

靶向白血病干细胞作为治疗的新策略

张艳红 李恭楚*

(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 白血病干细胞被认为是白血病发生、发展及治疗后复发的根源, 具有其特异的性状特征, 以及自我更新、增殖和分化等能力。近年来以白血病干细胞作为治疗靶点已成为白血病治疗的一种新策略, 目前的研究主要针对白血病干细胞表面分子、细胞内信号通路及与微环境的相互作用这三方面展开。对白血病干细胞的进一步认识将有助于提供新的更为有效的治疗靶点。

关键词 白血病干细胞; 靶向; 治疗

白血病是一种在正常造血过程中由于某一阶段细胞恶性扩增而产生的造血系统疾病^[1]。目前, 白血病的治疗方法主要有化疗和骨髓移植, 但这两种方法都存在一定的缺陷。例如, 化疗药物环磷酰胺可导致内皮细胞与肝功能损伤以及免疫抑制^[2], 化疗期间还可能因感染和出血导致死亡。骨髓移植可能引起移植并发症及排异反应。目前, 传统治疗方法面临的主要难题是如何解决白血病的愈后复发问题。近几年的研究提示, 愈后复发的根本原因在于白血病患者体内存在白血病干细胞 (leukemia stem cell, LSC), 这群细胞通常处于静止状态, 对药物有抗性^[1, 3-5], 因而不能被一般治疗方法清除。一旦条件适合, 残留的白血病干细胞又可通过增殖与分化引发新的白血病。

自 Bonnet 等^[6]开始白血病干细胞的研究以来, 人们对其特征已有了一定认识。研究发现, 白血病干细胞和造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 一样具有很强的增殖能力, 可在免疫缺陷型小鼠体内诱发出各亚型的白血病, 在二次移植受体鼠体内也获得同样的结果, 表明这群细胞具备长期自我更新能力, 即可以长期通过分裂产生新的干细胞, 是白血病发生、发展及治疗后复发的重要原因^[7, 8]。靶向白血病干细胞作为治疗白血病的新策略已引起研究者的广泛关注, 目前的研究主要针对其细胞表面分子、细胞内信号通路及与微环境的关系等方面展开。

1 靶向白血病干细胞表面分子

选择白血病干细胞特异的表面分子作为治疗靶点是要解决的关键问题。研究者曾针对白血病干细胞高表达药物泵的特点, 研制了抑制 ATP 相关转运蛋白的药剂, 但效果都不理想^[9, 10], 其原因是这种转运蛋白在正常干细胞中也有表达, 所以也就达不到特异性

的要求。

白血病干细胞与正常造血干细胞的表型特征有相同的地方, 但近年的研究也发现了一些差异。两者均表达 CD34 而不表达 CD38, 但 Thy-1 (CD90) 和 c-Kit (CD117) 在正常造血干细胞中表达而在白血病干细胞中则不表达^[11, 12]。另外, IL-3 受体 α 链 (CD123) 是急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 干细胞区别于造血干细胞的特异分子标记^[13]。Hosen 等^[14]发现了一种新的 AML 干细胞表面分子 CD96, 它是 Ig 基因超家族的一员。流式细胞术分析显示, CD96 在 CD34⁺/CD38⁻ AML 细胞中表达率为 (74.0 ± 25.3)%, 同时在正常造血干细胞中表达率仅为 (4.9 ± 1.6)%。为了检测 CD96⁺ AML 细胞是否具有白血病干细胞活性, 将分离得到的 CD96⁺ 细胞和 CD96⁻ 细胞分别移植到辐照的 Rag2^{-/-} γ (c)^{-/-} 新生小鼠中, 发现 CD96⁺ 细胞在 5 例小鼠中有 4 例移植成功。这表明 CD96 是 AML 干细胞表面特异分子之一。

Feuring-Buske 等^[15]于 2002 年构建了白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 与 IL-3 的融合蛋白 (DT₃₈₈IL3)。白喉毒素是一种分子量为 58 kDa 的蛋白质, 包括 AB 两部分, B 介导毒素与细胞表面受体的结合, A 可以使延伸因子 2 失活, 从而抑制蛋白质合成, 引发细胞凋亡。由于 IL-3 受体在许多 AML 病人体内都呈现高表达, 因此可以通过 IL-3 与其受体的特异性结合, 使白喉毒素特异性结合 AML 细胞。利用体外培养实验证实 DT₃₈₈IL3 在浓度为 50 ng/ml 时, 便可以杀死大部分白血病祖细胞。通过将 DT₃₈₈IL3 处理过的

收稿日期: 2007-10-17 接受日期: 2007-12-27

国家基础研究发展规划(973 计划)(No.2004CB518804)和浙江理工大学科研启动基金项目(No.0616066-Y)资助

* 通讯作者。 Tel: 0571-86843187, Fax: 0571-86843185, E-mail: lgc@zstu.edu.cn

AML细胞移植到NOD/SCID小鼠体内,发现DT₃₈₈IL3对白血病干细胞也有作用。这表明CD123可作为靶向白血病干细胞的治疗靶点。Liu等^[16]也构建了白喉毒素与IL-3融合蛋白,并对IL-3进行了改造,包括将IL-3的第116位氨基酸由赖氨酸突变为色氨酸,或将其第125到第133位氨基酸删除。这两种改造均提高了IL-3与其受体的亲和力,从而增强了该融合蛋白的杀伤力。Du等^[17]利用CD123抗体的单链可变区片段(Fvs)与假单胞菌外毒素A(Pseudomonas Exotoxin A)的38 kDa片段融合得到重组的免疫毒素,并发现该免疫毒素对CD123高表达的细胞系有显著的杀伤效果,而对CD123低表达或不表达的细胞系ML-1和U937没有毒性。

Hauswirth等^[18]在CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺ AML干细胞中发现了CD33的表达,NOD/SCID小鼠实验表明AML干细胞主要存在于CD33⁺细胞亚群中。并且发现在CD33⁺ AML病人中,98%以上的AML干细胞都有CD33的表达,而正常骨髓中CD34⁺/CD38⁻细胞及CD33⁻ AML干细胞中CD33均不表达。这些结果表明CD33在CD33⁺ AML干细胞中表达,可作为靶向清除白血病干细胞的新靶点。CD33是一种67 kDa的细胞表面糖蛋白,在90% AML病人的白血病细胞中表达,在正常造血干细胞中未见表达^[19]。目前以CD33为靶向的治疗主要是利用CD33单克隆抗体,包括未修饰的单克隆抗体、与放射性同位素偶联的单克隆抗体以及与药物偶联的单克隆抗体。其中研究最多的是药物Mylotarg(Gemtuzumab Ozogamicin, CMA-676)。Mylotarg是由一种人源化的CD33单克隆抗体(hP67.6)与一种高效的化疗药物calicheamicin衍生物偶联而成。Mylotarg与CD33结合后进入胞内,在水解酶作用下共价键断裂,calicheamicin衍生物通过与DNA的小沟结合,从而使DNA双链断裂,最终导致细胞死亡^[20]。Sievers等^[21]在进行Mylotarg的II期临床试验时,选取了142例CD33⁺ AML首次复发的患者作Mylotarg的静脉注射,2周后重复一次,发现30%患者骨髓中肿瘤细胞数量少于5%,中性粒细胞恢复到1 500个/ μ l以上,说明Mylotarg可以用于初次复发的CD33⁺ AML的治疗。

2 靶向白血病干细胞内信号通路

靶向白血病干细胞内特异的信号通路来清除白血病干细胞也是近年研究的热点。如NF- κ B途径便可作为治疗靶点,因NF- κ B途径在白血病干细胞中组

成性激活,而在造血干细胞内却不是^[5]。目前针对NF- κ B途径主要有两种治疗策略,一种是使用蛋白酶体抑制剂来阻断由NF- κ B调节的存活信号,另一种是利用NF- κ B途径的抑制剂,来诱导AML、慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)干细胞和祖细胞的凋亡^[22]。

Parthenolide (PTL)是一种倍半萜烯内酯,是菊科植物的一种成分,Guzman等^[22]发现PTL可诱导AML和CML细胞凋亡,但不会影响正常造血细胞及干细胞的活性。同时体外实验和干细胞NOD/SCID小鼠移植,表明PTL优先靶向白血病干细胞并诱导凋亡,其作用机制是抑制NF- κ B途径,激活p53,提高活性氧(ROS)的水平。

PI3K是一种脂质激酶,可调节细胞对多种细胞因子和趋化因子的反应。Xu等^[23]用PI3K的抑制剂LY294002处理AML细胞后,将细胞移植到NOD/SCID小鼠体内,发现移植率降低两倍,而正常的CD34⁺细胞在相同的剂量下没有明显变化,提示白血病干细胞的存活需要PI3K活化。Akt是PI3K的底物,它可以与下游元件作用来调节细胞生长、增殖和存活,其中一个靶点是mTOR(mammalian target of rapamycin)。mTOR通过调节p70S6激酶和4EBP-1的磷酸化来调节蛋白质的翻译。mTOR的抑制剂RAD001与Ara-C联用可以增强对AML细胞的杀伤力。另外PI3K/AKT途径可激活NF- κ B,所以,蛋白酶体抑制剂与PI3K激酶抑制剂联用,不仅可以抑制NF- κ B功能,还可抑制白血病干细胞的增殖。

PTEN(phosphatase and tensin homologue)是一种负调控PI3K信号通路的磷酸酶,能够抑制细胞的存活和增殖,是一种肿瘤抑制因子。有研究表明,在鼠造血系统中PTEN缺陷会导致造血干细胞的过度增殖,并导致骨髓中造血干细胞减少,而外周血及脾脏的造血干细胞增加。将PTEN缺陷的造血干细胞移植到NOD/SCID小鼠体内,无法长期维持造血系统的重建^[24]。另外,PTEN缺陷小鼠会产生骨髓增生紊乱(myeloproliferative disorders, MPD)以及白血病。mTOR抑制剂雷帕霉素(rapamycin)可恢复正常造血干细胞的发育并阻断白血病的发生^[25]。这些研究提示PTEN有可能作为白血病干细胞治疗的新靶点。

3 靶向白血病干细胞微环境

干细胞微环境(stem cell niche)是指干细胞周围

的细胞、蛋白质及一些其他成分, 能够为干细胞提供营养, 并调节干细胞的静息、自我更新、分化以及增殖等^[26]。干细胞微环境能够为干细胞提供一个屏障, 将其与分化、凋亡等刺激隔离。另外微环境还可阻止干细胞的过度增殖, 以防止肿瘤的发生。

近年的研究提示, 干细胞的生存及自我更新与其微环境有密切的关系, 这已在造血干细胞上得到验证^[26]。造血干细胞与松质骨之间通过神经性钙黏着蛋白(N-cadherin)联接, 有利于造血干细胞的锚定。在骨上的angiopoietin-1与在干细胞上的Tie-2相互作用可保持干细胞的静息状态。Shortt等^[27]证明角膜缘干细胞(limbal epithelial stem cells, LESC)的微环境对维持其正常干细胞功能有重要的作用。Adams等^[28]发现造骨细胞是人体正常造血干细胞微环境的一部分, 而造骨细胞上甲状腺激素受体的活化会增加干细胞的数量。这些都表明干细胞需要特定的环境以维持其干细胞特性。

供体细胞白血病(donor cell leukemia, DCL)可以作为一个微环境影响干细胞命运的例子^[29]。DCL发生于造血细胞移植后以供体细胞为来源的一种白血病。可以用“种子与土壤”理论来解释这一疾病。该理论由Paget提出^[30], 认为“种子”(肿瘤细胞)只能在适合的“土壤”中生长。异体移植后造血细胞迁移至由骨内膜、成骨细胞、破骨细胞、纤维原细胞、血管、细胞外基质蛋白及可溶性肽组成的复杂微环境中, 经过放化疗后, 微环境发生了很大变化, 从而使造血干细胞也发生了变化, 包括造血干细胞的端粒长度明显缩短, 引起未成熟细胞衰老及基因组的不稳定, 最终导致DCL。

Jin等^[31]和Krause等^[32]利用各自不同的模型发现CD44参与白血病干细胞与微环境之间的相互作用, 为清除白血病干细胞提供了新思路。CD44是一种广泛表达的跨膜糖蛋白, 经选择性剪切后产生多种衍生物, 可介导细胞与细胞间及细胞与细胞外基质间的相互作用, 也参与多种细胞间信号传导。Jin等^[31]利用激活型的CD44单克隆抗体H90, 在体外诱导AML细胞分化, AML细胞移植到NOD/SCID小鼠体内后, 注射H90引起骨髓中的AML细胞数目减少(91.0±4.1)%, 而相同的剂量对正常造血干细胞不产生影响。另外, H90处理过的AML细胞不能进行二次移植, 这提示H90抗体处理改变了AML干细胞的命运。Krause等^[32]则利用BCR-ABL融合蛋白构建了CML小鼠模型, 在两组细胞(CD44缺失的造血干细胞及正常造血干细

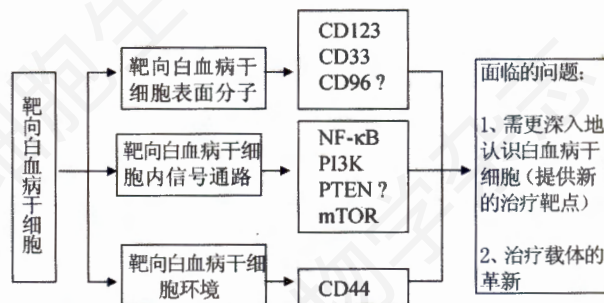


图1 靶向白血病干细胞的治疗策略与面临的问题

胞)中表达BCR-ABL融合蛋白, 再将这些细胞分别移植到NOD/SCID小鼠体内。研究发现, 白血病在CD44缺失的移植小鼠体内发病延迟。将表达BCR-ABL融合蛋白的白血病干细胞用CD44抗体处理后, 移植到NOD/SCID小鼠体内, 也会延缓发病。这表明CD44与白血病干细胞的归巢和自我更新能力之间存在密切的关系, 是一个有潜力的白血病干细胞治疗靶点。

4 展望

目前清除白血病干细胞的治疗研究已取得了多方面的进展, 但也面临新的问题(图1)。一方面问题在于对白血病干细胞的来源、自我更新及分化等机制还有很多未知领域, 各亚型白血病的干细胞特征及其自我更新和分化机制等尚待进一步明晰。这些问题的阐明都将有助于提供新的治疗靶点。另一方面, 治疗载体的革新也是研究者们面临的问题。例如病毒载体, 包括腺病毒、腺相关病毒和慢病毒等, 以其高效性已广泛应用于基因治疗领域, 但在白血病干细胞的治疗研究中还很少见成功的例子。以病毒为载体的基因治疗关键在于安全性、靶向性和治疗基因的有效性。如何在病毒载体平台上构建白血病干细胞的治疗靶向已引起研究者的关注, 也是我们主要研究的方向之一。随着科技的发展, 研究方法的不断进步, 对于白血病干细胞更深入的认识将有助于找到新的治疗靶点。而治疗手段的革新将为针对这些靶点的治疗策略提供更有利的工具。这些方面的进步都可能为白血病干细胞的治疗研究开辟新的道路。

参考文献 (References)

- [1] Guan Y et al. *Blood*, 2003, 101: 3142
- [2] Shirota T et al. *Exp Hematol*, 1991, 19: 369

- [3] Dean M *et al.* *Nat Rev Cancer*, 2005, **5**: 275
- [4] Konopleva M *et al.* *Br J Haematol*, 2002, **118**: 521
- [5] Guzman ML *et al.* *Blood*, 2001, **98**: 2301
- [6] Bonnet D *et al.* *Nat Med*, 1997, **3**: 730
- [7] Luo L *et al.* *Int J Hematol*, 2006, **84**: 123
- [8] Taussig DC *et al.* *Blood*, 2005, **106**: 4086
- [9] List AF *et al.* *Blood*, 2001, **98**: 3212
- [10] Baer MR *et al.* *Blood*, 2002, **100**: 1224
- [11] Blair A *et al.* *Blood*, 1997, **89**: 3104
- [12] Blair A *et al.* *Exp Hematol*, 2000, **28**: 660
- [13] Jordan CT *et al.* *Leukemia*, 2000, **14**: 1777
- [14] Hosen N *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**: 11008
- [15] Feuring-Buske M *et al.* *Cancer Res*, 2002, **62**: 1730
- [16] Liu TF *et al.* *Exp Hematol*, 2004, **32**: 277
- [17] Du X *et al.* *J Immunother (1997)*, 2007, **30**: 607
- [18] Hauswirth AW *et al.* *Eur J Clin Invest*, 2007, **37**: 73
- [19] Wagner JE *et al.* *Blood*, 1995, **86**: 512
- [20] Naito K *et al.* *Leukemia*, 2000, **14**: 1436
- [21] Sievers EL *et al.* *J Clin Oncol*, 2001, **19**: 3244
- [22] Guzman ML *et al.* *Blood*, 2005, **105**: 4163
- [23] Xu Q *et al.* *Blood*, 2003, **102**: 972
- [24] Zhang J *et al.* *Nature*, 2006, **441**: 518
- [25] Yilmaz OH *et al.* *Nature*, 2006, **441**: 475
- [26] Wilson A *et al.* *Nat Rev Immunol*, 2006, **6**: 93
- [27] Shortt AJ *et al.* *Stem Cells*, 2007, **25**: 1402
- [28] Adams GB *et al.* *Nat Biotechnol*, 2007, **25**: 238
- [29] Flynn CM *et al.* *Blood*, 2007, **109**: 2688
- [30] Paget S. *Cancer Metastasis Rev*, 1989, **8**: 98
- [31] Jin L *et al.* *Nat Med*, 2006, **12**: 1167
- [32] Krause DS *et al.* *Nat Med*, 2006, **12**: 1175

Targeting Leukemia Stem Cells as a Novel Strategy for Leukemia Treatment

Yan-Hong Zhang, Gong-Chu Li*

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

Abstract Leukemia stem cells (LSC) have been considered to be the origin of leukemia and the reason why leukemia develops and relapses. LSC have specific phenotypic characteristics, as well as capacities for self-renewal, proliferation, and differentiation. In recent years, targeting LSC has become a new strategy for therapy in leukemia. Researches are mainly focused on three aspects including LSC surface molecules, intracellular signaling pathways, and the interaction with micro-environmental elements. Further understanding on LSC may provide a variety of more effective novel therapeutic targets for the treatment of leukemia.

Key words leukemia stem cells; target; therapy

Received: October 17, 2007 Accepted: December 27, 2007

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2004CB518804) and the Science Foundation of Zhejiang Sci-Tech University (No.0616066-Y)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86843187, Fax: 86-571-86843185, E-mail: lgc@zstu.edu.cn