

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00953

多发性骨髓瘤肿瘤干细胞的研究进展

杨晓群,葛慧娟,余宏宇*

第二军医大学长征医院病理科,上海 200003

[摘要] 肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSC)是存在于肿瘤组织中的一小群具有干细胞性质的瘤细胞,具有高度自我更新和不定向分化的潜能,是形成不同分化程度肿瘤细胞和肿瘤不断扩展的源泉。多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)肿瘤干细胞的发现以及对其与侧群(side population,SP)细胞的关系和龛(niche)等的相关研究为MM的发病机制提供了新的解释。

[关键词] 多发性骨髓瘤;肿瘤干细胞;记忆B淋巴细胞;侧群细胞;龛

[中图分类号] R 733.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0953-03

Cancer stem cells of multiple myeloma: recent progress

YANG Xiao-qun, GE Hui-juan, YU Hong-yu*

Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] Cancer stem cells (CSCs) are a small proportion of tumor cells with the property of stem cells in the tumor tissue; they are capable of self-renewal, multi-lineage differentiation and serve as the source of tumor cells and tumor tissues. The discovery of multiple myeloma CSCs and the study on its relationship with side population cells and niche provide a new interpretation on the pathogenesis of multiple myeloma.

[KEY WORDS] multiple myeloma; neoplastic stem cells; memory B-lymphocytes; side population; niche

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8): 953-955]

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是分泌 Ig 的浆细胞在骨髓内恶性增殖,损害正常造血组织及破坏骨组织,并引起一系列伴随症状的恶性肿瘤。其治疗措施主要是联合化疗和造血干细胞移植,但由于其复发率较高,仍属于不能治愈的疾病,严重威胁中老年人生命健康。如能找到其发病机制,无疑对临床治疗产生重大的影响。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)理论^[1-2]认为肿瘤组织中存在一小群具有干细胞性质、具有高度自我更新能力和不定向分化潜能的肿瘤细胞,能驱动肿瘤的形成和生长,可能是肿瘤产生、转移和复发的根源。

1 肿瘤干细胞

1.1 肿瘤干细胞的研究史及成果 早在1958年, Hewitt^[3]在研究白血病时发现移植细胞仅有0.1%~1%能够在体外形成克隆。20世纪90年代, Trott^[4]指出肿瘤是由比例不到1%的肿瘤干细胞分裂增殖、产生具有自身表型的子细胞及分化细胞构成的,并得出结论:只有部分肿瘤细胞(而不是全部肿瘤细胞)具有致瘤性。1994年, Lapidot等^[5]首次鉴定和分离出了人急性粒细胞白血病干细胞,证明了肿瘤干细胞的客观存在。2003年, Al-Hajj等^[6]从人乳腺组织中分离出预期的乳腺癌起始细胞(breast cancer-initiating cell, BrCa-IC),

第一次在实体瘤内分离出肿瘤干细胞。近几年来研究者已从更多组织类型的肿瘤如黑素瘤^[7]、结肠癌^[8]、胰腺癌^[9-10]、肺癌^[11-12]、头颈部鳞癌^[13]等中成功分离和鉴定了特异的肿瘤干细胞。目前,在MM中也成功地分离鉴定出肿瘤干细胞^[14-16]。以上研究充分证实了肿瘤干细胞的存在,为研究肿瘤的发生、发展机制奠定了坚实的基础。

1.2 肿瘤干细胞的特点和起源 肿瘤干细胞从功能的角度定义为具有无限自我更新能力、能够在免疫缺陷型小鼠体内形成与原发肿瘤类型相同的肿瘤的一类肿瘤细胞^[17]。这也是目前鉴定肿瘤干细胞的金标准。肿瘤干细胞的特点:(1)具有自我更新、无限增殖能力和不定向分化潜能;(2)对放疗以及化疗不敏感(这可能是肿瘤转移、复发的根源)。但目前对肿瘤干细胞与正常的组织特异性干细胞和不具备干细胞特性的肿瘤细胞之间的区别仍不清楚。一般认为肿瘤干细胞可能有多种细胞起源^[18]:(1)由正常干细胞(组织特异性干细胞和骨髓间充质干细胞)突变成;(2)一些已经开始分化的原始细胞或成熟细胞去分化变为幼稚细胞并具有分裂能力;(3)起源于异常的融合细胞;(4)起源于发生水平基因转移的异常细胞。胡以平^[19]认为肿瘤干细胞来源于其先前正常组织器官中的组织特异性干细胞的可能性较大,但也不排除由成熟细胞和过渡细胞转化而来或其他因素所致。

[收稿日期] 2008-12-02 **[接受日期]** 2009-05-25

[作者简介] 杨晓群,硕士生. E-mail: yangxiaqun963@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81886122, E-mail: yuhongyu795@hotmail.com

2 MM 肿瘤干细胞

早在1977年,Hamburger等^[20]就发现仅有1/5 000~1/1 000的MM肿瘤细胞能在体外形成克隆,提示MM肿瘤细胞具有异质性。近年来 Matsui等^[15-17]对MM肿瘤干细胞的研究使其变得逐渐清晰。

目前认为CD138(syndecan-1)是浆细胞最特异的指标,也是临床上MM最特异的病理诊断指标之一,其表达仅限于末期分化成熟的浆细胞。Matsui等^[21]发现人MM细胞株中有一小群细胞亚群(<5%)缺乏CD138的表达,与CD138⁺细胞相比在体外培养时有较高的克隆形成能力;将其移植入非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠体内能够形成MM,并且体外能够连续传代,而其他亚群骨髓瘤细胞不具备这些功能。这就提示MM肿瘤干细胞可能是CD138⁻细胞,且是分化较幼稚的细胞,这些细胞不但可以自我更新,还可以分化成CD138⁺的恶性浆细胞。另外,他们体外比较了CD138⁻和CD138⁺细胞对4种药物(地塞米松,lenalidomide,硼替佐米和4-hydroxycyclophosphamide)的敏感性,发现这几种药物均可以抑制CD138⁺的恶性浆细胞生长,但对CD138⁻的浆细胞无此作用^[15]。后来的实验中他们发现CD138⁻细胞表达记忆B细胞标志CD27和B细胞标志CD20的细胞具有体外致瘤性,在NOD/SCID小鼠体内进行初次和二次移植后均能引起与原发肿瘤类型相同的MM的发生。以上研究充分证明记忆B细胞在MM中扮演了肿瘤干细胞的角色。

2.1 MM 肿瘤干细胞与侧群细胞 侧群(side population, SP)细胞也称边群细胞,是指能够将进入细胞核的活性染料Hoechst33342排出胞外的一类细胞,首先由Goodell等^[22]在研究造血干细胞的体内增殖时发现;且SP细胞排出染料的能力与其细胞膜上的多药耐药基因-MXR/BCRP/ABCG2有关。SP细胞与干细胞有很多相似点。如,SP细胞进行着类似于干细胞的不对称分裂^[23];在细胞的表面分子标记、信号转导通路以及耐药性产生机制方面,与组织干细胞也大多具有一致性;像肿瘤干细胞一样在肿瘤细胞中所占的比例都很小。最新的研究发现肿瘤干细胞具有“SP表型”,可能是一种SP细胞。Daniel等^[24]在4种骨髓瘤细胞株中分离出了不同比例的SP细胞。Matsui等^[15]也发现CD138⁻细胞具有排出活性染料Hoechst33342能力且具有干细胞的特性。以上表明SP是一类干细胞样细胞。鉴于已在多种肿瘤中证实SP细胞的存在^[15,23,25-26],我们可将其作为研究肿瘤干细胞的重要资源。但是也有不少研究结果显示SP表型与肿瘤干细胞的不一致性,如Lichtenauer等^[27]通过对肾上腺皮质肿瘤细胞系NCI-h295R的研究证实SP细胞不具有癌干细胞特性;Burkert等^[28]也进一步指出SP表型作为常用的干细胞标志可能并不适用于胃肠道癌细胞;有研究者则更明确提出SP细胞只是富含干细胞,其中有部分细胞并非干细胞,也并非所有肿瘤干细胞都具有SP表型;近年在对甲状腺癌细胞系C57BL/6中SP细胞的研究也证明了这一点^[29]。这表明目前还不能确定肿瘤组织中分离出的SP细胞与肿瘤干细胞之间的确切关系,虽然它们有着一定程度的功能的重叠,

但可利用SP细胞亚群的分析方法对肿瘤干细胞进行初步筛选。Matsui等^[15]的研究正是利用此方法初步验证了MM中CD138⁻细胞具有干细胞的特性。

2.2 MM 肿瘤干细胞与龕 干细胞的龕(niche)是支持干细胞的特殊的微环境,包括壁龕细胞、细胞外基质和来源于壁龕细胞的可溶性因子。其作用是滋养干细胞并保持干细胞的稳定态(homeostasis)。最早是由Schofield^[30]在1978年提出,用于描述干细胞生长的特定生理环境。国内大多译为“龕”或“壁龕”,也有人提出“生态位”,即不仅是解剖位置,而是具有功能和结构两方面的含义^[31]。

骨髓微环境作为一个具有多重功能的复杂的网络结构,由基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)及其他复杂的细胞外基质如网状组织、血管、神经等组成。研究表明MM细胞的生长、存活及耐药的产生与骨髓微环境密切相关。骨髓微环境中的各种细胞因子和间充质干细胞支持MM细胞的生长并阻止其凋亡,如白细胞介素-6(IL-6)、血管内皮生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)等。有研究^[32]发现在骨髓干细胞移植等实验移植的干细胞可以在宿主信号分子作用下,发生一个类似于“归巢”的反应,回到特定龕状微环境中,归巢后的干细胞保持着自我更新等干细胞特性。如果龕状微环境出现空位,甚至能够招募其他类型的细胞寄居其中,并赋予其部分干细胞特性。当壁龕的这种调控失去正常控制后,干细胞就会出现失控的增殖,导致肿瘤的发生。因此,在用NOD/SCID小鼠建立人MM的动物模型时,Yaccoby等^[33]建立了一种SCID-hu model,克服了之前的动物模型缺乏人体细胞微环境的缺点。

2.3 MM 肿瘤干细胞的分选和鉴定

2.3.1 MM 肿瘤干细胞的分选 肿瘤干细胞的分选是其研究过程中的一大难题。目前MM肿瘤干细胞采用的分选技术分为流式细胞术和磁式分选技术两类。具体分选可采用以下几种方法:(1)利用细胞表面的蛋白标记物及特异抗体进行分选,如CD138、CD19、CD27、CD20等。Matsui等^[15]先利用抗CD138和CD34的磁珠剔除出CD138⁺CD34⁺的细胞,再在分离出的CD138⁻CD34⁻的细胞中分选出CD19⁺CD27⁺CD20⁺的细胞。(2)利用SP细胞亚群的分选进行初步的筛选。SP细胞在肿瘤总细胞中占的比例极小,并表达不同种类的ATP结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白,如MDR1和BCRP,导致其有强大的排出药物的能力,从而产生对化疗药物的天然抵抗。Daniel等^[24]在2006年就利用此方法初步分离MM肿瘤干细胞。此外,由于SP细胞中干细胞十分丰富且其致瘤性很强,在肿瘤的发生发展中具有重要的作用。因此,可以利用SP细胞亚群的分析方法对MM肿瘤干细胞进行初步的筛选。

2.3.2 MM 肿瘤干细胞的鉴定 目前,如同其他肿瘤一样,MM肿瘤干细胞的鉴定难以从形态学角度进行,只能从功能学方面进行分析。其鉴定方法一般包括以下两个方面。(1)利用其生物学特性在体外培养进行初步的鉴定;观察和测定体外培养的MM肿瘤干细胞是否呈悬浮球状生长、是否具自我更新和增殖能力、是否具多向分化潜能。Matsui等^[21]

利用此方法发现 CD138⁻ 的 MM 细胞体外培养时有较高的克隆源性,不但可以自我分化,还可以分化成 CD138⁺ 的恶性浆细胞。(2)测定体内克隆形成能力。Matsui 等^[15] 将初步鉴定出的肿瘤干细胞(CD27⁺ 细胞)移植入 NOD/SCID 小鼠体内能够形成与原发肿瘤类型相同的多发性骨髓瘤,并且体外能够连续传代,而其他亚群骨髓瘤细胞不具备致瘤性。此种方法被认为是现在进行肿瘤干细胞鉴定的金标准。

3 小结及展望

MM 肿瘤干细胞的发现是 MM 研究领域的一大进展,为 MM 的耐药性和复发提出了新的解释,并为研究其临床治疗提供了新的思路——从传统的以杀死大部分肿瘤细胞为主的治疗策略向重点针对肿瘤干细胞以从根本上彻底治愈肿瘤的策略转变。我们可以利用其肿瘤干细胞表面特异标志物让其抗体携带细胞毒药物从而有针对性地杀伤肿瘤干细胞。可以寻找出 MM 肿瘤干细胞与正常的组织特异性干细胞和普通肿瘤细胞之间在基因序列上的差异,以利用基因治疗的手段来治愈 MM。也可以通过对 MM 肿瘤干细胞表面特异标记物的检测和识别进行早期诊断。总之,MM 肿瘤干细胞的发现为研究 MM 的发病机制和治疗奠定了基础,但对于 MM 肿瘤干细胞的研究尚处于探索阶段,还有很多问题有待解决,例如分离培养 MM 肿瘤干细胞的技术体系、MM 肿瘤干细胞的来源及其与骨髓微环境的关系等。

[参考文献]

- [1] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, Weissman I L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414: 105-111.
- [2] Pardoll R, Clarke M F, Morrison S J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 895-902.
- [3] Hawitt H B. Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukemia of CBA mice[J]. *Br J Cancer*, 1958, 12: 378-401.
- [4] Trott K R. Tumor stem cells: the biological concept and its application in cancer treatment[J]. *Radiother Oncol*, 1994, 30: 1-5.
- [5] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice[J]. *Nature*, 1994, 367: 645-648.
- [6] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, Morrison S J, Clarke M F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3983-3988.
- [7] Zabierowski S E, Herlyn M. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 2890-2894.
- [8] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells[J]. *Nature*, 2007, 445: 111-115.
- [9] Olempska M, Eisenach P A, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F, Kalthoff H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6: 92-97.
- [10] Lee C J, Dosch J, Simeone D M. Pancreatic cancer stem cells[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 2806-2812.
- [11] Ho M M, Ng A V, Lams S, Hung J Y. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem like cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 4827-4833.
- [12] Peacock C D, Watkins D N. Cancer stem cells and the ontogeny of lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 2883-2889.
- [13] Prince M E P, Ailles L E. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 2871-2875.
- [14] Matsui W, Wang Q J, Barber J P, Brennan S, Smith B D, Borrello I, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 190-197.
- [15] Huff C A, Matsui W. Multiple myeloma cancer stem cells[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 2895-2900.
- [16] Ghosh N, Matsui W. Cancer stem cells in multiple myeloma[J]. *Cancer Lett*, 2009, 77: 1-7.
- [17] Al-Hajj M, Clarke M F. Self-renewal and solid tumor stem cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 7274-7282.
- [18] Bjerkvig R, Tysnes B B, Aboody K S, Najbauer J, Terzis A J A. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights[J]. *Nature Rev*, 2005, 5: 899-904.
- [19] 胡以平. 关于肿瘤干细胞问题的一些思考[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15: 201-204.
- [20] Hamburger A W, Salmon S E. Primary bioassay of human tumor stem cells[J]. *Science*, 1977, 197: 461-463.
- [21] Matsui W, Huff C A, Wang Q, Malehorn M T, Barber J, Tanheco Y, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells[J]. *Blood*, 2004, 103: 2332-2336.
- [22] Goodell M A, Brose K, Paradis G, Conner A S, Mulligan R C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*[J]. *J Exp Med*, 1996, 183: 1797-1806.
- [23] Hirschmann-Jax C, Foster A E, Wulf G G, Nuchtern J G, Jax T W, Gobel U, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 14228-14233.
- [24] Daniel S, Yen S L, Sulim M, Warren K, Ross D B, Phoebe J H, et al. Identification and characterization of cancer stem cells in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2006, 108: 512-513.
- [25] Nishii T, Yashiro M, Shinto O, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K. Cancer stem cell-like SP cells have a high adhesion ability to the peritoneum in gastric carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100: 1397-1402.
- [26] Han J S, Crowe D L. Tumor initiating cancer stem cells from human breast cancer cell lines[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34: 1449-1453.
- [27] Lichtenauer U D, Shapiro I, Geiger K, Quinkler M, Fasnacht M, Nitschke R, et al. Side population does not define stem cell-like cancer cells in the adrenocortical carcinoma cell line NCI h295R[J]. *Endocrinology*, 2008, 149: 1314-1322.
- [28] Burkert J, Otto W R, Wright N A. Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells[J]. *J Pathol*, 2008, 214: 564-573.
- [29] Hoshi N, Kusakabe T, Taylor B J, Kimura S. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics[J]. *Endocrinology*, 2007, 148: 4251-4258.
- [30] Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell[J]. *Blood Cells*, 1978, 4(1-2): 7-25.
- [31] Scadden D T. The stem-cell niche as an entity of action[J]. *Nature*, 2006, 441: 1075-1079.
- [32] Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche[J]. *Cell*, 2004, 116: 769-778.
- [33] Yaccoby S, Barlogie B, Epstein J. Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations[J]. *Blood*, 1998, 92: 2908-2913.