

· 综 述 ·

膀胱癌干细胞研究进展*

宁志丰¹综述,刘复兴²审校

(湖北科技学院基础医学院:1. 解剖学教研室;2. 病理学教研室,湖北咸宁 437100)

关键词:膀胱肿瘤;癌干细胞;靶向治疗;CD44

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.039

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)28-2990-03

癌干细胞(CSCs)是一小群能够再现肿瘤全部特点的细胞。CSCs的概念早在20世纪60年代就已提出,最近10年研究人员对其进行了分离。首先,是在急性髓性白血病^[1],接着在实体肿瘤(如乳腺癌^[2],脑肿瘤^[3])进行分离。CSCs对放疗^[4]和化疗^[5]表现出抵抗性。因此,膀胱CSCs的分离、分子特征、治疗靶点的确定对理解其病理发生很有意义。

1 膀胱癌异质性

20世纪70年代以来,人们已经发现膀胱癌肿瘤组织存在异质性。这种异质性体现在增殖、锚着依赖性生长、对治疗的反应等方面。早期利用软琼脂或甲基纤维素测定显示只有一小群膀胱癌细胞(0.0004%~1.7000%)能够在体外形成克隆。Mackillop等^[6]发现能够在软琼脂中形成较大克隆的膀胱癌细胞都是高密度的小圆细胞,具有中等密度的膀胱癌细胞能够分裂数次,但不能形成大的克隆。使用可视密度法、凝集素结合实验、流式细胞仪清楚地证实正常的尿路上皮中存在3种形态截然不同的细胞。包括基底层的小圆细胞、中间层的锥形细胞和浅层的巨细胞。进一步的研究试图生产针对膀胱尿路上皮不同层的单克隆抗体,利用这些抗体确定不同组织亚型的膀胱移行细胞癌。Lipponen等^[7]证实结合到正常尿路上皮基底层的单克隆抗体(MoAb21.48)可以用来确诊乳头状移行细胞癌,在低分化肿瘤中显示出广泛的染色,结合到正常尿路上皮浅层的单克隆抗体(MoAb5.48)能使分化良好的移行细胞癌着色,而不能使分化差的移行细胞癌着色。在当时人们还不知道细胞角蛋白和细胞表面标志可以用来确定正常尿路上皮的分化状况,但是,这些早期的数据清楚地表明这些基底细胞样膀胱肿瘤细胞亚群有独特的特点,包括锚着非依赖性生长和与低分化膀胱癌的相关性。

2 膀胱CSCs的分离

目前,鉴定CSCs最好的方法就是利用来自患者的原代肿瘤细胞或早期传代细胞,检测它们在免疫缺陷小鼠身上是否更容易形成肿瘤,是否能够重现母系肿瘤的表现型异质性。这种方法必须确保肿瘤细胞经过长时间的传代后仍然保留原来的性状。Keith等^[8]使用与正常膀胱基底细胞(Lineage⁻CD44⁺CK5⁺CK20⁻)表型相同的细胞表面标志从原代膀胱癌细胞中成功分离出膀胱癌启动细胞(bladder cancer-initiating cell), $10^2\sim 10^3$ 个CD44⁺肿瘤细胞能够在RAG2⁻/ γ c⁻小鼠形成异种移植瘤,而至少 $(2.0\sim 5.0)\times 10^4$ 个CD44⁻肿瘤细胞才能形成肿瘤。另外,Yang等^[9]指出在膀胱癌标本中CD44v6⁺EMA MUC细胞是CSCs。在膀胱癌细胞系SW780和T24中,She等^[10]和Ning等^[11]找到了一小群能够有效泵出Hoechst33342染料的侧群细胞,这些侧群细胞能够有效形成克隆

和异种移植瘤。周韬等^[12]使用免疫组化证实干细胞标志物(ATP-binding cassette transporter G2, ABCG2)的表达强度与膀胱移行细胞癌病理分级呈正相关。接着,He等^[13]证实来自SW780的异种移植瘤中表达层粘连蛋白受体(相对分子质量为 6.7×10^3)的肿瘤细胞有10倍更强的致瘤性。另外,他们发现在早期的异种移植瘤中CD66C低表达的肿瘤细胞的致瘤性增强了70倍。Tatokoro等^[14]证实膀胱移行细胞癌细胞株5637中CD44⁺细胞亚群有膀胱癌启动细胞的特征,对顺铂有更强的抵抗能力,表达更高的Akt和ERK致瘤性信号通路,使用热休克蛋白90抑制剂可以增强膀胱癌启动细胞对顺铂的敏感性,暗示热休克蛋白90抑制剂在基于顺铂的联合化疗治疗高分期膀胱癌中的增敏作用。Keith等^[8]发现另一个尿路上皮基底细胞特异性标志——CK17,经常表达在相对分子质量为 6.7×10^3 的层粘连蛋白受体(LR67)阳性肿瘤细胞,而不与CD66C共同出现。尽管没有哪个标志能在细胞系和异种移植瘤上同时表达,这些数据表明在膀胱癌中存在肿瘤启动细胞样的基底细胞。近来,Su等^[15]利用乙酰脱氢酶1来分离CSCs,发现它的表达与癌症特异性生存率和总生存率呈负相关。以上这些数据表明在膀胱癌中存在而且能够分离出功能独特的CSCs,但是使用不同细胞表面标志或方法分离得到的CSCs之间的关系目前还不明确。

3 正常尿路上皮干细胞、前体细胞和分化细胞之间的关系

CSCs这个概念常常使人误以为这类细胞来源于正常成体干细胞。事实上,CSCs这个概念目前还只是功能上的定义,与CSCs的细胞起源还没有直接的关联。基于对免疫表型CD34⁺/CD38⁻的分析,Bonnet和Dick^[1]认为急性髓性白血病CSCs来源于同样表达CD34⁺/CD38⁻的造血干细胞。接着,Miyamoto等^[16]发现尽管第一个重要的易位发生在造血干细胞,但是其他的变异出现在下游分化的前体细胞,因此,这些前体细胞是癌症的起源。表达在基底细胞的标志例如CD44、CK5、CK17同样表达在来源于侵袭性膀胱癌标本或细胞株形成的异种移植瘤的CSCs上,表明来源于这些标本的膀胱CSCs来源于基底细胞,尽管目前还缺乏直接的证据。而且,他们还观察到对300个样本的膀胱癌组织点阵的分析表明,60%的组织CD44染色阴性。有趣的是,当CD44⁻膀胱癌原发肿瘤被移植到免疫缺陷小鼠时,CD44⁻肿瘤特性得以保留。到目前为止,还没有发现有新的标志能够在CD44⁻肿瘤中分离出有致瘤性潜能的亚群。作者假定在CD44⁻肿瘤中的CSCs可能起源于尿路上皮的不同分化阶段,可能不是起源于基底细胞群。那么,不同患者膀胱CSCs的免疫表型将会不同。正常干细胞和CSCs的共同特点是都能自我更新和分化引起下游所

* 基金项目:湖北省教育厅科技处B类基金资助项目(B20112806);湖北省教育厅重点基金资助项目(D20122802)。

有细胞,复制出正常和癌症组织的异质性。在正常的尿路上皮,Kurzrock 等^[17]使用溴脱氧尿苷(BrdU)来标记尿路上皮中的所有分裂细胞,这种方法常常被应用到具有高组织更新率的上皮组织和脉冲追赶标记大鼠的慢周期成体干细胞。随着时间推移,所有增殖细胞将逐渐丢失 BrdU,只有慢周期干细胞仍然保留着 BrdU 的标记。这些所谓的标记保留细胞占大鼠膀胱基底细胞的 9%。这些细胞表达整合素 β_1 ,在体外有很强的成克隆能力。Thangappan 和 Kurzrock^[18]进一步对来源于尿路上皮的三型克隆的特征进行了分析,指出第三型克隆可能有干细胞的特点,这些克隆在首次培养时只有较低的增殖率和凋亡指数,然而经过数次传代后它们能被刺激发生快速增殖。近来,Zhang 等^[19]从尿液中分离出一种前体细胞,这种细胞能被诱导进行多向分化产生尿路上皮、平滑肌,甚至内皮细胞和间质细胞。Anumanthan 等^[20]将骨髓来源的间充质干细胞置于肾周围囊间隙内,可以诱导分化产生尿路上皮细胞。不像造血系统、皮肤、乳腺,没有表面标志能够在尿路上皮中分离出干细胞、前体细胞和终末分化细胞。然而,细胞的形态、两维培养系统和组织分层清楚地表明正常尿路上皮也有阶层,可以被分为 3 种截然不同的细胞类型:基底细胞、中间细胞和伞细胞。在膀胱癌中极可能是经过多个分化步骤后才出现了这种细胞阶层,CD44⁺/K5⁺/K20⁻细胞最终分化为 CD44⁻/K5⁻/K20⁺细胞。最近,Gaisa 等^[21]使用双色酶组织化学证实尿路上皮中细胞色素氧化酶缺陷的区域存在相同的体细胞线粒体 DNA 变异,表明这些区域是一个克隆单位,包含尿路上皮中所有分化阶段的细胞,从而证实尿路上皮干细胞的存在。

4 膀胱 CSCs 的分子特征和靶向治疗

Keith 等^[8]使用免疫组化和原位杂交在 300 多个患者样本中分析了与成体组织干细胞自我更新有关基因的表达状况,包括 Gli1、Bmi-1、Stat3、 β -catenin、OCT-4 和 Nanog。他们的数据表明驱动膀胱癌进展的信号通路在膀胱癌中表达不一。使用全基因表达点阵,他们发现有个基因标记在 CD44⁺膀胱肿瘤表达,而 CD44⁻膀胱肿瘤不表达。这个基因标记能够将 97%的侵袭性膀胱癌与非侵袭性膀胱癌分开(另外一个研究报道为 87%),而且能够确诊复发的非侵袭性膀胱癌。Keith 等^[8]的数据支持 CSCs 驱动扩散性膀胱癌进展,而不是所有肿瘤细胞都能驱动膀胱癌进展的观点。另外,He 等^[13]检测了来源于膀胱癌细胞株 SW780 的异种移植瘤中 LR67⁺和 LR67⁻肿瘤的基因表达谱。他们的数据表明 Wnt 信号通路对于驱动 SW780 肿瘤进展是重要的。然而,Keith 等^[8]的免疫组化分析只在不到 5%的膀胱癌组织中发现了 β -catenin 的核激活形式,SW780 可能是 β -catenin 被激活膀胱癌的特殊模型。

越来越多的证据支持 CSCs 对放疗^[4]和化疗^[5]有更强的抵抗能力。因此,联合传统治疗对 CSCs 进行靶向治疗将会产生更好的疗效。Keith 等^[8]发现一种对巨噬细胞吞噬功能有抑制作用的信号蛋白——免疫球蛋白样跨膜整合素相关蛋白(IAP/CD47),几乎表达在所有膀胱癌细胞中,在膀胱 CSCs 表达显著增高。CD47 与信号调节蛋白 α 相互作用,后者广泛表达在髓系细胞,例如巨噬细胞、粒细胞和树突状细胞上。这种相互作用减少了巨噬细胞对膀胱癌细胞的吞噬。Majeti 等^[22]证实急性髓性白血病中 CD47 在 CSCs 表达增高能独立地提示预后差。使用抗 CD47 的抗体阻断 CD47 和 SIRP α 的结合,在小鼠异种移植瘤中能够选择性地去除急性髓性白血病细胞,而对正常造血干细胞没有影响^[23]。使用单克隆抗体阻断 CD47 可以在体外诱导巨噬细胞对膀胱癌细胞的吞噬^[8]。使

用抗 CD47 的单克隆抗体对移植了膀胱癌的小鼠进行治疗,可以使膀胱癌显著缩小,而且呈剂量依赖性。因为 CD47 在膀胱 CSCs 表达增高,因此,CD47 可能是膀胱 CSCs 的一个有前景的治疗靶点。

5 结 论

显而易见,膀胱癌中存在 CSCs,而且能够分离出来。但是,对于膀胱 CSCs 的细胞起源,目前还不是很明显。进一步的研究应该明确它的分化状况,进行遗传学及表观遗传学研究,平衡膀胱 CSCs 的分化和自我更新,确定除 CD47 以外的治疗靶点,比如开发促进膀胱 CSCs 分化,抑制其自我更新的药物,研制治疗性抗体,开展针对 CSCs 的免疫治疗等。

参考文献:

- [1] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-737.
- [2] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [3] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [4] D'Andrea FP, Safwat A, Kassem M, et al. Cancer stem cell overexpression of nicotinamide N-methyltransferase enhances cellular radiation resistance[J]. *Radiother Oncol*, 2011, 99(3): 373-378.
- [5] Awad O, Yustein JT, Shah P, et al. High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-FLI1 inhibition[J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): 1394-1396.
- [6] Mackillop WJ, Bizarri JP, Ward GK. Cellular heterogeneity in normal and neoplastic human urothelium[J]. *Cancer Res*, 1985, 45(9): 4360-4365.
- [7] Lipponen PK, Eskelinen MJ, Nordling S. Intratumoral heterogeneity of DNA indexes in transitional cell bladder cancer: relation to tumor histology[J]. *Eur Urol*, 1991, 20(4): 311-314.
- [8] Keith SC, Espinosa I, Chao M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(33): 14016-14021.
- [9] Yang YM, Chang JW. Bladder cancer initiating cells(BCICs) are among EMACD44v6t subset; novel methods for isolating undetermined cancer stem(initiating) cells[J]. *Cancer Invest*, 2008, 26(7): 725-733.
- [10] She JJ, Zhang PG, Wang ZM, et al. Identification of side population cells from bladder cancer cells by dye cycle violet staining[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(10): 1663-1668.
- [11] Ning ZF, Huang YJ, Lin TX, et al. Subpopulations of stem-like cells in side population cells from the human bladder transitional cell cancer cell line T24[J]. *J Int Med Res*, 2009, 37(3): 621-630.
- [12] 周韬, 方志强, 周锋, 等. ABCG2 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2009, 38(23): 2954-2956.

- [13] He X, Marchionni L, Hansel DE, et al. Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(7):1487-1495.
- [14] Tatokoro M, Koga F, Yoshida S, et al. Potential role of Hsp90 inhibitors in overcoming cisplatin resistance of bladder cancer-initiating cells[J]. *Int J Cancer*, 2011, 30(12):1543-1545.
- [15] Su Y, Qiu Q, Zhang X, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(2):327-337.
- [16] Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13):7521-7526.
- [17] Kurzrock EA, Lieu DK, Degraffenried LA, et al. Label-retaining cells of the bladder: candidate urothelial stem cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(6):1415-1421.
- [18] Thangappan R, Kurzrock EA. Three clonal types of urothelium with different capacities for replication[J]. *Cell Prolif*, 2009, 42(6):770-779.
- [19] Zhang Y, McNeill E, Tian H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction[J]. *J Urol*, 2008, 180(5):2226-2233.
- [20] Anumanthan G, Makari JH, Honea L, et al. Directed differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells into bladder urothelium[J]. *J Urol*, 2008, 180(14):1778-1783.
- [21] Gaisa NT, Graham TA, McDonald SA, et al. The human urothelium consists of multiple clonal units, each maintained by a stem cell[J]. *J Pathol*, 2011, 225(2):163-171.
- [22] Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells[J]. *Cell*, 2009, 138(2):286-299.
- [23] Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(6):457-464.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-03-22)

· 综 述 ·

自动心肺复苏仪的研究进展

杨雪玉 综述, 梁隆斌 审校

(成都大学附属医院急诊科 610081)

关键词: 心脏停搏; 心肺复苏术; 仪器

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.040

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)28-2992-03

心搏骤停是临床常见的危急病症, 必须立即进行心肺复苏(cardiopulmonary resuscitation, CPR)救治。徒手复苏有其局限性, 人工按压时可因医务人员的技术差异而影响复苏效果, 并可因耗费体力而频繁换人致按压中断, 亦可因为按压力度不当、位置不准而发生肋骨骨折和内脏损伤, 在开放静脉通路行药物治疗时常需 2 人以上才能完成, 而且在进行电除颤时需中断复苏。为了提高心搏骤停患者复苏期间的血液灌注和提高存活率, 人们研制了替代传统 CPR 的自动心肺复苏装置。目前, 自动心肺复苏仪器已经在临床中广泛使用^[1]。本文综述常见的自动心肺复苏仪的研究进展和它们在临床应用中的优缺点。

1 第 1 代自动心肺复苏仪

第 1 代自动心肺复苏仪主要以模拟徒手 CPR 原理发展而来, 其可实现连续不间断的点式按压, 这种方式很好地改善了徒手 CPR 容易疲劳、中断按压的情况, 其中以美国密歇根公司的萨勃心肺复苏机 Thumper 为代表^[2]。此类设备是以胸泵理论为基础, 即胸外按压时心脏受到胸骨和胸椎的挤压, 使心室和大动脉之间产生压力梯度, 这种压力驱使血液流向体循环和肺循环^[3]。它根据美国心脏学会心肺复苏指南要求设计, 具有全自动、同步胸外心脏按压、间歇性正压通气的特点。当被正确地安装在患者胸骨上时, 它可自动测量出前后胸径, 并显示出胸部按压下陷 20% 的读数, 避免按压不足或按压过重。同时可调节按压频率, 在自动模式下可在 5 次按压后自动输送一

次预定的潮气量, 避免按压与通气的冲突, 它能在短时间内安装完毕, 并且是全气动、电绝缘的, 这使得 Thumper 能与患者监护及除颤设备同时安全地使用。在那些有可能妨碍徒手技术效果的情况下, 为心搏骤停患者提供持续不断的心肺复苏。适用于如火车、救护车、飞机等院外环境。也可在急诊室、冠心病监护病房和心脏导管室等院内环境使用。它的垫板可提供良好的心肺复苏按压平面, 抢救过程中不必搬动患者, 方便转运。但是 Thumper 也存在一些不足之处, 如以气体为驱动方式, 要携带较大容量气瓶, 体积大, 重量大, 不方便携带, 且容易引起爆炸; 缺少复苏过程中患者实际呼出潮气量、气道压力和呼出 CO₂ 的监测, 不利于保证患者的通气质量, 容易造成气压伤。有研究表明, Thumper 在整体的动物实验和临床研究中发现其对心和脑的灌注血流量没有显著改善^[4]。因此, Lund 大学推出的 LUCAS 心肺复苏装置对点式按压进行了改进, 对按压头进行了改良, 采用了吸盘式按压头, 它在按压胸腔的同时可以向上拉升胸廓, 使其充分回弹, 在减压时给予胸廓向上拉力使胸腔内产生一个较大的负压, 从而促进血流回流到心脏。它能够每分钟提供 100 次, 深度达 5 cm 的按压, 易于操作, 可在 15 s 内安装完毕, 按压头能使按压部位保持固定位置, 能够很好应用于急救, 除颤时无需停止^[5]。2005 年, Rubertsson 等在心搏骤停猪模型上比较了传统徒手按压和 LUCAS 按压的脑血流和 P_{ET}CO₂ 等指标, 实验结果显示, 使用 LUCAS 能明显改善脑血流和心输出量^[6]。Steen 等^[4]于 2005