

不同表型的乳腺癌干细胞研究现状及其 临床应用价值

赵宁¹ 综述, 傅深² 审校

1. 上海交通大学附属第六人民医院肿瘤放疗科, 上海 200233;
2. 复旦大学附属肿瘤医院放射治疗中心, 上海市质子重离子医院放射治疗科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 201321

[摘要] 肿瘤干细胞理论认为肿瘤起源于小部分具有干细胞特性的肿瘤细胞。乳腺癌干细胞是乳腺癌细胞中极少数具有自我更新、多向分化潜能和高致瘤性的细胞亚群, 与乳腺癌复发、侵袭转移、放疗抵抗及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等密切相关。就近年来乳腺癌干细胞的研究进展予以综述。

[关键词] 乳腺癌干细胞; 干细胞标记物; 分子亚型; 复发转移

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.08.010

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)08-0699-05

Recent advances in breast cancer stem cell phenotypes and clinical application ZHAO Ning¹, FU shen²
(1.Department of Radiation Oncology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200032, China; 2.Department of Radiation Oncology, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai Proton and Heavy Ion Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 201321, China)

Correspondence to: FU Shen E-mail: shen_fu@hotmail.com

[Abstract] The cancer stem cell theory suggests that cancer develops from a subset of tumor cells that possess characteristics of stem cells. Breast cancer stem cells comprise a sub-population, which possesses the capacity of self-renewal and the potential for differentiation and high tumorigenicity. Evidence from both *in vitro* and *in vivo* studies demonstrates breast cancer stem cells are responsible for tumor relapse, invasion and metastasis, chemo- and radio-resistance and epithelial-mesenchymal transition (EMT). Herein, this review highlighted the recent advances in breast cancer stem cells.

[Key words] Breast cancer stem cells; Stem cell markers; Molecular isoforms; Relapse and metastasis

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁着女性健康。早期乳腺癌患者经过严格治疗后仍有部分发生复发转移^[1]。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)理论认为, 肿瘤组织中极小部分的CSCs是肿瘤起源、复发和转移的根源。乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSCs)存在不同的分子标志物, 即具有不同的表型。乳腺癌是一类在分子水平上具有高度异质

性的恶性肿瘤, 不同分子亚型的乳腺癌中BCSCs表型及所占比例各不相同, 从而造成它们在侵袭、转移和预后等方面存在差异。因此, 阐明不同分子亚型中BCSCs的表型及其调控机制不但可以揭示乳腺癌的发病机制, 还将为分子靶向治疗及预后判断提供新的视角。本文就近期不同表型的BCSCs相关研究进展及其临床应用进行综述。

1 BCSCs的发现

2003年Al-Hajj等^[2]首次分离出少数具有CD44⁺/CD24^{-low}/Lin⁻表型的细胞群,只需要少量的该细胞即可在联合重症免疫缺陷小鼠中成瘤,并可连续传代。此结果证实了BCSCs的存在,开创了研究BCSCs的先河。

2 BCSCs的标志物

不同类型肿瘤的CSCs表面标志物存在差异,借助表面标志物可以分选、鉴定出BCSCs。目前已发现多种BCSCs标志物,其中对ALDH1、CD44和CD24的研究最为广泛,但特异性的标志物还有待进一步研究。

2.1 乙醛氧化脱氢酶1(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)

ALDH1目前被公认为是BCSCs的标志物之一,是一种在细胞内催化乙醛氧化为乙酸的细胞质溶质酶,在干细胞分化早期催化视黄醇氧化成视黄酸,是组织中正常干细胞生长、分化所必需的。ALDH1在白血病和其他实体肿瘤(包括乳腺癌)的CSCs群中活性增加,可作为多种CSCs的通用标志物。2007年,Cheung等^[3]首次从急性粒细胞白血病患者的肿瘤细胞中分离出ALDH1⁺的细胞,并证实该细胞群具有CSCs的特性。有研究发现,在胚胎性横纹肌肉瘤(embryonal rhabdomyosarcoma, eRMS)中,ALDH1^{high}的细胞群具有CSCs的特性,表明ALDH1可能是eRMS中CSCs的潜在标志物^[4]。Ginestier等^[5]首次发现乳腺癌组织中ALDH1⁺细胞占乳腺癌细胞总数的5%,并进行体内实验发现,ALDH1⁺的BCSCs具有强致瘤性,500个ALDH1⁺的BCSCs即可成瘤,而即使50 000个ALDH1⁻的BCSCs也无法成瘤。

ALDH1具有19种亚型,主要包括ALDH1A1、ALDH1A2、ALDH1A3、ALDH1B1、ALDH1L1和ALDH1L2。但目前对细胞内ALDH1的催化活性发挥主要作用的亚型仍不确定。Wu等^[6]研究表明,ALDH1A1的mRNA高表达的乳腺癌患者总生存率(overall survival, OS)较低,ALDH1A2与ALDH1L1的mRNA高表达者OS较高,但未发现ALDH1A3与

ALDH1B1的mRNA高表达与OS的关系,充分说明ALDH1A1是ALDH1亚型中唯一可提示乳腺癌患者预后差的标志物,ALDH1A1可能是乳腺癌中决定ALDH1活性的主要亚型。但Marcato等^[7]研究却发现ALDH1A3亚型而不是ALDH1A1,对ALDH的活性起主要作用,并与肿瘤的分期、分级及转移显著相关。

2.2 CD44和CD24

跨膜蛋白CD44和CD24是最早被发现的BCSCs标志物,目前发现CD44⁺/CD24^{-low}只作为BCSCs的标志物,具有组织特异性。CD44是细胞外基质中透明质酸和骨桥蛋白的膜表面受体,介导细胞与细胞、细胞与间质之间的相互作用。Al-Hajj等^[2]进行的体内实验显示,CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻细胞具有更高的致瘤能力,形成的肿瘤能够在小鼠中连续传代并产生具有同样致瘤能力的异质性细胞,说明CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻细胞具有CSCs的特性。遂将CD44⁺/CD24^{-low}/Lin⁻表型的肿瘤细胞亚群鉴定为BCSCs。Ginestier等^[5]研究发现,BCSCs中ALDH1⁺与CD44⁺/CD24^{-low}少量重合,但只占1.16%或更少。只需20个ALDH1⁺/CD44⁺/CD24^{-low}的BCSCs即可成瘤,具有高致瘤性。而ALDH1⁻/CD44⁺/CD24^{-low}没有致瘤性,提示CD44⁺/CD24^{-low}亚群是由BCSCs和非BCSCs组成的具有异质性的细胞群。两种标志物的互补检测纯化了“癌干细胞群”,提示通过联合多个BCSCs标志物分选得到的细胞群更加具有“干样”特性。

此外,研究发现整合素家族的CD29、CD49f、CD61,蛋白分子CD55、CD90、CD133、CXCR4、ABCG2和转录因子EZH2、Oct4、Nanog、Sox2、FOXC2均可能是有重要意义的BCSCs候选标志物。

3 BCSCs的表型与乳腺癌各分子亚型、临床病理特征

乳腺癌根据基因表达谱的差异分为Luminal A型、Luminal B型、HER-2过表达(HER-2-OE)型、Basal-like型和Normal breast-like型5种基因亚型。不同基因亚型的乳腺癌在免疫表型和临床病理特征上的显著差异可能起源于不同表型

的BCSCs, 并且BCSCs表型在不同基因亚型的乳腺癌中呈差异性分布。目前研究较多的BCSCs表型主要是ALDH1和CD44/CD24。

3.1 ALDH1

Ricardo等^[8]研究表明, ALDH1⁺表型并不存在于某一特定的分子亚型中, 最常见于Basal-like和HER-2-OE亚型中, 对466例浸润性乳腺癌组织和8种乳腺癌细胞系的分析表明, ALDH1⁺肿瘤组织中39.4%为Basal-like型, HER-2-OE型也主要表达ALDH1。另有研究发现, ALDH1在不同分子亚型的导管原位癌中呈差异性表达, 在Luminal B型中表达最高, 其次是HER-2、Basal-like型, 在Luminal A型中最少^[9]。Liu等^[10]研究报道, ALDH1A1的表达水平随着肿瘤体积、组织学分级、淋巴结转移率、HER-2表达水平的增高和ER/PR表达水平的降低而增高, ALDH1A1⁺的乳腺癌患者预后相对于ALDH1A1⁻者较差。Mieog等^[11]研究发现, ALDH1的表达和预测作用具有年龄依赖性, 随着年龄的增长, ALDH1的表达水平降低, 对于65岁以下的患者, ALDH1⁺可作为预后差的独立危险因素。Nalwoga等^[12]研究发现, ALDH1的表达与病理分级的增加、核分裂象的增多、ER⁻、PR⁻、P53⁺、CK5/6⁺、EGFR⁺及Basal-like亚型有密切关系。Ohi等^[13]的研究也显示, ALDH1的表达与较高的组织学分级密切相关。

3.2 CD44/CD24

目前多项研究表明, CD44⁺/CD24^{-low}表型主要在Basal-like亚型中表达^[8,14-15]。Ricardo等^[8]的研究表明, 在76.5%的Basal-like亚型乳腺癌组织中, CD44⁺/CD24^{-low}表型的细胞比例最高, 基底/肌上皮细胞系也主要表达CD44⁺/CD24^{-low}。Gudadze等^[14]研究也表明, 在乳腺浸润性导管癌Luminal A型中, CD44⁺/CD24^{-low}者比例低, 而在Luminal B和Basal-like型中, 其比例最高; CD44⁺/CD24^{-low}比例随着临床分期的增高而显著增加, 而且CD44⁺/CD24^{-low}者远处淋巴结转移率升高, 表明该表型在肿瘤进展和扩散中发挥重要作用。De Beca等^[15]研究发现, CD44⁺/CD24^{-low}的表达与乳腺癌组织学

类型具有相关性, CD44⁺/CD24^{-low}表型在髓样癌、乳头状癌和小管癌中高表达(分别占80%、100%和100%), 而在浸润性导管癌中低表达(仅占45.3%), 仅髓样癌和化生性乳腺癌可同时表达ALDH1和CD44⁺/CD24^{-low}(分别占36.4%和28.6%)。

此外, 有研究发现, CXCR4和ABCG2在Luminal A、Luminal B、HER-2-OE和Basal-like亚型乳腺癌组织中表达量依次递增, 在HER-2-OE和Basal-like型中表达最高^[16]。FOXC2是人类forkhead家族的转录因子, 在具有上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和CSCs特性的Claudin-low亚型乳腺癌中富含FOXC2诱导基因的表达印迹, 可作为基于阻断EMT来治疗Claudin-low亚型乳腺癌的靶点^[17]。

综上所述, Basal-like亚型乳腺癌中含有不同表型的BCSCs比例最高, 因此认为三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)的恶性生物学行为与此密切相关。研究可靠的特异性的干细胞标志物对于鉴别不同表型的乳腺癌干细胞群, 开展靶向治疗具有关键作用。

4 BCSCs的表型与预后

早期乳腺癌患者大约有30%复发或远处转移。ALDH1⁺肿瘤与高复发、转移率显著相关, 复发后ALDH1⁺肿瘤细胞的比例升高, 而CD44⁺/CD24^{-low}肿瘤细胞比例未变化。尽管CD44⁺/CD24^{-low}细胞比例与转移率没有明显关系, 但其高比例是复发、转移的危险因素。因此有研究认为, ALDH1⁺/CD44⁺/CD24^{-low}的BCSCs在肿瘤转移中发挥重要作用, 但相对于CD44⁺/CD24^{-low}表型, ALDH1⁺细胞比例可更好地预测乳腺癌转移^[18]。多项研究已证实, ALDH1是预测原位乳腺癌临床预后差的有力指标^[13,19]。有研究发现, 在伴有1~3级腋窝淋巴结转移的乳腺癌腋窝淋巴结中ALDH1⁺者其无病生存率较低, 预后差^[19]。Ohi等^[13]对106例TNBC患者免疫组化分析显示, 肿瘤细胞内ALDH1表达者的无病生存率下降, 是TNBC的独立预后指标。

有研究表明, TNBC具有较高的侵袭、转移和致瘤能力, 该肿瘤组织和细胞系中CD44⁺

CD24^{-low}表达水平远远高于其他亚型乳腺癌,因此认为CD44⁺/CD24^{-low}表型在该乳腺癌高复发及远处转移中可能发挥重要作用,可以将其作为治疗的靶点^[20]。有研究显示,在TNBC细胞系MDA-MB-231中,具有较高自我更新和克隆形成能力的细胞均表现为CD133⁺,而且CD133可促进血管化拟态的形成,可能在TNBC的复发和进展中起重要作用^[21]。

5 BCSCs与放疗抵抗

Phillips等^[22]将乳腺癌细胞悬浮培养制备乳腺球和贴壁细胞,两种培养来源的细胞单次2 Gy照射后,发现乳腺球来源的细胞存活分数高于贴壁细胞;分割照射后非黏附性CD44⁺/CD24^{-low}细胞比例明显增加;检测放射敏感相关分子ROS、H2AX磷酸化水平后发现,乳腺球来源的细胞中这两种物质均低于贴壁细胞。以上结果均提示乳腺球来源的BCSCs具有更强的抗辐射能力。

6 BCSCs的调控机制

目前认为,在BCSCs的调控中涉及Notch、Wnt/ β -catenin和Hedgehog3个主要的信号通路。这些信号通路的活化异常导致BCSCs的产生。

有研究发现,Notch活性高的乳腺癌细胞其微球体形成及BCSCs标志物的表达量增加,在Basal-like和Luminal型乳腺癌细胞系中,Notch⁺的细胞表达更多的Notch4受体,并具有更高的致瘤能力^[23]。Wnt/ β -catenin信号通路异常活化后可促进BCSCs的自我更新,BCSCs中Wnt及下游分子 β -catenin的表达水平要高于非BCSCs,增加干细胞的治疗抵抗性;使用该通路的阻滞剂CWP232228后,BCSCs生长受抑制程度要高于非BCSCs^[24]。有研究发现,在乳腺癌细胞系MCF-7的BCSCs亚群中,盐霉素通过明显下调Hedgehog通路中关键因子Smo和Gli1的表达水平,抑制BCSCs的自我更新并诱导其凋亡^[25-26]。

最新研究表明,PTEN/PI3K-AKT/mTORC、IL-6/JAK1/STAT3/NF- κ B、VEGF/VEGFR2/STAT3、 α v β 3/KRAS/RalB/NF-KB和BMP/TGF- β 等信号通路在BCSCs的调控中发挥着不可取代

的作用,各通路之间相互作用活化后共同促进BCSCs自我更新、乳腺微球体的形成及EMT,从而促进乳腺癌的发生、发展、侵袭和转移^[26-30]。使用各信号通路的抑制剂使BCSCs的分化及增殖均受抑制,致使BCSCs比例大大减少。目前关于这些信号通路的阻滞剂正在进一步的研究中。

7 展望

BCSCs的发现和深入研究为研究乳腺癌的发病机制、诊治方法提供了新的视角,进一步深入了解乳腺癌干细胞的生物学特性,从分子水平上明确其调控机制,寻找更具特异性的表面标志物,建立以乳腺癌干细胞为靶点的治疗体系,将开启乳腺癌靶向治疗的新篇章。

[参 考 文 献]

- [1] GONZALEZ-ANGULO A M, MORALES-VASQUEZ F, HORTOBAGYI G N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 608: 1-22.
- [2] AL-HAJJ M, WICHA M S, BENITO-HERNANDEZ A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [3] CHEUNG A M, WAN T S, LEUNG J C, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential [J]. *Leukemia*, 2007, 21(7): 1423-1430.
- [4] NAKAHATA K, UEHARA S, NISHIKAWA S, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is a potential marker for cancer stem cells in embryonal rhabdomyosarcoma [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0125454.
- [5] GINESTIER C, HUR M H, CHARAFE-JAUFFRET E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 555-567.
- [6] WU S, XUE W, HUANG X, et al. Distinct prognostic values of ALDH1 isoenzymes in breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4): 2421-2426.
- [7] MARCATO P, DEAN C A, PAN D, et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis [J]. *Stem Cells*, 2011, 29(1): 32-45.
- [8] RICARDO S, VIEIRA A F, GERHARD R, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype [J]. *J Clin Pathol*, 2011, 64(11): 937-946.

- [9] TSUKABE M, SHIMAZU K, MORIMOTO K, et al. Clinicopathological analysis of breast ductal carcinoma in situ with ALDH1-positive cancer stem cells [J] . *Oncology*, 2013, 85(4): 248–56.
- [10] LIU Y, LV D L, DUAN J J, et al. ALDH1A1 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis [J] . *BMC Cancer*, 2014, 14: 444.
- [11] MIEOG J S, DE KRUIJF E M, BASTIAANNET E, et al. Age determines the prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase-1 in breast cancer [J] . *BMC Cancer*, 2012, 12: 22.
- [12] NALWOGA H, ARNES J B, WABINGA H, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumours in African breast cancer [J] . *Br J Cancer*, 2010, 102(2): 369–375.
- [13] OHI Y, UMEKITA Y, YOSHIOKA T, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer [J] . *Histopathology*, 2011, 59(4): 776–780.
- [14] GUDADZE M, KANKAVA Q, MARIAMIDZE A, et al. Features of CD44+/CD24-low phenotypic cell distribution in relation to predictive markers and molecular subtypes of invasive ductal carcinoma of the breast [J] . *Georgian Med News*, 2014, (228): 81–87.
- [15] DE BECA F F, CAETANO P, GERHARD R, et al. Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types [J] . *J Clin Pathol*, 2013, 66(3): 187–191.
- [16] 许立国, 李惠翔. 乳腺癌组织中ALDH1、CXCR4及ABCG2与其分子亚型的关系 [J] . *肿瘤基础与临床*, 2013, 26(5): 387–388.
- [17] HOLLIER B G, TINNIRELLO A A, WERDEN S J, et al. FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer [J] . *Cancer Res*, 2013, 73(6): 1981–1992.
- [18] ZHONG Y, SHEN S, ZHOU Y, et al. ALDH1 is a better clinical indicator for relapse of invasive ductal breast cancer than the CD44+/CD24- phenotype [J] . *Med Oncol*, 2014, 31(3): 864.
- [19] NOGAMI T, SHIEN T, TANAKA T, et al. Expression of ALDH1 in axillary lymph node metastases is a prognostic factor of poor clinical outcome in breast cancer patients with 1–3 lymph node metastases [J] . *Breast Cancer*, 2014, 21(1): 58–65.
- [20] MA F, LI H, WANG H, et al. Enriched CD44(+)/CD24(-) population drives the aggressive phenotypes presented in triple-negative breast cancer (TNBC) [J] . *Cancer Lett*, 2014, 353(2): 153–159.
- [21] LIU T J, SUN B C, ZHAO X L, et al. CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer [J] . *Oncogene*, 2013, 32(5): 544–553.
- [22] PHILLIPS T M, MCBRIDE W H, PAJONK F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation [J] . *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(24): 1777–1785.
- [23] D'ANGELO R C, OUZOUNOVA M, DAVIS A, et al. Notch reporter activity in breast cancer cell lines identifies a subset of cells with stem cell activity [J] . *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(3): 779–787.
- [24] JANG G B, HONG I S, KIM R J, et al. Wnt/beta-catenin small molecule inhibitor CWP232228 preferentially inhibits the growth of breast cancer stem-like cells [J] . *Cancer Res*, 2015, 75(8): 1691–702.
- [25] LU Y, MA W, MAO J, et al. Salinomycin exerts anticancer effects on human breast carcinoma MCF-7 cancer stem cells via modulation of Hedgehog signaling [J] . *Chem Biol Interact*, 2015, 228: 100–107.
- [26] ZHOU J, WULFKUHLE J, ZHANG H, et al. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance [J] . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(41): 16158–16163.
- [27] KIM S Y, KANG J W, SONG X, et al. Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells [J] . *Cell Signal*, 2013, 25(4): 961–969.
- [28] ZHAO D, PAN C, SUN J, et al. VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2 [J] . *Oncogene*, 2014, 34(24): 3107–3119.
- [29] SEGUIN L, KATO S, FRANOVIC A, et al. An integrin beta(3)-KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition [J] . *Nat Cell Biol*, 2014, 16(5): 457–468.
- [30] BUIJS J T, VAN DER HORST G, VAN DEN HOOGEN C, et al. The BMP2/7 heterodimer inhibits the human breast cancer stem cell subpopulation and bone metastases formation [J] . *Oncogene*, 2012, 31(17): 2164–2174.

(收稿日期: 2015-04-03 修回日期: 2015-06-29)