

乏氧与肿瘤干细胞干性、异质性和血管生成的关系

郭秀伟, 张培彤

(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

摘要: 缺氧诱导因子(HIFs)是肿瘤干细胞适应乏氧及营养缺乏的主要调节因子。活化的HIFs可以诱导肿瘤干细胞的干性维持、异质性和血管生成,对肿瘤干细胞介导肿瘤的自我更新、多分化潜能及可塑性、血管生成及侵袭和转移能力、治疗抗性起到重要作用。因此,研究HIFs与肿瘤干细胞干性、异质性和血管生成的关系,将为肿瘤的治疗提供新的思路。

关键词: 肿瘤干细胞; 缺氧诱导因子; 异质性; 血管生成

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2017)12-0972-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2017.12.A009

Relationships of Hypoxia with Characteristic Maintenance, Heterogeneity and Vasculogenesis of Cancer Stem Cell

GUO Xiu-wei, ZHANG Pei-tong

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China)

Abstract: Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a main regulatory factor for cancer stem cell to adapt hypoxia and nutrient-deficiency environment. Activated HIFs can induce stem cell characteristic maintenance, heterogeneity and vasculogenesis, which play an importance role in tumor self-renewal, multi-differentiation potential, plasticity, invasion and metastasis capacity, and treatment-resistance. The study on relationships of hypoxia with characteristic maintenance, heterogeneity and vasculogenesis of cancer stem cell may provide a new insight for cancer treatment.

Key words: cancer stem cell; hypoxia-inducible factor; heterogeneity; vasculogenesis

肿瘤的乏氧微环境是影响实体瘤治疗效果常见的生物现象。缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIFs)的活化是肿瘤乏氧环境影响肿瘤干细胞的一个主要原因。在乏氧环境中肿瘤细胞通过适应环境,筛选出具有更强侵袭能力的肿瘤细胞,即肿瘤干细胞,并可以通过改变表观遗传学和基因稳定性产生克隆亚群、生长速度和化疗耐药程度不同的肿瘤干细胞。另外可促进肿瘤干细胞血管生成,使得肿瘤细胞获得更强的增殖、侵袭和转移能力,并对临床中的一些治疗方法包括放疗、化疗不敏感。因此,研究乏氧微环境在不同肿瘤干细胞的干性产生与维持、异质性产生和血管生成中的作用,对于提高现有治疗

方法的疗效,开发新的治疗思路提供依据。

1 乏氧微环境导致肿瘤干细胞的形成

乏氧微环境是肿瘤的一个常见特征,在不同的肿瘤类型中乏氧的严重程度不同。在增殖明显、生长迅速的肿瘤组织中,由于更多的细胞需要更多的氧供,氧消耗超过了氧供应,而且细胞与血管之间的距离增加,阻碍了氧气的弥散,创造了一个更加乏氧的微环境。肿瘤组织乏氧环境的氧含量比正常组织的氧含量平均低1%~2%^[1]。然而,不同肿瘤组织中的氧含量水平不同,这是因为肿瘤组织的氧含量与肿瘤组织的初始氧供、肿瘤的形状和肿瘤细胞所停留的细胞周期有关。

乏氧主要是通过激活肿瘤细胞内的一系列基因

收稿日期:2016-11-23;修回日期:2017-02-22

基金项目:国家自然科学基金项目(81173450);北京自然科学基金项目(7122152)

通讯作者:张培彤, E-mail: zhangpeitong@sohu.com

从而对乏氧作出应答反应,一方面肿瘤细胞适应了乏氧微环境,另一方面导致了肿瘤的治疗抵抗。这些基因主要包括乏氧诱导因子(HIFs)、乏氧诱导的膜结合酶(CAIX)、VEGF等。

乏氧诱导因子(HIFs)活化是肿瘤乏氧环境影响肿瘤干细胞形成的主要作用机制之一。HIF- α 是异质二聚体的转录因子,是由依赖氧调节的HIF- α 亚基(HIF-1 α 、HIF-2 α 或HIF-3 α)和不依赖于氧调节的HIF-1 β 亚基组成。在有氧环境下,HIF- α 亚基通过以下环节进行调控:首先经历O₂依赖的脯氨酰羟化酶(PHD)羟化;然后乏氧蛋白与VHL结合,并受肿瘤抑制蛋白VHL的抑制;VHL招募E3泛素蛋白连接酶形成复合物;HIF-1 α 泛素化后被蛋白酶体降解。在乏氧环境下,脯氨酰羟化酶活性受限,HIF-1 α 表达增加,与HIF-1 β 形成二聚体,激活靶基因的转录。

在乏氧环境中肿瘤细胞通过适应环境,引起肿瘤细胞去分化并产生肿瘤干细胞表型^[2],并筛选出具有更强侵袭能力的肿瘤细胞^[3]。这主要是通过HIF转录因子家族介导肿瘤干细胞标志物CD133、OCT4、KLF4、SOX2、NANOG的表达增加引起的^[4]。Mathieu等^[4]通过对11种肿瘤细胞系的干细胞标志物和相关指标OCT4、NANOG、SOX2、KLF4、MYC和miRNA-302的表达进行检测,结果发现HIF- α 联合iPSC诱导物作用于肿瘤细胞后,细胞的NANOG、OCT4表达和克隆能力增加,并具有更强的致瘤能力,表明HIF可以作为肿瘤干细胞形成的关键诱导因子。另有研究发现人类乳腺癌细胞在乏氧环境下进行培养后,可以增加肿瘤干细胞的百分比,通过shRNA阻碍HIF-1 α 的表达后,可以抑制乏氧环境下CSC表型^[5]。而抗胶质瘤的化疗药物替莫唑胺(TMZ)可以诱导产生HIF-1 α 和HIF-2 α ,此两者可以通过诱导胶质瘤细胞获得干细胞CD133表型,诱导化疗耐药性胶质瘤干细胞的产生^[6]。以上研究均说明乏氧环境不仅可以维持胶质瘤干细胞的干性,并可以对肿瘤细胞表型进行重新编程产生干细胞表型,如OCT4、NANOG和c-MYC^[7]。

一方面HIF转录因子家族是通过介导肿瘤干细胞标志物相关mRNA的去甲基化,引起肿瘤干细胞标志物表达增加。NANOG分子作为肿瘤干细胞维持特性的标志物,同时也是HIF家族的靶向下游

分子。如ALKBH5是一种可以催化N6甲基从RNA腺苷酸残基上移除的酶类,可以介导NANOG mRNA去甲基化,并增加其稳定性,最终导致NANOG蛋白表达增加。而乏氧可以诱导HIF依赖性的ALKBH5的表达,诱导干细胞表型NANOG表达。ZNF217基因为人类染色体20q13.2编码的转录子,胚胎干细胞(ES)Zfp217,为鼠ZNF217的同系物,研究发现其可以通过隐退METTL3分子,抑制NANOG、KLF4和SOX2 mRNA的甲基化修饰(m6A),从而促进BCSC表型表达,另外乏氧可通过HIF依赖方式诱导ZNF217的表达^[8]。

另外乏氧可以通过多种信号通路如PI3K/AKT、Notch、NF- κ B、Wnt/ β -catenin和Hedgehog信号通路影响干细胞表型。Notch受体与配体Jagged或Delta家族相互作用,Notch细胞内基序从细胞膜表面转移到细胞核与CSL、P300、MAML形成DNA结合复合物进而调节靶基因的转录^[9]。有研究发现SOX2作为肿瘤干细胞样细胞的转录因子,属于乏氧诱导NOTCH信号通路的下游分子。乏氧或过表达NOTCH1可以促进干细胞形成,导致药物抵抗,并且肿瘤干细胞相关基因SOX2、ALDH和ABC转运蛋白的表达增加^[10]。乳腺癌组织坚硬,比正常乳腺组织环境乏氧程度高,研究发现乏氧微环境可以通过整合素链激酶ILK调节PI3K/Akt信号通路,促进乳腺癌干细胞样细胞的发展^[11]。Wnt信号通路是导致各种实体瘤形成的重要原因,并在肿瘤干细胞形成和维持中发挥重要作用。研究发现HIF-1 α 介导Wnt信号通路活化,在促进干细胞活性维持方面起重要作用^[12]。而Santoyo-Ramos等^[13]却有不同的研究结果,发现HIFs可以通过负调控Wnt信号通路,在肿瘤干细胞干性维持中发挥重要作用。产生这两种不同结果的原因不得而知,仍待进一步研究。有报道,Oct4作为HIF-2 α 的下游靶基因,当导入HIF-2 α 胚胎来源的肿瘤组织,Oct4表达增加,表明低氧在促使HIF-2 α 表达增加的同时也促进了Oct4表达的增加,这就促进并维持了干细胞的特性发挥^[14]。

2 乏氧微环境对肿瘤干细胞异质性影响

近年来,研究表明肿瘤干细胞具有异质性和可塑性,包括来源于不同组织或病理类型的肿瘤细胞

间的异质性和同一组织或病理类型的肿瘤细胞内异质性。研究发现卵巢癌化疗耐药细胞株中肿瘤干细胞异质性表现为耐药早期阶段比晚期阶段的肿瘤干细胞具有更强的致瘤能力^[15]。而肺的原发肿瘤和转移瘤的基因异质性是普遍存在的,原发肿瘤比转移瘤具有更多的非同义体突变^[16]。另外东亚肺癌患者在 *EGFR*、*KRAS* 和 *ALK* 基因表达上与西方人不同。

乏氧环境在肿瘤干细胞异质性形成方面有重要意义。研究发现肿瘤中心部位较边缘部位的乏氧程度更高^[17]。从神经来源的肿瘤组织边缘部分和中心部位分别进行取材,并进行细胞培养,发现两者均可以产生肿瘤干细胞,而中心部分取材培养的胶质瘤细胞具有更强的克隆能力,脑内注射可以引起胶质瘤的形成,并推测周边部位肿瘤干细胞的形成是来源于中心部位的肿瘤干细胞^[18]。另有研究同样发现胶质瘤细胞手术后的周边部位细胞具有形成克隆灶的能力,但是其较肿瘤中心部位细胞克隆形成的能力弱^[19]。以上均说明了乏氧环境导致的细胞去分化特征不仅能导致肿瘤细胞异质性的产生,还能导致乏氧肿瘤细胞侵袭能力的增加。

肿瘤干细胞异质性主要是通过肿瘤干细胞标志物、表观遗传学改变、基因稳定性、治疗耐药差异和生长速度等方面体现的。如乳腺癌干细胞存在两个亚型,CD44⁺/CD24⁻/ALDH⁺乳腺癌干细胞较 CD44⁺/CD24⁻肿瘤干细胞具有更强的致瘤性、耐药性,并且存在生长速度快、临床预后差的特点。而乏氧环境中肿瘤干细胞亚群产生异质性的机制并未完全明确,但主要是涉及到基因的消失或过表达过程,如编码 bHLH 蛋白的转录因子 *HASH1*、*dHAND* 和 *MYCN* 的下调可以促使乏氧细胞的去分化,这也是乏氧环境引起肿瘤细胞异质性的早期发现。其可能机制阐述是肿瘤内的异质性可因乏氧环境导致肿瘤细胞 DNA 高甲基化引起。研究发现 48% 的高甲基化与乏氧有关,这与基因突变或增殖引起的高甲基化不同。*TET* 酶可以催化 5-基胞嘧啶 (5-mC) 转化为 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hmC),是 DNA 去甲基化过程中的重要酶。乏氧可以降低 *TET* 的活性,诱导 5-羟甲基胞嘧啶基因启动子和增强子下调,基因高甲基化,并与干细胞异质性之间存在重要关系^[17]。DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMTs) 是表观遗传学中催

化并维持 DNA 甲基化的重要酶家族。*DNMT1* 的降低可以促进 *Zeb2* 和 *KLP4* 启动子区域上的 *H3K9me3* 和 *H3K27me3* 表达抑制,即调节组蛋白脱甲基化的表观遗传学改变,进而控制干细胞表型的改变^[20]。有研究发现乏氧环境可以上调 *DNMT1* 的改变,从而促进干细胞表型的转变和干细胞异质性的产生。

肿瘤干细胞异质性也可因乏氧环境导致肿瘤细胞 RNA 改变引起。乏氧环境可以增加乏氧诱导因子 1 (*HIF-1 α*) 的表达,*HIF-1 α* 预处理肿瘤干细胞是通过 *HIF-1 α* 与其启动子结合来调控 *miR-107* 和 *miR-210* 表达增加的^[21]。而 microRNA 通过作用于特定的靶点或 RNA 与 RNA 相互作用网络,在影响干细胞异质性包括肿瘤血管形成方面有重要作用^[22]。

3 乏氧微环境对肿瘤干细胞血管生成的影响

血管生成增多是肿瘤乏氧微环境的一个典型特征。在病理学方面,表现为血管增生和细胞增多,如乏氧环境中恶性胶质瘤的典型特征是假性栅栏样坏死,表现为坏死区域周围细胞增多,血管增生明显。细胞增多造成耗氧增加,因此细胞增多区域是高度乏氧的。

乏氧可以导致抗血管生成因子和促血管生成因子间的失衡,这就导致了快速的、非正常的血管生成。这些新生血管形态扭曲、管壁较薄,而且血管内皮细胞间有间隙,从而导致了血流的缓慢及停滞。经过几翻的血管再生、肿瘤细胞侵袭和血管变形导致了血管的塌陷。这可以从实验动物学和临床诊断学中应用的生物医学图像中观察到,肿瘤血管紊乱可以导致血管周围存在不同浓度梯度代谢物质的不规则分布,并可以表现出显著的低氧区域^[23,24]。一方面肿瘤细胞从实体肿瘤中心部位通过闭塞、扭曲和退化的血管逃离,导致了肿瘤在邻近正常组织的侵袭并向远处转移。另一方面,血管生成成为肿瘤细胞的蔓延提供了更丰富的营养物质和氧气。总之,乏氧可以刺激血管生成改善乏氧状态,而血管生成又刺激肿瘤细胞数量增多,同时增加对氧气消耗,近而形成恶性循环。

影响肿瘤血管生成的因子众多,如血管内皮生

长因子(VEGF)、间质细胞衍生因子(SDF)、表皮生长因子(EGF)、血管生成素(angiogenin)、胰岛素样生长因子(IGF)等。Grange 等^[25]研究发现,CD105⁺肾癌干细胞分泌的微囊泡(microvesicles,MVs)在体外及小鼠体内试验中均可促进人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)的增殖并形成管样结构;将 MVs 注射到小鼠体内后,发现小鼠肺转移灶形成处 VEGFR1 及 VEGF 表达上调。Bao 等^[26]在体内研究中发现,干细胞样胶质瘤细胞(stem cell-like glioma cells,SCLGCs)较普通肿瘤细胞 VEGF 表达水平显著提升,并认为这与其通过旁分泌作用方式以 VEGF 为轴促进肿瘤血管生成有关。另外,肿瘤干细胞可直接分泌 bFGF 和 VEGF 等血管生长因子和干细胞因子(SCF)以促进肿瘤血管内皮生长,且促血管生长因子的分泌在缺氧状态下会明显上调^[27]。除了分泌因素外,肿瘤干细胞还可以通过招募骨髓来源的循环内皮祖细胞促进肿瘤血管的形成^[28]。CD133⁺干细胞中具有一小部分可以表达血管内皮钙黏素的亚群细胞,可经诱导转化为内皮细胞,并出现 CD31、CD34、vWF 等内皮细胞的表面标记^[29]。

4 乏氧在肿瘤治疗中的新策略和展望

HIFs 是肿瘤细胞适应缺氧环境的主要调节因子,可以通过调节下游基因及信号通路的表达,实现对肿瘤干细胞的干性维持、异质性和血管生成的调节,因此更加精确地掌握 HIFs 的功能及其与下游信号通路的作用,将有助于从分子水平为肿瘤干细胞的治疗提供理论基础。靶向 HIFs 及相关信号分子的治疗,将从改善肿瘤干细胞的自我更新能力、血管生成和可塑性角度,影响肿瘤的侵袭和转移。

另外,由于同一肿瘤的不同区域是由不同氧浓度微环境组成,会产生多个克隆亚型和不同肿瘤表型的干细胞,组织样本的获得只能代表小范围肿瘤组织的病理类型,化疗药物只能针对这小范围肿瘤有效,而对于其他范围肿瘤效果不明,这使得肿瘤的治疗变得复杂。逻辑上表明,同时靶向肿瘤细胞和肿瘤干细胞的联合治疗方法可以作为改善长期治疗结果的有效措施。

参考文献:

- [1] Muz B, de la Puente P, Azab F, et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy[J]. *Hypoxia*(Auckl), 2015, 3:83-92.
- [2] Gaelzer MM, Santos MS, Coelho BP, et al. Hypoxic and reoxygenated microenvironment: stemness and differentiation state in glioblastoma[J]. *Mol Neurobiol*, 2016. [Epub ahead of print]
- [3] Yao K, Gietema J, Shida S, et al. In vitro hypoxia-conditioned colon cancer cell lines derived from HCT116 and HT29 exhibit altered apoptosis susceptibility and a more angiogenic profile in vivo [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(12): 1356-1363.
- [4] Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3):4640-4652.
- [5] Semenza GL. Regulation of the breast cancer stem cell phenotype by hypoxia-inducible factors[J]. *Clin Sci*, 2015, 129(12):1037-1045.
- [6] Lee G, Auffinger B, Guo D, et al. De-differentiation of glioma cells to glioma stem-like cells by therapeutic stress-induced HIF signaling in the recurrent GBM model [J]. *Mol Cancer Therapeut*, 2016. [Epub ahead of print]
- [7] John M, Heddleston, Zhizhong Li, et al. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype[J]. *Cell Cycle*, 2015, 8(20):3274-3284.
- [8] Zhang CZ, Zhi WQ, Lu HQ, et al. Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217-and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40):64527-64542.
- [9] Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9):678-689.
- [10] Seo EJ, Kim DK, Jang IH, et al. Hypoxia-NOTCH1-SOX2 signaling is important for maintaining cancer stem cells in ovarian cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34):55624-55638.
- [11] Pang MF, Siedlik MJ, Han S, et al. Tissue stiffness and hypoxia modulate the integrin-linked kinase ILK to control breast cancer stem-like cells[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(18): 5277-5287.
- [12] Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, et al. O2 regulates stem cells through Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Nature Cell Biol*, 2010, 12(11):1007-1013.
- [13] Santoyo-Ramos P, Likhatcheva M, Eduardo A, et al. Hypoxia-inducible factors modulate the stemness and malignancy of colon cancer cells by playing opposite roles in

- canonical wnt signaling[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): 1–17.
- [14] Covello KL, Kehler J, Yu H, et al. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(5): 557–570.
- [15] Singh RK, Dhadve A, Sakpal A, et al. An active IGF-1R-AKT signaling imparts functional heterogeneity in ovarian CSC population[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36612.
- [16] Kim EY, Cho EN, Park HS, et al. Genetic heterogeneity of actionable genes between primary and metastatic tumor in lung adenocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 27.
- [17] Rampazzo E, Della PA, Frasson C, et al. Phenotypic and functional characterization of glioblastoma cancer stem cells identified through 5-aminolevulinic acid-assisted surgery[J]. *Neuro-oncol*, 2014, 116(1): 505–513.
- [18] Piccirillo SGM, Combi R, Cajola L, et al. Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution[J]. *Oncogene*, 2009, 28: 1807–1811.
- [19] Thienpont B, Steinbacher K, Zhao H, et al. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity[J]. *Nature*, 2016, 537(7618): 63–68.
- [20] Lee E, Wang J, Yumoto K, et al. DNMT1 regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells which promotes prostate cancer metastasis[J]. *Neoplasia*, 2016, 18(9): 553–566.
- [21] Haider KH, Pharm M, Kim HW, et al. HIF-1 α in stem cell preconditioning: mechanistic role of hypoxia related micro-RNAs[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 138(1): 257.
- [22] Singh SK, Vartanian A, Burrell K, et al. A microRNA link to glioblastoma heterogeneity[J]. *Cancer*, 2012, 4(3): 846–872.
- [23] Koong AC, Mehta VK, Le QT, et al. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 48(4): 919–922.
- [24] Sun JD, Liu Q, Wang J, et al. Selective tumor hypoxia targeting by hypoxia-activated prodrug TH-302 inhibits tumor growth in preclinical models of cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(3): 758–770.
- [25] Grange C, Tapparo M, Collino F, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung pre-metastatic niche[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(15): 5346–5356.
- [26] Bao S, Wu Q, Sathornsumetee HM, et al. Stem cell like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 7843–7848.
- [27] Kaidi A, Williams AC, Paraskeva C. Interaction between β -catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 2(9): 210–217.
- [28] Folkins C, Lee C, Shan M, et al. Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and the mobilization of bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 1283.
- [29] Wang R, Chadalavada L, Wilshire J, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium[J]. *Nature*, 2010, 468(7325): 829–833.