

乳腺癌干细胞靶向治疗研究进展

部 松 魏佳昶 许久航 李 洁 武晓慧 马世荣 张 静 王映梅 李 青 徐玉乔

摘 要 乳腺癌干细胞是指具有干细胞性质的乳腺癌细胞,其对癌细胞的存活、增殖、复发及转移起重要作用。研究表明,乳腺癌干细胞具有自我更新及无限增殖的能力,其活跃的运动和迁徙能力又使癌细胞的侵袭及转移成为可能。随着乳腺癌干细胞理论的进一步发展,针对乳腺癌干细胞治疗已逐渐成为治疗乳腺癌的有效方法之一,并且有望从根本上治愈乳腺癌,本文针对近年来乳腺癌干细胞的靶向治疗及相关的研究进展做一总结。

关键词 乳腺癌 肿瘤干细胞 信号通路 靶向治疗 综述

中图分类号 R730.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.09.002

肿瘤干细胞是指在白血病及实体肿瘤中发现的极少数具有干细胞性质的肿瘤细胞,其对肿瘤的存活、增殖、复发及转移发挥重要作用。肿瘤干细胞通过自我更新和无限增殖维持着肿瘤细胞群的生命力,肿瘤干细胞的运动和迁徙能力又使肿瘤细胞的转移成为可能。此外,肿瘤干细胞可以长期处于休眠状态从而使肿瘤细胞产生耐药性。因此,对肿瘤干细胞的靶向治疗可能有望从根本上治愈肿瘤。

一、针对乳腺癌干细胞自我更新

阐明干细胞自我更新的机制一直是干细胞研究的热点之一。自我更新是乳腺癌干细胞与正常干细胞的共同特征,目前人们对正常干细胞的自我更新机制已有了深刻的认识,但对乳腺癌干细胞的自我更新机制还了解甚少。研究发现在正常干细胞中维持自我更新的通路,如 Notch、Wnt、Hedgehog 等在乳腺癌干细胞中出现突变或异常激活,因此这些通路可成为乳腺癌干细胞的治疗靶点。

1. Notch 信号通路:研究表明,Notch 信号通路在细胞分化、增殖及机体发育过程中发挥着极其重要的作用,其信号传递异常往往会导致肿瘤的发生。IRF6 是一种干扰素调节因子,同时是一个通过 CSL (一种 DNA 结合蛋白)途径诱导细胞变异的 Notch 靶基因,抑制 IRF6 的表达可阻碍 Notch 信号通路从而诱导细胞变异提示 IRF6 是 Notch 信号通路起作用的

重要中介物质^[1]。在乳腺癌上皮细胞中,IRF6 是 Notch 下游细胞增殖和转化的正调节物质,因此特异性阻断 IRF6,可以在一定程度上阻碍乳腺癌干细胞的增殖与转化^[2]。另有研究表明,microRNA-34a 的异位表达亦可以抑制癌细胞增殖、转移和侵袭,也可靶向作用于癌基因,使乳腺癌细胞产生抗药性。通常 microRNA-34a 在乳腺癌干细胞中低表达。体外实验表明过表达 microRNA-34a 可抑制乳腺癌干细胞。Notch1 作为 microRNA-34a 的重要靶点,调节细胞增殖、转移、干性和化疗抵制,因此 microRNA-34a/Notch1 可作为潜在治疗靶标,而且也是紫杉醇 (PTX) 抗化疗的可行靶点^[3]。此外已发现,microRNA9 在乳腺癌细胞中表达降低,相反 Notch1 在转移的乳腺癌细胞中表达上调;研究发现,通过诱导表达 microRNA9 可以抑制肿瘤细胞的转移及诱导凋亡,这些都提示在转移的乳腺癌细胞中 microRNA9 通过作用于 Notch1 而发挥肿瘤抑制作用^[4]。当细胞高表达 Notch1 信号时,上皮细胞 E 型钙黏蛋白和闭锁蛋白的表达水平降低,而间充质细胞 N 型钙黏蛋白和弹性蛋白以及纤维结合素的表达水平上升,从而促使肿瘤细胞发生上皮间质转化 (EMT)^[5]。在乳腺癌细胞中,Notch1 激活可诱导 STAT3 的磷酸化,并且增强 p65 和白介素-1 β 的表达,也降低了 EMT 的标志物 N 型钙黏蛋白的表达,增加了 E 型钙黏蛋白的表达^[6]。

2. Wnt 信号通路: Wnt/ β -catenin 信号通路调节异常发生在人乳腺癌干细胞中,异常的 Wnt/ β -catenin 信号通路可能是乳腺癌重要的临床特征和预后不良的征兆,这些结果暗示乳腺癌干细胞可能对靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路敏感。LGR5 是一种乳腺癌干细胞的标志物,在乳腺癌中过表达 LGR5 与乳

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (31400722, 81170798)

作者单位:710032 西安,第四军医大学基础部病理学教研室、西京医院病理科 (部松、李洁、武晓慧、马世荣、张静、王映梅、李青、徐玉乔);710032 西安,第四军医大学学员旅 (部松、魏佳昶、许久航)

通讯作者:徐玉乔,电子信箱: yuqiaoxu@fmmu.edu.cn

腺癌复发有着密切联系,在乳腺癌细胞中,LGR5 通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肿瘤细胞转移、转移灶的形成以及上皮-间质细胞转化,并且 LGR5 在肿瘤球中高表达而且增加了乳腺癌干细胞的干性^[7,8]。此外,通过使用 microRNA 微点阵技术研究乳腺癌干细胞和非干细胞肿瘤的 microRNA 发现,MiRNA-1 的选择性表达影响着乳腺癌干细胞的增殖和转移,进一步研究表明 microRNA 通过作用于 Frizzled7(一种 Wnt 受体)和 TNKS2(一种多功能端粒结合蛋白)来抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路从而抑制乳腺癌干细胞的增殖和转移^[9]。另有研究表明,PMK2 通过调控 β -catenin 而在癌细胞干性上发挥重要作用,即降低 PKM2 在乳腺癌干细胞的表达可对乳腺癌患者预后产生良好效果^[10]。大量研究指出, PI_3K s 蛋白家族常参与细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调节,并且 PI_3K 活性的增加亦与多种癌症相关。Kim 等^[11]研究发现,纤维样细胞比上皮样细胞具有更高的肿瘤发生和转移的能力,由于纤维样细胞的紧密连接蛋白下调而 β -catenin 蛋白含量上升,且 β -catenin 蛋白含量的升高是经典的 Wnt 通路和 EGFR/mTORC2/AKT 通路的激活所致。

3. Hedgehog 信号通路: Hedgehog 基因是一种分节极性基因,该基因编码一种高度保守的分泌性糖蛋白,在调节胚胎发育中细胞定向分化有着重要作用。Hedgehog 信号通路控制细胞生长与增殖,因此 Hedgehog 信号通路的异常激活与肿瘤发生有着密切联系。中胚层和 EMT 相关转录因子 FOXC1 在基底细胞型乳腺癌中高表达,FOXC1 通过 Hedgehog 信号通路基因控制肿瘤干细胞的干性,并且 FOXC1 的高表达增加了对抗 Hedgehog 的敏感度^[12]。

二、促进乳腺癌干细胞凋亡

肿瘤干细胞被认为是肿瘤生长、药物抗性、转移和复发的起因。因此,降低肿瘤干细胞的自我更新是一种有前景的疗法。因此促进乳腺癌干细胞的凋亡是近年来靶向治疗乳腺癌的热点所在。

Yu 等的研究指出,RelA/P56 蛋白的 Ser536 位点的磷酸化可能有肿瘤抑制的作用,在结肠黏膜中,RelA/P56 蛋白的 Ser536 位点的磷酸化通常伴有上皮细胞的成熟与凋亡,但此现象在肿瘤细胞中明显降低。此外,在结肠癌、乳腺癌及前列腺癌中,RelA/P56 乳腺癌干细胞中 survivin 的过表达与异常的凋亡抑制有关,因此导致了大量癌细胞的增殖。另有研究显示

在 SP 细胞中,survivin 的过表达可以减少肿瘤细胞的凋亡和增加肿瘤多重抗药性,抗癌药灵菌红素可显著下调 survivin 的表达,使得 SP 细胞变得对多种化疗药物敏感度增加,进而促进肿瘤干细胞的凋亡^[13]。其次,氯柳硝胺亦被认为是治疗乳腺癌的有效药物之一,因为它对乳腺癌干细胞有细胞毒作用,研究表明氯柳硝胺通过对自体吞噬的抑制增强细胞毒性,从而诱导肿瘤干细胞凋亡^[14]。

新近的研究表明,黑素瘤缺乏因子-2(AIM2)可以显著促进乳腺癌细胞的凋亡,AIM2 高表达可以抑制抗凋亡蛋白 Bcl-xl 的表达,增加凋亡蛋白 bad 和 bax 的表达,而且可以活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶这些都导致了 DNA 修复蛋白 PARP 的裂解^[15]。

此外,P2X7R 在乳腺癌中高表达与正常乳腺组织相比,而且通过 PCR,Western 印迹以及免疫组化方法分析得到其与雌激素受体有联系,Western blot 法检测结果显示 P2X7 蛋白在被对照 shRNA 感染的 MCF-7 细胞中高表达,而在 P2X7R-shRNA 感染的细胞中低表达,由此可见,P2X7R 在乳腺癌中是过表达的,但是促进了细胞的凋亡和减少了细胞增殖^[16]。以上结果均暗示了 P2X7R 可以作为乳腺癌治疗和预防的潜在靶点。

近年来,还有一些新的靶点在不断涌现。比如 NAF-1 是一种最新发现的局限于线粒体外膜和内质网的铁硫蛋白,NAF-1 的 shRNA 抑制导致了乳腺癌上皮细胞的凋亡,同时有研究发现,NAF-1 在乳腺癌细胞的代谢调节中起着重要作用通过影响铁的分布,线粒体代谢和诱导凋亡^[17]。另外,BER 通过调节多种信号通路诱导凋亡,包括 p38、MAPK 和 JNK 通路的激活和 JAK2、p85、 PI_3K 、AKT 以及 NF- κ B 等信号通路的失活。因此可推断 BER 可能是有效而且安全的治疗侵袭性乳腺癌的药物靶点^[18]。现已证实,5-氮-2'-脱氧胞苷对于肿瘤的分化有影响:低浓度 5-氮-2'-脱氧胞苷可通过激活肿瘤抑制基因促进肿瘤干细胞分化,从而达到抗肿瘤的目的^[19]。

三、靶向乳腺癌干细胞所需的微环境

与正常干细胞一样或普通细胞一样,乳腺癌干细胞的存活也需要特定的微环境。微环境在乳腺癌干细胞的自我更新、多向分化和持续存活以及乳腺癌的转移过程中都发挥着重要作用。对乳腺癌干细胞与微环境的关系的深入研究,将有可能为乳腺癌的治疗提供新的思路和方法。

BMP9 是最有效的成骨性因子,与癌症转移相关

基因的表达被监测到能识别调节 BMP9 的因子,研究显示 BMP9 能抑制肿瘤的侵袭而且能促进 MAD - MB - 231 细胞的凋亡。IL - 6、MMP - 2、MCP - 1 在 BMP - 9 过表达的 MAD - MB - 231 细胞中表达降低,同时 EMT 相关分子也降低^[20]。因此,BMP - 9 可以抑制乳腺癌细胞的侵袭促进其凋亡通过 SDF - 1/CXCR4 - PI₃K 信号通路调节 MAD - MB - 231 细胞和 HS - 5 细胞的相互影响^[21]。此外,已有研究证实 ncRNA 是癌细胞和微环境之间重要的中介物质^[22]。

Palbociclib 是最近研究的药物,可以通过阻断细胞周期诱导骨髓抑制,与紫杉醇和多柔比星等抗癌药相比,它不会导致 DNA 损害和细胞凋亡。Palbociclib 可以使乳腺癌干细胞迅速衰老,而且与抗雌激素有叠加作用^[23]。而且已有证据表明,双胍类药物有有效地抗肿瘤作用,在这些药物中,苯乙双胍有可能比二甲双胍更有抗肿瘤活性。苯乙双胍通过 AMPK/mTOR/p70s6k 和 MAPK/ERK 信号通路诱导细胞周期改变和细胞凋亡,同时也可诱导间质上皮转化,降低乳腺癌的转移率^[24]。

KLF - 4 是乳腺癌细胞富含的一种多功能因子,KLF - 4 可以通过 Ras 信号通路的激活及下游效应器分子 miR - 206 的作用促进肿瘤发生和细胞存活。这两类调节 miR - 206 的转录因子任何一种的枯竭都可促进肿瘤细胞的凋亡,因此可以发现一种新的因子靶向作用于肿瘤微环境对抗 KLF4 - miR - 206 的作用^[25]。

肿瘤发生因子与肿瘤微环境有相关干扰关系,SLUG 和 SOX9 转录因子在诱导和维持肿瘤发生的能力有很大的作用,黏蛋白 C 和骨膜蛋白在转移的微环境中有很重要的作用。SLUG 和 SOX9 的高表达诱导了黏蛋白 C 和骨膜蛋白的表达,从而使肿瘤细胞侵袭转移能力更强。

BMP2 和 BMP4 是干细胞和微环境的重要调节因子,发育未完全的人类乳腺上皮细胞长期暴露于高水平的 BMP2 环境中,会向肿瘤样表型转化,由受体 BMPRII 调节。在生理条件下,BMP2 控制早期腺管细胞的维持和分化,而 BMP4 在干细胞和早期肌上皮细胞中存在。BMP2 和乳腺微环境在启动干细胞转化有重要作用,从而提出了腺管乳腺癌的病因学方面的新看法。

黏蛋白 - W 是一种在成长和疾病状态下表达模式变化着的基质细胞蛋白。在骨髓间质细胞,TGF - β 1 通过激活 TGF - β 1 受体 ALK5 诱导黏蛋白 - W

的表达,黏蛋白 - W 通过支持肿瘤细胞的转移和繁殖,从而促使乳腺癌细胞转移到骨。

研究发现内皮细胞在支持乳腺癌细胞生长和非依赖血道转移方面可能有作用。通过体内和体外实验证实,内皮细胞通过提供 Notch 信号依赖的肿瘤微环境以增强乳腺癌细胞的生存能力、多能性和早期转移的潜能。肿瘤刺激产生的在内皮细胞中间充质适应现象强化了间充质/内皮微环境的构造,该微环境可以增加肿瘤的增殖力、多能性和侵袭力。在间充质表型产生中,Notch 和 TGF - β 通路的介入可能提出新的间充质细胞的靶点。此外,已发现单核 - 吞噬细胞的旁分泌作用对肿瘤干细胞微环境有支持作用。

四、临床上应用于治疗乳腺癌的药物

皮格列酮,作为治疗糖尿病药物,维持 MAPK 活性而发挥抗肿瘤的作用,是过氧化物酶体增生物激活受体 - γ (PPAR - γ) 非依赖通路。研究表明,皮格列酮可抑制 MCF7 细胞的增殖,相关机制可能是通过 PPAR - γ 非依赖性机制如 p21 的诱导以及 MAPK 的活化等途径实现的。这些发现显示出皮格列酮在治疗 PPAR 阳性或阴性的癌症和发展一类能强化皮格列酮效果的化合物方面有功效。

盐霉素可克服乳腺癌细胞的化学抵抗力,经试验,连续应用盐霉素后,乳腺癌细胞多向耐药基因 MDR1 和 BCRP1 表达下调。因此,盐霉素可减少乳腺癌细胞药物抗性。此外发现多种抗生素也有一定的抗肿瘤能力,例如强力霉素等。

PI₃K 抑制剂 BKM120 可通过阻滞 PI₃K/AKT 和 NF - κ B 通路,反过来又诱导半胱天冬酶 - 3/7 和半胱天冬酶 - 9 的活化,并调节若干凋亡相关基因的表达,达到抗肿瘤及减少耐药细胞的形成。此外,BKM120 和阿霉素联用可表现出强大的抗增殖作用,这给临床上乳腺癌的用药提供了新的方法。

IL - 8/CXCR1 是乳腺癌发生、发展过程中重要的通路,IL - 8 高表达的乳腺癌患者预后较差,repair-xin 是一种有效 CXCR1 抑制剂,它和多西他奇的联合用药可有效减少肿瘤细胞的数量。

二甲双胍可通过肝内 AMPK 通路激活降低糖质新生,限制能量产生,从而抑制肿瘤基因,达到抗肿瘤作用。同时研究指出,二甲双胍可抑制 CD133 (+) 细胞的增殖和 p70s6k 的信号活化作用以及 ERK 的磷酸化作用,使其具有潜在的临床价值。

综上所述,乳腺癌干细胞可能是乳腺癌发生、发展的普遍规律,虽然目前对乳腺癌干细胞的靶向治疗

已取得了一定的研究进展,但还是要对肿瘤的生物学特性做进一步的了解。而且乳腺癌干细胞理论的成熟对抗肿瘤药的研发也提供了新的思路。相信随着乳腺癌干细胞理论的进一步成熟,在不久的将来一定会出现乳腺癌靶向药物研究与乳腺癌治疗方式的变革。

参考文献

- Zengin T, Ekinici B, Kucukkose C, Yalcin - Ozuyul O. IRF6 is involved in the regulation of cell proliferation and transformation in MCF10A cells downstream of Notch signaling[J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0132757
- Ke CY, Xiao WL, Chen CM, *et al.* IRF6 is the mediator of TGFbeta3 during regulation of the epithelial mesenchymal transition and palatal fusion[J]. Sci Rep, 2015, 5:12791
- Kang L, Mao J, Tao Y, *et al.* MicroRNA - 34a suppresses the breast cancer stem cell - like characteristics by downregulating Notch1 pathway[J]. Cancer Sci, 2015, 106(6):700 - 708
- Jo MH, Ali BA, Al - Khedhairi AA, *et al.* A reverse complementary multimodal imaging system to visualize microRNA9 - involved neurogenesis using peptide targeting transferrin receptor - conjugated magnetic fluorescence nanoparticles[J]. Biomaterials, 2012, 33(27):6456 - 6467
- Liu S, Sun J, Cai B, *et al.* NANOG regulates epithelial - mesenchymal transition and chemoresistance through activation of the STAT3 pathway in epithelial ovarian cancer[J]. Tumour Biol, 2016, Epub ahead of print
- Zhang X, Zhao X, Shao S, *et al.* Notch1 induces epithelial - mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype in breast cancer cells and STAT3 plays a key role[J]. Int J Oncol, 2015, 46(3):1141 - 1148
- Jiang Y, Li W, He X, *et al.* Lgr5 expression is a valuable prognostic factor for colorectal cancer: evidence from a meta - analysis[J]. BMC cancer, 2016, 16(1):12
- Yang L, Tang H, Kong Y, *et al.* LGR5 promotes breast cancer progression and maintains stem - Like cells through activation of Wnt/beta - Catenin signaling[J]. Stem Cells, 2015, 33(10):2913 - 2924
- Liu T, Hu K, Zhao Z, *et al.* MicroRNA - 1 down - regulates proliferation and migration of breast cancer stem cells by inhibiting the Wnt/beta - catenin pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(39):41638 - 41649
- Zhao Z, Song Z, Liao Z, *et al.* PKM2 promotes stemness of breast cancer cell by through Wnt/beta - catenin pathway[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3):4223 - 4234
- Kim S, Chun SY, Kwon YS, Nam KS. Crosstalk between Wnt signaling and Phorbol ester - mediated PKC signaling in MCF - 7 human breast cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 77:114 - 119
- Han B, Qu Y, Jin Y, *et al.* FOXC1 activates smoothened - independent Hedgehog signaling in basal - like breast cancer[J]. Cell Rep, 2015, 13(5):1046 - 1058
- Bu Y, Li X, He Y, *et al.* A phosphomimetic mutant of RelA/p65 at Ser536 induces apoptosis and senescence: An implication for tumor - suppressive role of Ser536 phosphorylation[J]. Int J Cancer, 2015, 138(5):1186 - 1198
- Karakas D, Cevatemre B, Aztopal N, *et al.* Addition of niclosamide to palladium (II) saccharinate complex of terpyridine results in enhanced cytotoxic activity inducing apoptosis on cancer stem cells of breast cancer[J]. Bioorg Med Chem, 2015, 23(17):5580 - 5586
- Liu ZY, Yi J, Liu FE. The molecular mechanism of breast cancer cell apoptosis induction by absent in melanoma (AIM2)[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9):14750 - 14758
- Tan C, Han LI, Zou L, *et al.* Expression of P2X7R in breast cancer tissue and the induction of apoptosis by the gene - specific shRNA in MCF - 7 cells[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(4):1472 - 1478
- Holt SH, Darash - Yahana M, Sohn YS, *et al.* Activation of apoptosis in NAF - 1 - deficient human epithelial breast cancer cells[J]. J Cell Sci, 2015, 129(1):155 - 165
- Li X, Zhao SJ, Shi HL, *et al.* Berberine hydrochloride IL - 8 dependently inhibits invasion and IL - 8 - independently promotes cell apoptosis in MDA - MB - 231 cells[J]. Oncol Rep, 2014, 32(6):2777 - 2788
- Phan NL, Trinh NV, Pham PV. Low concentrations of 5 - aza - 2' - deoxycytidine induce breast cancer stem cell differentiation by triggering tumor suppressor gene expression[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9:49 - 59
- Wan S, Liu Y, Weng Y, *et al.* BMP9 regulates cross - talk between breast cancer cells and bone marrow - derived mesenchymal stem cells[J]. Cell Oncol Dordrecht, 2014, 37(5):363 - 375
- Wang W, Weng Y, Ren W, *et al.* Biological roles of human bone morphogenetic protein 9 in the bone microenvironment of human breast cancer MDA - MB - 231 cells[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(9):1660 - 1674
- Patel JS, Hu M, Sinha G, *et al.* Non - coding RNA as mediators in microenvironment - breast cancer cell communication[J]. Cancer Lett, 2016, 380(1):289 - 295
- Hu W, Sung T, Jessen B, *et al.* Mechanistic investigation of bone marrow suppression associated with palbociclib and its differentiation from cytotoxic chemotherapies[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(8):2000 - 2008
- Liu Z, Ren L, Liu C, *et al.* Phenformin induces cell cycle change, apoptosis, and mesenchymal - epithelial transition and regulates the AMPK/mTOR/p70s6k and MAPK/ERK pathways in breast cancer Cells[J]. PLoS One, 2015, 10(6):e0131207
- Lin CC, Sharma SB, Farrugia MK, *et al.* Kruppel - like factor 4 signals through microRNA - 206 to promote tumor initiation and cell survival[J]. Oncogenesis, 2015, 4:e155

(收稿日期:2016 - 02 - 22)

(修回日期:2016 - 03 - 15)