

# 侧群细胞与肝癌干细胞

强光辉, 余德才, 江春平

强光辉, 余德才, 江春平, 南京医科大学附属鼓楼临床医学院肝胆外科 江苏省南京市 210008

江春平, 南京大学附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

江春平, 教授, 主任医师, 主要从事消化系统恶性肿瘤综合治疗领域的研究。

江苏省南京市卫生局科技发展基金资助项目, No. ZKX08025

作者贡献分布: 本文综述由强光辉完成, 余德才修改, 江春平审校。

通讯作者: 江春平, 教授, 210008, 江苏省南京市, 南京大学附属鼓楼医院肝胆外科. chunpingjiang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-01-06 修回日期: 2010-03-08

接受日期: 2010-03-15 在线出版日期: 2010-04-08

## Side population cells and liver cancer stem cells

Guang-Hui Qiang, De-Cai Yu, Chun-Ping Jiang

Guang-Hui Qiang, De-Cai Yu, Chun-Ping Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Chun-Ping Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Supported by: the Science Foundation of Nanjing City, No. ZKX08025

Correspondence to: Professor Chun-Ping Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. chunpingjiang@yahoo.com.cn

Received: 2010-01-06 Revised: 2010-03-08

Accepted: 2010-03-15 Published online: 2010-04-08

## Abstract

Liver cancer is a life-threatening disease whose etiology and pathogenesis remain unclear now. No effective therapeutic targets for the disease have been found. Recent studies suggest that a small population of cells having the potential of self-renewal and differentiation in tumors may be the source of tumor metastasis and recurrence. Liver cancer stem cells may also exist. The side population (SP) cells, a small population of tumor cells, have many properties of stem cells and are easy to isolate. Identification and isolation of SP cells in liver cancer may help us find liver cancer stem cells, elucidate the mechanisms behind the metastasis and recurrence of liver cancer, and provide an efficient target for therapy of liver cancer.

Key Words: Side population cell; Liver cancer; Stem cell

Qiang GH, Yu DC, Jiang CP. Side population cells and liver cancer stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(10): 971-974

## 摘要

肝癌是严重威胁人类生命和健康的一种疾病。其病因和发病机制尚不完全清楚, 治疗缺少有效靶点。对肝癌恶性生长、转移及复发机制的研究正在逐渐深入。近年来的研究认为, 肿瘤中存在一小群具有自我更新和分化潜能的细胞, 即肿瘤干细胞, 可能是肿瘤转移和复发的根源。肝癌中应同样存在这样的一群细胞。侧群(side population, SP)细胞是肿瘤细胞中一小部分, 具备干细胞的多种特性且易于分离。肝癌组织中SP细胞的鉴定和分离有可能找到肝癌干细胞, 有助于肝癌的转移和复发机制的研究, 并为肝癌治疗提供有效治疗靶点。

关键词: 侧群细胞; 肝癌; 干细胞

强光辉, 余德才, 江春平. 侧群细胞与肝癌干细胞. 世界华人消化杂志 2010; 18(10): 971-974

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/971.asp>

## 0 引言

肿瘤干细胞假说最先在血液肿瘤中被提出。在急性单核细胞白血病中CD34<sup>+</sup>和CD38<sup>-</sup>细胞富含具有肿瘤开始能力的细胞<sup>[1,2]</sup>, 被认为是肿瘤干细胞-肿瘤生长、转移和复发的根源。随着研究的进展, 人们在脑肿瘤<sup>[3]</sup>、结肠癌<sup>[4]</sup>和乳腺癌<sup>[5]</sup>等实体肿瘤中均发现肿瘤干细胞的存在。肝癌作为常见的一种恶性肿瘤, 是否存在肝癌干细胞备受人们关注。在一些实体肿瘤中人们使用一些特异性表面标志物鉴别肿瘤干细胞, 不同类型的肿瘤可能存在不同的肿瘤干细胞标志。在肝癌中人们尝试使用CD133、CD90等表面标志来鉴别肝癌干细胞, 但都不是理想的特异性表面标志物。研究发现在一些肿瘤组织包括肝癌组织存在侧群(side population, SP)细胞, 其具有类似于干细胞的特性。因此人们认为SP细胞至少组成了肝癌干细胞的一部分, SP细胞的发现为肿瘤干

## ■背景资料

肝癌作为常见的一种恶性肿瘤, 是否存在肝癌干细胞备受人们关注。在一些实体肿瘤中人们使用一些特异性表面标志物鉴别肿瘤干细胞, 不同类型的肿瘤可能存在不同的肿瘤干细胞标志。在肝癌中人们尝试使用CD133、CD90等表面标志来鉴别肝癌干细胞, 但都不是理想的特异性表面标志物。研究发现在一些肿瘤组织包括肝癌组织存在侧群(SP)细胞, 其具有类似于干细胞的特性。因此人们认为SP细胞至少组成了肝癌干细胞的一部分, SP细胞的发现为肿瘤干细胞的鉴别和分离提供了一种新方法。

## ■同行评议者

余宏宇, 教授, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院病理科

## ■研发前沿

如何分离纯化肿瘤干细胞是一个亟待解决的问题,在肝癌中目前仍没有发现一个高特异性和敏感性表面标志物。

细胞的鉴别和分离提供了一种新方法。

### 1 SP细胞

Goodell等<sup>[6]</sup>在用Hoechst33342荧光染色对小鼠骨髓造血干细胞进行检测时,发现极少数的细胞能将此荧光染料排出,表现为细胞核不着色或着色程度很低,且这群细胞在流式二维分析点阵图上呈彗星状分布在细胞主群的一侧,因此将这群细胞称为SP细胞。自从小鼠骨髓中SP细胞发现以后,学者们已经在多种组织中鉴别出了SP细胞,包括皮肤、肺、肝脏、心脏、脑、乳腺以及骨骼肌等组织<sup>[7]</sup>。在正常组织中,这些细胞高水平表达干细胞相似基因以及具有多向分化潜能。因此,他们被认为具有干细胞相似的特性。

### 2 SP细胞的特性

SP细胞的研究在逐步深入,人们发现SP细胞存在于多种组织中。他们仅占细胞总群的一小部分,并具有许多类似于干细胞的特性。在细胞周期中相对静止是干细胞的一个重要特性<sup>[8]</sup>,研究发现多种肿瘤细胞株中SP细胞处于相对静止期,如:鼠卵巢癌细胞系MOVCAR7的SP细胞主要处于细胞周期的G<sub>1</sub>期<sup>[9]</sup>,Huh7细胞株中的SP细胞80%处于G<sub>0</sub>期<sup>[10]</sup>。

SP细胞的鉴别是利用其能排出Hoechst染料这一特性,Hoechst染料排出以细胞膜上的一种ATP结合蛋白[ATP-binding cassette superfamily G(White)member 2]为运载体。从小鼠各种组织检测到的SP细胞相比于非SP细胞ABC运载体明显高表达。Zhou等<sup>[11]</sup>发现SP细胞表型的形成与ABCG2有着最直接的联系。SP细胞的细胞周期相对静止和高表达ABCG2的特性使其能够逃避一些化疗药物的损害。SP细胞处于相对静止期,可以免受杀伤DNA复制期细胞的药物的作用,此外其高表达的ABC转运蛋白能将毒性药物大量泵出。

SP细胞还具有自我更新和多向分化潜能。SP细胞最早发现于小鼠骨髓中,Challen等<sup>[12]</sup>研究发现随着造血干细胞的长期传代,SP细胞比例越来越高。在一些肿瘤细胞系中,SP细胞具有自我更新和无限增殖的潜能。在鼠卵巢癌细胞系MOVCAR7和4306<sup>[9]</sup>、肝癌细胞系Huh7及PLC/PRE/5<sup>[13]</sup>中分离的SP细胞体外培养能产生SP细胞和非SP细胞,SP细胞比例升高。SP细胞还能多向分化,Kondo等<sup>[14]</sup>证明由大鼠胶质瘤细胞

系C6中分离的SP细胞,能在其体内分化为神经元细胞及胶质细胞。小鼠乳腺中分离的SP细胞注入小鼠乳腺脂肪垫中可产生完整的腺小管及腺小叶组织<sup>[15]</sup>,Wulf等<sup>[16]</sup>发现肝脏SP细胞体外培养可以分化为肝细胞和造血细胞,将肝脏的SP细胞移植到DDC药物引起的损伤肝脏中,可以发现SP细胞可分化为肝实质细胞和胆管上皮细胞而修复肝脏。

总之,无论是正常组织还是肿瘤细胞系中分离的SP细胞均具有干细胞样特性。在肿瘤细胞系中分离的SP细胞还具有高致瘤性-一种肿瘤干细胞特性。从肝癌<sup>[13]</sup>、肺癌<sup>[17]</sup>、胃癌<sup>[18]</sup>、C6神经胶质瘤细胞<sup>[14]</sup>和鼻咽癌<sup>[19]</sup>细胞株中分离出的SP细胞具有较高的肿瘤形成能力。肝癌细胞系Huh7及PLC/PRE/5中的 $1 \times 10^3$  SP细胞可以使NOD/SCID小鼠皮下成瘤,皮下注射 $1 \times 10^6$ 非SP细胞却不能成瘤<sup>[13]</sup>。

### 3 肝癌干细胞的鉴别与分离

研究肝癌干细胞生物学特性首先需要将其分离出来。在肝癌干细胞的分离过程中研究者尝试使用各种细胞表面标志,如CD133、CD90。Ma等<sup>[21]</sup>发现CD133<sup>+</sup>肝癌细胞高表达与干细胞自我更新、增殖等相关性基因,具有分化为非肝细胞的潜能和高致瘤性。但许多肝癌细胞株中并未检测到CD133<sup>+</sup>肝癌细胞<sup>[20,21]</sup>,在Huh7肝癌细胞株中CD133<sup>+</sup>肝细胞占65%,在Hep3B中占90%<sup>[21]</sup>,这与肿瘤干细胞仅占肿瘤细胞中一小部分的理论不符。

Yang等<sup>[22]</sup>研究显示从多种人肝癌细胞系分离到的CD90<sup>+</sup>细胞,可在免疫缺陷小鼠体内形成肿瘤。各种肝癌细胞系中CD90<sup>+</sup>细胞比例与该细胞系的成瘤性和转移能力呈正相关。CD90<sup>+</sup>细胞的干细胞特性与CD45、CD44的表达相关。在所有肝癌标本及90%的肝癌患者血样本中分离到了CD45<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>细胞,这些细胞均可在免疫缺陷小鼠体内成瘤。CD44抗体可诱导CD90<sup>+</sup>细胞体外凋亡。但是Yamashita等<sup>[23]</sup>证实CD90只在EpCAM-AFP的肝癌细胞系中表达。因此CD133、CD90作为肝癌干细胞的表面标志仍缺乏特异性和敏感性,需进一步研究予以证实。

SP细胞目前也已应用于肝癌干细胞的鉴别,Chiba等<sup>[13]</sup>在肝癌细胞系Huh7及PLC/PRE/5均分离出SP细胞,比例分别是0.25%、0.80%。这群细胞具有自我更新、多向分化潜能,且具有高致瘤性。人的肝细胞癌组织中也存在SP细胞,但在

Hep2和Huh6这两个肝癌细胞株中未检测到SP细胞. 因此SP法也不是一个完美的鉴别肝癌干细胞的方法, 且Hoechst33342具有DNA毒性, 分选后的细胞生物学特性是否发生改变存有疑问. 分选出来的SP细胞和非SP细胞难于比较各自的生物学特性. 所以需寻求另一种表面标志用于分选SP细胞, 比如利用ABCG2特异性抗体结合后再用流式细胞仪分选可能成为SP细胞分选的新方法.

#### 4 SP细胞与肝癌干细胞

肿瘤干细胞是恶性肿瘤的根源, 与肿瘤的恶性程度和预后有一定的关系, 因此肿瘤干细胞可能是肿瘤治疗的一个有效靶点. 鉴于以上资料, SP细胞虽不等同于肝癌干细胞, 但SP细胞至少包含了部分肝癌干细胞, 因此在发现特异性肝癌干细胞表面标志物前SP细胞可以作为肝癌治疗的靶点.

SP细胞不仅有开始肿瘤的潜能还能通过其外排机制抵抗化疗药物, 这些细胞可能在肿瘤维持和复发中起着重要的作用. Shi等<sup>[24]</sup>研究表明肝癌标本中存在SP细胞, 其比例与肝癌术后早期转移复发相关, 因此改变SP细胞的比例可能降低肿瘤复发机率. ABCG2与SP表型有直接相关性, 因此能影响ABCG2蛋白表达、功能状态、组织分布的因素均可影响SP表型. 研究发现在MHCC-97L肝细胞癌细胞株中Akt信号通路抑制剂和血清供给可以调节SP细胞的比例, 具体机制是通过改变ABCG2运输体的亚细胞定位从而调节SP细胞的外排活力<sup>[25]</sup>. ABCG2分子能够被钙离子拮抗剂维拉帕米非特异性阻断, 抑制染料外排, 逆转耐药, 减少SP细胞; 加入维拉帕米后可见SP亚群明显减少. 在间充质肿瘤、侵袭性纤维瘤病中干扰素可以导致SP细胞数量的增加<sup>[26]</sup>. 以上结果表明一些化学性因素具有改变SP数量的能力, 具有这种能力的因子可以结合常规化疗用于减少或清除致瘤细胞预防肿瘤复发.

除了通过改变SP细胞的数量改善肿瘤预后外, 还可能通过改变SP细胞的特性如自我更新、致瘤性等来防止肿瘤复发. 基因BMI1参与各种不同干细胞的自我更新<sup>[27,28]</sup>, 研究表明其对白血病干细胞自我更新能力的维持是必需的<sup>[29]</sup>. Chiba等<sup>[30]</sup>研究发现Huh7和PLC/PRF/5肝癌细胞株中的SP细胞BMI1表达高于非SP细胞, 通过基因敲除技术研究发现BMI1敲除后细胞活力下

降, SP细胞具有自我更新和产生非SP细胞的能力, BMI1缺失可导致SP细胞的数量下降, 提示BMI1亦调节肝细胞癌中SP细胞的自我更新能力, BMI1缺失加快了SP向无致瘤性的非SP细胞方向分化. 相反, 在Huh7肝癌细胞株中BMI1基因的过度表达导致SP亚群显著的增长, CD133阳性的细胞与阴性相比具有更强的致瘤性, SP细胞中CD133的表达较非SP细胞强, BMI1缺失可导致CD133数量下降, 反之则CD133数量增多, BMI1与代表肿瘤干细胞表型的SP细胞以及CD133阳性细胞均密切相关. Huh7和PLC/PRF/5肝癌细胞株中的 $1 \times 10^3$  SP细胞即可在NOD/SCID小鼠体内形成移植瘤, 但10倍的BMI1缺失的SP细胞却失败了, BMI1的缺失使起始肿瘤的能力显著的降低. SP细胞具有异质性, 不同的细胞株BMI1对SP表型的作用不同, BMI1可能只是众多SP细胞自我更新调节因子中的一种, 因此需要更多的研究来明确调节肝癌干细胞具体机制. BMI1与SP细胞细胞活力、自我更新能力以及致瘤性有关, 因此他可能成为一个清除肝细胞癌中的肿瘤干细胞的治疗靶点.

#### 5 结论

随着对肿瘤干细胞更进一步的认识, 肿瘤干细胞学说在不断发展. 如何分离纯化肿瘤干细胞是一个亟待解决的问题, 在肝癌中目前仍没有发现一个高特异性和敏感性表面标志物. 肝癌SP细胞具有明确的高致瘤性等肝癌干细胞特性, 尽管他不等同于肝癌干细胞, 但SP表型仍可作为研究肝癌干细胞的重要手段. 同时, 人们还将SP细胞作为治疗肿瘤的一个靶点进行了大量的研究并取得了一定的进展, 虽然离应用于临床治疗恶性肿瘤还有一定的距离, 但这为恶性肿瘤的治疗带来了新的希望. 肿瘤干细胞生物学行为的深入研究, 也许能帮助发现真正治愈恶性肿瘤的方法.

#### 6 参考文献

- 1 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645-648
- 2 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 3 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating

#### ■应用要点

肝癌SP细胞具有明确的高致瘤性等肝癌干细胞特性, 尽管他不等同于肝癌干细胞, 但SP表型仍可作为研究肝癌干细胞的重要手段.

## ■同行评价

本文选题尚可, 内容丰富, 参考文献引用合理, 可读性较好。

- cells. *Nature* 2004; 432: 396-401
- 4 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115
- 5 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-3988
- 6 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-1806
- 7 Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett* 2008; 268: 1-9
- 8 Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, Glimcher LH, Fuchs E. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* 2008; 132: 299-310
- 9 Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, Dombkowski D, Preffer F, Maclaughlin DT, Donahoe PK. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 11154-11159
- 10 Kamohara Y, Haraguchi N, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Mori M, Kanematsu T. The search for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2008; 144: 119-124
- 11 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7: 1028-1034
- 12 Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 2006; 24: 3-12
- 13 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- 14 Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 781-786
- 15 Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3547-3549
- 16 Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Brenner MK, Goodell MA. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 2003; 88: 368-378
- 17 Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 4827-4833
- 18 Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006; 24: 506-513
- 19 Wang J, Guo LP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res* 2007; 67: 3716-3724
- 20 Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 820-824
- 21 Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-2556
- 22 Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, Li ML, Tam KH, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008; 47: 919-928
- 23 Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* 2009; 136: 1012-1024
- 24 Shi GM, Xu Y, Fan J, Zhou J, Yang XR, Qiu SJ, Liao Y, Wu WZ, Ji Y, Ke AW, Ding ZB, He YZ, Wu B, Yang GH, Qin WZ, Zhang W, Zhu J, Min ZH, Wu ZQ. Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 1155-1163
- 25 Hu C, Li H, Li J, Zhu Z, Yin S, Hao X, Yao M, Zheng S, Gu J. Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2289-2297
- 26 Tjandra SS, Hsu C, Goh YI, Gurung A, Poon R, Nadesan P, Alman BA. IFN- $\beta$  signaling positively regulates tumorigenesis in aggressive fibromatosis, potentially by modulating mesenchymal progenitors. *Cancer Res* 2007; 67: 7124-7131
- 27 Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihlaja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423: 302-305
- 28 Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 2003; 425: 962-967
- 29 Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 2003; 423: 255-260
- 30 Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Aoki R, Seki A, Morita Y, Yonemitsu Y, Yokosuka O, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A. The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 7742-7749

编辑 李军亮 电编 何基才