

未来肝癌治疗的新靶点—肝癌干细胞

江春平

江春平, 江苏省肝胆疾病临床医学中心 江苏省南京市 210008

江春平, 教授, 主任医师, 主要从事消化系统恶性肿瘤综合治疗领域的研究。

卫生部重点基金资助项目, No. WKJ2005-2-032

南京市卫生局重点基金资助项目, No. ZKXO410

通讯作者: 江春平, 210008, 江苏省南京市, 江苏省肝胆疾病临床医学中心. chunpingjiang@yahoo.com.cn

电话: 025-83304616-11902

收稿日期: 2009-01-06 修回日期: 2009-02-18

接受日期: 2009-02-19 在线出版日期: 2009-03-18

A new target in future treatment of liver cancer - liver cancer stem cells

Chun-Ping Jiang

Chun-Ping Jiang, Jiangsu Clinical Medicine Center of Hepatobiliary Diseases, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Supported by: the Major Program from Ministry of Health, No. WKJ2005-2-032; and the Major Program from Health Bureau of Nanjing City, No. ZKXO410
Correspondence to: Chun-Ping Jiang, Jiangsu Clinical Medicine Center of Hepatobiliary Diseases, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. chunpingjiang@yahoo.com.cn
Received: 2009-01-06 Revised: 2009-02-18
Accepted: 2009-02-19 Published online: 2009-03-18

Abstract

The hypothesis that tumors come of stem cells has been demonstrated in various human cancers. Cancer is not only a genetic disease but also a stem cell disease. It is a key of regeneration, mutations and recurrence of tumors that gene mutations occur in stem cells and then normal stem cells mutate to cancer stem cells. More recently, there is a hypothesis that hepatocellular carcinoma (HCC) arises by maturation arrest of liver stem cells. Analysis of the cells in HCC supports the presence of cells with stem-cell properties (e.g., immortality, transplantability, and resistance to therapy). However, definitive markers for these putative cancer stem cells have not been found yet and no liver cancer stem cells has been isolated.

Key Words: Liver stem cells; Liver cancer stem cells; Hepatocellular carcinoma

Jiang CP. A new target in future treatment of liver cancer - liver cancer stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 743-746

摘要

肿瘤起源于干细胞的假说正在各种人类肿瘤中得到证实, 肿瘤不单是一种基因病, 而且是一种干细胞病。基因突变作用于干细胞, 干细胞突变成肿瘤干细胞, 这是肿瘤发生、再生、转移和复发的关键。最新研究表明, 肝细胞型肝癌可能是由肝干细胞未分化或分化不全引起的。对于肝癌细胞的研究我们知道肝细胞型肝癌中的细胞具有干细胞特性, 如永生性, 可移植性以及治疗手段的抵抗性。但至今为止, 确切的肝癌干细胞的标志物没有找到, 而且没有分离出肝癌干细胞。

关键词: 肝干细胞; 肝癌干细胞; 肝细胞型肝癌

江春平. 未来肝癌治疗的新靶点—肝癌干细胞. *世界华人消化杂志* 2009; 17(8): 743-746

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/743.asp>

0 引言

干细胞是具有多能性的细胞, 能够无限制的自我更新并具有分化成不同的成熟组织类型的多能性。在研究肿瘤的发生发展过程中, 人们发现肿瘤细胞与人体内的成体干细胞具有类似之处, 如他们都能自我更新, 具有不定分化的潜能, 其细胞表面标志也相类似。尽管这两种细胞均能够进行增殖, 但不同之处在于: 肿瘤细胞的增殖不受控制, 而干细胞的增殖则受到严格的调控; 肿瘤细胞增殖后异常分化, 而干细胞则可以分化成正常的成熟细胞。科学家们将这些具备增殖能力和多向分化潜能的肿瘤细胞, 称之为肿瘤干细胞(tumor stem cells, TSC), 并产生了肿瘤干细胞学说。

肝细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一。近年来, 就肝癌的发生起源问题一直是有争议的, 然而随着干细胞研究的深入, 越来越多的研究结果证实了肿瘤起源于干细胞的观点。正如白血病细胞由正常干细胞发生突变而来, 对实体瘤的研究结果同样显示正常干细胞与肿瘤干细胞存在很强的相似性, 还可能有类似的细胞表面标志。目前研究结果提示肝癌干细胞与肝癌的发生有一定的关系。

■背景资料

肝细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一。近年来, 就肝癌的发生起源问题一直存有争议, 在肝肿瘤干细胞的研究过程中, 越来越多证据表明肝癌组织中确有肿瘤干细胞存在。随着研究的深入及更多表面标志物的发现, 将会实现对肝癌肿瘤干细胞的分离与鉴定, 进一步揭示肝肿瘤发生发展和转移机制, 为研究肝癌的诊断治疗方法提供理论依据。

■同行评议者

戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科; 肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

■研发前沿

虽然一些TSC的存在已经得到了实验性证实,但是否所有的肿瘤都起源于TSC还不清楚.如何识别和分离TSC?这是利用TSC来进行癌症治疗的一个关键环节.根据细胞表面标记的特征,科研人员已经识别和分离出几种TSC.但如何对其他TSC进行分子或者形态上的鉴定,仍然是一项非常艰巨的任务.由于TSC与干细胞的相似性,如何避免对TSC具有杀伤作用的治疗手段影响到正常的干细胞就显得十分重要.靶向治疗TSC的设想令人振奋但并不容易,总之,如何发现能选择性地杀伤TSC的治疗手段是一个仍然需要深入研究的课题.

■相关报道

Yang *et al*最新研究表明,通过采用CD90作为肝癌干细胞的细胞表面标志,同时从肝癌细胞株和HCC患者肝癌组织中筛选出CD90阳性的细胞,异种移植入SICD小鼠体内,发现其有致癌性,肿瘤病理提示符合HCC的诊断.同样的,在HCC患者血清样本中也可以检测到CD90阳性的细胞,从而得出了CD90可以作为肝癌干细胞的一个有价值的细胞表面标志,并可以作为基因诊断和治疗的靶标.

1 肿瘤干细胞与肿瘤干细胞学说

自Reya *et al*提出“肿瘤干细胞学说”以来,TSC一直是学者们研究的新热点,肿瘤干细胞学说理论先后在白血病、乳腺癌、脑肿瘤和肺癌中已得到证实^[1].实体肿瘤干细胞最早的实验依据是A1-Haji *et al*在NOD/SCID小鼠模型上根据乳腺癌细胞表面分子表型的不同,将癌细胞分为致癌性细胞和非致癌性细胞,致癌性细胞能在一系列移植中形成组织学特性与原发肿瘤一致的肿瘤,这群致癌性细胞被命名为乳腺癌干细胞.近年来,对实体瘤干细胞分子生物学特性的研究进展显著:Singh *et al*在脑瘤中分离纯化出肿瘤干细胞,并提示CD133⁺细胞是脑肿瘤干细胞.Seigel *et al*^[2]研究显示视网膜母细胞瘤干细胞为ABCG2阳性细胞.Hilbe *et al*^[3]报道在非小细胞肺癌有CD133分子表达的内皮祖细胞.Houghton *et al*报道胃癌中肿瘤干细胞来源于骨髓干细胞.据此,肿瘤干细胞被定义为:存在于肿瘤细胞群体中少数干细胞样癌细胞亚群,其具有肿瘤细胞和干细胞特征,与肿瘤进展和转移的发生密切相关,是肿瘤产生的根源.由此提出了肿瘤干细胞学说,认为肿瘤可能是正常干细胞在长期自我更新过程中,由于多基因突变导致自我更新失调,最终形成的无限增殖的异常组织.肿瘤干细胞与正常干细胞和肿瘤细胞具有相似性,故其细胞表面标志物也具有相似性,但又不完全相同,利用某些干细胞标志物与肿瘤细胞标志物相结合,有望从肿瘤组织中分离出肿瘤干细胞,并利用其生物学特性即成瘤性进行异体移植对其进行鉴定,从而确定肿瘤干细胞特异性的标志物.正因为TSC是肿瘤发生过程中的最原始细胞,如果可以及早地识别并分离出TSC,就有可能依据其分子标志来对患者进行早期诊断.肿瘤干细胞特异性标志物的确定,将有助于进一步确定肿瘤干细胞及确定治疗肿瘤的靶标.

2 肝癌干细胞的研究现状

肝细胞型肝癌,居人类常见肿瘤第5位,占人类肝癌的90%.他的发病率随着乙型和丙型病毒性肝炎的增加而逐年升高^[4].肝脏肿瘤的切除和肝移植是目前治疗肝细胞型肝癌的主要手段.但是患者的5年生存率主要是依据患者诊断为肝癌时的肿瘤分期.化疗和放疗对大部分肝细胞型肝癌晚期患者的治疗效果不尽如人意.

关于肝癌发病机制的研究历史悠久,但是

至今仍然没有找到明确的基因或其分子标志物,于是人们猜想:以往的研究可能太注重于成人肿瘤细胞,而忽略了肿瘤细胞的根源-TSC^[5-8].由于没有高度特异性和高敏感性的标志物,肝细胞型肝癌的早期诊断和治疗面临的形势严峻.据报道,用来诊断肝细胞型肝癌的基因或分子的敏感性和特异性最高达60%-70%.如果能鉴定和分离肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs),那么可以推测由肝癌干细胞表达的分子对诊断肝脏恶性肿瘤具有更高的特异性和敏感性.有报道肝细胞型肝癌细胞株中存在功能性的LCSCs^[9-12],但是至今还没有关于肿瘤组织中存在功能性LCSCs的报道.

3 肝癌干细胞可能的分子标志

目前肿瘤干细胞的鉴定方法尚未成熟,TSC所占的比例很小,目前还不能从形态学上鉴定肿瘤干细胞,而只能用功能学方法对其自我更新能力和分化潜能的两个主要生物学特征进行评价,因此学者们正试图寻找实体瘤干细胞特征性的“标志物”.目前研究认为肝肿瘤干细胞的来源可能为肝干细胞或肝祖细胞,肝干细胞表达某些表面标志可以作为今后肝肿瘤干细胞筛选的参考标志物.目前已筛选出一些高度表达的标志物,如OV6、CK7、CK19.随着肝干细胞研究的不断深入,研究者们陆续发现一些新标志物.王阁 *et al*^[13]报道发现:原发性肝癌不同病理组织类型均可表达CK7、CK19、AFP、c-kit和Thy-1多种肝干细胞标志,这可能与肝干细胞的多源性和分化程度有关.另有报道显示:通过免疫组化的方法对混合类型的原发性肝癌病例切片进行分析,联合使用多种肝干细胞表面标记包括:hepPar1、AFP、CK7、CK19、OV-6、c-kit、CD34、CD45、chromogranin-A.提示人类的混合性肝癌可能是由肝癌干细胞/肝脏祖细胞分化而来的^[14].Yang *et al*^[15]最新研究表明,通过采用CD90作为肝癌干细胞的细胞表面标记,同时从肝癌细胞株和HCC患者肝癌组织中筛选出CD90阳性的细胞,异种移植入SICD小鼠体内,发现其有致癌性,肿瘤病理提示符合HCC的诊断.同样的,在HCC患者血清样本中也可以检测到CD90阳性的细胞,从而得出了CD90可以作为肝癌干细胞的一个有价值的细胞表面标记,并可以作为基因诊断和治疗的靶标.

确定肝癌干细胞标志物的关键是要能够把肝癌干细胞与正常细胞或者癌前病变的细胞区

分开来或者能够从肝细胞性肝癌中分离出来。但是真正的肝癌干细胞还没有从任何肝脏来源中分离出来。肝癌干细胞与其他肝脏来源的细胞没有形态学上的差异。Villanueva *et al*^[16]综述了最近关于肝细胞型肝癌的基因组学和信传途径。但是, 他们所列举的大多数与肝细胞型肝癌相关的基因产物(例如转录因子c-Myc)是非特异性的(正常和不正常增殖的肝细胞都可以表达这些蛋白)。所以确定与肝细胞型肝癌有关的基因产物很困难, 更不用说推测中的肝癌干细胞。

尽管如此, Takahashi *et al*^[17]报道, c-Myc与其他三个转录因子Oct3/4, Sox2和Klf4可以诱导体人皮肤成纤维细胞成为多向潜能的胚胎干细胞。虽然还没有直接的证据证明Oct3/4和Sox2与肝癌干细胞有关, 这些蛋白认为是与干细胞功能有关, 而且与抑制小鼠和人类胚胎的分化有关; c-Myc与Klf4可以修改染色体结构从而更有利于Oct3/4和Sox2功能的发挥^[17]。与干细胞功能有关的信号蛋白(比如c-kit), 与胚胎发生有关的信号蛋白(比如Bmi1、Wnt和 β -catenin^[18-19]), 与膜转运有关的信号蛋白(比如, ABCG2^[20])还有细胞表面分子(比如CD133用来分离卵圆细胞和其他细胞^[12,21])都与卵圆细胞表达和肝细胞型肝癌形成有关。所以, 肝癌干细胞的标志物可能包括干细胞的公共表达蛋白类型; 确定肝癌干细胞的标记的巨大挑战可能就是寻找这些隐蔽细胞的特异性标志物。

4 侧群细胞

侧群细胞(side population, SP)的研究为肿瘤干细胞的分离和鉴定提供了可行性。所谓的“侧群细胞”是指正常的干细胞因为细胞膜上有ATP结合盒膜转运蛋白, 这种蛋白可以有效地将Hoechst33342染料从细胞膜内排出到细胞膜外, 而非侧群细胞(non side population, NSP)则没有这种特性。利用这一特性, 通过荧光细胞活化系统(fluorescence activated cell sorter, FACS)将SP细胞和非SP细胞分选开来。肿瘤干细胞与肿瘤细胞在形态上没有差异, 肿瘤干细胞只是一个功能学概念, 体内致瘤性是鉴定肿瘤干细胞的重要依据。通过侧群细胞的研究, 可以在肿瘤细胞株中将SP细胞与非SP细胞分选开来。分选出来的SP细胞则可以用来检测他们是否有肿瘤干细胞特性: 体内高效的致瘤性。这一技术在肝癌细胞^[22], 人胶质瘤细胞和乳腺癌细胞运用时, 发现分离出来的SP细胞只要以100个数量就可以

在体内致瘤, 而非SP细胞则不能致瘤。这样就得出了SP细胞可能组成了肿瘤干细胞。

但是, Hoechst33342染料是具有细胞毒性的, SP细胞因为细胞膜上有ATP结合盒膜转运蛋白保护而不受Hoechst33342染料的毒性作用, 但是NSP细胞因为细胞膜上没有保护性蛋白, 所以不能存活^[23]。那么, SP细胞的致瘤性究竟是肿瘤干细胞的内在致瘤性, 还是由于人为的Hoechst33342染料的毒性作用? 这还是一个有待解决的问题, 所以, 以是否排除Hoechst33342染料来用于肿瘤干细胞的鉴定是不合理的。然而, ABCG2在细胞表面的表达可能可以作为一个肝癌干细胞的表面标志物来研究^[20]。

5 结论

目前对肿瘤干细胞的分离广泛使用FACS, 白血病、乳腺癌及脑癌等肿瘤干细胞的分选过程都应用此项技术进行。此项技术需要细胞表面标志物进行识别, 但是目前大多数实体瘤干细胞的表面标志物仍不能确定, 由于肿瘤干细胞在肿瘤中含量很少, 所以其分离工作仍然存在着很大困难。此外肿瘤干细胞鉴定工作多采用NOD/SCID小鼠异体瘤移植, 小鼠本身可能残存的免疫功能对肿瘤产生的结果也将造成一定影响。以往对肿瘤的研究工作大多集中在分子水平上研究基因表达调控对肿瘤发生机制的影响方面, 而肿瘤干细胞是从细胞水平上研究肿瘤形成机制与生物学特征。肿瘤干细胞理论对肿瘤发生与发展过程进行了新的诠释, 为今后肿瘤研究提供了新的方向, 对癌症的预防、早期检测、等级评估及预后都有着重要意义, 也为今后肿瘤治疗提供了新的思路。虽然一些TSC的存在已经得到了实验性证实, 但是否所有的肿瘤都起源于TSC还不清楚。如何识别和分离TSC? 这是利用TSC来进行癌症治疗的一个关键环节。根据细胞表面标记的特征, 科研人员已经识别和分离出几种TSC。但如何对其他TSC进行分子或者形态上的鉴定, 仍然是一项非常艰巨的任务。由于TSC与干细胞的相似性, 如何避免对TSC具有杀伤作用的治疗手段影响到正常的干细胞就显得十分重要。靶向治疗TSC的设想令人振奋但并不容易, 总之, 如何发现能选择性地杀伤TSC的治疗手段是一个仍然需要深入研究的课题。在肝肿瘤干细胞的研究过程中, 越来越多证据表明肝癌组织中确有肿瘤干细胞存在。相信随着研究的深入及更多表面标志物的发现,

■应用要点

肿瘤干细胞鉴定工作多采用NOD/SCID小鼠异体瘤移植, 小鼠本身可能残存的免疫功能对肿瘤产生的结果也将造成一定影响。以往对肿瘤的研究工作大多集中在分子水平上研究基因表达调控对肿瘤发生机制的影响方面, 而肿瘤干细胞是从细胞水平上研究肿瘤形成机制与生物学特征。

■同行评价

本综述介绍了肝癌干细胞的研究概况,为今后肿瘤研究提供了可借鉴的新方向。

将会实现对肝癌肿瘤干细胞的分离与鉴定,进一步揭示肝肿瘤发生发展和转移机制,为研究肝癌的诊断治疗方法提供理论依据。

6 参考文献

- Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121: 823-835
- Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis* 2005; 11: 729-737
- Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Günsilius E, Hilbe G, Wöll E, Kähler CM. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57: 965-969
- McMahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2005; 25 Suppl 1: 3-8
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10946-10951
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1030-1037
- Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 820-824
- Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, Jiang G, Ge C, Xie H, Wan D, Yang S, Zheng S, Gu J. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 2007; 120: 1444-1450
- Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-2556
- 王阁, 索金友, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中, 胡庆, 李增鹏, 肖华亮, 王东. 原发性肝癌不同病理组织类型中肝干细胞的起源分析. *第三军医大学学报* 2006; 28: 114-116
- Zhang F, Chen XP, Zhang W, Dong HH, Xiang S, Zhang WG, Zhang BX. Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence. *Histopathology* 2008; 52: 224-232
- Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, Li ML, Tam KH, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008; 47: 919-928
- Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 55-76
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872
- Chiba T, Zheng YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakanuma Y, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H. Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* 2007; 133: 937-950
- Apte U, Thompson MD, Cui S, Liu B, Cieply B, Monga SP. Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology* 2008; 47: 288-295
- Zen Y, Fujii T, Yoshikawa S, Takamura H, Tani T, Ohta T, Nakanuma Y. Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2007; 170: 1750-1762
- Rountree CB, Barsky L, Ge S, Zhu J, Senadheera S, Crooks GM. A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential. *Stem Cells* 2007; 25: 2419-2429
- Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res* 2006; 66: 1891-1895; discussion 1890

编辑 李军亮 电编 何基才