

肿瘤干细胞起源及其生物学特性

陈 晶 蔡 荣 钱 程*

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘要 肿瘤干细胞与正常成体干细胞在自我更新与增殖分化能力、表型标记和强耐药性等诸多方面存在着相类似的生物学特征, 所以肿瘤干细胞被推测为肿瘤发生的细胞起源。基于肿瘤干细胞与正常干细胞之间的相似性质和肿瘤发生的分子机制, 科学家建立了一系列从肿瘤组织或肿瘤细胞系分离肿瘤干细胞的实验方法和研究肿瘤干细胞起源的动物实验模型。现就目前在肿瘤干细胞起源和生物学特性领域的研究作概括阐述。

关键词 肿瘤干细胞; 成体干细胞; 表型标记

早在20世纪50年代就有科学家通过肿瘤细胞自体移植实验发现肿瘤组织中极少数细胞能诱发新的肿瘤组织, 由此科学家们提出了肿瘤干细胞的假设^[1,2]。早期研究通过软琼脂克隆形成以及动物体内成瘤实验发现白血病和一些实体肿瘤组织中都存在少量特殊细胞, 在体外它们可以单独形成克隆, 在体内它们能够形成肿瘤组织, 而大部分肿瘤细胞不具备这种能力^[1]。

众所周知, 正常成体干细胞能够通过自我更新长期生存, 其不对称分裂还能产生成熟的组织细胞或已分化的前体细胞从而产生正常组织, 组织中前体细胞和成熟细胞拥有一定的增殖潜能, 但它们不具备干细胞的多潜能未分化性质, 其增殖能力是有限的, 这些细胞的生命周期较为短暂, 很快衰老、死亡, 于是自我更新以及增殖分化能力被认为是定界干细胞与分化的成熟细胞的标准^[3]。有研究表明恶性肿瘤组织中的细胞大部分都已分化成熟, 并在肿瘤组织内部形成不同等级, 这些已分化的肿瘤细胞的增殖能力均有局限性, 科学家推测肿瘤组织中那些极少数量的有能力在体外形成克隆, 在体内再生肿瘤的特殊细胞执行着肿瘤组织起始细胞功能, 它们被称为肿瘤干细胞^[3]。

肿瘤干细胞是否与成体干细胞有相类似的性质, 两种干细胞相异之处, 肿瘤干细胞与肿瘤组织之间是否存在因果关系, 肿瘤干细胞与已分化的肿瘤细胞的异同点以及肿瘤干细胞的起源等问题的解决将有助于人们真正了解肿瘤的起源, 帮助科学家尽快找到根治癌症的方法, 这些问题已成为目前研究肿瘤干细胞的热点。

与早期通过体外克隆形成实验来鉴定肿瘤组织中可形成克隆的细胞的方法不同, 现在利用高效的流式细胞仪和磁性细胞分选仪分选肿瘤干细胞。

流式细胞仪分选是较常用的分离肿瘤干细胞的方法, 主要通过两种途径进行: ①表型标记筛选法。由于特殊细胞表面带有特异性膜蛋白(也称表型标记), 用荧光标记的表型标记的抗体温育细胞, 抗体结合到表型标记后, 在流式细胞仪荧光活化系统检测下可将标有荧光的细胞分选出来; ②侧群细胞筛选法。用结合DNA的荧光染料Hoechst 33342处理细胞, 利用肿瘤干细胞可将染料泵出细胞的性质, 经过荧光活化细胞分选系统(fluorescence activated cell sorter, FACS)的分析, 将不被染色或低染色的肿瘤干细胞筛选出来, 又可称为侧群细胞(side-population cell, SP)分选法^[4]。

磁性细胞分选技术原理与表型标记筛选法基本相同: 将吸附有表型标记抗体的微小磁珠与细胞共同温育, 表达特殊表型标记的细胞被吸附在磁珠上, 通过Miltenyi Biotec公司生产的分选仪器和配套试剂分选出吸附细胞的磁珠, 利用洗液将细胞从磁珠上洗脱下来^[5]。

分选出来的肿瘤细胞需经过各种验证加以证明它们是否具有干细胞特性, 也即是否具备自我更新与增殖分化的能力, 现在通常用的验证手段分体外与体内实验两种。

体外实验主要包括经典的克隆形成实验和测量

1 分离和鉴定肿瘤干细胞的方法

收稿日期: 2006-09-06 接受日期: 2006-12-12

国家重点基础研究发展规划(973计划)(No.2004CB518804)和浙江省留学回国基金(No.116153A4105038)资助项目

*通讯作者。Tel: 0571-86843186, E-mail: cqian@unav.es

细胞生长曲线。在克隆形成实验中, 将分选的阴性及阳性细胞分别以低浓度移植到细胞培养容器内(一般选用96孔培养板, 每孔植入100或200个细胞), 大约7天后观察其各自克隆形成情况, 由此证明分选的细胞形成克隆的能力; 将细胞植入96孔培养板, 其中每孔1000个细胞, 用检测细胞生长的试剂盒和酶标仪, 每两天检测一次细胞生长指数, 连续跟踪观察7至8天, 描绘出细胞生长曲线, 对比分选的阴性与阳性细胞生长速度来确定分选的细胞在体外的增殖能力^[5]。

体内实验是对肿瘤干细胞自我更新与增殖分化能力的直接验证。将分选出的不同数量的阴性和阳性细胞分别注射到严重免疫缺陷的实验小鼠体内(例如分别一次性注射100、200、500、1000个细胞)观察不同细胞体内成瘤的情况和免疫组织化学检测, 由此推断目的细胞形成肿瘤组织和增殖分化出不同成熟细胞的能力^[6]。

另外, 还有许多其他鉴定分选出的细胞特性的方法。免疫细胞化学实验是将分选出的贴壁生长的肿瘤细胞种植在盖玻片上(即细胞爬片实验)检测该种类型的细胞在体外增殖能否产生异质细胞与自我更新生成更多的同质细胞。鉴于正常成体干细胞增殖速度慢而大部分时间处于G₀期的特性, 也可对分选出的肿瘤细胞进行G₀期鉴定, 证明肿瘤干细胞的干细胞特性。很多研究还运用分子生物学的实验方法(例如RT-PCR等)来研究分选出的细胞的生物学特性^[7]。

2 肿瘤干细胞的生物学特性

目前分离出来的不同肿瘤组织或细胞系中的肿瘤干细胞与正常成体干细胞不仅在自我更新与增殖分化能力上有相似性, 而且两者在表型标记及细胞内存在的特异分子标记上也有共同之处, 以及在细胞外排药物或细胞毒素方面两者都较它们所在组织中已分化的细胞强。

Brian等^[1]筛选出带CD34⁺分子标记的急性骨髓性白血病细胞具有干细胞特性, 而CD34也是造血干细胞的表型标记; Ponti等^[8]发现乳腺癌干细胞表达正常干细胞标记分子Oct-4; Singh等^[5,6]研究证实大脑恶性肿瘤干细胞不仅带有造血干细胞和神经系统干细胞表型标记CD133^[9], 且表达成体干细胞特异分子nestin; Kim等^[10]研究证明肺组织成体干细胞可转化为肺癌干细胞, 在研究中发现一定条件下诱发的肺癌干细胞表达成体干细胞标记分子Sca-1和CD34;

Bapat等^[7]已从卵巢癌中分离出两种有卵巢癌干细胞特性的癌细胞, 这两种细胞表达正常干细胞标记分子nestin、Oct4和nanog, 而Oct4和nanog分子则是维持处于细胞未分化状态下的转录因子, 将该细胞注入动物体内可形成肿瘤; Collins等^[11]从前列腺癌中筛选出带有CD44⁺/α2β1^{hi}/CD133⁺表型标记的肿瘤细胞, 这些细胞膜抗原也是前列腺上皮干细胞的典型标记分子, 筛选出的细胞含量只占研究标本中细胞总量的0.1%, 通过比较分析, 研究发现带有CD44⁺/α2β1^{hi}/CD133⁺表面分子的细胞其复制与自我更新能力显著地高于其他肿瘤细胞, 并且在体外实验研究中证明有较强的侵入性。两种干细胞共同的表型标记在维持干细胞特性的具体功能仍有待于进一步研究。

细胞通常表达一些ATP结合转运蛋白(ATP-binding cassette, ABC), 利用ATP能量将对细胞有毒害的外来物质泵出胞外以达到保护细胞自身的目的, 造血干细胞这种排除毒素的能力比已分化的细胞更强, 因为它表达ABCG2(哺乳动物细胞表达的一种重要的ABC)较已分化的细胞多。Goodell等^[12]运用造血干细胞的这种耐药机理建立了筛选出造血干细胞的SP细胞筛选体系, 此法被推广于筛选其他组织类型的干细胞, 如肝组织干细胞等^[14]。将这种筛选方法用于筛选出肿瘤组织和肿瘤细胞系中的SP细胞, 发现这些肿瘤侧群细胞具有干细胞特性^[2], 例如分选出成神经细胞瘤^[13]、乳腺癌^[14]和肝癌细胞系Huh7与PLC/PRF/5^[15]中的SP细胞都具有肿瘤干细胞性质, 通过RT-PCR分析, SP细胞表达ABCG2远比非SP细胞表达量高。

3 肿瘤干细胞起源的研究

研究发现细胞恶性转化不是单纯个别基因变异的结果, 而是细胞内多基因突变的累积。由于已分化的细胞其生命周期较短, 从理论上推测无法完成这些多重基因变异的累积, 但是干细胞具有自我更新、长期存活以及相对无限增殖等特征, 这些生物学特性为它们多重变异累积提供潜在的可能性^[3], 有科学家推测肿瘤干细胞起源于正常干细胞。以下将概述几种组织肿瘤干细胞起源的研究。

3.1 白血病干细胞

Jamieson等^[16]在慢性髓细胞性白血病的研究中发现: 伴随着慢性髓细胞性白血病的发生, 粒性白细胞/巨噬细胞的前体细胞大量增殖, 而造血干细胞的数量却没变化, 并且这种前体细胞核内β连环蛋白水

平明显增高,胞内融合基因BCR-ABL扩增,其中 β 连环蛋白是Wnt信号通路的下游激活因子,是干细胞保持其自我更新能力的标志分子,它在前体细胞核内水平增高说明此细胞获得自我更新的能力^[3];BCR-ABL基因的持续表达是维持白血病细胞增殖先决条件。由此,研究者认为:在慢性髓细胞性白血病的发生和发展中,变异的粒性白细胞/巨噬细胞的前体细胞充当着肿瘤干细胞的角色。

除上述的 β 连环蛋白和BCR-ABL两个因子外,很多其它的分子在肿瘤发生的分子机制中也起重要的作用,例如JunB——一种骨髓组织生成的转录调控因子,同时也是一种潜在的肿瘤抑制因子,其基因失活或缺陷将引起骨髓组织增殖失控,促使白血病发生^[17]。Passequé等^[18]发现:JunB基因失活的小鼠长期造血干细胞和粒性白细胞/巨噬细胞的前体细胞大量增殖,造成类似慢性髓细胞性白血病样病变,产生早期的骨髓及外骨髓增生紊乱症状,而这种症状的发生与长期造血干细胞内JunB基因失活以及长期造血干细胞增殖失控直接相关,这项研究结果暗示造血干细胞变异可能是慢性髓细胞性白血病发生的起源,造血干细胞可能充当慢性髓细胞性白血病干细胞前体的角色。

3.2 间质干细胞转化为肿瘤干细胞模型

从人体骨髓组织中提取的间质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSC)表现出具有多潜能的生物学特性,能分化成中胚层骨骼、肌肉、软骨和脂肪等组织,但是在体外它缺乏端粒酶活性,细胞寿命较短,增殖能力有限。为了克服这个缺陷,建立了反转录病毒载体介导端粒酶的反转录酶亚基表达的人类间质细胞系hMSC-TERT20,这个细胞系体外增殖寿命大大增强,并在免疫缺陷小鼠体内有致瘤性质,但在体外连续培养20代后,细胞发生分化,部分细胞丧失致瘤功能;另有部分毛细管状细胞在缺乏血清培养情况下仍具活力,并高表达细胞周期蛋白D1,它们还保存有其母代细胞的致瘤性质。这项研究证明有致瘤性质的hMSC-TERT20具有肿瘤干细胞的功能,并提供了一个正常干细胞转化为肿瘤干细胞的模型^[13]。

3.3 Lox-Stop-Lox-K-ras 小鼠肺癌模型

肺支气管Clara细胞的前体细胞的功能是维持细支气管和末端支气管上皮细胞的数量与更新,它表达特异性蛋白分子CCA;而肺泡细胞II(AT2)则维持肺泡上皮细胞的数量与更新,其细胞表面带有特异性分子标记SP-C(prosurfactant apoprotein-C)。通过双荧光免疫方法发现末端支气管部位存在带有表型标记

CCA⁺和SP-C⁺的双阳性细胞,该细胞被称为支气管-肺泡干细胞(BASC)。用化学物质萘处理小鼠呼吸道后使小鼠肺部Clara细胞数量大大减少,而BASC数量增加,BASC作用是帮助修复已损害的支气管上皮细胞,停止使用化学试剂萘处理后BASC数量可恢复到原有水平;而用化疗药物博来霉素处理小鼠呼吸道,当肺泡细胞处于严重缺损状态时BASC数量却大大增加,可得到用萘处理的小鼠呼吸道相同的实验结果,提示BASC可维持肺泡上皮细胞的动态平衡。通过流式细胞仪筛选出带有干细胞表型标记Sca-1⁺/CD45⁻/Pecam⁻/CD34⁺的BASC,再通过体外细胞单克隆形成、细胞分化等实验证实BASC具有干细胞自我更新与全能分化的特性。

肺癌中存在不同类型的癌细胞,如鳞癌和腺癌等,它们具有不同的生物学特性,很难从它们的性质判断肺癌起源于何种类型的细胞。为确定肺癌的细胞起源,Kim等^[10]建立一个LSL-k-ras G12D鼠系模型,该小鼠带有由Lox-Stop-Lox调控的原癌基因K-ras表达序列:K-ras基因被一种可切除的转录终止元件“Stop”所抑制,通过小鼠鼻腔呼吸道感染表达Cre重组酶的重组腺病毒,由Cre切割lox位点切除Stop元件以解除对k-ras的抑制,促使肺部细胞恶性转化。同时通过上呼吸道将化学物质萘处理小鼠,研究发现肺部只有BASC及AT2仍可保持分裂增殖的活性状态,研究人员通过体内外实验证实肿瘤细胞数量和肿瘤在肺泡表面扩展面积随着BASC的增多而增加,但与AT2无关;在诱导生成的癌组织中既含有CCA⁺和SP-C⁺双标记的BASC细胞,又含有SP-C⁺单标记的已分化的组织细胞,实验显示恶性转化的细胞是含有CCA⁺和SP-C⁺双标记的BASC细胞,并且BASC转化后的细胞有继续分化的能力。Kim等由此认为恶性转化了的BASC可能是来源于肺组织的成体干细胞。

3.4 LAP-tTA/tet-off MYC 小鼠肝癌模型

Shachaf等^[19]将分别带有LAP-tTA和TRE-MYC序列的两种小鼠系进行杂交,得到LAP-tTA-tet-off MYC杂交鼠系,建立了一个研究肝肿瘤干细胞起源的动物模型。MYC是一种原癌基因;LAP是肝脏激活蛋白,其启动子限制tTA基因只在肝细胞中表达;tTA是四环素控制的转录激活蛋白;tet-off系统由大肠杆菌的四环素耐受操纵子和基因的启动子融合而成。研究发现在用四环素类似物强力霉素处理情况下tTA与强力霉素结合从而抑制tet-off系统活性使

MYC不转录,其最终结果是小鼠存活;在无强力霉素处理的情况下,tTA则与tet-off系统结合使MYC转录、表达,其最终结果是细胞发生恶性转化而诱发肝癌,这种通过在一定条件下诱发的肝癌与在自然条件下生长的肝癌极为相似,该小鼠的存活期通常在12周左右。将所诱发的肝癌细胞移植到重症免疫缺陷病(SCID)小鼠模型体内,再用强力霉素处理小鼠时研究发现在濒临死亡的小鼠体内所移植的肝癌细胞竟然消失,其中大部分癌细胞发生凋亡,较小部分的癌细胞转化为正常肝细胞,分化成肝实质细胞和胆管细胞,并且在受体小鼠体内形成胆管状结构;再次停用强力霉素处理时,那部分肿瘤细胞的转化而来的正常肝细胞可再次发生恶性转化,并增殖形成肿瘤块。此研究将分离的原代肝癌细胞连续移植到SCID小鼠模型体内,经5次连续传代,传代期为两年。因为已分化的正常肝细胞的生命周期不可能达到两年,所以MYC失活、肿瘤消退后良性转化的正常肝细胞不可能是和原代肝癌细胞随行的正常肝细胞。矩阵比较基因组杂交实验证明在MYC激活、失活与再激活等不同条件下,历经恶性和良性反复转化过程的所有细胞的第二条染色体有相同的变异,说明MYC失活后分化的正常细胞与MYC激活时的癌细胞具有同源性。另外,在MYC失活后已转化为正常细胞中的部分细胞表达肝组织成体干细胞标记分子CK19。由此看来,在移植的癌细胞中存在一些特殊细胞群体,细胞群体在MYC激活、细胞恶性转化时具有肿瘤起始细胞功能,MYC失活、细胞良性转化时又充当正常干细胞。实验资料充分显示诱导发生的肝癌由肝组织成体干细胞或前体细胞恶性转化后增殖形成。

4 小结与展望

虽然目前已发现在白血病和多种实体瘤内存在少量特殊肿瘤细胞系肿瘤干细胞,这些细胞与正常成体干细胞有着很多相似性,移植到免疫缺陷的实验小鼠体内具有很强的成瘤能力,但是目前科学界尚无法完全确定肿瘤干细胞与自然发生的肿瘤之间是否具有因果关系,进一步研究肿瘤干细胞的生物学特性以及它与肿瘤之间的关系将有助于人们去发掘肿瘤发生的自然机制,也是研究治疗肿瘤疾病的关键所在。

另一方面,证实肿瘤干细胞的起源也有助于我们去了解肿瘤干细胞与肿瘤发生之间的关系以及肿瘤干细胞的生物学特性。鉴于肿瘤干细胞是否真正起源于正常干细胞的种种推测,目前这方面研究主要集

中在建立各种细胞模型,特别是干细胞模型,通过基因载体——腺病毒和反转录病毒等,将特殊基因,如原癌基因或抑癌基因转入细胞内,诱导细胞增殖失控或恶性转化,转化的细胞移植到免疫缺陷小鼠体内,观察其成瘤能力,已有部分实验充分证明转化的细胞具备肿瘤干细胞的功能,由此推测在自然状态下发生的肿瘤组织中的肿瘤干细胞有可能起源于正常干细胞。但是人工模型与在自然状态下发生的肿瘤目前还不能完全划上等号,更为重要的是目前还没有更多的实验数据对这一现象以及恶性转化后细胞的成瘤能力是否具有普遍性质加以证实。但是从胚胎干细胞能生成畸胎瘤的这一病例上去思考问题,正常干细胞与肿瘤发生很可能存在着密切的关联。Uhrbom等^[20]研究证实:缺失肿瘤抑制位点INK4a-ARF后,已分化的星形胶质细胞可去分化为神经前体细胞,在致癌因素条件下很容易产生恶性转化引起神经胶质细胞瘤,由此看来,已分化成熟的细胞在某些关键基因突变的情况下也可能发生细胞的恶性转化为肿瘤干细胞而获得成瘤能力。这样不得不引起科学界思索下一个问题:肿瘤干细胞的起源是单一性还是多样性。

此外,有研究证明在正常发育条件下造血干细胞也可分化为非血液细胞系,如肌肉细胞和心肌细胞等,并发育为不同组织和器官^[21],正常组织和器官可以由并非其相应成体干细胞发育而来,特定肿瘤组织的肿瘤干细胞是否也可能与其生成的肿瘤组织具有组织异质性。

总之,肿瘤干细胞与肿瘤组织的关系,肿瘤干细胞的起源及其生物学特性还有待于更多的研究工作去证实。

参考文献(References)

- [1] Huntly BJ *et al.* *Nat Rev Cancer*, 2005, **5**: 311
- [2] Dean M *et al.* *Nat Rev Cancer*, 2005, **5**: 275
- [3] Reya T *et al.* *Nature*, 2001, **414**: 105
- [4] Eaker SS *et al.* In: Hawley TS *et al.* (eds.) *Flow Cytometry Protocols*, 2nd ed., Totowa: Humana Press, 2004, 161
- [5] Singh SK *et al.* *Cancer Res*, 2003, **63**: 5821
- [6] Singh SK *et al.* *Nature*, 2004, **432**: 396
- [7] Bapat SA *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**: 3025
- [8] Ponti D *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**: 5506
- [9] Yin AH *et al.* *Blood*, 1997, **90**: 5002
- [10] Kim CF *et al.* *Cell*, 2005, **121**: 823
- [11] Collins AT *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**: 10946
- [12] Goodell MA *et al.* *Nat Med*, 1997, **3**: 1337
- [13] Hirschmann-Jax C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 14228

- [14] Al-Hajj M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 3983
[15] Chiba T *et al.* *Hepatology*, 2006, **44**: 240
[16] Catriona C H Jamieson *et al.* *N Engl J Med*, 2004, **351**: 657
[17] Polakis P. *Genes Dev*, 2000, **14**: 1837
[18] Passegue E *et al.* *Cell*, 2004, **119**: 431
[19] Shachaf CM *et al.* *Nature*, 2004, **431**: 1112
[20] Uhrbom L *et al.* *Cancer Res*, 2002, **62**: 5551
[21] Zhang N *et al.* *Stem Cells Dev*, 2006, **15**: 17

The Origin and Biological Characteristics of Tumor Stem Cells

Jing Chen, Rong Cai, Cheng Qian*

(Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract It is suspected that tumor stem cells give rise to tumorigenesis in that tumor stem cells share some biological characteristics with normal stem cells in self-renewal, proliferation & differentiation, expression of same superficial markers and strong drug-resistance. According to the similarity between tumor stem cells and normal stem cells, scientists explored a series of scientific experiment methods and established a number of experiment models in order to separate tumor stem cells from tumor tissues or tumor cell lines and discover the origin of tumor stem cells. This review comprehensively explains the latest studies on the origin and biological characteristics of tumor stem cells.

Key words tumor stem cell; stem cell; superficial marker

Received: September 6, 2006 Accepted: December 12, 2006

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2004CB518804) and the Foundation for Returnees from the Abroad of Zhejiang Province (No.116153A4I05038)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86843186, E-mail: cqian@unav.es