

· 综述 ·

肿瘤干细胞的治疗耐受机制研究进展

曹梦雪^{1,2}, 孙凡², 林厚文^{1,2} (1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 上海交通大学附属仁济医院药剂科, 上海 200127)

[摘要] 肿瘤的发病率和死亡率位居各类疾病之首, 肿瘤的复发和转移是目前肿瘤治疗失败的主要原因, 肿瘤治疗的失败又与肿瘤干细胞有着密切的关系。肿瘤干细胞的耐药机制一般包括以下几个方面: 高表达的 ABC 转运蛋白介导化疗药物外排; 乙醛脱氢酶的高表达与肿瘤的发病率和预后差显著相关; 高效的 DNA 损伤修复能力; 促存活通路的激活能力。笔者综合介绍肿瘤干细胞几种主要的治疗耐受机制, 以期为开发新型抗肿瘤药物以及临床合理用药提供理论依据。

[关键词] 肿瘤干细胞; 治疗耐受; ABC 转运蛋白; 乙醛脱氢酶; DNA 损伤修复; 促存活通路

[中图分类号] R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)03-0193-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.001

Advance in resistance mechanism of cancer stem cells therapy

CAO Mengxue^{1,2}, SUN Fan², LIN Houwen^{1,2} (1. College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University Pharmacy, Shanghai 200127, China)

[Abstract] Lung cancer is the leading cause of cancer deaths worldwide. Recurrence and metastasis are the primary reasons for its poor prognosis. Growing evidence has proposed that lung cancer may be driven by cancer stem cells (CSCs), which may be responsible for the poor outcome of lung cancer. The resistance mechanisms of cancer stem cells include four aspects: high expression of the chemo-resistant efflux transporter ABC in CSCs populations, over-expression of ALDH, efficient DNA damage repair system, developmental pathway activation. The tolerance mechanism of CSCs was described to provide theoretical basis for clinical treatment and development of new anti-tumor drugs.

[Key words] cancer stem cells; therapy resistance; ABC transports; ALDH; DNA damage repair; developmental pathway activation

随着人口老龄化、工业化发展和环境的污染, 肿瘤的发病率和死亡率逐年增加, 死亡率位居各类疾病之首^[1]。目前肿瘤常规的治疗方式主要为手术、放疗和化疗, 但经常规治疗后的复发和转移仍然是当前面临的巨大难题。肿瘤复发和转移的主要原因之一是治疗耐受, 而近几年研究发现肿瘤产生治疗耐受的重要原因之一是肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的存在, 因此在肿瘤治疗的研究中, 以CSCs作为靶点的治疗手段具有较好的临床前景。对CSCs耐药机制的深入了解, 可为开发新型抗肿瘤药物以及临床合理用药提供理论依据。本文主要从ABC转运蛋白引起的药物外排、乙醛脱氢酶(al-

dehyde dehydrogenase, ALDH)活性和活性氧的清除、增强DNA损伤修复能力和促存活通路的激活等4个方面对CSCs的治疗耐受机制进行综述。

1 ABC转运蛋白引起的药物外排

ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporters, ABC蛋白)是一类跨膜蛋白, 对维持机体内环境的化学平衡, 防御外界药物的入侵, 维持正常的机体内环境平衡具有重要作用。ABC转运蛋白家族包括49种蛋白, 其中3种跟肿瘤的多药耐药有关。它们分别是P-糖蛋白(P-glycoprotein, MDR1, ABCB1)、多药耐药蛋白1(multidrug resistance protein 1, MRP1, ABCC1)、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP, ABCG2)^[2]。肿瘤组织利用ATP分解产生的能量主动将细胞内的药物泵出, 从而降低细胞内的药物浓度, 进而保护自身免受细胞毒性药物的损伤。

[基金项目] 国家青年科学基金资助项目(81502936)

[作者简介] 曹梦雪, 硕士研究生. Tel: 18821264950; Email: caomengxue2008@163.com

[通讯作者] 林厚文, 教授. 研究方向: 海洋生物活性成分研究与新药开发. Tel: (021) 68383346; Email: franklin67@126.com

Guan 等^[3]研究发现原发性的头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)中约有 2.7% 的肿瘤细胞是侧群(side population, SP)细胞,检测发现 SP 细胞中的 MRP1 和 ABCG2 的表达量均高于非 SP 细胞,并且 SP 细胞具有更强的增殖能力和多药耐药能力,用维拉帕米(verapamil)治疗头颈部鳞状细胞癌可将 SP 细胞比例降低至 0.7%。Xie 等^[4]也发现从结肠癌中分选得到的 SP 细胞,其 ABCG2 的蛋白表达水平明显升高。Stacy 等^[5]研究发现,磷酸二氢酶 5 抑制剂和烟曲霉素型吡啶型哌嗪 Ko143 可以通过抑制 ABCG2 的活性,增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。大豆抗毒素^[6]具有类似 Ko143 的性质可以抑制 ABCG2 的活性,且显示出剂量依赖性。色瑞替尼(LDK378)^[7]是目前在 III 期临床试验用于治疗非小细胞肺癌的第二代酪氨酸激酶抑制剂。研究发现 LDK378 通过抑制 ABCB1 或 ABCG2 所介导的药物外排,显著增加化疗剂诸如阿霉素(DOX)在肿瘤细胞内的积累,因此临床上可以将 LDK378 联合化疗药物治疗肿瘤。姜黄素同样可以通过抑制 ABCG2,增加丝裂霉素 C 对乳腺癌干细胞的杀伤能力^[8]。

总之,由于 ABC 转运蛋白引起的药物外排会导致肿瘤耐药,以 ABC 转运蛋白作为靶点寻找抑制剂,逆转 CSCs 的药物外排具有一定的临床应用前景。

2 ALDH 的活性和活性氧清除能力增强

ALDH 现已作为 CSCs 的标记物,用来分选肿瘤组织中的 CSCs^[9]。Qiu 等^[10]的研究成果表明,乳腺癌中 ALDH1A3⁺ / CD44⁺ 肿瘤细胞比例与乳腺癌的复发率以及预后呈正相关,并且从肺癌、前列腺癌、乳腺癌、脑癌分离得到 ALDH 高表达的肿瘤细胞在体外实验中表现出干细胞特性,具有较高的克隆形成能力,在非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠体内具有较强的致瘤能力,同时能增加肿瘤的异质性。

ALDH 活性与激活促存活通路密切相关。抑制 ALDH 的活性,可以抑制其下游 mTOR 的表达和激活。此外 ALDH 的活性也与 Notch 信号通路有关,但其作用机制尚未完全阐明。低表达 ALDH 的肺癌细胞中,转化生长因子 β (TGF- β)、血小板衍生因子(PDGF)、整合蛋白、趋化因子等表达水平下调,且均是通过 PI3K/AKT 信号通路调控^[11]。

在肿瘤组织中,ALDH 的表达不仅跟肿瘤发病及预后有关,还与活性氧(reactive oxygen spe-

cies, ROS)的清除能力有关。研究发现,与卵巢癌细胞相比,卵巢癌干细胞中 ALDH1 和抗氧化转录因子 Nrf 2 的表达量均显著增高,且高表达 ALDH1 的卵巢癌干细胞具有更强的 ROS 清除能力,其 ROS 水平明显低于低表达 ALDH1 的卵巢癌细胞^[12]。Diehn 等^[13]报道在表型为 CD44⁺ CD24⁻ 乳腺癌细胞中,与 ROS 清除相关的基因如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶均高表达。利用丁硫氨酸亚砷(BSO)抑制谷氨酸-半胱氨酸连接酶,降低 ROS 水平,可显著降低 CSCs 的自我更新能力。ALDH 在调控细胞的辐射敏感度中也发挥着重要作用。神经胶质瘤中,ALDH1A3 高表达的胶质瘤细胞的放疗耐受能力明显增强。化疗效果不佳的食管癌病人其 ALDH1 呈现出高表达^[14]。一些影响肿瘤细胞新陈代谢的化疗药物如环磷酰胺及其类似物异环磷酰胺、马磷酰胺和解毒的中间产物,可以通过增加 ALDH1A1 和 ALDH3A1 的活性影响肿瘤细胞的新陈代谢能力^[15,16]。

以上证据表明,ALDH 在 CSCs 的生物学特性和肿瘤治疗耐受中有着复杂的作用,未来可以通过抑制 ALDH 的活性,提高肿瘤治疗的有效性。

3 DNA 损伤修复

目前肿瘤的非手术治疗方法主要是放疗和化疗,其作用机制主要是通过引起肿瘤细胞的 DNA 损伤进而诱导肿瘤细胞凋亡。在肺癌、乳腺癌、神经胶质瘤等肿瘤的 CSCs 中都发现其 DNA 损伤修复能力增强^[17,18]。最近研究发现人乳腺癌和小鼠乳腺癌干细胞在接受放射治疗后,RAD51 表达增加,DNA 的双链断裂标志物 H₂AX 的 C 末端丝氨酸 139 位的磷酸产物 γ -H₂AX 的表达量减少,表明 CSCs 中放疗所引起的 DNA 双链断裂明显少于非肿瘤干细胞^[19]。Zhang 等^[20]发现 P53 缺失的小鼠乳腺癌干细胞后代的 DNA 损伤应答基因 Nek1、Brcal、Chk1、Hus1、Ung、Xrcc5、Sfpq、Uhrf1 的表达均升高。Bartucci 等^[17]报道称,由于化疗可以引起非小细胞肺癌干细胞的 DNA 损伤,激活周期检查点激酶 1(Checkpoint kinase point 1, Chk1),诱导其细胞周期阻滞,CSCs 可高效修复化疗引起的 DNA 损伤,Chk1 抑制剂 AZD7762 可以增强非小细胞肺癌干细胞对吉西他滨、顺铂和紫杉醇等化疗药物的敏感性,诱导有丝分裂灾难,最终显著降低 CSCs 的存活能力。Bao 等^[21]研究发现在胶质母细胞瘤中,放疗引起细胞的 DNA 损伤,CD133⁺ 的细

胞的 ATR-Chk1 和 ATM-Chk2 被优先激活,且 CD133⁺ 细胞相对 CD133⁻ 具有更强的 DNA 损伤修复能力。此外,在 CD133⁺ 的胶质母细胞瘤中加入 Chk1 或 Chk2 激酶抑制剂,可以增加 CSCs 对放疗药物敏感性。在表型为 CD133⁺/CD44⁺ 的前列腺癌中降低 Chk1 的表达水平同样可以取消放疗引起的细胞周期阻滞,增加 CSCs 对放疗药物的敏感性。另有研究发现乳腺癌 CD44⁺ CD24⁻ /^{low} 细胞放疗的敏感性增加是由于激活了 ATM/Chk2 信号通路,使用 ATM 抑制剂 KU55933 可以恢复 CD44⁺ CD24⁻ /^{low} 乳腺癌细胞的放疗敏感性^[22]。

目前,DNA 仍然是抗肿瘤药物的热门靶点,但是由于 CSCs 具有较强的 DNA 修复能力导致耐药,因此寻找一些细胞周期检查点抑制剂联合化疗药物阻断 CSCs 的 DNA 损伤修复,引起细胞的凋亡或死亡,对于肿瘤的治疗具有重要意义。

4 促存活通路的激活

在肿瘤的治疗过程中出现治疗耐受或 CSCs 的异常加速增殖,可能与组织平稳和胚胎发育等相关信号通路的激活有关。CSCs 常见促存活通路包括 Wnt/ β -catenin 通路、Notch 通路、Hedgehog 通路。

4.1 Wnt/ β -catenin 信号通路和 Notch 信号通路

Wnt/ β -catenin 信号通路调控着 CSCs 自我更新和分化,该通路的激活在多种肿瘤的发生、发展和耐药过程中发挥着重要的作用。Teng 等^[23]发现 Wnt/ β -catenin 信号通路对肺癌干细胞的“干性”维持起重要的调控作用。Wnt/ β -catenin 信号通路调控着白血病干细胞(Leukemia stem cells, LSCs)的自我更新^[24]。

当非肿瘤干细胞受到外界刺激时,有向 CSCs 转化的潜力。Martins-Neves 等^[25]研究发现在骨肉瘤细胞系和小鼠异种移植模型中,暴露于常规化疗的肿瘤细胞有向 CSCs 转化的趋势,并且 Wnt/ β -catenin 信号通路激活和多能性因子和解毒系统(ABC 转运和 ALDH 活性)上调,最终导致化疗失败。Catalano^[26]发现活化的甲状腺激素通过调控 Wnt 和 BMP4 信号促进结肠直肠癌干细胞的分化,增强其化疗敏感性,因此利用药物诱导 CSCs 分化,抑制 CSCs 的增殖,可减缓肿瘤的进展。Fang 等^[27]发现 Wnt/ β -catenin 抑制剂 LF3(4-硫脲基-苯磺酰胺衍生物)能抑制结直肠癌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号中 Wnt 活性,不论其为细胞外源性或内源性刺激。在小鼠异种移植模型中 LF3 能显著抑制肿瘤生长并且诱导分化(表 1)。

Notch 信号通路在进化过程中高度保守,与细胞的增殖、分化、凋亡、黏附及表皮细胞向间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)密切相关,对大多数组织的正常发育发挥着重要的作用。Wang 等^[28]研究发现 Notch 信号通路的抑制剂 Key(表 1)可增加 CD133⁺ 的胶质母细胞瘤对化疗药物的敏感性。 γ -分泌酶抑制剂(γ -secretase inhibitors, GSI)(表 1)对于治疗 CD133⁺ 的胶质母细胞瘤并没有明显的效果。综上所述,CD133 调控着 CSCs 的生存能力。Liu 等^[29]报道称 GSI 可以增加经阿霉素和紫杉醇处理过的 CD133⁺ 非小细胞肺癌的敏感性。在卵巢癌干细胞中,通过 GSI 或 siRNA 靶向 Notch 通路,可以增加卵巢癌干细胞对铂类药物的敏感性^[30]。另外,在肺癌细胞中激活 Notch 信号通路可以增加肺癌细胞的转移能力,增加其对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂吉非替尼的耐药性。EMT 获得性增加会引发细胞重编程,诱导其生成干细胞样肿瘤细胞群,这类肿瘤细胞具有很高的克隆形成、致瘤和转移性。采用 siRNA 抑制 Notch 信号通路能减少 EMT 表型,维持肺癌细胞对吉非替尼的敏感性^[31]。结肠癌病人中大约有 90% 为 EGFR 突变,可使用 EGFR 抑制剂进行临床治疗,但是仍有约 10% 的结肠癌病人并非 EGFR 突变,而是 KRAS 突变^[32],靶向抑制 Notch 配体 DLL4,可以减少结肠癌干细胞中的 KRAS 突变的比例^[33]。以上研究表明,Notch 信号通路被激活后,降低了 CSCs 对传统非手术疗法的敏感性,导致出现治疗耐受。

Wnt/ β -catenin 和 Notch 在 CSCs 的自我更新和分化中都起着重要的作用。两条通路被激活均能促进 CSCs 增殖而抑制其分化,但各自侧重不同。通过一些靶向抑制剂,抑制该通路的激活,对于临床靶向治疗 CSCs 具有重要意义。

4.2 Hedgehog 信号通路

Hedgehog(Hh)信号通路在胚胎的发育和组织器官的形成等过程中发挥着重要作用,同时也调控着肿瘤的发生和发展。Hedgehog 通路的失调影响着乳腺癌的进展,Norman 等^[34]利用 TCGA 库免疫组化和高通量 RNA 测序分析临床三阴性乳腺癌病人的病理特征,发现 SHH(sonic hedgehog, SHH)高表达的病人与不良预后显著相关。这些证据表明 SHH 可能可作为乳腺癌侵袭能力体现的生物标志物。胃癌出现耐药与胃癌干细胞直接相关。Xu 等^[35]发现高表达 CD44⁺/Musashi-1⁺ 的胃癌干细胞中 SHH 通路和核转录因子(glioma-associated oncogene homolog

1, GL1)基因被激活,并且 ABCG2 的表达量增加。加入 GL1(表 1)的抑制剂 GANT61 和 GDC-0449 可以阻断 SHH-GL1 级联信号通路。目前,临床上治疗实体瘤白血病使用的是 Hedgehog 信号通路抑制剂如 GDC-0449、LDE225、GSI(RO4929097 和 MK-0752)和化疗药物如紫杉醇、卡铂、卡培他滨、长春花碱、吉西他滨和替莫唑胺(NCT01238133、NCT01196416、NCT01158274、NCT01145456、NCT02027376、NCT00636610)联合使用。

表 1 3 种促存活信号通路抑制剂

通路	靶点	抑制剂	适用范围
Wnt /β-catenin		LF3 DKK-1	结直肠癌 脑肿瘤
Notch	γ-分泌酶 DLL4	Key γ-分泌酶抑制剂 DLL4 抗体	胶质母细胞瘤 结肠癌
Hedgehog	Smo Gli1 Gli2	GDC-0449 ,GANT61 epigallocatehin-3-gallate Cyclopamine , Vismodegib , 5E1 , shSMO , derivative-CyT ,IPI-926 , PF-04449913 , Endogenous Hhip , 5E1 , LDE-225	胰腺癌、胃癌、 乳腺癌、非小 细胞肺癌、小 细胞肺癌、慢 性骨髓白血 病、胶质瘤

5 展望

综上所述,CSCs 的发现为研究肿瘤的发生、发展、耐药以及复发等问题提供了一个新的视角。以 CSCs 为靶点,研究肿瘤的治疗耐受,逆转肿瘤耐药,解决肿瘤的复发、转移问题,是提高肿瘤病人生存期的重要途径。目前,针对 CSCs 的治疗已有靶向 ABC 转运蛋白、肿瘤微环境、CSCs 干细胞的表面标志物以及存活通路等方向的抗肿瘤药物,但其作用机制并未详细阐明,因此寻找作用靶点以及作用机制明确的抑制剂,可为肿瘤的临床治疗提供新的治疗手段。

【参考文献】

[1] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J].Cell, 2011, 144 (5): 646-674 .
 [2] Chufan EE, Kapoor K, Ambudkar SV. Drug-protein hydrogen bonds govern the inhibition of the ATP hydrolysis of the multidrug transporter P-glycoprotein [J].Biochem Pharmacol, 2016, (101): 40-53 .
 [3] Guan GF, Zhang DJ, Zheng Y, et al. Significance of ATP-binding cassette transporter proteins in multidrug resistance of head and neck squamous cell carcinoma[J].Oncol Lett, 2015, 10 (2): 631-636 .

[4] Xie ZY, Lv K, Xiong Y, et al. ABCG2-mediated multidrug resistance and tumor-initiating capacity of side population cells from colon cancer[J]. Oncol Res Treat, 2014, 37 (11): 666-672 .
 [5] Stacy AE, Jansson PJ, Richardson DR. Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance [J]. Mol Pharmacol, 2013, 84 (5): 655-669 .
 [6] Schexnayder C, Stratford RE. Genistein and Glyceollin effects on ABCG2 (MRP2) and ABCG2 (BCRP) in Caco-2 Cells[J]. Int J Environ Res Public Health, 2015, 13 (1):17-30 .
 [7] Hu J, Zhang X, Wang F, et al. Effect of ceritinib (LDK378) on enhancement of chemotherapeutic agents in ABCB1 and ABCG2 overexpressing cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncotarget, 2015, 6 (42): 44643-44659 .
 [8] Zhou Q, Ye M, Lu Y, et al. Curcumin improves the tumoricidal effect of mitomycin C by suppressing ABCG2 expression in stem cell-like breast cancer cells[J]. PLoS One, 2015, 10 (8): e0136694 .
 [9] Rodriguez-Torres M, Allan AL. Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors [J]. Clin Exp Metastasis, 2016, 33 (1): 97-113 .
 [10] Qiu Y, Pu TJ, Guo P, et al. ALDH⁺/CD44⁺ cells in breast cancer are associated with worse prognosis and poor clinical outcome[J]. Exp Mol Pathol, 2016, (100): 145-150 .
 [11] Moreb JS, Baker HV, Chang LJ, et al. ALDH isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells[J]. Mol Cancer, 2008, 7 (87). doi: 10.1186/1476-4598-7-87 .
 [12] Mizuno T, Suzuki N, Makino H, et al. Cancer stem-like cells of ovarian clear cell carcinoma are enriched in the ALDH-high population associated with an accelerated scavenging system in reactive oxygen species [J]. Gynecol Oncol, 2015, 137 (2): 299-305 .
 [13] Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells [J]. Nature, 2009, 458 (7239): 780-783 .
 [14] Ajani JA, Wang X, Song S, et al. ALDH-1 expression levels predict response or resistance to preoperative chemoradiation in resectable esophageal cancer patients [J]. Mol Oncol, 2014, 8 (1): 142-149 .
 [15] Mi JQ, Li JM, Shen ZX, et al. How to manage acute promyelocytic leukemia[J]. Leukemia, 2012, 26 (8): 1743-1751 .
 [16] Parajuli B, Fishel ML, Hurley TD. Selective ALDH3A1 inhibition by benzimidazole analogues increase mafosfamide sensitivity in cancer cells[J]. J Med Chem, 2014, 57 (2): 449-461 .
 [17] Bartucci M, Svensson S, Romania P, et al. Therapeutic targeting of Chk1 in NSCLC stem cells during chemotherapy [J]. Cell Death Differ, 2012, 19 (5): 768-778 .
 [18] Chen Y, Li D, Wang D, et al. Quiescence and attenuated DNA damage response promote survival of esophageal cancer stem cells[J]. J Cell Biochem, 2012, 113 (12): 3643-3652 .

