

肝癌干细胞与肝癌的研究进展

王英 综述 李文涛 审校

复旦大学附属肿瘤医院放射诊断科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] 肿瘤起源于干细胞的假说已在人类许多实体瘤中得到证实, 近来亦发现肝癌中存在肝癌干细胞。肿瘤干细胞被认为是肿瘤产生的根源, 对肿瘤的发生、发展、转移、复发及耐药具有关键作用。因此, 如何分离鉴定肝癌干细胞对于改善预防方法、促进早期检测以及研发新的治疗方法都是一个非常紧迫的课题。本文就肝癌干细胞的来源、表面标志、分选方法、应用前景及存在的问题作一综述。

[关键词] 肿瘤干细胞; 肝癌干细胞; 分子标志; 侧群细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2011.09.016

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2011)09-0735-04

Advance in research on liver cancer stem cell and liver cancer WANG Ying, LI Wen-tao (Department of Radiology, Cancer Center, Fudan University, and Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: LI Wen-tao E-mail: liwentao98@126.com

[Abstract] The hypothesis that tumors come from stem cells has been validated in many solid tumors, including hepatocellular carcinoma. Cancer stem cells (CSCs) are considered to be responsible for tumor initiation, development, metastasis, recurrence and resistance of drugs. Therefore, isolation and identification of liver cancer stem cells (LCSCs) are imperative for improving prevention approaches, enhancing early detection and extending the limited treatment options. This review focused on the source, surface markers, isolation and application of LCSCs and the problems that might arise.

[Key words] Cancer stem cells; Liver cancer stem cells; Molecular marker; Side population cells

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 我国每年死于肝癌的人数约为11万, 占全世界肝癌死亡人数的45%。肝癌的发病机制一直是研究热点。Lingala等^[1]通过CD133⁺/醛脱氢酶(aldehyde hydrogenase, ALDH)或联合CD44和CD90免疫组化染色的方法证实了肝癌组织中肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)的存在。随着干细胞研究的深入, 越来越多的研究结果证实了LCSCs与肝癌密切相关。

1 LCSCs的来源

目前认为肿瘤组织中存在少数具有类似干细胞特性的恶性肿瘤细胞, 此类细胞对肿瘤的发生、发展、转移、复发及化疗耐药性起关键作用。现已在血液系统肿瘤、脑肿瘤、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌及肝癌等中证实了肿瘤干细胞的存在^[1-2]。

LCSCs的来源尚不明确, 目前存在两种观

点: (1)起源于正常干细胞, 由肝脏干细胞基因突变形成LCSCs; (2)部分成熟肝细胞产生突变, 去分化重新获得自我更新能力和分化潜能而演变成LCSCs。

LCSCs具有自我更新能力, 因此推断其来自于同样具有自我更新能力的正常肝脏干细胞, 并且越来越多的研究证据支持这一观点。卵原细胞是目前较公认的肝脏干细胞, OV6是卵原细胞的主要标志物之一。Yang等^[3]在肝癌细胞系和肝癌组织中均发现有小群的低分化OV6⁺细胞, 比OV6⁻细胞有更强的成瘤能力和耐药性, 且高表达肝脏干细胞的多种标志物, 如ABCG2、EpCAM、c-kit及AFP等, 表明具有癌干细胞特性的OV6⁺细胞很有可能来源于肝脏干细胞。Yamashita等^[4]的研究表明, EpCAM⁺/AFP⁺肝癌细胞是具有LCSCs特性的肿瘤起始细胞, 而EpCAM和AFP分别是肝脏干细胞和胚胎肝母细胞的分子标志。另外, 在已经分离的Huh7肝癌细胞系的侧群细胞中也发现被

认为是肝脏干细胞分子标志之一的CD29表达上调^[5]。

目前多数研究者认为, LCSCs由正常肝脏干细胞基因突变而来。然而, 也有学者认为LCSCs的产生是由已分化的子代细胞再次激活了干细胞的程序, 即去分化的结果。Bralet等^[6]用逆转录病毒介导的方法对大鼠成熟肝细胞的 β -半乳糖苷酶基因进行标记, 发现在肝切除术后再生的肝细胞和用致癌剂二乙基亚硝氨(DEN)刺激产生的肝癌细胞中来自成熟肝细胞的细胞比例接近, 分别占18.3%和17.7%。这表明成熟肝细胞在损伤修复时可以产生肝细胞, 而且在致癌因素作用下可能产生肝癌, 提示已分化成熟的肝细胞在特定的环境刺激下也能去分化演变成LCSCs。

2 LCSCs的分离与鉴定

2.1 LCSCs的分子标志

Yin等^[7]在人肝癌细胞系SMMC-7721、原发肝癌组织及肝硬化组织中均检测到小群CD133⁺细胞的存在, 并且从SMMC-7721分选出的CD133⁺细胞比CD133⁻细胞有更强的致癌能力和克隆形成能力。Suetsugu等^[8]在人肝癌细胞系Huh-7中也证明了CD133⁺细胞具有LCSCs的特性。因此认为, CD133很可能是LCSCs的分子标志物。Yang等^[9]采用CD90作为LCSCs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⁺细胞, 异种移植入SICD小鼠体内, 发现其有致瘤性, 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⁺细胞, 从而得出了CD90是LCSCs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。CD44是一种细胞表面黏附分子, 介导多种信号途径。Yang等^[10]进一步将CD90⁺细胞群分为CD90⁺CD44⁺和CD90⁺CD44⁻共2个亚群, 利用抗CD44抗体阻断CD44的活化, 发现CD90⁺的致瘤性与抗CD44抗体呈量效关系: 加入抗体剂量越大, 则CD90⁺细胞的致瘤率越低。

上皮细胞黏附分子(EpCAM)广泛表达于肝脏干细胞和胚胎肝细胞中, 是肝脏干细胞的分子标志之一。Yamashita等^[4]发现EpCAM⁺肝癌细胞具有肿瘤干细胞的所有特性, 并且EpCAM是Wnt/连环蛋白(β -catenin)信号通路的靶基因, 激活该通路能够富集EpCAM⁺肝癌细胞群, 运用RNA干扰阻断EpCAM表达将使细胞活

力受损。这提示肝癌治疗时应用佐剂靶向阻断Wnt/连环蛋白(β -catenin)信号通路中的关键成分, 例如EpCAM, 将有希望能够根除LCSCs, 从而防止肝癌复发或转移。此外, Lingala等^[1]通过CD133⁺/ALDH或联合CD44和CD90免疫组化染色的方法, 证实了肝癌组织中LCSCs的存在。

综上所述, 不同文献报道的LCSCs拥有CD90、CD44、CD133、ALDH、EpCAM和OV6等分子标志物, 但至今没有发现一种特异性分子标志, 进一步研究寻找特异性强的LCSCs标志对肝癌的研究具有重要意义和价值。

2.2 LCSCs的分离

常用的肿瘤干细胞的分离方法有: 分离侧群细胞(side population cells, SP cells)、荧光活化细胞分选法(fluorescence activated cell sorting, FACS)、免疫磁性细胞分选法(magnetic activated cell sorting, MACS)、球培养法。

“失巢凋亡”(anoikis)是细胞与细胞外基质或相邻细胞脱离接触而诱发的一种程序性细胞死亡。球培养法利用肿瘤干细胞具有失巢凋亡抗性^[11], 能够在低黏附培养器皿中生存, 加入EGF等多种生长因子, 肿瘤干细胞可以增殖形成悬浮生长的细胞团, 称为球体。

2.2.1 SP细胞分选法

SP细胞是能将进入细胞核的荧光染料Hoechst33342通过膜转运蛋白ABCG2排出细胞外的一类细胞。而非侧群细胞(non side population cells, NSP cells)则没有这种特性。SP细胞分选表型标志和分离方法明确, 无需特异性的肿瘤干细胞分子标志物, 具有普遍适用性, 是肿瘤干细胞研究中的一种有效方法。

Chiba等^[5]分别对4个肝癌细胞系进行SP检测, 55.0%~68.2%的SP细胞同时表达肝细胞标志物AFP和胆管细胞标志物CK19, NSP细胞中无两者同时表达, 并且SP细胞表现出极强的致瘤力: 1×10^3 个SP细胞就能在非肥胖型糖尿病/联合免疫缺陷型(NOD/SCID)鼠皮下种植成瘤, 而 6×10^3 个NSP细胞却不能成瘤, 提示SP细胞对肝癌的发生具有重要作用。BMI1在成体干细胞自我更新过程中处于中心地位^[12]。Fan等^[13]用血清饥饿法培养肝癌来源的SP和NSP细胞, 结果发现抑制细胞凋亡的原癌基因**bcl-2**在SP细胞表达上调, 促进细胞凋亡的**Bax**在NSP细胞表达上调, 表明SP细胞具有强的抗凋亡

能力,并对恶劣环境有较强的抵抗力^[14]。Shi等^[15]的研究表明,肝癌标本中存在SP细胞,其比例与肝癌术后早期转移复发率密切相关。因此有学者认为,即使SP细胞不等同于LCSCs,但至少包含了部分细胞^[16]。

但Lichtenauer等^[17]的研究表明,SP细胞与肿瘤干细胞之间存在差异,有些肿瘤SP细胞不具有肿瘤干细胞特性。另外,由于DNA染料Hoechst33342具有细胞毒性,可能会给比较SP细胞和NSP细胞之间的生物学特性带来干扰。

2.2.2 利用LCSCs表面分子进行分选

由于SP细胞分选法存在上述缺陷,近年来MACS和FACS法的应用逐渐增多,两者的关键在于LCSCs表面分子的选定。如上文所述已发现的LCSCs分子标志有CD90、CD44、CD133、ALDH、EpCAM和OV6等。FACS、MACS分选法正是基于这一理论基础,不同的是FACS中肿瘤干细胞被特异荧光染色,从而与未被染色的细胞分离开来;MACS中肿瘤干细胞则被磁性标记而作为阳性细胞成分被直接分选出来。Salnikov等^[18]利用免疫荧光双染观察到肝癌患者成簇癌细胞较远的地方仍有不少CD133⁺细胞,提示仅仅检测CD133的表达来鉴定LCSCs是不可靠的。Zhu等^[19]通过抗CD133单抗和抗CD44单抗双染人肝癌细胞株HepG2、Hep3B、Huh7和SMMC-7721进行流式分选,所获得的CD133⁺CD44⁺细胞不仅具有干细胞增殖、自我更新以及分化为大量肿瘤细胞的特性,而且体内异种移植试验显示出较高的成瘤性,该类细胞表达了某些干细胞相关基因产物,并对化疗药物具有较强的耐药性。需要指出的是,上述分子标志物也在其他细胞群中表达,因此分选与鉴定工作中往往需要联合多种标志物进行。

3 应用及前景

3.1 肝癌的早期诊断、复发监测

LCSCs是肝癌发生过程中的最原始细胞,如果可以依据其分子标志及早地识别并分离,就极有可能对患者进行早期诊断。肝癌术后复发一直困扰着肝癌治疗,术后监测LCSCs的生物标志可以帮助评估术后复发风险,并及早做出相应处理^[20]。

3.2 LCSCs治疗途径

3.2.1 分子靶向治疗

通过阻断信号传导途径抑制LCSCs的激活。Ma等^[21]发现体外培养的肝癌细胞在应用

化学药物如表柔比星和氟尿嘧啶后产生CD133⁺亚群明显富集,显示CD133⁺细胞具有抗药性。应用Akt1抑制剂阻断Akt/PKB通路后,Akt/PKB和*bcl-2*途径相关存活蛋白表达显著下降,可以明显减少CD133⁺细胞的抗药性,提高对化疗药物的敏感性。

3.2.2 分化治疗

肿瘤干细胞分化最终导致其致癌性受到抑制。肝细胞核因子HNF4a是一种中心转录因子,在肝细胞分化和肝功能维持方面发挥重要作用^[22]。最近一项研究显示,HNF4a基因转导可以通过诱导细胞分化减少肝癌细胞系中具有成瘤性的CD90⁺和CD133⁺细胞比例^[23]。

3.2.3 抗体治疗

CD44是透明质酸酶和骨桥蛋白受体,在肝脏干细胞和白血病干细胞中广泛表达。CD44⁺细胞具有肿瘤干细胞特征,抗CD44抗体治疗可能成为肿瘤干细胞特异性治疗方案。肝细胞癌中的中低分化肿瘤有大量肿瘤血管,抗血管生成因子如贝伐单抗已应用于肝细胞癌临床试验,并在一些患者中产生疗效^[24]。

3.2.4 干细胞巢治疗

干细胞巢(stem cell niche)是干细胞维持自我更新、增殖分化、保持功能完整性的特殊屏障环境,由内皮细胞组成的特殊血管床、间质细胞以及细胞外基质构成。肿瘤干细胞巢的改变能影响肿瘤干细胞的命运,并与肿瘤的转移有关^[25]。Liu等^[26]发现,干细胞巢对肿瘤干细胞具有归巢作用,虽然切除了原发灶,但由于肿瘤干细胞巢的存在,能重新募集肿瘤干细胞到原肿瘤切除邻近部位定植,导致肿瘤术后复发。这表明在以清除肿瘤干细胞为目的的同时,针对肿瘤干细胞巢的治疗可能是另一种新的有效治疗方法。

4 存在的问题

肿瘤干细胞学说为人类认识肿瘤提供了一个崭新的视野,相对于乳腺癌、结肠癌等其他肿瘤干细胞,LCSCs研究仍停留于功能学方面,尚有许多问题亟待深入研究:(1)如何找到LCSCs特异性的分子标志,进一步纯化和分离LCSCs;(2)正常干细胞对于遗传错误具有修正能力,那么是何种原因使肝干细胞发生基因突变并将这种遗传错误保存积累下来而演变成LCSCs,我们又施加什么样的干预进行预防;(3)LCSCs在肝癌发生、发展和转归中的具

体机制尚有待阐明; (4)了解LCSCs的增殖分化及耐药机制, 为诱导LCSCs凋亡、分化或逆转耐药性提供理论依据。随着该领域研究的不断深入, 将有助于通过识别特异性的标志物检测分离LCSCs从而早期诊断肝癌, 并设计出靶向杀伤LCSCs的药物和方法。

【参 考 文 献】

- [1] LINGAL S, CUI Y Y, CHEN X, et al. Immunohistochemical staining of cancer stem cell markers in hepatocellular carcinoma [J] . *Exp Mol Pathol*, 2010, 89(1): 27-35.
- [2] KIM C F, JACKSON E L, WOOLFENDEN A E, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer [J] . *Cell*, 2005, 121: 823-835.
- [3] YANG W, YAN H X, CHEN L, et al. Wnt/beta-Catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells [J] . *Cancer Res*, 2008, 68 (11): 4287-4295.
- [4] YAMASHITA T, JI J, BUDHN A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features [J] . *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012-1024.
- [5] CHIBA T, KITA K, ZHENG Y W, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J] . *Hepatology*, 2006, 44(1): 240-251.
- [6] BRALET M P, PICHARDI V, FERRY N. Demonstration of direct lineage between hepatocytes and hepatocellular carcinoma in diethylnitrosamine-treated rats [J] . *Hepatology*, 2002, 36(3): 623-630.
- [7] YIN S, LI J, HU C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity [J] . *Int J Cancer*, 2007, 120 (7): 1444-1450.
- [8] SUETSUGU A, NAGAKI M, AOKI H, et al. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J] . *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(4): 820-824.
- [9] YANG Z F, NGAI P, HO D W, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer [J] . *Hepatology*, 2008, 47: 919-928.
- [10] YANG Z F, HO D W, NG M N, et al. Significance of CD90 cancer stem cells in human liver cancer [J] . *Cancer Cell*, 2008, 13 (2): 153-166.
- [11] SHEN W, CHEN D, FU H, et al. S100A4 protects gastric cancer cells from anoikis through regulation of αv and $\alpha 5$ integrin [J] . *Cancer Sci*, 2011, 102 (5): 1014-1018.
- [12] CHIBA T F, MIYAGI S, SARAYA A, et al. The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma [J] . *Cancer Res*, 2008, 68 (19): 7742-7749.
- [13] FAN J, LI R, ZHANG R, et al. Effect of Bel-2 and Bax on survival of side population cells from hepatocellular carcinoma cells [J] . *World J Gastroenterol*, 2007, 13(45): 6053-6059.
- [14] TAVALUC R T, HART L S, DICKER D T, et al. Effects of low confluency, serum starvation and hypoxia on the side population of cancer cell lines [J] . *Cell Cycle*, 2007, 6 (20): 2554-2562.
- [15] SHI G M, XU Y, FAN J, et al. Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials [J] . *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(11): 1155-1163.
- [16] 高杨, 李立, 冉江华. 肝癌干细胞的研究进展 [J] . *医学综述*, 2011, 17(3): 374-377.
- [17] LICHTENAUER U D, SHAPIRO I, GEIGER K, et al. Side population does not define stem cell-like cancer cells in the adrenocortical carcinoma cell line NCI h295R [J] . *Endocrinology*, 2008, 149 (3): 1314-1322.
- [18] SALNIKOV A V, KUSUMAWIDJAJA G, RAUSCH V, et al. Cancer stem cell marker expression in hepatocellular carcinoma and liver metastasis is not sufficient as single prognostic parameter [J] . *Cancer Lett*, 2009, 275 (2): 185-193.
- [19] ZHU Z, HAO X, YAN M, et al. Cancer stem cells are highly enriched in CD133⁺CD44⁺ population in hepatocellular carcinoma [J] . *Int J Cancer*, 2010, 126(9): 2067-2078.
- [20] YANG X, FAN J, YANG X R, et al. High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cells biomarkers related to tumor angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma [J] . *J Am Coll Surg*, 2010, 59 (7): 953-962.
- [21] MA S, LEE T K, ZHENG B J, et al. CD133⁺ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway [J] . *Oncogene*, 2008, 27(12): 1749-1758.
- [22] BEI-FANG N, JIN D, CHUAN Y, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α suppresses the development of hepatocellular carcinoma [J] . *Cancer Res*, 2010, 70: 7640-7651.
- [23] YIN C, LIN Y, ZHANG X, et al. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene [J] . *Hepatology*, 2008, 48: 1528-1539.
- [24] THOMAS M B, MORRIS J S, CHADHA R, et al. Phase II trial of the combination of bevacizumab and erlotinib in patients who have advanced hepatocellular carcinoma [J] . *J Clin Oncol*, 2009, 27: 843-850.
- [25] KUHN N Z, TUAN R S. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis [J] . *J Cell Physiol*, 2010, 222(2): 268-277.
- [26] LIU J M, MAO B Y, HONG S, et al. The postoperative brain tumour stem cell (BTSC) niche and cancer recurrence [J] . *Adv Ther*, 2008, 25(5): 389-398.

(收稿日期: 2011-03-15 修回日期: 2011-06-15)