发现类似的表型。在肺癌的研究中发现, ALDH1 阳性细胞的增殖能力、侵袭能力比 ALDH1 阴性细胞更强, 且体内成瘤能力远高于 ALDH1 阴性细胞 (1×10^3 vs 1×10^5)^[14]。体外实验与临床数据显示, 与 ALDH1A1 阴性细胞相比, ALDH1A1 阳性细胞对靶向抗肿瘤药物表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI), 如吉非替尼具有抵抗性^[15]。

Alamgeer 等^[16]在 205 例 I 期术后 NSCLC 中对 ALDH1A1 与 CD133 的表达与患者预后的关系进行

了分析。作为单独因素, 虽然 ALDH1A1 而非 CD133 的高表达预示着患者较短的无复发生存期 ($P = 0.025$), 但是在 ALDH1A1 与 CD133 均高表达的患者中, 无复发生存期最短, 整体生存率最低, 显示出与不良预后的显著相关。

1.4 对化疗耐药的细胞

在肺癌的治疗中, 对化疗药物的耐药性是肺癌治疗失败的重要原因。在肺癌组织这群异质性的“细胞社会”中, LCSCs 处于这个社会的顶端。化疗药物, 如顺铂可以杀死分化的肺癌细胞, 但由于 LCSCs 具有 ABCG2 等 ABC 跨膜转运蛋白的表达, 可以将 Hoechst 等荧光染料以及药物排出胞外, 因此化疗药物对 LCSCs 的杀灭效果不佳。从这点受到启发, Levina 等^[17]利用 LCSCs 对化疗药物的耐药性对 LCSCs 进行了筛选和富集。首先用常见的肿瘤治疗药物, 如顺铂 (通过共价键直接与核酸结合, 使 DNA 链交连或断裂, 破坏 DNA 功能并阻止复制)、多柔比星 (可嵌入 DNA 碱基对中, 阻碍 RNA 转录)、依托泊苷 (细胞周期特异性抗肿瘤药物, 作用于 DNA 拓扑异构酶 II, 形成药物-酶-DNA 稳定的可逆性复合物, 阻碍 DNA 修复) 等对肺癌细胞系 H460 在体外处理 1 周, 发现存活下来的耐药肿瘤细胞 (drug surviving cells, DSCs) 具有 LCSCs 的各类特性。DSCs 高表达 CD133、CD117、核 β -catenin 及胚胎干细胞抗原和转录因子 SSEA-3、TRA1-81、Oct-4, 低表达细胞角蛋白 8/18 (cytokeratin 8/18, CK8/18)。DSCs 可以在体外形成悬浮细胞球, 并可自我更新和分化。SCID 小鼠体内移植可更高效地形成肿瘤。DSCs 接种小鼠产生的肿瘤所分泌的血管生成因子和生长因子, 如 VEGF、bFGF、IL-6、IL-8、HGF、PDGF-BB、G-CSF 以及 SCGF- β 等是 H460 接种小鼠产生的肿瘤分泌的相关因子的 2~3 倍。Barr 等^[18]利用顺铂处理 NSCLC 细胞系 A549、SKMES-1、MOR 及 H460, 观察到类似的现象。顺铂抵抗细胞具有众多干细胞标志物及表皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关标志物的表达上升, 同时, 顺铂处理引起的 DNA 损伤减少。Freitas 等^[19]总结得出常见抗肿瘤药物除上述顺铂和多柔比星外, 氟尿嘧啶 (胸苷酸合成酶抑制剂)、甲氨蝶呤 (抗叶酸类抗代谢药) 和针对 NSCLC 的吉非替尼、厄洛替尼 (选择性 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂), 以及放化疗诱导, 均可产生具有类似 LCSCs 表型的抵抗细胞, 并认为肿瘤治疗手段是一种富集肺癌干细胞的有效方法。

1.5 CD44阳性细胞

虽然以 CD44 作为 LCSCs 的标志物的研究较少, 但也有证据表明 CD44 的 NSCLC 细胞群具有 CSCs 的特性^[20], 包括具有较强的体外形成悬浮肿瘤细胞球的能力、较强的增殖能力, 以及表达 Oct4、Nanog 和 Sox2 等多能性基因等。另外, 与 CD44 阴性细胞相比, CD44 阳性细胞对顺铂等化疗药物耐受性更强。更重要的是, 在 141 例术后 NSCLC 组织标本中, 未发现 CD133 的高表达, 而 CD44 表达比例为 50.4%。

利用共同表达 LCSCs 两种标志物的肺癌细胞对 LCSCs 进行研究可能更有意义。有学者对 ALDH 和 CD44 均高表达 (ALDH^{hi}CD44^{hi}) 的肺癌细胞进行分析, 发现该细胞亚群的干细胞特性表型均强于 ALDH^{hi}CD44^{lo}、ALDH^{lo}CD44^{hi}、ALDH^{lo}CD44^{lo} 及未分选的细胞群^[21]。ALDH^{hi}CD44^{hi} 细胞具有更强的致瘤性且对化疗抵抗。抑制 Hedgehog 和 Notch 通路可降低 ALDH^{hi}CD44^{hi} 的细胞数, 抑制 ALDH 的表达与 CD44 的敲低可使 ALDH^{hi}CD44^{hi} 细胞的干性相关基因表达下降并对化疗药物增敏。相应的临床数据显示, 共表达 ALDH^{hi}CD44^{hi} 的细胞数量与患者无复发生存期相关。CD90 作为 LCSCs 的标志物报道得很少, 除在 A549 与 H446 细胞系中研究发现 CD90⁺ 细胞具有更强的 LCSCs 特征^[22], 如自我更新能力更强和干性基因表达水平更高, 尚无更充足的证据。但 2013 年, Wang 等^[23] 从 20 例原发肺癌组织中用无血清培养系统建立了 15 个原发肺癌细胞系, 这些细胞系包含 SCLC、LCC、SCC 和 AC 各亚型。他们发现 CD44^{high}CD90⁺ 亚群细胞在 SCLC 和 LCC 中具有 LCSCs 的特征, 而在 SCC 亚型肺癌中, CD44^{high} 亚群具有 LCSCs 的特性。

1.6 其他标志物

LCSCs 与 ESCs 具有相似的与多能性相关的基因的表达, 如 Oct4、Sox2、Nanog、SSEA4 等转录因子和抗原。这些多能性相关基因据报道与肿瘤的预后也具有相关性, 如在 126 例临床肺癌组织样本中, 91 例显示 Oct4 阳性, 且 Oct4 的表达与患者的无病生存期等预后指标呈负相关^[24]。在体外肺癌细胞中, Sox2 可以促进 EGFR 的表达, 而 EGFR 的激活进一步促进 Sox2 的表达, 形成正反馈。Sox2 还可通过诱导抗凋亡基因 BCL2L1 表达等促进化疗药物抵抗。临床证据显示, Sox2 与 NSCLC 患者的预后差相关性较强^[25]。在 163 例肺癌临床样本中亦证实, Nanog 的表达水平与患者的肿瘤分化

程度及分级相关, 高水平的 Nanog 的表达预示较差的预后^[26]。在 38 例 NSCLC 病例^[27]中也检测到 SSEA-4 表达的患者有更高的复发率 (6 倍) 和疾病相关死亡率。

关于 LCSCs 的表面标志目前仍存在争议, 尤其是 SP 细胞、CD133 细胞、ALDH 细胞之间是否是同一群细胞, 它们之间是否有重叠。研究的结果倾向于这几群不同亚型的细胞之间并不是相互重叠, 而是不同亚群的细胞群体。如 Akunuru 等^[28]发现, 无论在肺腺癌细胞系 A549 或人原代 NSCLC 细胞中, SP 细胞和非 SP 细胞中 CD133 细胞比例没有显著差异, CD44 阳性细胞比例同样没有显著差异; 不过 ALDH 阳性细胞比例虽然在 A549 细胞系中没有显著差异, 但在人原代 NSCLC 细胞中具有表达差异。而 Singh 等^[7]在 H1975 和 H1650 细胞系发现, 分选的 SP 细胞中 ALDH 阳性细胞的比例要高于非 SP 阳性细胞 (6~8 倍)。因此, 对于肺癌干细胞的表面标记有待进一步的研究。

2 维持LCSCs自我更新的相关信号通路

目前的研究显示, 维持正常干细胞自我更新能力的一些信号通路在 CSCs 中也有较高水平的表达, 这些信号通路调控网络共同组成了 CSCs 自我更新能力维持的重要机制。这些信号通路主要包括 Hedgehog、Notch、Wnt 等信号通路。另外, 非典型蛋白激酶 C (atypical protein kinase C iota, PKC_i) 通路不仅对于细支气管干细胞的增殖十分重要, 对癌基因 *Kras* 驱动型 NSCLC 的发生也是必需的^[29]。最近, 在 SCC 中的研究进一步证实 PKC_i 对 LCSCs 表型的维持不可或缺^[30]。其他肿瘤信号通路, 如 Pten 信号通路、EGFR 信号通路、Raf-Ras 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、SCF/c-Kit 信号通路、非经典途径 JNK 通路等, 在 CSCs 生物学特性的调控上与干性相关信号通路相互作用, 如 Notch 信号通路与 Wnt 信号通路之间^[31]、Notch 信号通路与 Pten 信号通路之间^[32]等, 它们共同形成复杂的调控网络。这些信号通路的失调可能在不同肿瘤中促使 CSCs 的发生。

2.1 Hedgehog信号通路

Hedgehog 信号通路由 Hedgehog 配体和跨膜受体 Patched (Ptch) 和 Smoothed (Smo) 的结合而启动, 通过下游的转录因子 Gli 蛋白 (GLI1、GLI2、GLI3) 的激活, 进而调节下游靶基因的表达。Smo 受体是 Hedgehog 信号传递所必需的, 在无 Hed-

gehog 的情况下, Ptch 受体通过抑制 Smo 蛋白活性, 对 Hedgehog 信号起着负调控的作用。当 Hedgehog 结合到 Ptch 后, Smo 蛋白被释放, 启动下游的 Gli 蛋白靶基因的转录。Gli 激活的靶基因包括 Cyclin D、Cyclin E、Myc、Gli1 及 Ptch 等。Hedgehog 信号在大多健康成体组织中表达沉默, 但在不同的干细胞和肿瘤组织中有表达, 目前研究证实该信号通路在整体上参与调节胚胎发育, 如神经管发育, 而在细胞水平参与调控干细胞的增殖、迁移和分化过程。在肿瘤发生发展过程中, Hedgehog 信号通路的作用在一系列的肿瘤类型中得到证实, 如神经胶质瘤、黑色素瘤、乳腺癌及肺癌等。

SCLC 是一类恶性的神经内分泌亚型肺癌, Watkins 等^[33]首先在急性支气管上皮损伤再生中发现 Hedgehog 信号通路被广泛激活, 接着在 SCLC 中发现存在 Hedgehog 信号通路的激活。利用藜芦植物生物碱成分环巴胺, 一种天然的 Smo 蛋白的抑制剂, 可以使 SCLC 细胞的致癌能力大大降低。Park 等^[34]在敲除 Rb1 和 Trp53 基因的小鼠 SCLC 模型中发现 Hedgehog 信号通路可被诱导激活, 体外持续性的 Hedgehog 信号通路激活可使 SCLC 细胞克隆形成能力增强。在该 SCLC 模型中敲除 Smo 后大大降低了 SCLC 的发病, 另外使用 Smo 的抑制剂 NVP-LDE225 抑制 Hedgehog 信号通路尽管对于肿瘤的化疗效果不佳, 但可以很好地防止肿瘤的复发, 进一步表明 Hedgehog 通路在抑制 LCSCs 的肿瘤重建方面具有重要的作用。

2.2 Notch信号通路

Notch 基因最早是在果蝇中发现的, 因其功能缺失引起果蝇翅膀的边缘形成缺口 (notch) 而得名。哺乳动物中有 4 种 Notch 基因, 且高度保守, 在发育中与细胞命运决定相关。Notch 配体 (DSL) 与受体结合后, 受体相继发生两次蛋白水解, 分别由肿瘤坏死因子 α -转化酶 (tumor necrosis factor- α -converting enzyme, TACE) 和 γ -分泌酶 (γ -secretase) 所催化。经过切割的 Notch 受体胞内域 (notch intracellular domain, NICD) 进入胞浆并转移入细胞核, 与转录因子 CSL (CBF1/RBP-J κ /Suppressor of Hairless/LAG-1, CSL) 结合, 从而激活 HES (hairy and enhancer of split, HES)、Myc、p21 等靶基因的表达。Notch 与肿瘤的关系比较复杂, 虽被证实与多种恶性肿瘤相关, 但在不同的肿瘤类型中作用却不完全相同, 如 Notch 在头颈肿瘤和乳腺癌中起促进作用, 而在皮肤癌中却起抑制作用。

Notch 受体的异常表达与肺癌相关, 但不同类型的肺癌中 Notch 的表达并不相同。在 NSCLC 中存在 Notch1、Notch2 及下游 Hes1 的高表达, 而在 SCLC 中却几乎检测不到。在 Ras 突变型肿瘤细胞中, 活化型 Ras-GTP 处于持续结合的状态, 导致增殖信号持续转导, 引起细胞的过度增殖从而癌变, 而在这类细胞中 Notch 通路亦被激活, 相应的受体 Delta-1 也表达上调^[35]。进一步的研究证明, Notch1 通过在翻译后修饰水平调节 p53 的稳定性, 抑制 p53 所介导的凋亡, 因而对 *Kras* 驱动型 NSCLC 的发生具有重要作用^[36]。

虽然 Notch 在肺癌发生中具有重要作用, 但 Notch 与 LCSCs 的研究目前报道较少。Hassan 等^[37]利用 Notch 的 GFP 报告载体研究发现, Notch GFP 阳性肺腺癌细胞的 LCSCs 相关特性均显著高于 Notch GFP 阴性细胞。在 443 例肺腺癌患者中, 89 例具有 Hes-1 高表达的患者临床预后显著较差。Sullivan 等^[38]在 NSCLC 临床标本中发现 ALDH1A1 高表达, 而这群 ALDH 阳性的细胞 Notch 通路也高表达。用 γ -分泌酶抑制剂或者 Notch3 的 shRNA 处理细胞后, NSCLC 中具有干细胞特性的 ALDH 阳性细胞比例大大下降, 这提示抑制 Notch 通路能靶向杀死 LCSCs, 从而对 NSCLC 的治疗具有重要价值。在人胶质瘤 CSCs 的研究中发现, 用 γ -分泌酶的抑制剂处理^[39]胶质瘤细胞后, CD133 阳性细胞的数量下降了近 80%, 其中 SP 细胞亚群消失, 在体内肿瘤移植中也丧失了致瘤性。这提示胶质瘤 CSCs 对于 Notch 通路抑制剂也极为敏感。

由于 Notch 信号通路在肿瘤发生、干性维持、肿瘤血管生成及免疫相关的功能各方面具有重要作用, 因此被认为是肿瘤治疗的一个重要靶点。在临床试验中, γ -分泌酶的抑制剂显示出较好的治疗效果, 但副作用也较大^[40], 这可能与缺乏特异性有关, 因此需要进一步寻找更加特异性的抑制剂。

2.3 Wnt信号通路

Wnt 最初在果蝇中被发现, 是果蝇的分节极性基因, 与果蝇的胚胎发育和蜕变过程中体翼的形成有关。在哺乳动物中, Wnt 通路在胚胎发育和中枢神经系统的形成中具有十分重要的作用。Wnt 信号转导通路包括 Wnt、受体 Frizzled 及下游胞质蛋白, 如 β -catenin、结肠腺瘤样息肉病蛋白 (adenomatous polyposis coli, APC)、糖原合成酶 3 β (GSK-3 β)、轴蛋白 (axin) 和转录因子 T 细胞转录因子 / 淋巴样增强因子 (T cell transcription factor/lymphoid enhancer

factor, TCF/LEF) 等。在没有 Wnt 信号时, β -catenin 与 GSK-3 β 复合物结合, 被磷酸化从而降解, 因此胞质 β -catenin 表达水平很低; 而当 Wnt 配体与 Fizzled 受体结合后, β -catenin 与 GSK-3 β 复合物分离, 不再被降解, 从而在胞质内积聚并向细胞核内转移, 与转录因子 TCF/LEF 结合, 进而调节下游靶基因如 c-Myc、Cyclin D1 等的表达。

Wnt 通路与肺癌和 LCSCs 之间的关系较为密切, 在相关的信号通路转导以及细胞黏附、增殖、凋亡中均有作用^[41]。首先, 肺癌中存在 Wnt 的过度表达^[42], 且 Wnt 信号对于临床 NSCLC 的预后具有一定意义。据报道 NSCLC 临床标本中 Wnt1 的高表达意味着预后较差 (OR = 1.834, $P = 0.032$), 因此, 可以作为影响 NSCLC 预后的独立危险因素^[43]。另一项研究中证实 NSCLC 患者标本中 Wnt2 高表达, 同时用 Wnt2 抗体处理高表达 Wnt2 的细胞株发现细胞发生凋亡^[44]。进一步利用基因表达谱芯片技术对人肺腺癌干细胞和肺正常干细胞的基因差异表达研究发现, 13 个与 Wnt 通路相关的基因表达有明显差异, 其中 8 个上调 (2 倍 \leq 倍率 \leq 13.1 倍), 5 个下调 (2.1 倍 \leq 倍率 \leq 2.8 倍)^[45]。

3 LCSCs与EMT的关系

EMT 是指上皮细胞在形态学上发生向成纤维细胞或间质细胞表型的转变并获得迁移的能力, 在个体发育和组织再生中具有重要作用。研究证实 EMT 在不同类型肿瘤的发生发展中也扮演重要的角色。在肿瘤的转移过程中, 原位癌首先突破上皮细胞基底膜, 从而进入周围组织并随循环系统转移, 然后在特定位点转移出来并逐渐生长。这一过程具备 EMT 类似的特点。在基因水平上, EMT 的重要特征是上皮标志物如 E-cadherin、Cytokeratin 等的丧失, 间质标志物如 N-cadherin、Twist、Snail、Slug 及 Vimentin 等表达的增加。E-cadherin 作为细胞黏附分子, 对于细胞间黏附十分重要, 其丧失意味着黏附能力下降, 细胞转移和侵袭能力增强。Cytokeratin 则对于维持上皮细胞的形态完整性很重要。Vimentin 是间质细胞中的一种中间丝蛋白, 与维持细胞骨架的完整性有关。临床研究证实, EMT 相关蛋白与肺腺癌预后紧密相关, EMT 相关蛋白的表达越高, 患者的生存期和整体状况越差^[46]。

在 NSCLC 的研究中发现, LCSCs 与 EMT 的关系十分密切。Akunuru 等^[28]报道用 TGF- β 1 对 A549、H441 细胞系及人原代肺腺癌细胞进行处理

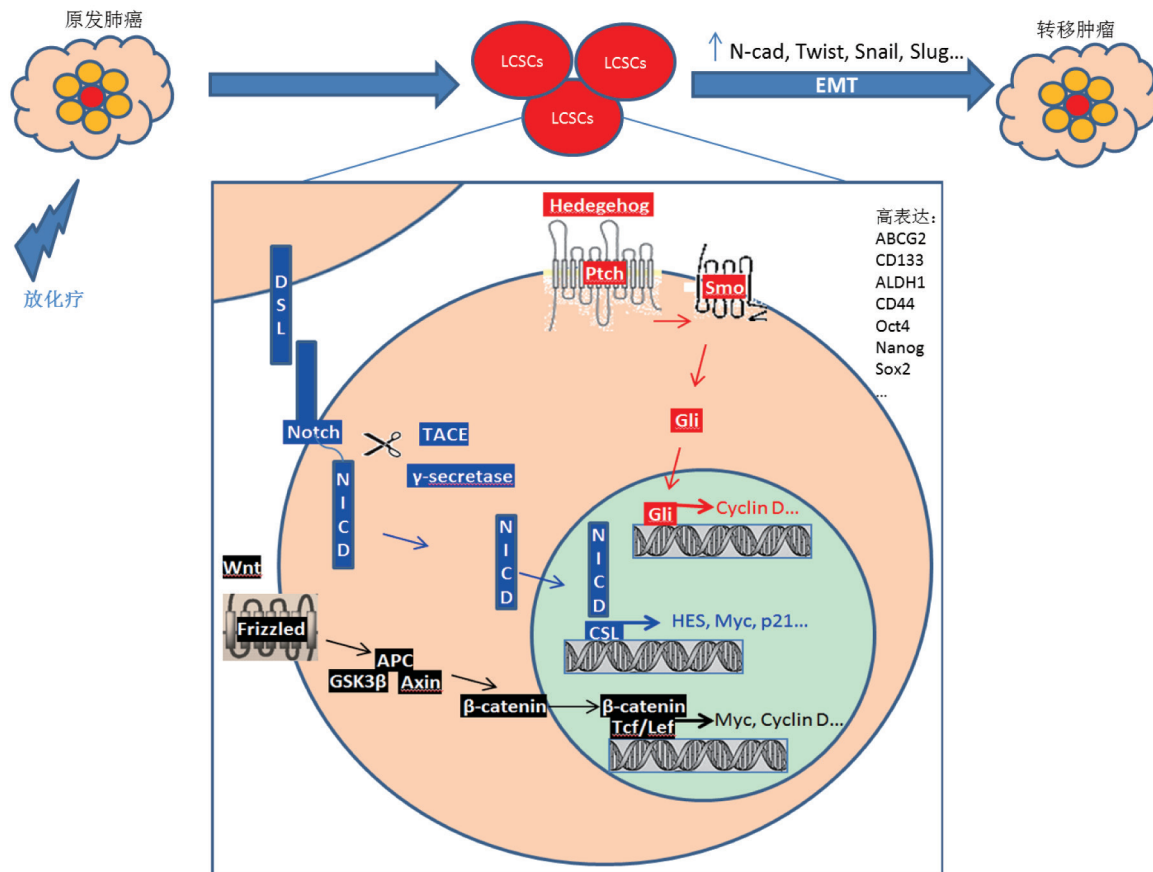
可促进 EMT 过程的发生。在该过程中, E-cadherin 表达下降, N-cadherin、Twist、Snail 及 Fibronectin 等基因表达上升。有趣的是, 该过程伴随着 CD133 阳性和 ALDH 阳性细胞比例的明显上升, 但 SP 阳性的细胞比例却明显下降。当 TGF- β 1 撤除以后, 以上表面标志的表达又发生逆转。另外, TGF- β 1 的处理还可以使 NSCLC 干性相关基因 Oct4 和 Nanog 等表达增加, Notch 等信号通路也表达增加, 侵袭相关基因 HoxB9、VEGFA、IL-1 β 和 IL-6 表达水平上升, 细胞的体外成球能力增加。同样, 当 TGF- β 1 撤除以后, 以上生物学特性的变化又发生逆转。进一步针对 EMT 过程中关键调控基因 Rac1 的研究发现, TGF- β 1 处理细胞后 Rac1-GTP 的表达水平上升, 而敲除 Rac1 后可阻断 EMT 现象的发生, 且细胞成球能力下降, 阻断了 TGF- β 1 诱导产生的 ALDH 阳性细胞比例增加及 SP 细胞比例下降现象。这些结果提示, LCSCs 与非 LCSCs 之间存在一种动态平衡, 在特定的条件下可以相互转化。作为肿瘤微环境成分之一的成纤维细胞被证实参与了 NSCLC 细胞 EMT 过程。2013 年, Shintani 等^[47]研究发现, NSCLC 肿瘤组织中成纤维细胞通过分泌 TGF- β 1, 在诱导 NSCLC 肿瘤细胞获取 EMT 特性, 进而向 LCSCs 转化的过程中具有重要作用。NF- κ B 在 TGF- β 诱导的 NSCLC 的 LCSCs 产生过程中也扮演关键的角色。Kumar 等^[48]利用三维悬浮细胞培养技术观察到 EMT 过程伴随 NF- κ B 的组成性表达, 并且抑制 NF- κ B 可以使 EMT 相关标志蛋白表达下降, 细胞的侵袭和转移能力也下降。有意思的是, 对 NSCLC 细胞系 A549 和 H460 进行放疗处理后, 具有放疗抵抗特性的类 LCSCs 亦可观察到 EMT 特征性蛋白的表达^[49]。对 LCSCs 的特性描述见图 1。

4 展望

近年来, 科研人员不仅对 LCSCs 的相关表型进行了观察, 而且对 LCSCs 的生物学特性及相关信号通路进行了广泛的研究。尽管依然存在一些争议, 但随着人们对 LCSCs 认识的不断深入, 靶向 LCSCs 或针对 LCSCs 异常信号通路的药物将具有良好的应用前景, 这些努力也必将使肿瘤治疗进入新的阶段。

[参 考 文 献]

[1] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem



放化疗抵抗的肺癌干细胞表达一系列标志物及干性相关基因，同时存在Hedgehog、Notch和Wnt等信号通路的异常激活。EMT在肺癌干细胞侵袭转移形成转移肿瘤中具有重要作用。

图1 放化疗抵抗的LCSCs中激活的信号通路

- cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9339-44
- [2] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-7
- [3] 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
- [4] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med*, 1996, 183(4): 1797-806
- [5] 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. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 4827-33
- [6] Shi Y, Fu X, Hua Y, et al. The side population in human lung cancer cell line NCI-H460 is enriched in stem-like cancer cells. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33358
- [7] Singh S, Bora-Singhal N, Kroeger J, et al. β arrestin-1 and Mcl-1 modulate self-renewal growth of cancer stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55982
- [8] Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3): 504-14
- [9] Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*, 2004, 57(9): 965-9
- [10] Wang P, Suo Z, Wang M, et al. *In vitro* and *in vivo* properties of CD133 expressing cells from human lung cancer cell lines. *Exp Hematol Oncol*, 2013, 2(1): 16
- [11] Le H, Zeng F, Xu L, et al. The role of CD133 expression in the carcinogenesis and prognosis of patients with lung cancer. *Mol Med Rep*, 2013, 8(5): 1511-8
- [12] Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(31): 11707-12
- [13] 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. *Stem Cells*, 2005, 23(6): 752-60
- [14] 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
- [15] Huang CP, Tsai MF, Chang TH, et al. ALDH-positive lung

- cancer stem cells confer resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Lett*, 2013, 328(1): 144-51
- [16] Alamgeer M, Ganju V, Szczepny A, et al. The prognostic significance of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) and CD133 expression in early stage non-small cell lung cancer. *Thorax*, 2013, 68(12): 1095-104
- [17] Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, et al. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS One*, 2008, 3(8): e3077
- [18] Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, et al. Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54193
- [19] Freitas DP, Teixeira CA, Santos-Silva F, et al. Therapy-induced enrichment of putative lung cancer stem-like cells. *Int J Cancer*, 2014, 134(6): 1270-8
- [20] Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One*, 2010, 5(11): e14062
- [21] Li GJ, Huang YC, Tian LW, et al. Relationship between high incidence of lung cancer among non-smoking women and silica in C1 bituminous coal in Xuanwei, Yunnan Province, China. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 2013, 31(1): 30-6
- [22] Yan X, Luo H, Zhou X, et al. Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H446 cell lines. *Oncol Rep*, 2013, 30(6): 2733-40
- [23] Wang P, Gao Q, Suo Z, et al. Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57020
- [24] Zhang X, Wang H, Jin B, et al. Correlations between OCT4 expression and clinicopathological factors and prognosis of patients with lung adenocarcinoma. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2013, 16(4): 197-202
- [25] Chou YT, Lee CC, Hsiao SH, et al. The emerging role of SOX2 in cell proliferation and survival and its crosstalk with oncogenic signaling in lung cancer. *Stem Cells*, 2013, 31(12): 2067-19
- [26] Du Y, Ma C, Wang Z, et al. Nanog, a novel prognostic marker for lung cancer. *Surg Oncol*, 2013, 22(4): 224-9
- [27] Gottschling S, Jensen K, Warth A, et al. Stage-specific embryonic antigen-4 is expressed in basaloid lung cancer and associated with poor prognosis. *Eur Respir J*, 2013, 41(3): 656-63
- [28] Akunuru S, James Zhai Q, Zheng Y. Non-small cell lung cancer stem/progenitor cells are enriched in multiple distinct phenotypic subpopulations and exhibit plasticity. *Cell Death Dis*, 2012, 3: e352
- [29] Regala RP, Davis RK, Kunz A, et al. Atypical protein kinase C α is required for bronchioalveolar stem cell expansion and lung tumorigenesis. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7603-11
- [30] Justilien V, Walsh MP, Ali SA, et al. Abstract B02: Protein kinase C α is required for the maintenance of a tumor-initiating cell phenotype in lung squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(2 Supplement): B02
- [31] Li C, Zhang Y, Lu Y, et al. Evidence of the cross talk between Wnt and Notch signaling pathways in non-small-cell lung cancer (NSCLC): Notch3-siRNA weakens the effect of LiCl on the cell cycle of NSCLC cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(5): 771-8
- [32] Ding XY, Ding J, Wu K, et al. Cross-talk between endothelial cells and tumor via delta-like ligand 4/Notch/PTEN signaling inhibits lung cancer growth. *Oncogene*, 2012, 31(23): 2899-906
- [33] Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, et al. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 2003, 422(6929): 313-7
- [34] Park KS, Martelotto LG, Peifer M, et al. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1504-8
- [35] Weijzen S, Rizzo P, Braid M, et al. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med*, 2002, 8(9): 979-86
- [36] Licciulli S, Avila JL, Hanlon L, et al. Notch1 is required for kras-induced lung adenocarcinoma and controls tumor cell survival via p53. *Cancer Res*, 2013, 73(19): 5974-84
- [37] Hassan KA, Wang L, Korkaya H, et al. Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8): 1972-80
- [38] Sullivan JP, Spinola M, Dodge M, et al. Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on Notch signaling. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9937-48
- [39] Fan X, Matsui W, Khaki L, et al. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7445-52
- [40] Imbimbo BP. Therapeutic potential of γ -secretase inhibitors and modulators. *Curr Top Med Chem*, 2008, 8(1): 54-61
- [41] Garcia Campelo MR, Alonso Curbera G, Aparicio Gallego G, et al. Stem cell and lung cancer development: blaming the Wnt, Hh and Notch signalling pathway. *Clin Transl Oncol*, 2011, 13(2): 77-83
- [42] Mazieres J, He B, You L, et al. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett*, 2005, 222(1): 1-10
- [43] Wang Q, Zhan P, Yu L, et al. The correlation between the expression of Wnt1 and prognosis in resected non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2010, 13(6): 586-90
- [44] You L, He B, Xu Z, et al. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene*, 2004, 23(36): 6170-4
- [45] Luo FK, Zhao ZG, Zhao WP, et al. Analysis of the different gene expression profiles between lung adenocarcinoma stem cells and normal lung stem cells with cDNA microarrays. *Chin J Blood Transfusion*, 2009, 22(4): 269-74
- [46] Shi Y, Wu H, Zhang M, et al. Expression of the epithelial-mesenchymal transition-related proteins and their clinical significance in lung adenocarcinoma. *Diagn Pathol*,

- 2013, 8: 89
- [47] Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, et al. Pulmonary fibroblasts induce epithelial mesenchymal transition and some characteristics of stem cells in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 2013, 96(2): 425-33
- [48] Kumar M, Allison DF, Baranova NN, et al. NF- κ B regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68597
- [49] Gomez-Casal R, Bhattacharya C, Ganesh N, et al. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 94