

Wnt/ β -catenin 信号转导通路对骨肉瘤癌干细胞的调节作用

谢晓亮 李玉梅 朱海霞 樊天佑

摘要 部分骨肉瘤患者对化疗缺乏有效反应,其耐药机理目前尚不明确。骨肉瘤的难治性、复发转移和抗药性与癌干细胞有关。癌干细胞可通过细胞表面特异性标记物、侧群细胞、细胞球形成等进行辨别。多项研究发现,骨肉瘤中存在 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的异常表达。通过调控该信号转导通路可改变骨肉瘤癌干细胞的特性,抑制骨肉瘤的增殖、复发和远处转移。该文对 Wnt/ β -catenin 信号转导通路对骨肉瘤癌干细胞的调节作用及治疗前景作一综述。

关键词 Wnt/ β -catenin 信号转导通路;骨肉瘤;癌干细胞;研究进展

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2019.03.001

骨肉瘤是好发于儿童和青少年长骨干骺端的原发性间叶组织恶性肿瘤,由间充质干细胞或成骨细胞分化受阻引起。其特点为肿瘤可产生类骨质,具有局部入侵、远处转移及易复发的倾向^[1-2]。仅接受手术治疗的骨肉瘤患者 5 年生存率低于 20%^[3]。随着以氨甲蝶呤、顺铂等药物为基础的新辅助化疗的应用,骨肉瘤患者的 5 年生存率提高到约 80%^[4]。然而,一旦发生远处转移或复发,其 5 年生存率即降为约 20%^[5]。这些患者的低生存率很大程度上归因于其对化疗缺乏有效反应^[6],尽管联合应用新型辅助化疗,仍不能有效降低骨肉瘤患者的死亡率和改善患者整体预后^[7]。

骨肉瘤的耐药机理目前尚不明确,其中一个重要原因可能是骨肉瘤内含有干细胞特性的细胞,即癌干细胞。近 10 年,癌干细胞已在多种恶性肿瘤中被发现^[8-9]。它具有成瘤、自我更新及多向分化潜能等特性,是导致肿瘤形成、发展和转移的关键因素^[10]。癌干细胞还具有强抗药性^[11],在放化疗后仍能局部复发和远处转移^[12]。骨肉瘤是一种异质性恶性肿瘤,含有多种不同细胞,其中也包括少量癌干细胞^[13]。预后较差的骨肉瘤常与癌干细胞有关。

目前,研究已证实,多种信号转导通路可影响骨肉瘤癌干细胞的活性与功能^[14]。然而,哪些信号转

导通路起关键作用尚不明确。Wnt/ β -catenin 信号转导通路可调控细胞的生长、凋亡和分化,在胚胎、器官发育和维持干细胞自我更新方面起重要作用,对骨肉瘤癌干细胞也有重要影响。Wnt/ β -catenin 信号转导通路异常可导致骨肉瘤癌干细胞的生物特性改变,如自我更新失控、异常增殖以及分化障碍^[15]。通过调控该信号转导通路可改变骨肉瘤癌干细胞的特性,抑制骨肉瘤的增殖、复发和远处转移。这一策略有望成为骨肉瘤治疗的新方向。

1 骨肉瘤癌干细胞特性

早期研究认为,恶性肿瘤是细胞分裂形成的同质性团块,每个细胞都具有相同的基因变化^[16]。近年来,越来越多的研究表明恶性肿瘤是含有不同细胞级系的异质性组织。异质性骨肉瘤的小部分癌干细胞可能起源于单个癌干细胞,具有自我复制及分化成各种肿瘤细胞的能力^[16-17]。除了有形成恶性肿瘤的潜力,癌干细胞还可在癌症转移部位形成新肿瘤。因此,癌干细胞已逐渐成为治疗恶性肿瘤的靶点^[13,18]。随着分离和辨识技术的成熟,癌干细胞逐渐成为肿瘤学研究的热点。目前,辨认骨肉瘤内癌干细胞的主要方法包括细胞表面特异性标记物、侧群细胞、细胞球形成等。

1.1 细胞表面特异性标记物

尽管有证据支持骨肉瘤癌干细胞的存在,但能够成功用于辨识该细胞的标记物较少。CD133 是干细胞标记物,现用于标记部分恶性肿瘤的癌干细胞。从骨肉瘤 MG63、Saos-2 和 U2-OS 细胞系中均可分离出 CD133 阳性的癌干细胞。CD133 阳性细胞可显示干

基金项目: 国家自然科学基金(81573995)、国家自然科学基金青年科学基金(81403412)

作者单位: 200071, 上海中医药大学附属市中医医院骨伤科

通信作者: 樊天佑 E-mail: fantianyou365@hotmail.com

细胞样基因表达,如表达 *OCT3/4*、*Nanog* 和 *CXCR4*, 形成细胞球和具有侧群细胞特征。因此,CD133 阳性细胞有干细胞样特征,表现出高增殖率,其细胞周期处于 G2/M 期,具有 Ki-67 阳性高表达以及抗药标记物 ATP 结合膜转运蛋白(ABC 转运蛋白)G2 表达增高特性^[19]。CD133 阳性细胞具有较差的分化能力和较高的转移潜能^[20],因此 CD133 高表达的骨肉瘤患者预后较差^[21-22]。总之,CD133 是潜在的骨肉瘤治疗靶点。通过小干扰 RNA(siRNA)将 CD133 阳性表型转化为阴性表型有望成为有效的骨肉瘤治疗方法。

癌干细胞标记物的表达并非一对一模式,通常不同癌干细胞可表达同一种标记物,也可出现一种癌干细胞表达不同的标记物。癌干细胞中 CD117 和 Stro-1 多呈现共表达状态,CD117 和 Stro-1 双重阳性细胞具有较强的致癌和转移能力,并对多种药物呈抗药性^[23]。骨肉瘤癌干细胞中也可出现 CD133 和其他标记物共表达的情况。He 等^[24]研究发现,CD133 和 CD44 双重阳性的骨肉瘤 Saos-2 细胞比任何一种标记阳性的细胞更易发生肺转移。

1.2 侧群细胞

癌干细胞的抗药性可能因为药物转运蛋白(如 ABC 多药物外排转运蛋白)高表达所致^[16],这一特点被用于骨肉瘤癌干细胞的鉴定^[25]。观察这些细胞对荧光 DNA 结合染料的排斥能力,对染料排斥的细胞为侧群细胞。骨肉瘤的侧群细胞显示干细胞样基因(*Oct4*, *Nanog* 和 ABC 转运蛋白)上调,细胞球形成能力增强,以及对阿霉素、甲氨蝶呤和顺铂等多种药物的抗药性增强^[26]。

1.3 细胞球形成

Gibbs 等^[27]首次报道骨肉瘤干细胞的成球现象,有成球能力的骨肉瘤干细胞可使免疫缺陷小鼠致癌并有较强的抗药性,显示出癌干细胞的表型^[28]。Martins-Neves 等^[29]研究发现,从 MNNG/HOS 骨肉瘤细胞系提取的癌干细胞有自我复制能力和多向分化潜能,高表达 *Oct4*、*Nanog* 和 ABC 转运蛋白等多能胚胎干细胞具有的表面标记物,可诱发肿瘤形成,这些成球的癌干细胞对放化疗均有较强的抗药性。

以上证据表明骨肉瘤含有癌干细胞,癌干细胞在骨肉瘤的形成、复发和转移中起重要作用,靶向调控癌干细胞治疗骨肉瘤具有较好的应用价值。

2 Wnt/ β -catenin 信号转导通路对骨肉瘤癌干细胞的作用

通过不同的信号转导通路干预骨肉瘤癌干细胞

渐已成为骨肉瘤治疗的研究热点。Wnt/ β -catenin 信号转导通路是肿瘤发生发展和维持癌干细胞的重要通路之一,通过干预该通路来影响骨肉瘤癌干细胞的生物特性,在临床应用方面具有良好的发展前景。

2.1 调控作用

Wnt/ β -catenin 信号转导通路可对骨肉瘤癌干细胞产生重要影响,但具体机制尚未明确。Yi 等^[30]采用 Hoechst 染料排斥法检测骨肉瘤内的癌干细胞样侧群细胞发现,侧群细胞中 β -catenin 和 CyclinD1 表达明显升高,干细胞基因 *CD133*、*Oct4*、*Sox2* 和 *Nanog* 表达也明显增加。这些侧群细胞显示出高度的自我复制能力和高增殖率,具有高致瘤性和侵袭力。Martins-Neves 等^[31]研究发现,使用药物(如 IWR-1)抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路可破坏骨肉瘤癌干细胞的自我复制能力,阻碍干细胞标记物 *Sox2* 的表达并诱导癌干细胞凋亡。因此,抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的抗癌药物可通过消除骨肉瘤癌干细胞来改善骨肉瘤的治疗效果。Basu-Roy 等^[32]研究认为,*Sox2* 是显示骨肉瘤癌干细胞自我复制的生物学标记物,且具有拮抗 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的促分化作用。骨肉瘤内的 Wnt/ β -catenin 信号转导通路具有抑制肿瘤的作用,下调 *Sox2* 可增强 Wnt/ β -catenin 信号转导通路,从而促进成骨分化,抑制肿瘤发展。Matushansky 等^[33]研究认为,抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路可促使间充质干细胞形成恶性纤维组织细胞瘤,而正常 Wnt/ β -catenin 信号转导通路可促使间充质干细胞形成成熟的结缔组织。他们认为,抑制 *Sox2* 表达或增强 Wnt/ β -catenin 信号转导通路可能成为治疗骨肉瘤的新途径。

以上研究结果的不同可能与研究中的干细胞类型不同有关。Wnt/ β -catenin 信号转导通路是促进还是抑制肿瘤的形成、生长、转移及抗药性取决于癌细胞类型和发展阶段,Wnt/ β -catenin 信号转导通路异常可与其他致癌或抑癌的信号转导通路变化共同作用,影响癌症的形成和发展^[34]。

2.2 疗效及安全性

目前,化疗可有效缩小骨肉瘤体积,但对癌干细胞的作用不明显。癌干细胞对多种化疗药物呈明显抗药性^[13],治疗停止后癌干细胞可通过自我增殖导致肿瘤的生长和复发。此外,部分化疗药物在杀伤骨肉瘤细胞的同时也可刺激某些骨肉瘤非癌细胞

逆分化为癌干细胞,从而增强其对化疗药物的抗药性^[35]。同一肿瘤的癌干细胞可能有不同品系,对药物产生不同反应,因此,精准杀灭癌干细胞是治疗骨肉瘤的重要研究方向。有研究表明,Wnt/ β -catenin 信号转导通路可促进非癌干细胞向癌干细胞转变^[30],因此,抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路可能是治疗 Wnt/ β -catenin 高表达骨肉瘤的有效途径^[31,36-37]。研究认为,Wnt/ β -catenin 信号转导通路抑制因子 IWR-1 能有效降低骨肉瘤对阿霉素的抗药性^[31]。IWR-1 通过破坏 β -catenin 对癌干细胞产生抑制作用,其与阿霉素共同作用可降低胞核 β -catenin 和癌干细胞表面标记物 Sox2 的表达,显著抑制骨肉瘤的生长。但 Krause 等^[38]研究认为,Wnt/ β -catenin 信号转导通路拮抗剂 DKK1 可增强骨肉瘤的促肿瘤形成特性,这可能与上调应激反应酶、癌干细胞标记物乙醛脱氢酶 1 家族成员 (ALDH1)A1 有关。以上结果提示,不同的 Wnt/ β -catenin 信号转导通路抑制剂除抑制转导通路外,还可通过其他途径作用于癌干细胞,产生不同效果。至于单独抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路对骨肉瘤癌干细胞的作用尚待进一步研究。

除癌干细胞外,Wnt/ β -catenin 信号转导通路对正常胚胎和成人干细胞同样具有重要作用。这些干细胞也具有自我复制能力和多向分化潜能,能够形成骨、软骨、脂肪和其他类型的细胞^[39]。抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路也可干扰正常干细胞,造成严重不良反应。在骨组织中,Wnt/ β -catenin 信号转导通路可激发间充质干细胞分化为成骨细胞,促进成骨细胞增殖并抑制其凋亡,是新骨形成的重要途径^[40]。Wnt/ β -catenin 信号转导通路抑制剂可抑制成骨细胞骨形成,使骨量明显下降,进而导致严重的骨质疏松并诱发脆性骨折^[41]。因此,对于抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路治疗骨肉瘤应权衡利弊。从目前的研究来看,并非所有骨肉瘤都需采用抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路治疗,只有对于高表达该信号者,必要时可采用该方法作为辅助治疗,而对严重骨质疏松患者需慎重。最理想的方法是仅靶向抑制癌干细胞的 Wnt/ β -catenin 信号转导通路而不影响正常干细胞。

3 小结

目前,骨肉瘤治疗主要为手术切除结合新型辅助化疗。然而,骨肉瘤的癌干细胞可能对放化疗产生抗药性,导致部分患者治疗效果不理想。靶向抑

制癌干细胞可能是治疗骨肉瘤的重要途径。Wnt/ β -catenin 信号转导通路在骨肉瘤癌干细胞的自我更新、分化及成瘤中发挥重要作用,因此,抑制该通路有望破坏骨肉瘤癌干细胞的干细胞特性,为治疗难治性及复发性骨肉瘤提供新途径。然而,抑制该通路调控骨肉瘤细胞(包括癌干细胞)的治疗方案并非适用于所有患者,只有对该信号转导通路高表达者可试用作为辅助治疗。此外,抑制该信号转导通路也可能损害正常干细胞的功能,造成严重不良反应。因此,对抑制 Wnt/ β -catenin 信号转导通路治疗骨肉瘤的指征及利弊尚需作进一步研究。

参考文献

- [1] Bertoni F, Unni KK, McLeod RA, et al. Osteosarcoma resembling osteoblastoma[J]. Cancer, 1985, 55(2): 416-426.
- [2] Unni KK, Dahlin DC, McLeod RA, et al. Intracortical well-differentiated osteosarcoma[J]. Cancer, 1977, 40(3): 1337-1347.
- [3] Shaikh AB, Li F, Li M, et al. Present advances and future perspectives of molecular targeted therapy for osteosarcoma[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 506.
- [4] Harrison DJ, Geller DS, Gill JD, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2018, 18(1): 39-50.
- [5] Durfee RA, Mohammed M, Luu HH. Review of osteosarcoma and current management[J]. Rheumatol Ther, 2016, 3(2): 221-243.
- [6] Yang M, Yan M, Zhang R, et al. Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells[J]. Cancer Sci, 2011, 102(10): 1774-1781.
- [7] Brown HK, Schiavone K, Gouin F, et al. Biology of bone sarcomas and new therapeutic developments [J]. Calcif Tissue Int, 2018, 102(2): 174-195.
- [8] Zhang GF, Li CX, Liu ZQ, et al. Cancer stem cell targets: a review[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(10): 2045-2051.
- [9] Kharkar PS. Cancer stem cell (CSC) inhibitors: a review of recent patents (2012-2015) [J]. Expert Opin Ther Pat, 2017, 27(7): 753-761.
- [10] Lei Y, Zhang D, Yu J, et al. Targeting autophagy in cancer stem cells as an anticancer therapy[J]. Cancer Lett, 2017, 393: 33-39.
- [11] Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis [J]. J Clin Pharmacol, 2005, 45(8): 872-877.
- [12] Li S, Li Q. Cancer stem cells and tumor metastasis (Review) [J]. Int J Oncol, 2014, 44(6): 1806-1812.
- [13] Abarrategi A, Tornin J, Martinez-Cruzado L, et al.

- Osteosarcoma: cells-of-origin, cancer stem cells, and targeted therapies[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 3631764.
- [14] Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, et al. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(2): 97-106.
- [15] Naveen SV, Kalaivani K. Cancer stem cells and evolving novel therapies: a paradigm shift[J]. *Stem Cell Investig*, 2018, 5: 4.
- [16] Basu-Roy U, Basilico C, Mansukhani A. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma[J]. *Cancer Lett*, 2013, 338(1): 158-167.
- [17] Siclari VA, Qin L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell[J]. *J Orthop Surg Res*, 2010, 5: 78.
- [18] Yan GN, Lv YF, Guo QN. Advances in osteosarcoma stem cell research and opportunities for novel therapeutic targets[J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(2): 268-274.
- [19] Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, et al. Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours[J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3469.
- [20] Nunik HS, Sjahjenny M. Analysis of CD133 and CXCR4 expression in osteosarcoma with metastasis[J]. *Pathology*, 2016, 48(Suppl 1): S144-S145.
- [21] Xie Y, Huang J, Wu M, et al. Expression of CD133 protein in osteosarcoma and its relationship with the clinicopathological features and prognosis[J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(4): 892-895.
- [22] Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, et al. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(4): 959-973.
- [23] Adhikari AS, Agarwal N, Wood BM, et al. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4602-4612.
- [24] He A, Yang X, Huang Y, et al. CD133(+) CD44(+) Cells mediate in the lung metastasis of osteosarcoma[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(8): 1719-1729.
- [25] Murase M, Kano M, Tsukahara T, et al. Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in bone sarcomas[J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(8): 1425-1432.
- [26] Brown HK, Tellez-Gabriel M, Heymann D. Cancer stem cells in osteosarcoma[J]. *Cancer Lett*, 2017, 386: 189-195.
- [27] Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis [J]. *Neoplasia*, 2005, 7(11): 967-976.
- [28] Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T, et al. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines[J]. *Int J Oncol*, 2009, 34(5): 1381-1386.
- [29] Martins-Neves SR, Lopes AO, do Carmo A, et al. Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 139.
- [30] Yi XJ, Zhao YH, Qiao LX, et al. Aberrant Wnt/ β -catenin signaling and elevated expression of stem cell proteins are associated with osteosarcoma side population cells of high tumorigenicity[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5042-5048.
- [31] Martins-Neves SR, Paiva-Oliveira DI, Fontes-Ribeiro C, et al. IWR-1, a tankyrase inhibitor, attenuates Wnt/ β -catenin signaling in cancer stem-like cells and inhibits in vivo the growth of a subcutaneous human osteosarcoma xenograft[J]. *Cancer Lett*, 2018, 414: 1-15.
- [32] Basu-Roy U, Seo E, Ramanathapuram L, et al. Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas[J]. *Oncogene*, 2012, 31(18): 2270-2282.
- [33] Matushansky I, Hernando E, Socci ND, et al. Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(11): 3248-3257.
- [34] Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(1): 11-26.
- [35] Martins-Neves SR, Paiva-Oliveira DI, Wijers-Koster PM, et al. Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(2): 286-295.
- [36] Rubin EM, Guo Y, Tu K, et al. Wnt inhibitory factor 1 decreases tumorigenesis and metastasis in osteosarcoma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(3): 731-741.
- [37] Wang DZ, Gao JF, Jing SF, et al. Antitumor effect of docetaxel in osteosarcoma by the inhibition of wnt signal channel[J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2015, 65(11): 597-601.
- [38] Krause U, Ryan DM, Clough BH, et al. An unexpected role for a Wnt-inhibitor: dickkopf-1 triggers a novel cancer survival mechanism through modulation of aldehyde-dehydrogenase-1 activity[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(2): e1093.
- [39] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [40] Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(9): 1649-1657.
- [41] Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, et al. Regulation of bone metabolism by Wnt signals[J]. *J Biochem*, 2016, 159(4): 387-392.

(收稿:2018-11-30)

(本文编辑:李圆圆)