

癌干细胞与肿瘤的放射抗性

谭伟 让蔚清 周平坤

【摘要】 有关癌干细胞及其生物学特性研究信息的不断积累,推动了放射肿瘤生物学的发展。近年来的研究发现,癌干细胞和静止期癌细胞可能是导致肿瘤放射抗性增加和肿瘤放射治疗后复发的主要细胞学基础,有关这两种癌细胞亚群的放射敏感性及其机制的研究进展迅速,为提高肿瘤对放射治疗敏感性的措施研究提供了新的学术思路。该文将就癌细胞亚群的放射分子生物学特性,分析讨论肿瘤放射抗性的细胞学基础和相关分子机制。

【关键词】 肿瘤;肿瘤干细胞;放射抗性;DNA修复

Cancer stem cell and its relevance to tumors resistance to radiotherapy TAN Wei*, RANG Wei-qing, ZHOU Ping-kun. *Institute of Environmental Medicine and Radiation Hygiene, College of Public Health, University of South China, Hengyang 421000, China

Corresponding author: ZHOU Ping-kun, Email: zhoupk@bmi.ac.cn

【Abstract】 The gradually accumulated information and knowledge regarding cancer stem cell or stem-like cancer cell greatly potentiated the research progression of radiation oncology and biology. In recent years, a series studies have uncovered that the cancer stem cell and cancer quiescent cell could be the major cells origin attributed to the radioresistance and recurrence of tumors in the course of radiotherapy. A rapid research progression has already been achieved respecting the radiosensitivity and related mechanisms of these two subsets of cancer cells, and which provides an idea strategy for development of the measures targeting tumor radioresistance. This paper reviewed and discussed the cellular basis and molecular mechanism of the tumor radioresistance from the aspects of cancer cells subsets and the radiobiological characteristics.

【Key words】 Neoplasms; Cancer stem cells; Radioresistance; DNA repair

正常组织损伤和癌细胞放射抗性是困扰肿瘤放疗的两个非常棘手的难题,其中导致癌细胞放射抗性的可能因素主要有:①外环境或肿瘤微血管或微环境的影响,如传统放射生物学理论已经认识到的肿瘤组织乏氧;②肿瘤组织和癌细胞不均一性因素也是目前肿瘤放射生物学研究的前沿领域,其中最受关注的静止期癌细胞(quiescent cancer cell)、癌干细胞(cancer stem cell)或干细胞样癌细胞(stem-like cancer cell)亚群,被认为是肿瘤放疗失败和放疗后肿瘤复发的细胞学基础;③更多的是发生在癌细胞中的遗传和分子改变,如发生率很高的p53基因突变、DNA修复活性异常增加、细胞凋亡通

路失活等。肿瘤对放疗的敏感性既存在肿瘤组织类型的差异性,也存在个体差异性,其中,个体差异性在很大程度上由发生在癌细胞中的遗传和分子改变所决定。临床上常见部分患者经过放疗后肿瘤得到有效控制,肿瘤体积明显缩小甚至“消失”,但很快复发,这是由于还有一群具有显著放射抗性的癌细胞亚群残存下来,从而导致肿瘤快速复发。癌干细胞或干细胞样癌细胞与静止期癌细胞有可能是导致肿瘤放射抗性和肿瘤复发的癌细胞亚群,有关其放射抗性的分子机制研究也取得了明显进展。本文将就肿瘤组织中癌细胞不均一性即癌细胞亚群及其放射分子生物学特性,分析肿瘤放射抗性的细胞学基础和相关分子机制。

1 静止期癌细胞与肿瘤放射抗性

对于体外培养的增殖细胞来说,所处不同周期的细胞其放射敏感性存在一定差异,传统的放射生物学理论认为:M期最敏感,S期晚期最具抗性,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.03.012

基金项目:国家自然科学基金杰出青年基金(30825011)

作者单位:421001 湖南衡阳,南华大学公共卫生学院环境医学与放射卫生研究所(谭伟,让蔚清);100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所(周平坤)

通信作者:周平坤(Email: zhoupk@bmi.ac.cn)

延长 G1 期会增加细胞的放射抗性^[1-2]。而在实体瘤(癌)组织中除处于增殖分裂状态的细胞群体外,还存在一定比例的静止期癌细胞。正常组织中的细胞通常分布在血管周边,距离血管排列只有几个细胞层,而肿瘤组织中距离血管最远的细胞可能相距 15~20 个细胞层^[3]。很显然离血管越远的细胞的供氧和营养越缺乏。静止期癌细胞就是由于肿瘤组织的血管不发达导致癌细胞乏氧和缺乏营养,使细胞处于静止期状态^[3-4]。但是处于这种细胞状态的癌细胞只是暂停细胞分裂,能长久存活,仍然具有增殖潜能,一旦受到某些因素刺激,如放射损伤,就有可能恢复增殖活跃状态^[4-5]。同样处于非分裂状态的衰老细胞(senscence)却与静止期癌细胞有着本质差别,衰老细胞失去分裂增殖能力,能存活一定时间,且单个细胞的体积仍继续增长,因此呈现扁平巨大细胞形态。

有研究报道,相对于增殖癌细胞而言,静止期癌细胞对于 γ 或 X 射线具有明显的抗性,正因为如此,放疗后可能会有一定量的克隆性静止期癌细胞残留存活下来,其再增殖活性被触发后导致癌症复发^[2-3,6-8]。 γ 射线照射后,静止期癌细胞损伤的恢复能力显著高于增殖癌细胞,特别是具有较强的潜在致死损伤修复的能力,致使其放射抗性增加^[3,6,9-10]。除其所处肿瘤组织中的乏氧微环境外,静止期癌细胞放射抗性的发生机制目前尚不清楚。肿瘤复发的前提除静止期癌细胞不死之外,还需要被活化“唤醒”,进入细胞周期循环。视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)抑癌基因被认为是细胞周期静止的主控调节分子,Rb 蛋白能与转录因子 E2F 结合,将其由 S 期基因的激活子转换成为抑制子^[11]。在细胞 G1 期与 S 期之间的转换调节中,G1 期的细胞周期蛋白(Cyclin)和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, Cdk)复合物(如 Cyclin D/Cdk4 或 Cyclin D/Cdk6)磷酸化 Rb 蛋白,使其与 E2F 解离,被释放的 E2F 进一步激活 S 期功能基因如 Cyclin E 的表达,Cyclin E 与 Cdk4 形成复合物,推动 S 期进程。哺乳类雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是另一个调节静止期细胞的分子。P21 蛋白的持续诱导表达,导致细胞 G1 和 G2 期阻滞,并发生细胞衰老,不可逆性地失去增殖能力。如果同时用雷帕霉素抑制 mTOR 活性,就可将细胞由衰老表型转变成

为静止期表型,即一旦解除对 P21 蛋白的诱导表达,细胞又恢复增殖能力^[12]。P53 是 mTOR 的上游抑制分子,也能将 P21 诱发的 G1 和 G2 期阻滞的细胞维持在静止期细胞状态^[13]。DNA 损伤剂依托泊甙(etoposide, VP16)诱发细胞衰老而失去增殖潜能,如果同时用雷帕霉素抑制 mTOR 或采用无血清培养,同样能使细胞由衰老表型转变为静止期状态,继续保持增殖潜能^[14]。以上所提及的分子,几乎无一例外地在放射损伤细胞中都会发生改变。目前,尽管已经认识到了静止期癌细胞的放射抗性表型,但其放射抗性以及受照后是如何被激发重新进入细胞周期和获得增殖活性的分子机制尚不清楚。

2 癌干细胞与肿瘤放射抗性

对癌干细胞或干细胞样癌细胞亚群的诠释,是肿瘤细胞分子生物学研究的一大进展,同样也是肿瘤放射生物学的一个备受关注的热点问题^[15-16]。癌干细胞在癌组织细胞群体中只占很少的比例,但其具有很强的增殖能力和带有有别于其他癌细胞亚群的干细胞表面分子标志物,如乳腺癌的 CD44^{high}/CD24^{low}/lineage⁻、脑瘤、大肠癌和肺癌的 CD133⁺、头颈部鳞状细胞癌的 CD44⁺等^[17-18]。在乳腺癌组织中通常还含有其他非肿瘤细胞,故用各种可能出现的细胞的特异表面标记(统称为 lineage)来区分正常细胞(lineage⁺)和乳腺癌细胞(lineage⁻)。与静止期癌细胞不同的是,癌干细胞最靠近血管,有充足的氧和营养供给,由此可见,可能是癌干细胞的放射生物学特性决定了其放射抗性并直接影响肿瘤放疗的效果^[17,19-23]。

有研究发现,Notch 信号通路^[21]和 Wnt 信号通路^[22]的活化在胶质瘤干细胞的放射抗性中发挥了重要作用。乳腺癌干细胞中 Wnt 信号通路和编码谷胱甘肽代谢关联的基因的过量表达,也被认为是癌干细胞放射抗性的分子机制之一^[23]。目前,放射生物学领域更多地开始关注癌干细胞的 DNA 损伤信号响应和修复功能变化。另有文献报道,多形性胶质母细胞瘤 CD133 阳性的癌干细胞过量表达多梳蛋白家族成员 B 细胞特异性莫洛尼鼠白血病病毒插入位点 1(B-cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1, BMI1)蛋白,结果发现,在放射损伤后 BMI1 与 DNA 双链断裂损伤反应蛋白毛血管扩张性运动失调症突变基因组、磷酸化组

蛋白 H2AX、DNA 依赖蛋白激酶催化亚基(DNA dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs) 等相互结合共同定位在 DNA 损伤位点, 推动 DNA 修复, 这可能也是癌干细胞放射抗性的机制之一^[24-27]。Bao 等^[25]的研究报告显示, CD133 阳性的胶质瘤干细胞的 DNA 双链断裂修复和启动 DNA 损伤检查点机制的能力要显著优于癌非干细胞, 成为癌干细胞放射抗性的关键因素。但也有研究报道, 胶质瘤癌干细胞的倍增时间延长与 Chk1 和 Chk2 的活性增加是其产生放射抗性的主要因素^[27]。相反, 癌干细胞中 DNA 碱基损伤修复、单链断裂损伤修复以及磷酸化组蛋白 H2AX 的反应过程, 与非癌干细胞并无明显差别^[27]。c-myc 原癌基因活化在癌细胞中常见, Wang 等^[28]最近研究报道, 鼻咽癌干细胞中过表达的 c-myc 原癌基因蛋白通过直接与 Chk1 和 Chk2 基因启动子结合而激活其转录, 导致癌干细胞放射抗性增加。Diehn 等^[29]研究则发现, 与对照细胞群相比, 癌干细胞的抗氧化损伤即自由基清除系统的基因的表达量显著增加、其活性氧系列水平显著降低。

3 癌细胞 DNA 损伤修复改变与肿瘤放射抗性

癌细胞的内在遗传与分子改变是影响肿瘤对放疗敏感性的一个重要方面, 也是实施个性化治疗的理论依据。DNA 双链断裂损伤是电离诱发细胞最为严重的分子损伤类型, 是照射细胞凋亡的直接原因, 如早期研究已表明, DNA 双链断裂损伤残留是决定细胞放射敏感性的一个重要分子指标^[30-31]。虽然有不少的研究报道癌细胞中存在某种 DNA 修复缺陷, 导致基因组不稳定性, 但近年来, 也有一系列研究显示, DNA 双链断裂修复蛋白如 DNA-PKcs 在多种类型肿瘤组织中异常高表达, 而且在具有高转移特性和放射抗性的癌细胞中的表达活性更高^[32-38]。López 等^[36]通过基因表达分析发现, 由于包括 DNA-PKcs 在内的多个 DNA 双链断裂修复基因的表达增强, 导致宫颈癌干细胞样癌细胞亚群的放射抗性增加。

应用特异的 RNA 干扰技术使 DNA-PKcs 的表达下降, 可以显著提高癌细胞对 γ 射线的敏感性, 减慢癌细胞的生长速度和接种裸鼠后形成肿瘤的生长速度^[39-40]。还可通过 Akt/GSK 3 β 信号通路调节 c-myc 蛋白稳定性抑制 DNA-PKcs 的表达和活性, 使

癌组织 c-myc 蛋白表达水平显著降低^[40]。DNA-PKcs 沉默或活性受到抑制的细胞, 其 DNA 损伤诱发的 M 期阻滞的时间显著延长、有丝分裂退出或胞质分裂失败, 最终发生有丝分裂灾难死亡^[34]。还有报道, 未分化的间充质干细胞与被诱导分化为成骨细胞相比, 其放射抗性显著增加, 可能与间充质干细胞核内磷酸化 DNA-PKcs 和它的一个复合物蛋白 Ku70 的增加有关^[41]。上述研究表明, DNA-PKcs 是研发增加癌细胞放射敏感性药物的理想靶标之一。

当然, 也有研究报道, 干细胞样癌细胞的放射敏感性比非干细胞更高^[42], 由此可见, 癌干细胞与癌细胞放射抗性之间并非是一个固定不变的关系。进一步确证具有放射抗性特征的癌细胞亚群, 揭示其放射抗性的分子机制, 是当今肿瘤放射生物学研究的前沿之一, 将为研发针对放射抗性癌细胞亚群的放射增敏新措施提供新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Sinclair WK, Morton RA. X-ray sensitivity during cell generation cycle of cultured chinese hamster cells. *Radiat Res*, 1966, 29(3): 450-474.
- [2] Ahsan A, Himiker SM, Davis MA, et al. Role of cell cycle in epidermal growth factor receptor inhibitor-mediated radiosensitization. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 5108-5114.
- [3] Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol*, 2004, 14(3): 198-206.
- [4] Kyle AH, Baker JH, Minchinton AI. Targeting quiescent tumor cells via oxygen and IGF-I supplementation. *Cancer Res*, 2012, 72(3): 801-809.
- [5] Blagosklonny MV. Cell cycle arrest is not senescence. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(2): 94-101.
- [6] Masunaga S, Matsumoto Y, Kashino G, et al. Significance of manipulating tumour hypoxia and radiation dose rate in terms of local tumour response and lung metastatic potential, referring to the response of quiescent cell populations. *Br J Radiol*, 2010, 83(993): 776-784.
- [7] Masunaga S, Hirayama R, Uzawa A, et al. Influence of manipulating hypoxia in solid tumors on the radiation dose-rate effect in vivo, with reference to that in the quiescent cell population. *Jpn J Radiol*, 2010, 28(2): 132-142.
- [8] Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, et al. Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(1): R13.
- [9] Masunaga S, Nagasawa H, Liu Y, et al. Evaluation of the radiosensitivity of the oxygenated tumor cell fractions in quiescent cell populations within solid tumors. *Radiat Res*, 2010, 174(4): 459-466.

- [10] Rockwell S, Liu Y, Seow HA, et al. Preclinical evaluation of Laromustine for use in combination with radiation therapy in the treatment of solid tumors. *Int J Radiat Biol*, 2012, 88(3): 277–285.
- [11] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5): 646–674.
- [12] Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, et al. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle*, 2009, 8(12): 1888–1895.
- [13] Demidenko ZN, Korotchkina LG, Gudkov AV, et al. Paradoxical suppression of cellular senescence by p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(21): 9660–9664.
- [14] Leontieva OV, Blagosklonny MV. DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive reactivation of mTOR is associated with conversion to senescence. *Aging (Albany NY)*, 2010, 2(12): 924–935.
- [15] Ogawa K, Yoshioka Y, Isohashi F, et al. Radiotherapy targeting cancer stem cells: current views and future perspectives. *Anti-cancer Res*, 2013, 33(3): 747–754.
- [16] Chargari C, Moncharmont C, Lévy A, et al. Cancer stem cells, cornerstone of radioresistance and perspectives for radiosensitization: glioblastoma as an example. *Bull Cancer*, 2012, 99(12): 1153–1160.
- [17] Yoon SK. The biology of cancer stem cells and its clinical implication in hepatocellular carcinoma. *Gut Liver*, 2012, 6(1): 29–40.
- [18] Li Y, Lathera J. Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes?. *Cancer Res*, 2012, 72(3): 576–580.
- [19] Lopez J, Poitevin A, Mendoza-Martinez V, et al. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): e48.
- [20] Piao LS, Hur W, Kim TK, et al. CD133⁺ liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 2012, 315(2): 129–137.
- [21] Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells*, 2010, 28(1): 17–28.
- [22] Kim Y, Kim KH, Lee J, et al. Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Lab Invest*, 2012, 92(3): 466–473.
- [23] Nguyen NP, Almeida FS, Chi A, et al. Molecular biology of breast cancer stem cells: potential clinical applications. *Cancer Treat Rev*, 2010, 36(6): 485–491.
- [24] Facchino S, Abdouh M, Chato W, et al. BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J Neurosci*, 2010, 30(30): 10096–10111.
- [25] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006, 444(7120): 756–760.
- [26] Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells*, 2010, 28(4): 639–648.
- [27] Ropolo M, Daga A, Griffiro F, et al. Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(3): 383–392.
- [28] Wang WJ, Wu SP, Liu JB, et al. MYC regulation of CHK1 and CHK2 promotes radioresistance in a stem cell-like population of nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res*, 2013, 73(3): 1219–1231.
- [29] Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 780–783.
- [30] Zhou PK, Sun WJ, Sui JL, et al. DNA double-strand breaks repair and prediction of radioresistance of tumor cells. *Chinese Medical J*, 1997, 110(9): 672.
- [31] Zhou PK, Sproston ARM, Marples B, et al. The radioresistance of human fibroblast cell lines correlates with the residual levels of DNA double-strand breaks. *Radiother Oncol*, 1998, 47(3): 271–276.
- [32] Facompre N, Nakagawa H, Herlyn M, et al. Stem-like cells and therapy resistance in squamous cell carcinomas. *Adv Pharmacol*, 2012, 65: 235–265.
- [33] 余子建, 徐勤枝, 周丽君, 等. 肝癌组织 DNA-PKcs 过量表达及其靶向 siRNA 分子的抗增殖作用. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(36): 3815–3821.
- [34] Shang ZF, Huang B, Xu QZ, et al. Inactivation of DNA-dependent protein kinase leads to spindle disruption and mitotic catastrophe with attenuated Chk2 phosphorylation in response to DNA damage. *Cancer Research*, 2010, 70(9): 3657–3666.
- [35] Lee SW, Cho KJ, Park JH, et al. Expressions of Ku70 and DNA-PKcs as prognostic indicators of local control in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 62(5): 1451–1457.
- [36] López J, Poitevin A, Mendoza-Martinez V, et al. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*, 2012, 12: 48.
- [37] Willmore E, Elliott SL, Mainou-Fowler T, et al. DNA-dependent protein kinase is a therapeutic target and an indicator of poor prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(12): 3984–3992.
- [38] Beskow C, Skikuniene J, Holgersson A, et al. Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86. *Br J Cancer*, 2009, 101(5): 816–821.
- [39] An J, Xu QZ, Sui JL, et al. Silencing of DNA-PKcs alters the transcriptional profile of certain signal transduction genes related to proliferation and differentiation in HeLa cells. *Int J Mol Med*, 2005, 16(3): 455–462.
- [40] An J, Xu QZ, Sui JL, et al. Down-regulation of c-myc protein by siRNA-mediated silencing of DNA-PKcs in HeLa cells. *Int J Cancer*, 2005, 117(4): 531–537.
- [41] Oliver L, Hue E, Séry Q, et al. Differentiation-related response to DNA breaks in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2012, 31(4): 800–807.
- [42] Kim SY, Rhee JG, Song X, et al. Breast cancer stem cell-like cells are more sensitive to ionizing radiation than non-stem cells: role of ATM. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50423.