

上皮间充质转化促进肿瘤细胞 干性获得的研究进展*

蔚帅帅¹⁾ 马晓娟¹⁾ 林碧华²⁾ 李继霞²⁾ 周克元^{1, 2)**}

(¹⁾广东医学院广东省医学分子诊断重点实验室, 东莞 523808; (²⁾广东医学院生物化学和分子生物学研究所, 东莞 523808)

摘要 上皮间充质转化是上皮细胞丢失细胞极性和细胞黏附, 而获得间充质细胞迁移和侵袭特性的生物学过程. 肿瘤干细胞是存在于肿瘤中具有自我更新和异质性分化能力的一小群细胞, 在肿瘤的发生发展过程中起重要的作用. 上皮间充质转化(EMT)与肿瘤的转移密切相关, 而近几年的研究表明, EMT 也可以促进肿瘤细胞获得干细胞的特性, 因此使肿瘤治疗更困难, 本文对 EMT 促肿瘤干细胞形成机制及其对临床治疗意义的研究进展作一综述.

关键词 上皮间充质转化, 肿瘤干细胞, 干性, 耐药

学科分类号 Q5, Q7, R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00359

第一届国际上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)会议对 EMT 正式定义: 上皮细胞经历各种生物化学改变以获得间充质细胞表型^[1]. 上皮细胞主要构成上皮组织, 拥有游离面-基底面的极性和紧密的细胞间连接, 发生 EMT 之后, 由多边形变为梭形的纤维细胞样形态, 极性消失、黏附下降以及细胞骨架重构, 从而获得间充质细胞的迁移和侵袭以及抵抗凋亡的生物学特性, 还可使肿瘤细胞获得干细胞的特性^[2]. 从分子生物学水平上看, EMT 是多种生长因子共同调节, 通过多条信号通路信号转导、活化不同的核内转录因子、最终调节基因表达过程, 其中 E-cadherin 的丢失或表达下调是其主要特点^[3]. 所以 EMT 既是细胞去分化的过程, 又是细胞形态和行为重塑的过程.

EMT 最初是在胚胎形成过程中发现的, 在人胚胎干细胞分化过程中起着关键作用, 后来发现在组织修复再生、器官纤维化和肿瘤形成时也会被重新激活^[4]. 在上皮来源的恶性肿瘤发生发展及治疗的过程中, EMT 参与肿瘤干细胞的形成、肿瘤转移、肿瘤细胞抗放化疗及抗凋亡、肿瘤细胞的免疫逃逸及免疫抑制等多个环节^[5], 其中大量的文献表明, EMT 与肿瘤转移尤其是转移早期密切相关,

而在最近几年涌现出大量 EMT 与肿瘤干细胞形成的研究, 证明 EMT 对转移晚期肿瘤克隆形成所需的干细胞特性获得也有作用, 本文旨在综述这方面的研究.

1 EMT 促进肿瘤细胞获得干性

肿瘤发生的原因一直是医学界热议的话题, 随着近几年多种肿瘤组织和癌细胞系中肿瘤干细胞得到成功的分离和鉴定, 肿瘤干细胞学说不断得到证明. 肿瘤干细胞学说认为, 肿瘤实际上是由一小群具有无限自我更新能力和异质性分化能力的干细胞样细胞及其产生的分化程度不均一的细胞团组成, 而其中的这一小群细胞被称为肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC). 在肿瘤干细胞鉴定的实际实验中, 都是功能性的定义, 或者说是从操作可行

* 国家自然科学基金资助项目(81272434), 国家自然科学基金青年项目(81201710), 广东省自然科学基金资助项目(S2012010008259)和广东医学院建博科技创新团队项目(STIF201105).

** 通讯联系人.

Tel: 0759-2388581, E-mail: kyzhou@gdmc.edu.cn

收稿日期: 2013-07-31, 接受日期: 2014-03-21

性上进行定义的, 通过肿瘤干细胞的标志物或者标志物组合体, 结合体外成球实验和体内致瘤实验, 来鉴定和分离肿瘤干细胞, 所以又称肿瘤起始细胞. 虽然所谓的肿瘤干细胞已鉴定, 但肿瘤干细胞的真正来源是肿瘤学界一直无法解决的难题, 存在多种猜测, 比如有人认为肿瘤干细胞是正常的成体干细胞、祖细胞以及残留的静止胚胎干细胞甚至体细胞基因突变所致, 也有人认为是细胞融合或者细胞与某些病毒融合而成. 而 2008 年 Mani 等^[2]的研究为肿瘤干细胞来源的研究指引了新的方向, 他们通过转染 Snail 和 Twist, 或者加入 TGF β 培养, 使永生化的正常乳腺上皮细胞和肿瘤细胞发生 EMT 之后, 获得 CD44^{high}/CD24^{low} 表型的细胞, 发现 CD44^{high}/CD24^{low} 细胞丢失上皮细胞标志物且表达间充质细胞标志物, 而普遍认为表达的 CD44^{high}/CD24^{low} 细胞是正常乳腺干细胞或者乳腺肿瘤干细胞, 通过体外成球实验和流式细胞技术证实了 CD44^{high}/CD24^{low} 细胞的自我更新能力和异质分化能力 (CD44^{high}/CD24^{low} 细胞可以分裂生成 CD44^{low}/CD24^{high}, 反过来则不可以), 通过老鼠体内致瘤实验证明 CD44^{high}/CD24^{low} 细胞群引发肿瘤的能力更强, 证明 EMT 可以使正常细胞和肿瘤细胞获得干性. 而随后同样是在乳腺癌中, Morel 等^[6]的研究得出了相似的结论, 通过激活 Ras/MAPK 信号通路, 使得非肿瘤干细胞 CD44^{low}/CD24^{high} 发生 EMT, 转变成肿瘤干细胞 CD44^{high}/CD24^{low}, 后续也有大量的文献表明乳腺癌中 EMT 与肿瘤干细胞的形成密切相关.

在其他肿瘤中, EMT 与肿瘤干细胞的形成也有关系. Kirkland^[7]证实, 在人结直肠癌中, 加入 I 型胶原蛋白培养的多种结直肠癌细胞发生 EMT 样的变化, 同时抑制癌细胞的分化, 促进干性基因 Bim1 和结直肠癌干性标记 CD133 的表达. Snail 的过表达也会促使结直肠癌细胞 EMT 并获得干性^[8]. Wellner 等^[9]也在结直肠癌中证明, EMT 激活因子 ZEB1 使肿瘤细胞获得肿瘤起始能力, 他们在胰腺癌中得到了同样的结论. Pinho 等^[10]发现 p53 同时调控着正常胰腺细胞的生长、EMT 和干性. 在肺癌中, Oct4 和 Nanog 的共表达诱导 EMT 的发生和肿瘤干细胞特性, 同时也加强肿瘤细胞的恶性和减少了小鼠的平均生存时间^[11]. Giannoni 等^[12]在前列腺癌中找到支持这一点的证据, 他们发现, 肿瘤相关的成纤维细胞诱导的 EMT, 加强了前列腺癌细胞干性标志物的表达, 同时提高肿瘤细胞成球能力和自我更新. Albino 等^[13]发现 ESE3/EHF 的丢失也导致 EMT 的发生, 且诱导前列腺癌细胞获得干性和肿瘤起始能力以及转移能力. Chen 等^[14]发现在头颈鳞癌中, CD133/Src 信号通路是 EMT 和干性共同调节者. Qiao 等^[15]和 Zhu 等^[16]分别发现 BMP-4 和 Snail 介导的 EMT 使得口腔鳞状癌细胞获得干细胞表型. Chao 等^[17]对上皮性卵巢癌的研究表明, LMX1A 阻止 EMT 和干性的获得以及肿瘤的形成. Yasui 等^[18]发现 Snail 可诱导甲状腺癌的 EMT 和肿瘤干细胞的形成. 各类癌症(表 1)的实验都证明 EMT 可以促进肿瘤细胞获得干性, 而且有可能是肿瘤干细胞的来源之一.

Table 1 Activators and repressor associated with stemness in different cancers

表 1 各类癌症中肿瘤细胞干性获得和抑制分子

癌症类型	促进干性的分子	抑制干性的分子	参考文献
乳腺癌	TGF β 、Snail、Twist、ATF3、SOX2、HIF-1 α 、miR-21	miR-34c	[2, 19-23]
结直肠癌	I 型胶原蛋白、Snail、ZEB1	Dickkopf-1	[7-9, 24]
胰腺癌	ZEB1、Notch1	miR-34a	[9, 25-26]
肺癌	Oct4 和 Nanog、TGF β 1、	miR-145	[11, 27-28]
口腔鳞状癌	BMP-4、Snail		[15-16]
卵巢癌		LMX1A	[17]
甲状腺癌	Snail		[18]
前列腺癌	SOX2		[20]
胃癌	Wnt5a		[29]
肝癌	TGF β 、Sonic hedgehog、miR-216a/217		[30-31]

2 EMT 促进肿瘤干细胞形成的分子机制

上述大量文献表明发生 EMT 的细胞获得干性, 说明 EMT 与肿瘤干细胞的干性获得拥有某些相同的分子基础, 共享某些信号通路, 最终调节某些相同的基因. 其中 TGF β 是最主要的调节因子, 也与其他干细胞特性保持所需的信号通路都有相互作用, 如 Wnt、Hedgehog 和 Notch 信号通路等, 再加上 miRNA 的调节, 共同诱导 EMT, 并促使肿瘤细胞获得干性.

2.1 TGF β 信号通路

转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF β)在肿瘤的形成过程中具有双重作用, 在肿瘤形成早期抑制生长、诱导分化和促进凋亡, 而在晚期 TGF β 表达过多就会促进 EMT 的发生, 促使肿瘤的浸润、转移和干性的获得. 在 TGF β 诱导 EMT 的过程中, TGF β -Smad 是主要的信号通路, 其他非 Smad 介导的信号通路也有参与. TGF β 与 TGF β I 型和 II 型受体形成四聚体复合物, 其中 II 型受体磷酸化激活 I 型受体, 然后 I 型受体活化受体调节型的 Smad(Smad2/3), 活化的 Smad2/3 与共结合型的 Smad4 形成复合物, 因 Smad 复合物本身与 DNA 亲和力不强, 只能进入细胞与其他转录因子结合, 包括共刺激者(β -catenin、AP-1、SP1 和 HMGA2)和共抑制者(Snail、Zeb1 和 Zeb2), 才能定位于染色体, 刺激(PAI-1、 α -SMA、Vimentin、ET-1、c-jun 和 Snail)或者抑制(Cxadr、Cdh1、Occln、Cldn3 和 Cldn4)TGF β 靶基因的转录, 从而促进 EMT 的发生(图 1)^[32-33].

最近研究发现, TGF β 信号通路诱导的 EMT 增加了肿瘤细胞的干性. Yin 等对乳腺癌的研究表明, TGF β 诱导产生的 ATF3(activating transcription factor 3)可以上调 Snail、Slug 和 Twist 以及间充质细胞标志物的表达, 同时增加了细胞的移动性, 异位表达 ATF3 可以增加乳腺肿瘤干细胞即 CD44^{high}/CD24^{low} 细胞的比例、细胞的成球能力和体外致瘤性. Wu 等^[34]证明, 诱导 EMT 的转录因子 Twist1, 可以直接激活 Bim1, Bim1 是干细胞干性和自我更新能力保持所需的重要基因. Pirozzi 等^[27]用 TGF β 长期培养非小细胞肺癌的细胞株, 发现细胞丢失了上皮形态而变成成纤维细胞样的形态, 细胞角蛋白、E-钙黏蛋白和 CD326 表达下调, 波形蛋白和 CD90 表达上调, 同时干性基因如 Oct4、Nanog、Sox2、c-kit 和 CD133 等呈现高表达状态,

而且 TGF β 处理过的细胞在重症联合免疫缺陷型大鼠身上起始肿瘤的能力也明显增强. Farabaugh 等^[35]发现, 一个正常发育过程中的调节者 Six1, 同时也在许多肿瘤中高表达, 可以通过 Eya2 来诱导 TGF β 的表达, 从而诱导 EMT 和干性的获得. Zubeldia 等^[36]对结肠癌的研究证明, TGF β 1 促进老鼠原发性癌的生长和肝脏转移, 而 P144 全身性治疗会对 TGF β 1 这种效果有很明显的抑制作用, 同时在体外用 P17 培养 TGF β 1 预处理的结肠癌细胞的成球能力下降且干性标志物 CD44 和 SOX2 表达也降低.

2.2 Wnt 信号通路

Wnt 信号通路不仅参与 EMT, 同时也调节干细胞的自我更新和维持成体组织的稳定. 经典的 Wnt 信号通路是 Wnt 配体(主要是 Wnt1 和 Wnt3a)和受体结合(包括 Frizzled 和 LDL 受体相关蛋白 LRP5 或者 LRP6), 然后将信号传递给 Dishevelled (Dvl), Dvl 会抑制糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3beta, GSK-3 β)的活性. 在没有 Wnt 信号的情况下, GSK-3 β 与 Axin、结肠腺瘤性息肉病蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)共同组成一个破坏性复合物, 主要是 GSK-3 β 磷酸化 Wnt 信号的传递者 β -catenin, 然后通过泛素化, 最后被蛋白酶体摄取降解. 当 Wnt 信号抑制 GSK-3 β , β -catenin 在胞浆内会稳定并积累, 然后进入细胞核与 TCF/LEF(lymphoid enhancer factor)转录因子形成复合物, 从而调节 Wnt 靶基因的转录, 如乳腺癌肿瘤干细胞的标志物 CD44(图 1)^[37]. 国内 Li 等^[20]的研究发现, 干性基因 SOX2 可以直接结合在 β -catenin 基因的启动子区域, 促进其表达, 通过 Wnt 信号通路诱导乳腺癌细胞和前列腺细胞 EMT.

Wnt 信号通路可促进 EMT, 也可以促进干性的获得. DiMeo 等^[38]利用乳腺癌肺转移模型, 证明在肺转移的早期, Wnt 信号通路的很多分子高表达, 而通过 LRP6 抑制 Wnt 信号通路时, 上皮分化的标志物重新表达, 且 EMT 的转录因子 Slug 和 Twist 受到抑制, 肿瘤细胞的自我更新能力和体内致瘤性均下降. Qi 等^[24]对 217 份结肠癌标本的免疫组化染色发现, Dickkopf-1 的表达与 β -catenin 和波形蛋白的表达呈负相关, 与 E-钙黏蛋白的表达呈正相关, 在细胞模型上证明了 Dickkopf-1 可以使得结肠癌细胞恢复上皮细胞的表型, 抑制 Snail、Twist 以及结肠干细胞标志物 CD133 和

Lgr5 的表达. Kanzawa 等^[29]的研究为 Wnt 参与 EMT 提供了直接的证据, Wnt5a 在 66% 胃癌患者的癌巢外周高表达, 且在细胞模型上证明 Wnt5a 促进 EMT 和肿瘤干细胞特性的保持.

2.3 Hedgehog 信号通路

Hedgehog 信号通路主要参与胚胎正常发育和出生后一些器官修复的调控, 在哺乳动物体内存在三种 Hedgehog 同源物 Desert hedgehog、Indian hedgehog 和 Sonic hedgehog(SHH), 其中对 SHH 的研究是最多的. Sonic hedgehog 转录翻译之后, 去掉羧基端的非信号区域, 然后被脂化分泌, 与细胞膜上 Patched-1(PTCH1)结合, 在没有 SHH 信号时, PTCH1 会抑制 Smoothed(SMO), 最后导致 GLI (激活型 GLI1, 抑制型 GLI3 和 GLI2)转录因子的激活, 启动或者抑制靶基因的转录^[30](图 1). 有实验表明, GLI1 可以直接绑定 Snail1 的启动子, 上调 Snail 的表达, 促进 TGF β 诱导的 EMT, 促进肝细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭^[30]. Wang 等^[40]的研究证明, GLI1 也可以结合 Bmi1 的启动子, 上调 Bmi1 的表达, 且在浸润型的脑肿瘤中过表达, 促进脑肿瘤起始细胞特性的保持. Maitah 等^[41]对两种非小细胞肺癌细胞株的研究得出相似的结论, 细胞经 TGF β 长期培养, 参与 SHH 信号通路的 mRNA 和蛋白上调, 细胞移动和浸润能力加强, 而通过药物和 siRNA 抑制 SHH 后, 逆转了 EMT 的表型, E-钙黏蛋白表达上升, 间充质细胞的标志物 ZEB1 和纤连蛋白表达下调, 明显减弱了 TGF β 诱导的 EMT. Hao 等^[42]研究发现, 通过抑制 Hedgehog 信号通路可以有效地抑制细胞的增殖, 同时通过抑制 PI3K/AKT 信号通路而诱导细胞凋亡, 还可抑制 Snail 和 Slug 的激活而抑制 EMT 和转移的发生. 合适浓度 (20 mg/kg) 的萝卜硫素 (sulforaphane, SFN), 一种十字花科蔬菜的成分, 可以抑制 Smo、Gli1 和 Gli2 表达, 明显下调 Zeb1 的表达, 同时也抑制多能性保持所需转录因子 Nanog 和 Oct-4 的表达, 还能抑制从人体分离的胰腺肿瘤干细胞在裸鼠身上的生长^[43]. 有文献报道姜黄素 (curcumin) 也可以逆转 Hedgehog 信号通路所致 TGF β 诱导的胰腺癌 EMT^[44]. ElKhatib 等^[45]的研究证明, SHH 配体在胆管癌细胞株和 89% 的人类胆管癌组织标本中高表达, 环巴胺和 5E1 可以有效地下调 GLI1 和 GLI2 的表达, 在体内外均可抑制 E-钙黏蛋白的表达, 减少细胞有丝分裂, 从而抑制增殖和转移.

2.4 Notch 信号通路

Notch 信号通路的主要功能是保持胚胎细胞与成体细胞增殖与分化的动态平衡, 介导相邻细胞之间的相互作用. 在没有 Notch 信号时, Notch 的靶基因被一个抑制性复合物 CSL(C protein binding factor 1/Suppressor of Hairless/Lag-1)抑制. 当一个细胞上跨膜复合物即 Notch 的配体 Delta-like (Dll-1、Dll-3、Dll-4)和 Jagged (Jagged-1、Jagged-2)与另一个细胞膜的 Notch 受体蛋白结合后, Notch 就会被金属蛋白酶 TACE(tumor necrosis factor- α -converting enzyme)和 γ -分泌酶分别裂解为 Notch 胞外区域和 Notch 胞内区域(Notch-IC), Notch 胞内区域会进入细胞核与 CSL 结合, 然后募集转录激活因子, 共同形成 Notch-CSL 复合物, 直接激活 Notch 靶基因的表达, 包括 Hes 家族和 Hey 家族 (图 1)^[46]. Chen 等^[22]研究发现, 在低氧条件下, 乳腺癌细胞中 Notch 靶基因 Hes1 和 Hey1 表达升高, EMT 的转录因子 Snail 和 Slug 也升高, 且低氧诱导因子 HIF-1 α 可以直接结合 Hes1 的启动子, 用 shRNA 敲除 HIF-1 α 时, Hes1 和 Hey1 表达都下调, 当抑制 Notch 信号时, 低氧诱导的 Snail 和 Slug 表达下调, E-钙黏蛋白的表达恢复, 迁徙和浸润能力也下降, 说明低氧诱导的 EMT 依赖于 Notch. 低氧还可以通过 Jagged-2 来激活 Notch 信号, 促进细胞存活和 EMT, 并且明显增加肿瘤干细胞样的细胞即 CD24-CD44⁺ESA⁺ 细胞群^[47]. Bao 等^[25]直接证明, Notch1 过表达可以诱导胰腺癌细胞 EMT 和肿瘤干细胞的表型, 包括 EMT 标志物 ZEB1 表达上升和 miR-200b、miR-200c 下调, 同时干细胞标志物 CD44 和 EpCAM 随着成球增加而表达上升. 而 Notch3 却可以介导鳞状上皮的分化, 抑制表达 ZEB 的细胞扩增, 当 DNMA11 (dominant-negative Mastermind-like 1) 抑制 Notch3 引起 EMT 细胞成分 ZEB 上调, miRNA200 家族成员的表达也下降, 抑制食管细胞的分化, 促进非依赖锚定的生长和在裸鼠上肿瘤的形成^[48].

2.5 miRNA 的调节

近几年来, 对 miRNA(miR)的研究可谓是如火如荼, 也有大量的 miRNA 参与 EMT 和干性的调节. 研究较为热门的是 miR-200 家族和 ZEB 蛋白家族的双负反馈循环, 两者互为抑制, EMT 转录因子 ZEB(ZEB1 和 ZEB2)可与 E-钙黏蛋白基因 Cdh 的启动子区域的 E-box 结合抑制其表达, 而

miR-200 则可抑制干性基因 *Bmi1* 的表达, miR-200/ZEB 反馈也通过 *Jagged-1* 参与对 Notch 的信号通路的调节^[49], 以及 p53 也可以直接结合 miR-200c 的启动子激活其表达^[50]. 除此之外还有很多 miRNA 参与抑制肿瘤浸润转移和干性获得的调节. miR-194 可以直接与 *Bmi1* 3'端的非翻译区结合, 上调间充质表型的浸润子宫内膜癌细胞的 E-钙黏蛋白表达和抑制波形蛋白的表达, 同时也降低干性标志物和化学抵抗标志物(SOX-2、KLF4 和 MRP-1)表达^[51]. miR-34c 抑制乳腺癌肿瘤细胞自我更新和 EMT, 而且通过甲基化乳腺癌肿瘤起始细胞 *Notch4* 基因启动子而抑制了其表达, 从而抑制转移^[21]. miR-34a 抑制胰腺癌细胞 EMT 和自我更新的作用, 同时可以激活半胱天冬酶促进细胞凋亡^[26]. Chiou 等^[28]研究证明, miR-145 的表达也能抑制 EMT, 同时与胰腺癌标本中 Oct4、Sox2 和 Fascin1 的表达呈负相关, 而且分选出 CD133⁺ 的干细胞中 miR-145 呈现低表达. 与此同时, 也有大量 miRNA 则是促进 EMT 的发生和肿瘤干细胞的生成. miR-21 通过 EMT 促进肿瘤转移和乳腺癌干细胞标志物 ALDH1 和 CD44 表达, 通过抑制 AKT 和 ERK1/2 信号通路上调 PTEN, 则可以逆转 miR-21 的促 EMT 和肿瘤干细胞表型的作用^[23].

miR-216a/217 通过靶向下调 PTEN 和 *Smad7* 诱导肝细胞癌细胞的 EMT、迁徙转移和干细胞特性, 且正反馈调节 TGFβ 和 PI3K/Akt 信号通路导致获得对索菲拉尼的药物抵抗^[31]. Wang 等^[52]研究证明, miR-125b 可以增加具有干细胞特性和自我更新能力的边群细胞数目, 还可以促进 EMT 标志物表达的上升.

3 阻止 EMT: 抑制肿瘤干细胞的治疗耐受

3.1 EMT 促进肿瘤干细胞抵抗治疗

EMT 在促进肿瘤干细胞形成的同时, 还赋予其对放化疗的抵抗能力. Du 等^[53]发现, 能抵抗化疗的胰腺癌细胞表达 EMT 的标志物, 同时表达某些干性基因(Oct4、ABCG2、CD24 和 CD133), 这直接建立了化疗抵抗诱导的 EMT 和肿瘤干细胞的联系. 原发和转移的上皮源性卵巢癌通过顺铂治疗后的残余细胞和顺铂处理后细胞, *Snail*、*Slug*、*Twist* 和 *MMP-2* 的 mRNA 的表达都显著上升, 肿瘤干细胞的表面标志物 CD44、α2 整合素亚单位、CD117、CD133、EpCAM 以及干细胞因子 *Nanog* 和 Oct-4 的表达也都上升, 表明 EMT 后的肿瘤干细胞样细胞获得对顺铂的抵抗^[54]. *Snail* 和 *Slug* 共同调节卵巢癌细胞某些基因的表达, 促进干细胞样表型的获得, 并通过对抗 p53 介导的凋亡确保细胞在放射治疗和紫杉醇的作用下仍然存活^[55]. *Notch2* 和 *Jagged-1* 的结合, EMT 表型和干细胞样表型获得的同时, 也促进了胰腺癌细胞对吉西他滨的抵抗^[56]. *Dll4/Notch* 信号通路的激活加强了 EMT 表型和肿瘤干细胞的生成, 甚至加强了体外胰腺导管癌细胞的多药物抵抗^[57]. 可以看出, EMT 通过各种机制促进肿瘤干细胞的生成, 直接使恶性肿瘤得到“进化”, 抵抗放化疗, 迫使更有效的抗癌策略更新.

3.2 阻止 EMT: 抑制治疗耐受

随着各种抗 EMT 机制研究的增加, 也促生了大量对抵抗 EMT 的研究, 各种靶向治疗药层出不穷, 结合传统的化疗药物和放射治疗, 在体内外实验中证明有效. 多柔比星激活 TGFβ 信号通路, 可以诱导 EMT, 促进鼠和人乳腺癌细胞浸润和干细胞表型的产生, 当与 TGFβ 受体激酶抑制剂联合使用, 加强抑制肿瘤的生长和乳腺癌鼠模型肺转移的效果^[58]. NVP-LDE-225 是一种 Smo 的抑制剂, 可以抑制 Hedgehog 信号通路, 通过抑制 miR-200 家族抑制 N-cadherin、*Snail*、*Slug* 和 *Zeb1*, 上调

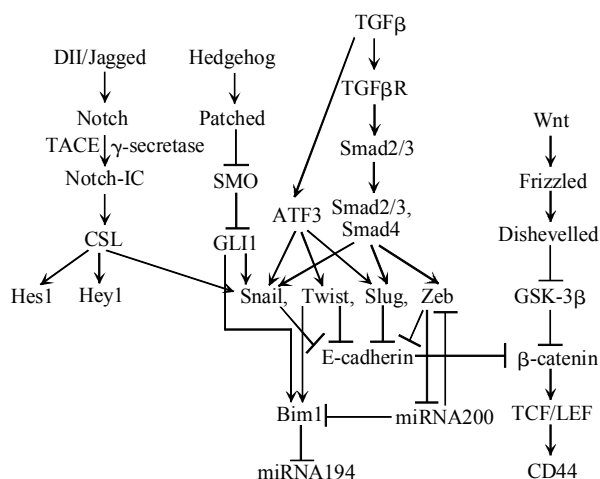


Fig. 1 Multiple signaling pathways can contribute to EMT generating cells with properties of stem cells^[19, 32-33, 37, 39, 46]

图 1 EMT 促进肿瘤细胞获得干性信号通路简图^[19, 32-33, 37, 39, 46]

TACE: 肿瘤坏死因子α转化酶(tumor necrosis factor-α converting enzyme); TGFβ: 转化生长因子(transforming growth factor-β); TGFβR: 转化生长因子受体(transforming growth factor-β receptor); E-cadherin: E-钙粘蛋白; ATF3: 转录激活因子(activating transcription factor 3); GSK-3β: 糖原合成酶激酶 3β(glycogen synthase kinase-3β); β-catenin: β 连环蛋白.

E-钙黏蛋白的表达; 通过上调 miR-128 抑制干性基因 Bmi1; 同时可以抑制多能性保持因子 Nanog、Oct-4c-Myc 和 Sox-2, 可以抑制细胞活力和肿瘤干细胞球的形成; 还可以诱导促凋亡基因 Bax 和 Bak, 抑制 Bcl-2、Bcl-XL、XIAP、cIAP1、cIAP2 和存活素, 从而促进凋亡^[59]。Sharma 等^[60]的研究则更为惊人, 抗 Notch 配体结合区的单克隆抗体在体外实验中, 可以不可逆地抑制假定乳腺癌肿瘤干细胞(CD44⁺CD24⁻表型的细胞)的形成, 且兼有抑制增殖和诱导凋亡的作用。以上多种实验证明, 在体外实验中, 靶向 EMT 抑制肿瘤干细胞的形成, 再结合传统治疗手段, 可以更有效地抑制细胞增殖和转移。

4 问题与展望

EMT 促进肿瘤的转移, 这不仅是简单的肿瘤细胞从一个地方转移到另一个地方增殖, 还增加了肿瘤细胞的干性和抵抗治疗的特性, 意味着 EMT 与临床肿瘤分级密切相关, 也就是说转移增加了肿瘤的恶性程度和难治性。虽然 EMT 可以促进肿瘤细胞获得干性, 但发生 EMT 后形成的肿瘤干细胞是原发性肿瘤的起始肿瘤干细胞, 还是转移性肿瘤干细胞尚无定论, 很多人更偏向于后者; 或者说在某些高转移癌或者肿瘤的复发过程中, 起始肿瘤干细胞和转移性肿瘤干细胞就是同一种细胞, 即发生 EMT 的细胞, 也就是说 EMT 可能是肿瘤干细胞的来源之一, 这个问题仍待研究。虽然体外实验证明很多药物有抑制 EMT 的作用, 但因很多通路都是正常发育和组织稳态维持所必须, 具有共性, 以及药物开发困难, 所以靶向 EMT 治疗策略走向临床还需要一定的时间。综上所述, EMT 在肿瘤发展进程中起着不可忽视的作用, 但是能有效遏制 EMT 杀灭肿瘤干细胞, 并可以运用于临床的治疗手段还有待继续研发, 这方面的研究在未来有着不可估量的前景。

参 考 文 献

- [1] Kalluri R, Neilson E G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*, 2003, **112**(12): 1776-1784
- [2] Mani S A, Guo W, Liao M J, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008, **133**(4): 704-715
- [3] Huber M A, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, **17**(5): 548-558
- [4] Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*, 2009, **119**(6): 1417-1419
- [5] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, *et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, **139**(5): 871-890
- [6] Morel A P, Lievre M, Thomas C, *et al.* Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 2008, **3**(8): e2888
- [7] Kirkland S C. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer*, 2009, **101**(2): 320-326
- [8] Fan F, Samuel S, Evans K W, *et al.* Overexpression of Snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med*, 2012, **1**(1): 5-16
- [9] Wellner U, Schubert J, Burk U C, *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(12): 1487-1495
- [10] Pinho A V, Rooman I, Real F X. p53-dependent regulation of growth, epithelial-mesenchymal transition and stemness in normal pancreatic epithelial cells. *Cell Cycle*, 2011, **10**(8): 1312-1321
- [11] Chiou S H, Wang M L, Chou Y T, *et al.* Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res*, 2010, **70**(24): 10433-10444
- [12] Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, *et al.* Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res*, 2010, **70**(17): 6945-6956
- [13] Albino D, Longoni N, Curti L, *et al.* ESE3/EHF controls epithelial cell differentiation and its loss leads to prostate tumors with mesenchymal and stem-like features. *Cancer Res*, 2012, **72**(11): 2889-2900
- [14] Chen Y S, Wu M J, Huang C Y, *et al.* CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. *PLoS One*, 2011, **6**(11): e28053
- [15] Qiao B, Johnson N W, Chen X, *et al.* Disclosure of a stem cell phenotype in an oral squamous cell carcinoma cell line induced by BMP-4 via an epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Rep*, 2011, **26**(2): 455-461
- [16] Zhu L F, Hu Y, Yang C C, *et al.* Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. *Lab Invest*, 2012, **92**(5): 744-752
- [17] Chao T K, Yo Y T, Liao Y P, *et al.* LIM-homeobox transcription factor 1, alpha (LMX1A) inhibits tumorigenesis, epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2013, **128**(3): 475-482
- [18] Yasui K, Shimamura M, Mitsutake N, *et al.* SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in aldehyde dehydrogenase-negative thyroid cancer cells. *Thyroid*, 2013, **23**(8): 989-996
- [19] Yin X, Wolford C C, Chang Y S, *et al.* ATF3, an adaptive-response gene, enhances TGF {beta} signaling and cancer-initiating cell

- features in breast cancer cells. *J Cell Sci*, 2010, **123**(Pt 20): 3558–3565
- [20] Li X, Xu Y, Chen Y, *et al.* SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition *via* regulation of WNT/beta-catenin signal network. *Cancer Lett*, 2013, **336** (2): 379–389
- [21] Yu F, Jiao Y, Zhu Y, *et al.* MicroRNA 34c gene down-regulation *via* DNA methylation promotes self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in breast tumor-initiating cells. *J Biol Chem*, 2012, **287**(1): 465–473
- [22] Chen J, Imanaka N, Chen J, *et al.* Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *Br J Cancer*, 2010, **102**(2): 351–360
- [23] Han M, Liu M, Wang Y, *et al.* Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN. *PLoS One*, 2012, **7**(6): e39520
- [24] Qi L, Sun B, Liu Z, *et al.* Dickkopf-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells and contributes to colon cancer suppression. *Cancer Sci*, 2012, **103**(4): 828–835
- [25] Bao B, Wang Z, Ali S, *et al.* Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett*, 2011, **307**(1): 26–36
- [26] Nalls D, Tang S N, Rodova M, *et al.* Targeting epigenetic regulation of miR-34a for treatment of pancreatic cancer by inhibition of pancreatic cancer stem cells. *PLoS One*, 2011, **6**(8): e24099
- [27] Pirozzi G, Tirino V, Camerlingo R, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition by TGFbeta-1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line. *PLoS One*, 2011, **6**(6): e21548
- [28] Chiou G Y, Cherng J Y, Hsu H S, *et al.* Cationic polyurethanes-short branch PEI-mediated delivery of Mir145 inhibited epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cancer stem-like properties and in lung adenocarcinoma. *J Control Release*, 2012, **159**(2): 240–250
- [29] Kanzawa M, Semba S, Hara S, *et al.* WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells. *Pathobiology*, 2013, **80**(5): 235–244
- [30] Zheng X, Vittar N B, Gai X, *et al.* The transcription factor GLI1 mediates TGFbeta1 driven EMT in hepatocellular carcinoma *via* a SNAI1-dependent mechanism. *PLoS One*, 2012, **7**(11): e49581
- [31] Xia H, Ooi L L, Hui K M. MicroRNA-216a/217-induced epithelial-mesenchymal transition targets PTEN and SMAD7 to promote drug resistance and recurrence of liver cancer. *Hepatology*, 2013, **58**(2): 629–641
- [32] Heldin C H, Vanlandewijck M, Moustakas A. Regulation of EMT by TGFbeta in cancer. *FEBS Lett*, 2012, **586**(14): 1959–1970
- [33] Fuxe J, Vincent T, Garcia de Herreros A. Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle*, 2010, **9**(12): 2363–2374
- [34] Wu K J. Direct activation of Bmi1 by Twist1: implications in cancer stemness, epithelial-mesenchymal transition, and clinical significance. *Chang Gung Med J*, 2011, **34**(3): 229–238
- [35] Farabaugh S M, Micalizzi D S, Jedlicka P, *et al.* Eya2 is required to mediate the pro-metastatic functions of Six1 *via* the induction of TGF-beta signaling, epithelial-mesenchymal transition, and cancer stem cell properties. *Oncogene*, 2012, **31**(5): 552–562
- [36] Zubeldia I G, Bleau A M, Redrado M, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes leading to liver metastasis are abrogated by the novel TGFbeta1-targeting peptides P17 and P144. *Exp Cell Res*, 2013, **319**(3): 12–22
- [37] Tellez C S, Juri D E, Do K, *et al.* EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. *Cancer Res*, 2011, **71**(8): 3087–3097
- [38] DiMeo T A, Anderson K, Phadke P, *et al.* A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res*, 2009, **69**(13): 5364–5373
- [39] Merchant A A, Matsui W. Targeting Hedgehog—a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res*, 2010, **16**(12): 3130–3140
- [40] Wang X, Venugopal C, Manoranjan B, *et al.* Sonic hedgehog regulates Bmi1 in human medulloblastoma brain tumor-initiating cells. *Oncogene*, 2012, **31**(2): 187–199
- [41] Maitah M Y, Ali S, Ahmad A, *et al.* Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF-beta1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells. *PLoS One*, 2011, **6**(1): e16068
- [42] Hao K, Tian X D, Qin C F, *et al.* Hedgehog signaling pathway regulates human pancreatic cancer cell proliferation and metastasis. *Oncol Rep*, 2013, **29**(3): 1124–1132
- [43] Li S H, Fu J, Watkins D N, *et al.* Sulforaphane regulates self-renewal of pancreatic cancer stem cells through the modulation of Sonic hedgehog-GLI pathway. *Mol Cell Biochem*, 2013, **373**(1–2): 217–227
- [44] Sun X D, Liu X E, Huang D S. Curcumin reverses the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by inhibiting the Hedgehog signaling pathway. *Oncol Rep*, 2013, **29**(6): 2401–2407
- [45] El Khatib M, Kalnytska A, Palagani V, *et al.* Inhibition of hedgehog signaling attenuates carcinogenesis *in vitro* and increases necrosis of cholangiocellular carcinoma. *Hepatology*, 2013, **57** (3): 1035–1045
- [46] Szabo P, Kolar M, Dvorankova B, *et al.* Mouse 3T3 fibroblasts under the influence of fibroblasts isolated from stroma of human basal cell carcinoma acquire properties of multipotent stem cells. *Biol Cell*, 2011, **103**(5): 233–248
- [47] Xing F, Okuda H, Watabe M, *et al.* Hypoxia-induced Jagged2 promotes breast cancer metastasis and self-renewal of cancer stem-like cells. *Oncogene*, 2011, **30**(39): 4075–4086
- [48] Ohashi S, Natsuzaka M, Naganuma S, *et al.* A NOTCH3-mediated

- squamous cell differentiation program limits expansion of EMT-competent cells that express the ZEB transcription factors. *Cancer Res*, 2011, **71**(21): 6836–6847
- [49] Brabletz S, Bajdak K, Meidhof S, *et al.* The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J*, 2011, **30**(4): 770–782
- [50] Chang C J, Chao C H, Xia W, *et al.* p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol*, 2011, **13**(3): 317–323
- [51] Dong P, Kaneuchi M, Watari H, *et al.* MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. *Mol Cancer*, 2011, **10**: 99
- [52] Wang H J, Guo Y Q, Tan G, *et al.* miR-125b regulates side population in breast cancer and confers a chemoresistant phenotype. *J Cell Biochem*, 2013, **114**(10): 2248–2257
- [53] Du Z, Qin R, Wei C, *et al.* Pancreatic cancer cells resistant to chemoradiotherapy rich in "stem-cell-like" tumor cells. *Dis Sci*, 2011, **56**(3): 741–750
- [54] Latifi A, Abubaker K, Castrechini N, *et al.* Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile. *J Cell Biochem*, 2011, **112**(10): 2850–2864
- [55] Kurrey N K, Jalgaonkar S P, Joglekar A V, *et al.* Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells*, 2009, **27**(9): 2059–2068
- [56] Wang Z, Li Y, Kong D, *et al.* Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res*, 2009, **69**(6): 2400–2407
- [57] Kang M, Jiang B, Xu B, *et al.* Delta like ligand 4 induces impaired chemo-drug delivery and enhanced chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 2013, **330**(1): 11–21
- [58] Bandyopadhyay A, Wang L, Agyin J, *et al.* Doxorubicin in combination with a small TGFbeta inhibitor: a potential novel therapy for metastatic breast cancer in mouse models. *PLoS One*, 2010, **5**(4): e10365
- [59] Nanta R, Kumar D, Meeker D, *et al.* NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial-mesenchymal transition and human prostate cancer stem cell growth in NOD/SCID IL2Rgamma null mice by regulating Bmi-1 and microRNA-128. *Oncogenesis*, 2013, **2**: e42
- [60] Sharma A, Paranjape A N, Rangarajan A, *et al.* A monoclonal antibody against human Notch1 ligand-binding domain depletes subpopulation of putative breast cancer stem-like cells. *Mol Cancer Ther*, 2012, **11**(1): 77–86

Epithelial Mesenchymal Transition Confers Properties of Stem Cells on Cancer Cells*

YU Shuai-Shuai¹⁾, MA Xiao-Juan¹⁾, LIN Bi-Hua²⁾, LI Ji-Xia²⁾, ZHOU Ke-Yuan^{1,2)**}

¹⁾ Guangdong Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China;

²⁾ Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

Abstract The epithelial mesenchymal transition(EMT)confers mesenchymal properties, migration and invasion on epithelial cells which normally is polarized and interacts with basement membrane *via* its basal surface. Cancer stem cell is a small subset of stem-like cells which have the capacity for self-renewal and asymmetric cell division. They play an important role in cancer initiation and progression. In recent years, some researches reveal that EMT, which is closely related tumor metastasis, can generate tumour cells with properties of stem cells. We review here recent observations correlated with the mechanism of it and its significance to clinical therapy.

Key words EMT, CSC, stemness, drug resistance

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00359

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(81272434, 81201710), Natural Science Foundation of Guangdong Province(S2012010008259) and Jianbo Technology Innovation Subject of Guangdong Medical College(STIF201105).

**Corresponding author.

Tel: 86-759-2388581, E-mail: kyzhou@gdmc.edu.com

Received: July 31, 2013 Accepted: March 21, 2014