

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.15.036

肿瘤干细胞在乳腺癌腋窝淋巴结转移中的作用*

周 健¹, 郑 鹏², 蒋小卫³综述, 余天雾^{2△}审校

(1. 重庆医科大学附属永川医院普通外科 3 病区, 重庆 402160; 2. 重庆医科大学附属永川医院普通外科 3 病区, 重庆 402160; 3. 重庆医科大学附属第二医院三腺外科, 重庆 400010)

[关键词] 乳腺肿瘤; 淋巴转移; 腋; 肿瘤干细胞; 间质化; 侵袭; 化疗抵制; 复发

[中图分类号] R730.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)15-2137-03

乳腺癌是现代女性较常见的恶性肿瘤之一, 每年全球的新发病例超过 400 万, 死亡病例可达 100 万, 已成为威胁女性健康的一大杀手。目前国内外常规的治疗手段, 包括手术、化疗、放疗、内分泌治疗及较新的靶向治疗等, 尽管提高了临床疗效, 但还不能完全控制晚期乳腺癌的发展。随着对肿瘤发生、发展及复发、转移等机制的深入研究, 干细胞在其中的作用越来越受到人们的关注。本文主要根据较新的文献总结乳腺癌干细胞的在肿瘤发展和促进肿瘤细胞播散方面的发生机制, 为乳腺癌的治疗提供新的思路, 从而提高乳腺癌患者的生存率。

1 乳腺癌肿瘤干细胞 (breast cancer stem cells, BCSCs) 的表型分子

肿瘤干细胞 (CSCs) 是成瘤能力很强的肿瘤细胞, 具有和机体正常成熟干细胞相似的几个特点, 能不对称分裂生成一个具有自我更新能力的干细胞和另一个能分化成典型的、形态各异的和长成肿瘤组织的癌祖细胞^[1]。近年来发现乳腺癌转移和术后复发的根源不是以细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 为分子标志的癌细胞, 而是对放化疗有抵抗, 能够产生和维持新的癌细胞永生和自我更新的 BCSCs。鉴别乳腺癌标本或乳腺癌细胞株中癌干细胞的主要方法是基于肿瘤细胞表面的分子表型如分化抗体群 (CD44⁺/CD24^{-/low}) 或乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase, ALDH⁺)。BCSCs 是表达 CSCs 相关分子标志物的肿瘤细胞亚型, 在活体内有很高的成瘤能力。腋窝淋巴结中可疑瘤细胞仍然由是否表达 (CD44⁺/CD24^{-/low}) ALDH⁺ 表型分子来鉴定。它的成功分离、培养有助于研究涉及 CSCs 的起源、自我更新、分化为瘤细胞、对放化疗抵制, 以及侵袭转移的能力的分子机制。Al-Hajj 等^[2] 于 2003 年首先在人乳腺癌组织中发现并分离出乳腺癌干细胞, 检测 ESA⁺/CD44⁺/CD24^{-/low} 标志物的表达。发现带有这种表型的细胞具有高度的成瘤性, 瘤细胞接种小鼠后仅需 200 个带有这种分子标记的细胞或 1 000 个细胞表型 CD44⁺/CD24^{-/low} 的细胞, 不论是来自原发灶还是胸腺渗出液都会生成肿瘤。相反, 未筛选的瘤细胞则需要 5 000 个才能形成小鼠肿瘤灶, 而且接种到小鼠体内的初始细胞保留了细胞表型的异质性。Ginestier 等^[3] 报道 ALDH⁺ 可被用来分离、收集正常乳腺上皮的干细胞和乳腺癌干细胞。取自人乳腺的 ALDH⁺ 的细胞接种到小鼠体内后能形成肿瘤并可传代, 反之, ALDH⁻ 的细胞则没有这些能力。Ginestier 等^[3] 在 2007 年报道由 ALDH1⁺ 细胞生成的肿瘤具有和原发肿瘤相似的细胞表型异质性, 肿瘤的大小和潜在特性都与接种的这些细胞数量相关。由 ALDH⁺ 联合 CD44⁺/CD24^{-/low} 的细胞表型特征来富集的肿瘤细胞具有很强的成瘤能力, 20 个就能长成肿瘤体。因而, ALDH⁺ 和 CD44⁺/CD24^{-/low} 标志物被用来评估乳腺癌细胞的致瘤性^[1]。

2 通过癌细胞表皮间质化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 和 MET 重塑侵袭分子, BCSCs 相关干性因子促进了肿瘤的侵袭、转移

除了 CD44 的阳性表达, 与肿瘤的侵袭、转移和复发有关的因素还包括 BCSCs 的其他相关基因如 OCT4、Slug、Snail、Sox1 和 Twist1 等不同程度的过表达。肿瘤组织中像 CSCs 样表达 OCT4 基因的细胞只占整个肿瘤细胞的很少一部分。OCT4 是 POU 家族众多转录因子中的一个, 在胚胎肝细胞中维持多能、增殖 (像自我更新) 的作用。正常乳腺组织的 OCT4 的转录调节作用诱发肿瘤和侵袭能力的细胞系产生。临床研究表明与级别低、OCT4 表达水平低的肿瘤相比, CSCs 分子 OCT4 过表达与病情进一步恶化、远处转移和生存期更短有密切关系。转录因子 Twist1 具有螺旋-环-螺旋基础结构, 文献报道它对肿瘤细胞血液播散和转移有强大的促进作用, 当然也为临床研究、有效的干预治疗提供了理想的标靶。Twist1 能促使细胞的 EMT, 能使癌细胞之间失去细胞黏附分子和肿瘤细胞迁徙、转移^[4]。对于上皮恶性肿瘤来说, EMT 是癌细胞血液播散的核心环节, 同时认为它有助于 CSCs 侵袭分子表型的形成。尤其是 EMT 过程致使癌细胞通过丧失细胞极性和黏附能力自原发灶脱落, 从而促进了癌细胞的迁徙^[5]。进一步研究阐明了 Twist 1 促进肿瘤转移的机制和对它的功能调节物的识别有助于制订抑制 EMT 和肿瘤转移的治疗新方案^[6]。乳腺癌淋巴结转移 (lymph node metastasis, LNM) 表明淋巴结内存在侵袭力强的癌细胞, 而且其 EMT 调节因子的表达水平上调^[7]。动物实验模型提供的证据进一步解释了原发肿瘤具有促使肿瘤细胞播散和生长因子表达水平上调的功能。

3 乳腺癌干细胞维持自我更新的分子机制

肿瘤内的 BCSCs 具有自我更新、分化潜能和多种表型。通过几种信号通路如 Notch、Hedgehog 和 Wnt 来调节干细胞的自我更新能力。此外, 核心转录因子调节了乳腺癌干细胞多个基因比如核转录因子 kappa B (NF-κB)、c-Jun、叉头样蛋白 Dach1 和 CDK 抑制子 p21CIP1^[8-10]。经过 Wnt 途径的自分泌, AKT 磷酸化后有活性的 GSK3β 已被发现能调节和维持 BCSCs 的自我更新能力。文献报道鼠系 BCSCs 可能源于大鼠转化的 CD44/CD24⁺ HMECs 和母系分化的上皮细胞。已有共识的是白细胞介素 (IL)-6 能促进混合肿瘤细胞群中的乳腺癌干细胞的快速形成^[11], 表明具有在两种细胞群之间发生塑性变化能力的自分泌细胞因子参与了信号传导通路调控。BCSCs 的自我更新和细胞信号通路变化与产生耐药性有关, 这些通路包括 Notch, Wnt, Hedgehog 及人表皮生长因子受体 2 (HER-2), 如 Notch1 的过表达与 BCSCs 对化疗耐药和抵制放疗有关。Survivin 表达量的增多下调了线粒体的多个控制节

* 基金项目: 重庆市科技计划项目科研基金 (CSTC2011JJA10038)。 作者简介: 周健 (1986—), 住院医师, 硕士, 主要从事乳腺肿瘤治疗研究。 △ 通讯作者, E-mail: 674079699@qq.com。

点,增加了基因的不稳定性和抑制了放化疗诱导的细胞凋亡。细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)是正常细胞和 CSCs 自我更新的必需成分,也是 Notch1 诱导乳腺肿瘤发生不可或缺的蛋白质,它通过抑制负性调节子 Numb 的表达提高了 Notch1 的活性。由于 Cyclin D1 也是 Wnt, Stat3, β -链蛋白(β -catenin)和 NF- κ B 信号传导通路的下游靶标,因而也是调控干细胞自我更新和扩增的重要靶点^[12]。对于 CSCs,尽管放疗是治疗的主要方式之一,但有文献表明它能增加小鼠移植瘤内 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型阳性的细胞群^[13],不过其机制还需要进一步研究。

4 乳腺癌淋巴结转移的检测对诊断治疗及预后判断的意义

乳癌患者第 1 次手术后,在系统性治疗和放化疗方面取得的进展已经大大减少了患者腋窝淋巴结中残留癌灶复发的风险。复发率已经从 1977 年美国乳腺和肠道外科辅助治疗计划 B-04(NSABP B-04) 报道的 38% 降到了 2010 年美国外科肿瘤学会(ACoSOG)Z11 报道的 3%^[14],几乎很少有局部复发。近年发现乳腺癌复发和转移的根源不是以 CK 为分子标志癌细胞,而是对放化疗抵抗、能够产生新的癌细胞和维持癌生长、有自我更新能力的 BCSCs。临床上,识别出已有淋巴结转移的肿瘤只是最粗浅的判断。文献报道认为拥有特异分子的肿瘤细胞使缺乏免疫力的宿主无法预防它向乳外器官转移。尽管肿瘤分子结构利于淋巴结转移及在远处器官增殖,但 Gangi 等^[15]研究表明对远隔器官的致命转移生长来说,淋巴结转移不是必定会出现的,而且早期脱落的细胞不够转移的细胞数量。虽然低龄、大体积肿瘤、临床高级别和淋巴血管侵犯能预测患者的预后,但通过免疫组织化学检测雌孕激素受体(ER)及 HER2/neu 去判断的肿瘤亚型的方法无法单独用来预测的淋巴结是否阳性,因而需要作特殊检测。而通过检测基因表达划分的乳癌实际上的亚型已被用于预测乳癌的预后。免疫组织化学仅仅提供了一个不太精确的、接近的乳癌真正分型,而且研究人员使用的 Marker-3 分子检测标志物比不上那种样本量更大的标志物检测板,这种方法检测的抗原包括表皮生长因子受体、细胞角素和 Ki67 等。

虽然很多研究者特别关注三阴性的乳腺癌检测新的手段,但免疫组织化学对该型划分级别还是合理的^[16]。对于明显异质性的肿瘤,必须要有一个明确的定义和其他的肿瘤标志物去探索基底型乳癌预后差的原因。患者预后差的原因尽管与之前的研究吻合,但三阴性的乳腺癌的后果与淋巴结的高转移率相关性不高。有文献认为与激素敏感型乳腺体癌相比,基底型实际上更少发生淋巴结转移。这些肿瘤亚型的细胞显然具有播散至乳外器官生长的分子构造。腋窝淋巴结的生长状态是预测肿瘤的复发和致死率的可靠标志之一。目前肿瘤分子学进展很快,它的致瘤机制正在探索,但要获得肿瘤和宿主通过其他方式相互影响的知识,仍有很多研究工作要做。尽管理论还不完善,腋窝淋巴结在机体内仍然具有生物学上的重要意义,能够判断肿瘤细胞是否已经到达了血液循环,是否拥有转移到乳房以外的器官生长、增殖分子机制。主要的问题是当腋窝淋巴结内的肿瘤细胞能被识别时,瘤细胞很可能已经进入了血液循环系统,这是因为淋巴结的解剖结构特点适合接受反流淋巴液中的小碎片。人体为了静脉系统维持低压力避免水肿通过淋巴管道分流将瘤细胞直接平衡转送至小静脉。血液检测肿瘤细胞分子甚至可以在淋巴结无肿瘤生长情况下提供血源性播散直接的依据。虽然循环血中的肿瘤细胞具有一些特征,但仍需要去改善检测手段的敏感性和实用性。进入血液循环的肿瘤细胞也会受到挑战^[17],因为肿瘤要在远处器官生长必须具有特殊的侵袭结构和相适应的宿主微环境。腋窝淋巴结中的大转移灶提示仅通过检测分析乳癌原发灶难以知晓肿瘤和宿主之间的相互作用。针对该问题,多基因检测分子标志

物取得了进展,尤其是在检测雌激素受体阳性的肿瘤,以及通过常规定量检测生物分子表达的肿瘤细胞亚群方面,这些细胞是由原发灶导致的侵袭和转移而来的肿瘤亚细胞群。然而,现在还没有特异性技术去可靠推测哪个个体会有肿瘤转移的潜在可能性。虽然肿瘤淋巴结转移提供了关于肿瘤播散和与宿主间相互作用的有价值的生物信息,但这些仍不能作为肿瘤转移预测的生物学标志^[18-19]。进一步说,根据阳性前哨淋巴结的生物学特征去研究判断具有局部复发的高危因素的患者是有价值的^[20]。因而,调控 LNM 的因子可以作为原发性乳腺肿瘤具有潜在的侵袭和远处转移的替代性标志物。针对识别血源性播散和有助于肿瘤乳外生长的宿主-肿瘤的相互作用,个性化的腋窝淋巴结活检仍是非常有益的措施。目前肿瘤生物学标志物已大量尝试性地用于恶性肿瘤的早期诊断,在治疗后监测病情的复发和转移以及对抗癌药物产生抵制的情况^[21]。

5 乳癌干细胞对放化疗的抵制

放疗可能耗竭了三阴性的 BCSCs[孕激素受体(PR⁻), ER⁻ HER2⁻]肿瘤群,说明对放疗产生抵抗不是 BCSCs 的固有特征,提示放疗对肿瘤分子表型具有作用。通过阐明放化疗影响 CSCs 存活的分子机制可能为治疗乳癌找到新的靶点。CSCs 被认为是唯一的生成肿瘤且可维持生长,在一些模型中 CSCs 造成了肿瘤的扩散、转移。文献报道在肿瘤转移过程中,BCSCs 扮演了重要角色,它促进了肿瘤的侵袭、迁徙及基因过表达促进了肿瘤转移。暗示 BCSCs 对化疗的抵抗可能与肿瘤转移灶形成有关。乳癌标本中 ALDH⁺ 的表达明显与肿瘤的级别、转移、阶段和生存率下降有关^[22-23]。由于 BCSCs 的标志物 ALDH⁺ 主要亚型是同型 ALDH1A3,因而基因表达的定量检测可能是更好的预后指标。抗炎药物雷帕米星是 IL-8 受体 CXCR1 的拮抗剂,减少了 BCSCs 的数量,导致肿瘤细胞群的凋亡,减少了小鼠模型中的转移灶^[24],说明阻断微环境中信号传导可能有助于根除 BCSCs。临床上,对于前哨淋巴结阳性、TNM 分期 T₁~T₂ 的原发性乳腺癌患者,腋窝淋巴结的放射治疗可以减少肿瘤所致的致死率^[25]。

6 展 望

尽管乳腺癌的治疗效果较十几年前有了很大的改善,然而仍有一部分接受综合治疗的患者预后差,难以根除的 CSCs 导致的癌细胞在远处器官的早期转移和对放化疗产生的抵抗仍为主要原因之一,尤其是对于三阴性(ER⁻/PR⁻/HER2⁻)的乳癌患者。因此,发现更灵敏、更具特异性的检测手段去提高早期微转移的正确诊断率对外科临床医师选择合适的手术方式、改善患者的疗效和生存率具有重要意义。尤其是从分子调控机制上研究早期识别 CSCs 以阻断肿瘤的早期转移和寻找新的体外负载、干扰措施影响该细胞的永生生化,促使它对微环境改变更敏感,从而易于凋亡和易被临床治疗手段消除。此外,通过从分子机制上施加的外部干预可削弱肿瘤的促细胞侵袭、破坏能力,可实现机体与其长期伴生的可能性。

参考文献

- [1] Velasco-Velázquez AM, Homsí N. Breast cancer stem cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(4): 573-577.
- [2] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [3] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 555-567.

- [4] Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, et al. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(3):372-386.
- [5] Qin Q, Xu Y, He T, et al. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1):90-106.
- [6] Markiewicz A, Ahrends T, Welnicka-Jaśkiewicz M, et al. Expression of epithelial to mesenchymal transition-related markers in lymph node metastases as a surrogate for primary tumor metastatic potential in breast cancer [J]. *J Transl Med*, 2012, 10:226.
- [7] Sleeman JP, Cady B, Pantel K. The connectivity of lymphogenous and hematogenous tumor cell dissemination: biological insights and clinical implications [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2012, 29(7):737-746.
- [8] Liu H, Patel MR, Prescher JA, et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(42):18115-18120.
- [9] Wu K, Jiao X, Li Z, et al. Cell fate determination factor Dachshund reprograms breast cancer stem cell function [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(3):2132-2142.
- [10] Scheel C, Eaton EN, Li SJ, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast [J]. *Cell*, 2011, 145(6):926-940.
- [11] Liopoulos D, Hirsch HA, Wang G. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(4):1397-1402.
- [12] Velasco-Velázquez MA, Li Z, Casimiro M, et al. Examining the role of cyclin D1 in breast cancer [J]. *Future Oncol*, 2011, 7(6):753-765.
- [13] Zielske SP, Spalding AC, Wicha MS, et al. Ablation of breast cancer stem cells with radiation [J]. *Transl Oncol*, 2011, 4(4):227-233.
- [14] Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(11):1023-1031.
- [15] Gangi A, Mirocha J, Leong T, et al. Triple-negative breast cancer is not associated with increased likelihood of nodal metastases [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(13):4098-4103.
- [16] Euhus DM. Are axillary lymph nodes still relevant in breast cancer? [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(13):4051-4053.
- [17] King JD, Casavant BP, Lang JM. Rapid translation of circulating tumor cell biomarkers into clinical practice: technology development, clinical needs and regulatory requirements [J]. *Lab Chip*, 2014, 14(1):24-31.
- [18] Rouzier R, Pronzato P, Chéreau E, et al. Multigene assays and molecular markers in breast cancer: systematic review of health economic analyses [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 139(3):621-637.
- [19] Cheung KJ, Gabrielson E, Werb Z, et al. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program [J]. *Cell*, 2013, 155(7):1639-1651.
- [20] Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial [J]. *Ann Surg*, 2010, 252(3):426-432.
- [21] Duffy MJ, Evoy D, Medermott EW. CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(23/24):1869-1874.
- [22] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(1):45-55.
- [23] Marcatò P, Dean CA, Pan D, et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis [J]. *Stem Cells*, 2011, 29(1):32-45.
- [24] Ginestier C, Liu S, Diebel ME, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(2):485-497.
- [25] Donker M, Van Tienhoven G, Straver ME, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(12):1303-1310.

(收稿日期:2015-11-22 修回日期:2016-01-25)

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.15.037

治疗 2 型糖尿病新药:钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂

缪洪芸¹, 李斌¹综述, 任伟^{2△}审校

(1. 重庆市江津区中心医院肾脏内分泌科 402260; 2 重庆医科大学附属第一医院内分泌科, 重庆 400012)

[关键词] 2 型糖尿病; 葡萄糖重吸收; 钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)15-2139-04

根据全国多中心流行病学调查研究显示, 2010 年中国成人糖尿病患病率达到 11.6%, 糖尿病前期状态患病率达到

50.1%^[1], 意味着在不久的将来糖尿病的治疗将会是我国面临的巨大挑战。虽然目前 2 型糖尿病 (T2DM) 有多种治疗选择,