

• 综述 •

非小细胞肺癌干细胞研究进展

曹宝山¹, 任 军^{2Δ}

(1. 北京大学第三医院肿瘤中心化疗科, 北京 100191; 2. 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所内科)

[关键词] 癌, 非小细胞肺; 肿瘤干细胞; 研究

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-167X(2008)05-0555-03

目前全球范围内新发肺癌患者每年已经超过 100 万例^[1]。预计 2008 年美国新发肺癌患者约 215 010 例, 因肺癌死亡的患者约 161 840 例, 其死亡率在男性和女性患者中均占恶性肿瘤死亡率的第一位^[2], 目前在中国其死亡率也居恶性肿瘤死亡率之首。肺癌的主要病理类型包括非小细胞肺癌和小细胞肺癌两大类, 其中非小细胞肺癌占肺癌总数的 80% ~ 85%^[3]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 主要包括鳞状细胞肺癌 (squamous cell cancer, SCC)、腺癌 (adenocarcinoma, AC) 和大细胞癌 (large cell cancer, LCC) 3 种亚型。尽管近十年来在诊断、手术、放化疗等方面取得了一些进步, 使得一些常见肿瘤 (如乳腺癌和前列腺癌等) 患者的 5 年生存率得到显著提高, 但是在非小细胞肺癌方面没有明显突破。目前非小细胞肺癌患者的 5 年生存率在发展中国家不足 9%^[1], 在美国最高, 但仍未超过 15%^[4]。

肿瘤干细胞学说表明肿瘤中存在一小群能够抵抗治疗和具有启动肿瘤形成的细胞, 即肿瘤干细胞^[5], 其具有独特的抵抗治疗的特征, 是肿瘤复发的根源^[5]。因此, 清除肿瘤干细胞或许是治疗肿瘤更为有效的方法。通过对肺损伤模型和肺癌细胞株、组织的研究发现, 肺癌干细胞与肺癌形成密切相关, 且已经从肺癌组织中分离得到肺癌干细胞, 其或许是造成非小细胞肺癌治疗瓶颈的主要原因。本文通过对非小细胞肺癌、非小细胞肺癌干细胞治疗的回顾, 介绍了非小细胞肺癌干细胞在肿瘤形成中的重要作用, 同时为非小细胞肺癌的治疗提供了新的思路。

1 肿瘤干细胞

肿瘤干细胞假说^[5]指出肿瘤起源于组织干细胞, 或者是组织干细胞的子代。正常情况下, 这些细胞的自我更新受严格调控, 但在发生恶性转化后, 自我更新的调控机制发生紊乱。另外, 发生恶性转化形成的肿瘤干细胞仍保留有干细胞样特性, 这些特性包括自我更新、驱动肿瘤的形成和维持肿瘤的存在; 分化能力, 导致肿瘤异质性。分化后产生的肿瘤细胞不具备成瘤性, 但这些分化细胞组成了肿瘤的主体。

肿瘤干细胞已经不再是一个新的概念, 目前可以从多种血液系统肿瘤和实体肿瘤中分离出来^[6]。大量证据表明肿瘤干细胞具有耐药性和抵抗射线的能力, 从而有助于肿瘤复发、转移^[5, 7-13]。耐药性产生的主要原因为肿瘤干细胞高表达多种 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白, 例如 *ABCB1* 基因编码 P-糖蛋白、*ABCG2/MXR* 基因编码多药耐药相关蛋白 1 和乳腺癌耐药蛋白-1^[9], 它们具有将药物、毒物、Hoechst 33342 染料外排的能力。与正常干细胞类似, 生长缓慢和多处于休眠状态也有助于肿瘤干细胞耐药性的产生。抵抗射线与肿瘤干细胞 DNA 损伤修复检测酶的激活等有关^[14]。研究还表明, 在放化疗后, 乳腺癌、脑胶质瘤对应的肿瘤干细胞比例升高^[15, 16], 成为肿瘤复发、转移的主要原因。因此清除肿瘤干细胞或许是治疗肿瘤的关键。

随着对肺损伤模型中支气管肺泡干细胞的分离及其和肺癌关系的研究, 促进了对非小细胞肺癌干细胞的研究, 为非小细胞肺癌的治疗提供了依据。

2 非小细胞肺癌干细胞

1982 年最先有研究表明非小细胞肺癌中可能存在干细胞^[17], 其应用从临床腺癌组织标本获取的单个肿瘤细胞进行克隆形成实验, 发现仅有一小部分 (<1.5%) 细胞具有克隆形成能力, 且形成的克隆在裸鼠体内能够形成肿瘤, 组织学表型与原代组织标本类似^[17], 间接表明非小细胞肺癌中可能存在肿瘤干细胞。直到 2007 年 Ho 等^[18]利用 SP (side population) 细胞分离方法才首次证实非小细胞肺癌中存在肿瘤干细胞。

Ho 等^[18]应用 Hoechst33342 染色和荧光激活细胞分选 (SP 细胞分选法) 的方法, 在 A549, H460, H23, HTB58, H441 和 H-2170 中分离出 SP 细胞, 并证实 SP 细胞具有自我更新、分化和高致瘤性的特征, 证实 SP 细胞中富集了肺癌干细胞样细胞, 并且发现其具备干细胞“永生”和处于静止状态的特征, 其抗凋亡因子和端粒酶 mRNA 高表达, 而标志细胞增生的 MCM7 mRNA 表达下调^[18]。多药耐药性也是肿瘤干细胞的一个特征^[9], Ho 等^[18]研究发现 SP 细胞表达大量 ABC 转运蛋白, 如 *ABCG2*, *MDR1*, *MPR2* 等, 导致其对多种化

Δ Corresponding author's e-mail, renjun@bjcancer.org

疗药物(如顺铂、吉西他滨、紫杉醇、多西紫杉醇等)抵抗。此外他们还成功地从非小细胞肺癌患者的肿瘤组织中分离出 SP 细胞。这些意味着非小细胞肺癌中确实存在干细胞,并且其具有潜在的耐药性。Sung 等^[19]也发现 A549 SP 细胞有 *ABCG2* 基因高表达,且 *MDRI* 和 *ABCC2* (*MPR2*) 基因高表达。此外 Sung 等利用基因芯片技术分析 A549 SP 和非 SP 细胞时,发现在 61 个分化的表达基因中,有 12 个基因在 SP 细胞中高表达,其中包括 3 个提示预后差的基因,分别是 *AKR1C1/C2*, *TM4SF1* 和 *NROB1*^[20]。随后 Eramo 等^[21]首次应用 CD133 从人肺癌组织中分离出 CD133⁺ 细胞,并证实其富集了肿瘤干细胞样细胞,同时发现其对吉西他滨等药物抵抗。

目前已经清楚肿瘤干细胞的分化与自我更新受 EGF/EGFR, PDGF/PDGFR, SCF/KIT, Hedgehog (SHH/PTCH/GLI), Notch 和 Wnt/ β -catenin 等通路的调控^[6]。在非小细胞肺癌干细胞中,研究较多的为 Notch, Hedgehog (SHH/PTCH/GLI) 和 Wnt/ β -catenin 通路^[22-30]。敲除小鼠的实验研究表明 Notch 通路活化在肺的发育中起重要作用^[22],并且 Notch 配体、受体和 HES1 的水平在非小细胞肺癌细胞株中表达升高,其与癌变的 RAS 信号关系密切^[23,24]。应用 γ -Secretase 抑制剂能够抑制 Notch-3 激活,在体内、外均可抑制肺癌的生长^[25]。Hedgehog (SHH/PTCH/GLI) 在肺的早期发育中起着重要作用^[26]。Wnt/ β -catenin 通路的异常激活与多种肿瘤的发生密切相关(包括非小细胞肺癌)。目前在肺癌中 Wnt 通路的激活方式主要包括:Wnt 效应子过表达(如 Dishevelled, Dvl),非经典途径 JNK 的激活和 Wnt 拮抗因子(如 Wnt inhibitor factor-1, WIF-1)下调。虽然这些通路和彼此之间的联系目前仍不是很清楚,但是针对这些通路的治疗已经在非小细胞肺癌的治疗中发挥作用^[27]。Uematsu 等^[28]报道 Dvl 在非小细胞肺癌组织和细胞株 H1703 中过表达,导致 Wnt 通路激活,应用其特异性的 siRNA 可以阻断 Dvl 和 β -catenin 的表达,抑制非小细胞肺癌的生长。Kim 等^[29]应用转染后含有 Wnt 抑制因子基因的 A549 和 H460 细胞株,测定细胞增生,并将含有 Wnt 抑制因子的脂质体注射到移植瘤周。结果表明 Wnt 抑制因子表达增加可以促进癌细胞的凋亡,使克隆形成率下降,并且重组的 Wnt 抑制因子蛋白能够抑制 H460 的增生,显著抑制肿瘤的生长。Wnt/ β -catenin 通路可以调控细胞周期,从而维持干细胞的分化和自我更新。在肺干细胞中 β -catenin 主要通过减弱分化促进组织干细胞数量的增加,而不是促进干细胞直接增生,其在非小细胞肺癌干细胞中的作用也需要进一步研究^[30]。

3 非小细胞肺癌干细胞的治疗策略

肿瘤干细胞具有耐药、抵抗射线、抗凋亡能力增强等特征,在接受放化疗后,肿瘤干细胞比例增高,从而导致疾病的快速复发^[6]。目前已清楚非小细胞肺癌中存在干细胞,这群细胞具有自我更新、分化和耐药的潜能^[20-23],因此清除非小细胞肺癌干细胞或许是治疗肺癌的关键。目前清除非小细胞肺癌干细胞的策略或许主要包括:(1)逆转肺癌干细胞的

耐药性。目前主要将研究集中在 ABC 转运蛋白的阻断剂上。(2)抑制肺癌干细胞的自我更新和诱导分化。目前研究主要集中在 Notch, Hedgehog (SHH/PTCH/GLI) 通路。(3)改善肿瘤干细胞的微环境,特别是血管生成。如在原位胶质瘤 U87 的移植肿瘤中,抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的单克隆抗体能够显著降低微血管密度和抑制肿瘤生长,并且发现与血管相关的具有自我更新的 CD133⁺/nestin⁺ 肿瘤细胞数量的下降^[31]。Folkens 等^[32]应用细胞毒性药物联合抗血管生成治疗药物治疗脑胶质瘤时,也发现抗血管生成药物的加入能够更多地降低肿瘤干细胞样细胞的比例。抗血管生成治疗已经应用在非小细胞肺癌的治疗中,并使患者的生存获益^[33]。但抗血管生成治疗对非小细胞肺癌干细胞是否有抑制作用,还有待于进一步深入研究。

非小细胞肺癌目前仍是全球范围内致死率居首的恶性肿瘤,现有的治疗手段使其总的 5 年生存率仍未超过 15%,这可能与非小细胞肺癌干细胞的存在密切相关。非小细胞肺癌干细胞具有耐药、抵抗治疗等特征,与非小细胞肺癌的复发、转移密切相关,是治疗失败的主要原因。因此清除非小细胞肺癌干细胞或许是治疗非小细胞肺癌的有效策略。尽管已经知道 ABC 转运蛋白过表达导致非小细胞肺癌干细胞耐药,Hedgehog (SHH/PTCH/GLI), Notch 和 Wnt/ β -catenin 通路调控非小细胞肺癌干细胞的自我更新和分化,通过逆转耐药和阻断干细胞的自我更新和分化来清除非小细胞肺癌干细胞初步取得效果。但目前尚存在许多亟待解决的问题,如参与非小细胞肺癌干细胞耐药的主要转运蛋白、调控非小细胞肺癌干细胞分化和更新的主要通路以及干预非小细胞肺癌干细胞的药物对正常干细胞的影响等尚不清楚。

参考文献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 74-108.
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007 [J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57: 43-66.
- [3] Murray T, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2008 [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58: 71-96.
- [4] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006 [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56: 106-130.
- [5] Wicha MS, Liu Suling, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift [J]. Cancer Res, 2006, 66: 1883-1890.
- [6] Mimeault M, Hauke R, Batra SK, et al. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers [J]. J Cell Mol Med, 2007, 11: 981-1011.
- [7] Mimeault M, Batra SK. Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies [J]. Stem Cells, 2006, 24: 2319-2345.
- [8] Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Recent advances on the molecular mechanisms involved in drug resistance of cancer cells and novel targeting therapies [J]. Clin Pharmacol Ther, 2007, 82: 252-264.
- [9] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5: 275-284.
- [10] Tso CL, Shintaku P, Nelson SF, et al. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties [J]. Mol Cancer Res, 2006, 4: 607-619.
- [11] Ravandi F, Estrov Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12: 340-344.
- [12] Wang Jing, Guo Liping, Chen Lizhen, et al. Identification of

- cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 3716–3724.
- [13] Zhang Mei, Rosen JM. Stem cells in the etiology and treatment of cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16: 60–64.
- [14] Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 8980–8984.
- [15] Yu Fengyan, Lieberman J, Song Erwei, et al. Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells[J]. *Cell*, 2007, 131: 1109–1123.
- [16] Bao Shideng, Bigner DD, Rich JN, et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 7843–7848.
- [17] Carney DN, Gazdar AF, Bunn PJ, et al. Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cells from lung cancer patients[J]. *Stem Cells*, 1982, 1: 149–164.
- [18] Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 4827–4833.
- [19] Sung JM, Cho HJ, Shin HC, et al. Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells[J]. *Biochem and Biophys Res Commun*, 2008, 371: 163–167.
- [20] Seo DC, Sung JM, Shin HC, et al. Gene expression profiling of cancer stem cell in human lung adenocarcinoma A549 cells[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 75.
- [21] Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 504–514.
- [22] Collins BJ, Kleeberger W, Ball DW, et al. Notch in lung development and lung cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14: 357–364.
- [23] Chen H, Thiagalingam A, Chopra H, et al. Conservation of the drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaetescute homolog-1 expression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5355–5360.
- [24] Weijnen S, Rizzo P, Braid M, et al. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human ras-transformed cells[J]. *Nat Med*, 2002, 8: 979–986.
- [25] Konishi J, Kawaguchi KS, Vo H, et al. Gamma secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 8051–8057.
- [26] Picicelli CV, Lewis PM, McMahon AP, et al. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung[J]. *Curr Biol*, 1998, 8: 1083–1086.
- [27] Mazieres J, Biao He, Jablons DM, et al. Wnt signaling in lung cancer[J]. *Cancer Lett*, 2005, 222: 1–10.
- [28] Uematsu K, Biao He, Jablons DM, et al. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression[J]. *Oncogene*, 2003, 22: 7218–7221.
- [29] Kim J, You L, Jablons D, et al. Wnt inhibitory factor inhibits lung cancer cell growth[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 133: 733–737.
- [30] Reynolds SD, Zemke AC, Giangreco A, et al. Conditional stabilization of β -catenin expands the pool of lung stem cells[J]. *Stem Cells*, 2008, 26: 1337–1346.
- [31] Calabrese C, Poppleton H, Allen M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11: 69–82.
- [32] Folkens C, Man Shan, Kerbel RS, et al. Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 3560–3564.
- [33] Herbat RS, Onn A, Sandler A, et al. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 3243–3256.

(2008-07-21 收稿)
(本文编辑:刘淑萍)

Progress of research on non-small cell lung cancer stem cell

CAO Bao-shan¹, REN Jun^{2Δ}

(1. Department of Oncology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 2. Department of Medical Oncology, Beijing Cancer Hospital & Institute, Peking University School of Oncology)

SUMMARY Non-small cell lung cancer (NSCLC) is now regarded as the most common cause of cancer-related mortality in China. Despite continuous efforts to improve the therapeutic response, the overall five-year survival rate for NSCLC is still less than 15%. Now we have known that the growth of neoplastic tumors is maintained exclusively by a small subpopulation called “cancer stem cells” which possesses ability of self-renew and differentiation. It has been widely accepted that cancer stem cells are chemoresistant and radioresistant. Therefore, a major challenge in treating this and other cancers is the intrinsic resistance to conventional therapies demonstrated by the stem/progenitor cell that is responsible for the sustained growth, survival, and invasion of the tumor. Identifying these stem cells in non-small cell lung cancer and defining the biologic processes necessary for their existence are paramount in developing new clinical approaches with the goal of preventing disease recurrence. This review summarizes our update understandings of the cellular and molecular mechanisms operating within the putative cancer-initiating cells at the core of non-small cell lung cancer.

KEY WORDS Carcinoma, non-small cell lung; Tumor stem cells; Research