

肿瘤异质性:肝癌干细胞有序的分化潜能^{*}

张文锋¹综述,冯 凯^{2△}审校(1. 重庆医科大学附属第二医院肝胆科,重庆 400010;2. 第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所/中国人民解放军西南肝胆外科医院,重庆 400038)

【关键词】 肿瘤异质性; 肝癌干细胞; 分子标志物

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 21. 054 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)21-3067-03

肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤之一,据《2012 年中国肿瘤登记年报》报道,肝脏肿瘤在我国的发病率为 28. 71%,发病率位居恶性肿瘤第 4 位。肝癌恶性程度高,发展迅速,临床上早期诊断困难,患者出现症状时往往已经预示着肝癌晚期,大多数已经出现肝内转移及肝外转移,且肝癌对放疗及化疗均不敏感,术后极易复发,这是导致其病死率高居不下的主要原因。根据巴塞罗那肝癌分期方法与治疗原则,极早期肝癌患者手术切除可获得较满意的预后,而早中期肝癌患者则应该选择更加积极的方式如肝移植、射频消融术、经皮酒精注射、化学药物治疗或介入栓塞,而晚期及终末期患者可以尝试生物治疗或针对并发症治疗^[1]。肝癌的局部复发和远处转移是产生治疗耐受的主要表现,治疗耐受产生的原因以肿瘤异质性学说得到广泛的认同,但是其机制仍存在争议,随着近年来肿瘤干细胞(CSCs)研究的深入,目前研究认为肿瘤的异质性与肿瘤干细胞亚群分化潜能密切相关^[2-5]。因此如果能够阐明肝癌干细胞如何“复原”正常组织干细胞有序的分化潜能而能够逃逸自身监控,并且让不同表面标志物亚群细胞在瘤内保持平衡的机制,这对进一步研究肿瘤异质性有重要的意义,并且对早期预防、诊断和治疗肝癌有重大的临床意义。本文针对肿瘤的异质性与肿瘤干细胞亚群分化潜能关系的最新研究结果进行综述,现报道如下。

1 癌干细胞有序分化潜在在肿瘤异质性的认识

癌症被认为是由于基因组和遗传的不稳定性造成的无性增值的恶性组织,传统观点认为原发性肿瘤中基本没有所谓生物学现象如突变、选择、适应的发生。^[3]但是在现代肿瘤的治疗进展的带动下已经认识到肿瘤患者基因型之间存在着差异,并称之为肿瘤间异质性,这种新的认识对患者个体化治疗有指导性意义^[4]。肿瘤异质性就是指肿瘤病灶中有着不同遗传基因组或者亚型的克隆细胞,包括不同患者的同一种病理分型的肿瘤之间的存在基因型差异,以及同一患者同一肿瘤病灶中的具有独特基因组的肿瘤细胞亚群的可能存在的肿瘤在不同的区域,或随着时间的推移表现不同的分化结果,也叫瘤内异质性^[4]。后者在肿瘤发生、恶化、转移、治疗、复发中发挥更重要的作用,因此也是学者们研究的重点。

肿瘤异质性的产生被认为与胚胎时期干细胞的发育有关,在胚胎时期干细胞的保留分化潜能而发育成人体的各种不同功能的器官组织^[2]。因此,肿瘤发生也被认为是干细胞有序而失控的分化潜能表现,这也是肿瘤干细胞学说的来源之一。目前对于肿瘤干细胞有两种不同的看法来解释肿瘤的发生和肿瘤异质性的产生:第一种看法认为在肿瘤病灶内所有肿瘤细胞

都是具有分化潜能的细胞,这种肿瘤细胞随机按照一定比例分化、增殖,刺激肿瘤的生长;第二种看法认为肿瘤与正常组织一样,是有序的分层组织,只有相当少的一部分祖细胞(即 CSCs)具有增长潜力,保持肿瘤的长期增长,而其他的肿瘤细胞为静默细胞,其分化潜能受到抑制^[2]。所以严格意义上讲,CSCs 和瘤内其他肿瘤细胞一样具有相同的基因型,而只是在肿瘤分化过程中表现出转录后修饰或者表观遗传的差异,这种现象产生的似乎与正常干细胞胚胎时期发育成不同器官和组织的机制存在某种特定的关系^[6]。

2 肝癌干细胞的获取及产生肿瘤异质性的机制

肝癌干细胞 1989 年由 Sell 等提出后得以广泛关注和发展的,他们认为肝癌病灶内存在少数具有特定分化潜能的细胞亚群,这种细胞亚群通过改变自身某种酶结构是导致肿瘤恶化的主要原因之一^[7]。但是由于当时技术条件的限制,学者们并未在肝脏肿瘤获取到干细胞的直接证据。直到最新流式细胞仪等技术成熟及肝癌干细胞表面标志物研究深入,学者们才陆续在肝癌病灶(包括转移灶)和外周循环中获取肝癌干细胞^[8]。这也推动了肝癌异质性的机制研究进一步深入。

目前已经证实了肝癌干细胞也像正常组织干细胞一样会表达某种分子标志物来,不同的研究团队采用这些表面分子标志物区分不同的肝癌干细胞分化亚群。但是就如正常组织干细胞并不只存在单一的分子标志物,这一结论也可以类推至肝癌干细胞中^[2,4-5]。因此只要在肝癌患者癌灶或外周循环中检测到这些具有特殊表面标志物的肿瘤干细胞亚群的存在以及监测肝癌不同时期肿瘤干细胞水平的变化,就可以客观地反映患者体内肝癌发生、恶化、转移、复发的情况。目前发现肝癌干细胞以 CD133、CD90、CD44 为代表的表面分子标志物大约有 10 多种^[9]。CD133 又称 Prominin-1,是造血干/祖细胞的一种跨膜糖蛋白,胚胎时期肝脏祖细胞大量 CD133 表达,也是学者们最早研究的肝癌干细胞的标志物之一,目前 CD133 被广泛地用来作为分选肝癌干细胞亚群的分子标志物。文献^[10]报道 CD133(+)肝癌细胞亚群在体外和体内均比 CD133(-)细胞具有更强的繁殖能力和致瘤率,而且在这些 CD133(+)细胞亚群中干细胞相关的基因如 β -连环蛋白,Oct3/4,Notch 的表达明显增加。CD90 即 Thy-1,是肝脏卵圆细胞的表面标志蛋白,目前已经发现肝癌局部癌灶和外周循环存在极少数的 CD45(-)CD90(+)亚群细胞,并且 CD90(+)亚群细胞多伴其他干细胞标志物如 CD133、CD44 的高表达。文献^[11-13]报道不仅分别在肝癌病灶和外周循环中分选出 CD90(+)CD44(+)CD45(-)标记的肿瘤干细胞,并且证实了这种干细胞比

^{*} 基金项目:国家重点实验室开放基金(SKLFKF201209);重庆市博士后特别资助项目(XM20120013)。

[△] 通讯作者,E-mail:fengkai7688@hotmail. com。

CD133(+)肝癌亚群细胞具有更高的致瘤率和侵袭性。CD44 是一种细胞表面黏附因子,通过与细胞外配体结合调节肝癌细胞的增生、增殖、分化、迁移和生存。在 Yang 等^[12]研究中 CD44(+)亚群细胞表现出比 CD44(-)更强的侵袭性,而 Zhu 等^[14]报道 CD44(+)CD133(+)细胞亚群不仅表现更强的化疗耐性,并且发现干细胞相关基因等过度表达。CD13 在 G₁/G₀ 期的肝癌细胞亚群高度表达,被认为是一种静默期或半静默期肝癌干细胞标志物。Haraguchi 等^[15]用阿霉素和 5-氟尿嘧啶(5-FU)处理 CD13 富集的肝癌干细胞亚群细胞,结果显示 CD13(+)亚群细胞具有明显的耐药性,并且化疗可促进 CD13 高表达。上皮细胞黏附分子(EpCAM)也称为 CD326,在胚胎起肝细胞及胆管上皮细胞以及肝硬化增生的胆管高度表达。Yamashita 等^[16]在肝癌恶变组织中发现 EpCAM 的水平增高,并且发现 EpCAM(+)肝癌亚群与肝脏祖细胞基因信号传导和分子信号通路密切相关,因此也认为 EpCAM 是肝癌干细胞表面标志物之一。Terris 等^[17]报道了 EpCAM(+)甲胎蛋白(AFP)(+)亚群细胞更强的致瘤率,迁移性和门静脉侵蚀性。还有 Zen 等^[18]以三磷酸腺苷(ATP)结合盒转运蛋白 G2(ABCG2)为标志物分选出来的肝癌干细胞亚群也具有明显的化疗药物耐受性。OV6 是肝脏卵圆细胞的标志物,OV6(+)亚群细胞具有更强的体外化疗抗性,OV6(+)肝癌患者表现出更强的侵袭性,并且与肝癌临床病理特征密切相关,但是 OV6(+)肝癌患者与 OV6(-)肝癌患者相比并无明显的无病生存期和总生存期质量差异^[19]。乙醛脱氢酶(ALDH)并非是干细胞表面标志物,但是 ALDH(+)CD133(+)亚群细胞具有更高致瘤率和迁移性^[20]。Oikawa 等^[21]报道 Sall 样蛋白 4(SALL4)在体外能够刺激肝癌细胞的增殖,并且多种肝癌干细胞表面标志物如 EpCAM、ABCG2、CK19 表达上调。SALL4 是锌指转录因子家族的成员之一,是组织干细胞标志物之一,在胚胎时期调节器官组织的形成和分化。他们的研究认为 SALL4 是肝癌干细胞的一种标志物,而且可以作为肝癌治疗预后的指标,过表达 SALL4 可以明显增加肝癌对 5-FU 的耐受性,并且抑制其表达可以明显抑制肝癌的增殖和分化^[21]。目前已经报道的不同肝癌干细胞表面标志物分选出来的细胞亚群均表现出不同的特性,但是这些亚群细胞在肿瘤增殖、恶化、复发过程中仍保持有序的分化潜能,这使得学者们推测肝癌干细胞有序的分化潜能可能是产生肿瘤异质性的根源^[2-5]。因此深入研究产生这些肝癌干细胞表面标志物表达的机制以及这些标志物在肝癌增殖、恶化、迁移、复发过程中发挥的作用和途径就可以靶向杀伤这些具有分化潜能的干细胞亚群,从而抑制肿瘤的生长^[2]。

调控正常组织干细胞分化过程的某些信号通路和调节基因也同样调节和维持肿瘤干细胞有序分化的过程。上皮-间质转化(EMT)机制与肿瘤恶性程度和侵略性密切相关,因此被认为是调控肿瘤干细胞分化潜能的主要机制^[4,22]。研究报道发生 EMT 的肿瘤细胞具有明显的分化潜能,这些分化潜能推测与转化生长因子- β (TGF- β)、Wnt/ β -catenin 及 MicroRNA 信号通路有关^[22-24]。

敲除 TGF- β 基因的裸鼠抑制肝癌的发生,并且过表达 TGF- β 不仅增加致瘤率,而且使肝癌更容易发生远处转移^[22]。并且 TGF- β 还能诱导在不同肿瘤细胞中与 EMT 发生相关的转录因子如 TWIST1、TWIST2、SNAIL、SNAIL2、ZEB1、ZEB2 的高表达,以及抑制 E-cadherin 表达。CD44(+)CD24(-)为标志物分选出来的乳腺癌细胞被证实了具有更明显的分化潜

能,同时在该亚群细胞中发现 TWIST1 过表达^[25]。虽然目前认为 TWIST1 在 EMT 过程发挥重要的作用,但是 TWIST1 如何通过 TGF- β 调节 EMT 以及在 CSCs 中有序分化过程,如何控制肿瘤异质性的机制仍未清楚。

而在 Wnt/ β -catenin 信号传导通路中,主要推测与 MicroRNA 作用相关。有报道 MiR-181 在胚胎时期的肝脏和 EpCAM(+)AFP(+)肝癌干细胞中均高表达,且抑制 MiR-181 表达的肝癌干细胞亚群能明显降低其致瘤率。MiR-181 主要通过转录因子 CDX2、GATA6 调节肝癌干细胞的分化潜能,以及通过 NLK 负向调节 Wnt/ β -catenin 信号传导通路^[24]。随着对 MicroRNA 研究的深入,let-7、Lin28、MiR-181 等也被证实了与肝癌的发生和转移密切相关,且存在正向和负向调节肝癌干细胞的干性表达。在正常的胚胎肝细胞中有大量 Lin28 的表达,它通过抑制 let-7 与成熟 mRNA 的结合来保持细胞的自我更新。在负向调节机制中,Lin28 和 c-myc 的大量激活使得 let-7 被降解从而破坏有分化潜能的肝癌干细胞亚群与整体肿瘤细胞的平衡,使得肿瘤发生恶变和转移。而在正向调节机制中,MiR-181 通过作用于 CDX2、GATA6、NLK 抑制 TGF- β 激活,这种抑制作用使得 EpCAM 表达升高。EpCAM 的胞外端被裂解成 EpICD,与 FHL2、 β -catenin、Lef-1 结合后进入细胞核内诱导转录因子 cyclin D1、c-Myc 和 miR-181 的表达^[26-27]。

这些不同表面标志物的肝癌干细胞亚群表现出较高的致瘤率也进一步证明了肿瘤异质性的。是否存在处于最高分化潜能的阶段肝癌干细胞亚群,或者是目前所发现的这些具有不同标志物的肝癌干细胞亚群只是处于不同分化时期的肝癌干细胞,目前仍不得知这些不同标志物的分化亚群是代表怎样的一种分化过程,并且目前的研究尚未获取到处于最高分化潜能阶段的肝癌干细胞,而具有不同表面标志的细胞亚群尚需要进一步的深入研究。

3 肝癌干细胞在诊断与治疗肝细胞癌的作用

Yang 等^[12]不仅在肝癌患者外周循环中获取具有高致瘤率的 CSCs,而且还进一步证实了行肝癌切除术术前外周循环 CSCs 水平与肝癌切除术后复发率呈显著正相关。多种肝癌干细胞蛋白与肝癌的恶性程度相关,如 K19 和 c-kit^[28]。K19 是一种胆管型细胞角蛋白,与肿瘤侵犯血管范围、肿瘤直径、分化程度及 AFP 水平密切相关还有 c-kit,又叫 CD117,是一种干细胞因子受体,在多种恶性肿瘤中表达。目前流式细胞技术提高了外周肝癌干细胞的获取率,这比肝细胞穿刺术更方便、并发症更少。因此外周循环出现的 CSCs 如果可以作为早期诊断肝癌、监测肿瘤复发的手段将大大改善肝癌患者的预后。

正常干细胞异质性能耐受 DNA 损伤诱导的细胞死亡,因为他们保存着基因完整表达潜能而获得生存优势。以此类推至同样具有有序分化潜能的 CSCs,它们同样可以比静止状态的肿瘤细胞更能耐受药物或放射治疗,也同样具有在不同方式干预后局部复发和远处转移的能力^[2]。因此如果采取某种有效方法直接杀死 CSCs,并且能抑制 CSCs 的自我更新或改变其分化方向,无疑是治愈肿瘤的最有效方式。Yamashita 等^[16]的研究中,EpCAM 特异性抗体比常规化疗药物更加有效地抑制肝癌的生长。但是由于 CSCs 的有序分化特性都与人体正常的干细胞相似,采取的治疗方式应在能够靶向抑制 CSCs 分化潜能的同时,不会损伤到自身肝细胞的更新以及肝脏或其他器官组织的机能。肝癌干细胞具有多种特异性表面标志物,如果使用肝癌干细胞特定的表面标志物抗体进行免疫治疗,或者

针对具有特定标志物的 CSCs 亚群使用分子靶向药物治疗,从而抑制 CSCs 自我更新和生存的信号通路,这无疑为肝癌的治疗提供了一个崭新领域。

CSCs 在肿瘤分化过程中表现转录后修饰以及表观遗传差异,这种差异是肿瘤异质性产生主要机制之一。具有不同标志物的肝癌干细胞亚群可能只是处于不同分化时期的肝癌干细胞,不同肝癌干细胞表面标志物分选出来的细胞亚群均表现出不同的致瘤率与药物耐受性,但是这些亚群细胞在肿瘤增殖、恶化、复发过程中仍保持有序的分化潜能。因此检测外周循环特定 CSCs 亚群可作为早期诊断肝癌、监测肿瘤复发的手段。同时,针对肝癌干细胞特定的表面标志物抗体进行免疫治疗,或者在特定标志物的 CSCs 亚群使用分子靶向治疗,从而可以抑制 CSCs 自我更新和生存信号通路。

参考文献

- [1] Llovet JM, Fuster J, Bruix J. The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Transpl*, 2004, 10(2 Suppl 1): S115-S120.
- [2] Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(10): 727-738.
- [3] Klein CA. Selection and adaptation during metastatic cancer progression[J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 365-372.
- [4] Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, et al. Tumour heterogeneity in the clinic [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 355-364.
- [5] Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 328-337.
- [6] Valent P, Bonnet D, De Maria R, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(11): 767-775.
- [7] Sell S, Dunsford HA. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma [J]. *Am J Pathol*, 1989, 134(6): 1347-1363.
- [8] Zhang Y, Li J, Cao L, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: detection techniques, clinical implications, and future perspectives [J]. *Semin Oncol*, 2012, 39(4): 449-460.
- [9] Tong CM, Ma S, Guan XY. Biology of hepatic cancer stem cells [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(8): 1229-1237.
- [10] Ma S. Biology and clinical implications of CD133(+) liver cancer stem cells [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(2): 126-132.
- [11] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2): 153-166.
- [12] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-928.
- [13] Fan ST, Yang ZF, Ho DW, et al. Prediction of posthepatectomy recurrence of hepatocellular carcinoma by circulating cancer stem cells a prospective study [J]. *Ann Surg*, 2011, 254(4): 569-576.
- [14] Zhu Z, Hao X, Yan M, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133⁺ CD44⁺ population in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(9): 2067-2078.
- [15] Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(9): 3326-3339.
- [16] Yamashita T, Forgues M, Wang W, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1451-1461.
- [17] Terris B, Cavard C, Perret C. EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2010, 52(2): 280-281.
- [18] Zen Y, Fujii T, Yoshikawa S, et al. Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(5): 1750-1762.
- [19] Turner R, Lozoya O, Wang Y, et al. Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 1035-1045.
- [20] Ma S, Chan KW, Lee TK, et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(7): 1146-1153.
- [21] Oikawa T, Kamiya A, Zeniya M, et al. Sal-like protein 4 (SALL4), a stem cell biomarker in liver cancers [J]. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1469-1483.
- [22] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-Mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- [23] Majumdar A, Curley SA, Wu X, et al. Hepatic stem cells and transforming growth factor β in hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(9): 530-538.
- [24] Leal JA, Lleona ME. MicroRNAs and cancer stem cells: therapeutic approaches and future perspectives [J]. *Cancer Lett*, 2013, 338(1): 174-183.
- [25] Mani SA, Guo WJ, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. *Cell*, 2008, 133(4): 704-715.
- [26] Wang XW, Heegaard NH, Orum H. MicroRNAs in liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(7): 1431-1443.
- [27] Heo I, Joo C, Cho J, et al. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA [J]. *Mol Cell*, 2008, 32(2): 276-284.
- [28] Kim H, Choi GH, Na DC, et al. Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression: keratin 19 expression and a poor prognosis [J]. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1707-1717.