

• 综述 •

乳腺肿瘤干细胞筛选方法和治疗抵抗研究进展

肖锡岗 房林

近年来肿瘤干细胞(tumor stem cell, TSC)的概念引起了学者们的广泛关注,已经成为肿瘤发生、发展机制研究中的热点。越来越多的研究表明,肿瘤干细胞除了存在于急性骨髓性白血病中^[1],也存在于诸多实体瘤中。乳腺肿瘤干细胞研究仍然是一个较新的领域,其与乳腺癌的形成、局部、远处转移及治疗抵抗等有关^[2-4]。学者们对有效筛选出乳腺肿瘤干细胞的方法进行了大量的研究,提高了乳腺肿瘤干细胞研究的效率。乳腺癌化疗后复发也许与肿瘤干细胞治疗抵抗效应(therapeutic resistance)有关,而针对治疗抵抗效应的靶向治疗有助于提高乳腺癌患者的生存率。笔者就乳腺肿瘤干细胞筛选方法和治疗抵抗的研究现状进行综述。

1 乳腺肿瘤干细胞研究概况

肿瘤干细胞和正常干细胞同样具有自我更新(self-renewal)的能力,可以引发肿瘤形成、复发和转移。肿瘤干细胞也可发生不对称分裂(asymmetrical cell division),生成一个分化肿瘤细胞和一个仍然具有自我更新能力的肿瘤干细胞^[5]。不同的是,肿瘤组织中肿瘤干细胞的含量稀少,其增殖往往不受调控,表现为无限制的生长和繁殖。2003年 Al Hajj 等^[6]利用流式细胞仪从8例乳腺癌患者的胸腔积液中分离出一类表型为 CD44⁺/CD24^{-/low}的乳腺癌细胞,发现约100个此类细胞即可在免疫缺陷小鼠(NOD/SCID mice)体内形成肿瘤,而1000个未分类的细胞方能生成肿瘤;并且在子代肿瘤中同样可分离出 CD44⁺/CD24^{-/low}的癌细胞,其具有相同的致瘤能力,从而证实乳腺癌中存在肿瘤干细胞。

乳腺肿瘤干细胞的来源得到众多学者关注。既然乳腺肿瘤干细胞是从乳腺癌中提取出来的,那么这些肿瘤干细胞是起源于正常干细胞,还是来源于基因突变后重新获得自我更新能力的已分化癌细胞? Shackleton 等^[7]以特定细胞表面标记为基础,从鼠乳腺组织中分离出独立的亚群细胞,最终鉴别出 Lin⁻/CD29^{hi}/CD24⁺亚群,通过移植该亚群可以培养得到很多乳腺干细胞。

作者单位:200072 上海,同济大学附属上海第十人民医院甲乳科

通信作者:房林, E-mail: fanglin@shdsyy.com.cn

为证明乳腺干细胞在乳腺癌形成过程中的潜在作用,作者取 MMTV-Wnt-1 小鼠(mouse mammary tumor virus-Wnt-1 mice)的乳腺癌前病变部分组织用于分离培养获得 $\text{Lin}^-/\text{CD}29^{\text{hi}}/\text{CD}24^+$ 亚群细胞。实验数据证实单个 $\text{Lin}^-/\text{CD}29^{\text{hi}}/\text{CD}24^+$ 细胞具有多潜能性和自我更新能力,说明这些细胞是乳腺干细胞。由于其来源于乳腺癌前病变组织,可以推测这些乳腺干细胞在乳腺癌的发生、发展中起着潜在的作用。

肿瘤的形成是一个多因素、多步骤的过程。Hwang Verslues 等^[8]认为,成熟细胞存活时间短,在癌变发生之前,通常已经凋亡,而正常干细胞的生命期限比已分化细胞长,正常干细胞更可能积累更多的基因突变,由此推测肿瘤干细胞来源于正常干细胞;肿瘤干细胞与正常干细胞的主要不同点在于细胞增殖的失控,大多数的抑癌基因(RB、BRCA1、BRCA2 和 p53)与细胞周期控制、DNA 损伤修复和凋亡调控密切相关;故可以推测上述某个抑癌基因的突变是导致正常干细胞转变为肿瘤干细胞的关键一步。

2 乳腺肿瘤干细胞的筛选方法

乳腺肿瘤干细胞一经证实存在,有关其筛选方法的研究层出不穷。这些研究的目的在于应用最合适的标记有效地筛选乳腺肿瘤干细胞,从而用以乳腺癌发病机制和生物治疗等方面的研究。

2.1 细胞表面标记物 $\text{CD}44^+/\text{CD}24^{-/\text{low}}/\text{Lin}^-/\text{ESA}^+$

$\text{CD}44^+/\text{CD}24^{-/\text{low}}/\text{Lin}^-/\text{ESA}^+$ (epithelial specific antigen, ESA) 是较早被发现的乳腺肿瘤干细胞表面标记。2003 年 Al Hajj 等^[6]研究人乳腺癌细胞在免疫缺陷小鼠体内的生长情况,发现只有少数人乳腺癌细胞能形成乳腺肿瘤,并命名这些细胞为乳腺肿瘤形成细胞。作者利用流式细胞仪从 8 例乳腺癌患者的胸腔积液中分离得到一类表型为 $\text{CD}44^+/\text{CD}24^{-/\text{low}}$ 的乳腺癌细胞,此类细胞仅 100 个即可在免疫缺陷小鼠中形成肿瘤,而未分类的细胞则需 1000 个方能生成肿瘤;且在 $\text{CD}44^+/\text{CD}24^{-/\text{low}}/\text{Lin}^-$ 肿瘤形成细胞的子代肿瘤中同样可分离出 $\text{CD}44^+/\text{CD}24^{-/\text{low}}$ 的癌细胞,并具有相同的致癌能力,从而证实乳腺癌中存在肿瘤干细胞,通过细胞表面特异标记物 $\text{CD}44^+/\text{CD}24^{-/\text{low}}/\text{Lin}^-$ 可分离获得乳腺肿瘤干细胞。由于 $\text{ESA}^+/\text{CD}44^+/\text{CD}24^{-/\text{low}}/\text{Lin}^-$ 乳腺癌细胞可在免疫缺陷小鼠中形成肿瘤,而 $\text{ESA}^-/\text{CD}44^+/\text{CD}24^{-/\text{low}}/\text{Lin}^-$ 细胞则不能形成肿瘤,所以乳腺肿瘤干细胞可以根据上皮特异性抗原 ESA 的表达进一步分类筛选。

2.2 肿瘤细胞中侧亚群的分离和细胞表面标记物 $\text{CD}55^{\text{hi}}$

利用具有细胞渗透性的 DNA 特异性染料烟酸己可碱 33342 (Hoechst 33342) 浸润肿瘤组织后,发现该种染料在肿瘤干细胞中逐渐溢出,在癌细胞中

积聚,这与肿瘤干细胞的细胞膜表面 ABC 运载体超家族(ATP binding cassette transporter superfamily,简称 ABC 超家族)功能有关。通过流式细胞仪可以分离得到淡染或不染的肿瘤干细胞亚群,由于其呈点状位于大多数细胞的边缘,而被称为侧亚群(side population,SP)^[9]。研究发现在实体瘤如非小细胞肺癌^[10]、胃肠道癌^[11]、鼻咽癌^[12]、乳腺癌^[13]中存在侧亚群细胞。这些研究证实侧亚群细胞可以自我更新和抑制细胞分化成熟,表现出肿瘤干细胞样特性。另外,由于染料 Hoechst 33342 本身会诱导细胞凋亡,若要筛选乳腺肿瘤干细胞用于细胞凋亡评估研究分析,则不甚适合应用 Hoechst 33342 来筛选乳腺肿瘤干细胞。Xu 等^[14]研究发现,在两个乳腺癌细胞系中分离得到的侧亚群细胞中,CD55 呈高表达。作者应用 CD55^{hi}作为标记筛选分离乳腺肿瘤干细胞,发现这些 CD55^{hi}细胞和侧亚群细胞一样,对于胞质缺失或神经酰胺诱导的细胞凋亡具有顽强的抵抗性,抗凋亡分子 Bcl-2 亦呈高度表达。因此,在研究侧亚群细胞的功能时,CD55^{hi}可作为筛选侧亚群细胞的标志物。

2.3 细胞表面标记 CD133

Wright 等^[15]应用流式细胞仪从 BRCA1^{Δexon11}/p53^{+/-}鼠乳腺癌构建的细胞系中辨别出乳腺肿瘤干细胞的另一种表面标记——CD133。作者还发现,CD133⁺干细胞样亚群和 CD44⁺/CD24⁻亚群的 CD 标记并没有重叠,两个亚群都有相似的自我更新能力,都能在各自己的亲代细胞中重建细胞群落。研究结果提示,BRCA1 缺陷小鼠乳腺肿瘤中包含异质性的干细胞亚群具有不同的细胞表面标记。在肿瘤发生、发展过程中,哪类肿瘤干细胞亚群所发挥的作用更大则需要进一步的研究。

2.4 香荚兰醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase,ALDH)

Ginestier 等^[16]利用体外或体内的实验证明,在正常的和癌性的乳腺上皮细胞亚群中 ALDH 活性增高,这些亚群具有干细胞或祖细胞属性。ALDH⁺乳腺癌细胞亚群具有致瘤性和自我更新的能力,其形成的肿瘤含有亲代肿瘤的异质性;同时作者还发现,只有一小部分的 ALDH⁺细胞与 CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻细胞相重叠,所有的 ALDH⁺细胞都可以在 NOD/SCID 小鼠中形成肿瘤。在体内实验中,同时具有 ALDH⁺和 CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻的细胞亚群可以更快地形成肿瘤,所形成的肿瘤体积也更大。相反,只具有 CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻而没有 ALDH⁺的细胞亚群在体内实验中不能形成肿瘤^[16]。因此,ALDH⁺可作为筛选乳腺肿瘤干细胞的标记。

2.5 细胞表面受体 PROCR(protein C receptor, CD201)

Shipitsin 等^[17]依靠 CD44⁺/CD24^{-/low}Lin⁻这个表面标记来初步分离乳腺肿瘤干细胞,进一步建立辨认新标记的方法。作者从乳腺癌患者的胸腔积

液中分离得到 CD44⁺ 细胞,并在这些细胞的基因表达谱中辨别出一种 CD44⁺ 细胞特异性基因产物——PROCR(一种细胞表面受体),且发现 PROCR 存在于 CD44⁺ 乳腺癌细胞的比例为 100%。随后,Shipitsin 等^[17]以 PROCR 为标记成功地从原发性浸润乳腺癌中分离得到 CD44⁺/PROCR⁺ 细胞,并发现这些细胞都富有与细胞运动性、趋化作用、止血和血管发生有关的基因。因此,PROCR 亦可作为表面标记来筛选乳腺肿瘤干细胞。

2.6 乳腺球细胞的体外培养

Zhou 等^[18]认为,肿瘤干细胞具有某些独特的特点,这也许有助于在体外培养中形成形态各异的细胞群落。作者试着利用这个假设的群落多态性从体外培养的人恶性神经胶质瘤细胞群落中辨别肿瘤干细胞。结果发现来自人神经胶质瘤细胞系 U251 的一小部分细胞在培养中形成了紧凑、圆形的群落。这些群落中的大多数细胞都具有自我更新的能力,可以形成肿瘤球(tumor spheres),而且可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。另外,在这些紧凑群落的肿瘤细胞中,几个神经干细胞相关基因呈高度表达。

乳腺肿瘤干细胞具有多个亚群,学者们推测其亦有独特的结构特点。在体外培养中,这些特性或许可以使得乳腺肿瘤干细胞形成形态各异的细胞群落。Ponti 等^[19]研究发现,从 3 例乳腺癌组织和一个确定的乳腺癌细胞系中取出细胞进行体外培养可以得到不黏附的球体簇细胞群(nonadherent spherical clusters),也称为乳腺球细胞(mammosphere cells),这些球体簇中的细胞被证实包含两类细胞,一类是具有自我更新和不断增殖能力的未分化细胞,一类是可定向分化为导管上皮或者肌上皮的细胞。这些球体簇细胞的特点是 CD44⁺/CD24⁻ 和 Cx43⁻,并表达许多血管形成和细胞保护相关因子以及假定的干细胞标志物 Oct-4,在 SCID 小鼠的乳脂垫中注入约 1000 个这类细胞便能形成新的肿瘤。这种体外培养模型可作为获得乳腺肿瘤干细胞的方法之一。

2.7 克隆柱法

对克隆形态学的研究最初来源于表皮细胞。根据文献报道,表皮细胞的生长存在 3 种不同的细胞克隆^[20]。全克隆中富含干细胞,具有无限增殖的能力;亚克隆为分化的短暂增殖细胞;部分克隆介于两者之间,又称间生态克隆。谢竞等^[21]研究应用“克隆柱法”提取 MCF-7 乳腺癌细胞系中癌干细胞。作者参考 Ponti 等^[19]的方法并结合克隆形态学理论进行适当改良,首先通过克隆柱法先从 MCF-7 乳腺癌细胞中获得富含干细胞的亚系(MCF-7H),然后再进一步采用低密度接种加干细胞培养基筛选扩增,获得呈“球样”生长的乳腺癌干细胞。同流式细胞筛选法相比,其优势在于可以连续传代并进行后续的基

因功能研究;同传统的干细胞培养基悬浮培养筛选相比,其优势在于干细胞筛选成功率提高,且细胞活力增加。

3 乳腺肿瘤干细胞与治疗抵抗效应

肿瘤干细胞与肿瘤形成、局部复发与远处转移、化疗与放射治疗抵抗(radioresistance)有关^[2-4]。乳腺肿瘤干细胞化疗抵抗(chemoresistance)的机制非常复杂,也没有明确的定义。通常认为这些机制包括 ABC 运载体的过度表达、解毒酶的作用(香荚兰醛脱氢酶)、低细胞周转率、激活 DNA 检测点反应的能力^[22]和 DNA 修复合活性高^[23]等。

Chang 等^[24]从应用多西紫杉醇治疗后的原发性乳腺癌患者中获得标本,不管这些标本起初的组织学形态如何,基因芯片分析提示它们的基因表达图型具有相似性。这提示它们可能来源于共同的具有化疗抵抗效应的细胞。

乳腺肿瘤干细胞含有高水平的 ABC 运载体(尤其是 ABCG2),这是其与肿瘤中其他细胞的一个区别^[25]。ABC 运载体可以通过反流泵机制将药物泵出乳腺肿瘤干细胞外以消除药物对该细胞的损害,因此,这种属性使得乳腺肿瘤干细胞具有药物治疗抵抗性^[26]。临床上最合适的化疗方案可以杀灭实体瘤中的大部分细胞,但是一小部分细胞(被认为是肿瘤干细胞)由于含有 ABC 运载体而具有药物抵抗性,这些未被杀灭的细胞起初处于静止的 G₀ 期。经过一段时间后或者受到某些刺激(细胞因子的释放、热休克蛋白等)后,这些处于静止状态的肿瘤干细胞反而被诱导分裂而形成祖细胞,随后一些祖细胞分化成具有化疗抵抗表型的新成熟癌细胞。这就是临床上具有获得性化疗抵抗性的乳腺癌模型。处于这一期肿瘤的患者易产生复发肿瘤,并且对进一步的化疗不敏感^[22]。

上面曾提到通过流式细胞仪可以分离得到烟酸己可碱 33342 淡染或不染的肿瘤干细胞亚群即侧亚群。Steiniger 等^[27]报道了侧亚群细胞具有更强的致肿瘤性和化疗抵抗性。作者在对乳腺癌细胞系侧亚群细胞进行蛋白质组分析时发现,一种小分子质量的肌动蛋白结合蛋白胸腺素 β₄ 与化疗抵抗有关,在应用阿霉素和紫杉醇化疗时抑制胸腺素 β₄ 的功能可以激活肿瘤细胞的凋亡,从而增加其化疗敏感性。

ALDH1 是一种解毒酶。500 个 ALDH1⁺ 细胞就可以在 NOD/SCID 小鼠中形成肿瘤^[16]。Chuthapisith 等^[22]发现应用阿霉素和紫杉醇化疗的乳腺癌组织具有较高的 ALDH1 活性。在其他研究中,应用环磷酰胺治疗的白血病和结肠癌细胞被发现有 ALDH1 的高度表达^[28-29]。ALDH1 作为一种解毒酶,又在肿瘤干细胞中呈过度表达,因此,可以推测这也是肿瘤干细胞治疗抵

抗的原因之一。

Cairns^[23]认为干细胞被 X 射线、化疗药物等因素损伤后将以一种特殊的方式来修复 DNA,即所谓永生的单链(immortal strand),推测乳腺肿瘤干细胞亦可通过该方式获得较高的 DNA 修复合活性,从而表现出化疗抵抗效应。Cairns^[23]亦认为,不同细胞对于 DNA 损伤呈现不同的反应是因为这些细胞处于不同的细胞周期以及对凋亡诱导表现出不同反应。调控细胞周期和细胞凋亡的分子也许在一定程度上保护宿主细胞免受损伤。Phillips 等^[30]发现 CD44⁺/CD24⁻细胞对其他形式的治疗(包括放射治疗)具有明显的抵抗性。作者从 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系中分离得到的 CD44⁺/CD24⁻细胞较其余细胞具有更强的放射治疗抵抗效应。然而,放射治疗抵抗效应的机制还未被完全阐释,其有可能与 CD44⁺/CD24⁻细胞中活性氧簇的诱导减少和 DNA 损坏检测点反应的激活有关。

4 乳腺肿瘤干细胞的靶向治疗

Li 等^[31]所作的新辅助化疗研究证实,CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻细胞的数量在接受化疗或者放射治疗的患者中有所上升,而在接受 EGFR/HER-2 酪氨酸激酶抑制剂拉帕替尼(lapatinib)治疗的患者中并未上升。这似乎提示,可应用特定抑制剂调节或阻断某些信号转导通路的方法来阻止肿瘤干细胞自我更新。Massard 等^[32]认为,针对各种与自我更新有关的信号转导通路进行选择性的靶向治疗有助于消除肿瘤干细胞,这些通路包括 Notch、Shh、BMI-1 和 Wnt。但是,如果正常干细胞和肿瘤干细胞的自我更新信号转导通路相同,那么针对肿瘤干细胞的选择性靶向治疗就会变得相当复杂,因为治疗的同时也可能损害正常干细胞。幸运的是,肿瘤干细胞的自我更新更依赖一些特定的假定信号通路^[33]。肿瘤干细胞的自我更新所涉及的信号通路有 Hedgehog、Notch 和 Wnt,以及抑癌基因 PTEN、TP53 和原癌基因 HER-2^[34]。

ABC 运载体可使得肿瘤干细胞具有化疗抵抗性,因此,针对 ABC 运载体的靶向治疗药物可以增加肿瘤对化疗药物的敏感性。Yang 等^[35]通过体外实验发现,应用酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼治疗具有多药物抵抗性的乳腺癌可逆转其化疗抵抗。Takigawa 等^[36]所进行的体外实验亦证实吉非替尼消除了小细胞肺癌对于 SN-38 的化疗抵抗性。因此,吉非替尼联合目前最佳的化疗方案或许可以有效地消灭乳腺肿瘤干细胞。

黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白聚糖(melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan, MCSP)是一种最初被认为只存在于黑色素瘤细胞表面的糖蛋白与蛋白聚糖聚合物。MCSP 在黑色素瘤细胞的转移、侵袭和血管生成等方

面发挥重要作用。近来发现,其亦存在于 CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻ 乳腺肿瘤干细胞表面^[37]。Gupta 等^[38]通过 FunctionFIRST™平台发现了第一个可与 MCSP 结合的单克隆抗体——AR11BD-2E11-2。免疫组化分析提示其可特异地与乳腺癌和黑色素瘤细胞相结合,而极少与正常细胞相结合。活体外实验显示,其针对乳腺癌和卵巢癌表现出明显的细胞毒性,针对乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 和卵巢癌细胞系 OVCAR-3 的体内试验亦发现该单克隆抗体明显的抗肿瘤活性。应用单克隆抗体 AR11BD-2E11-2 特异地结合 MCSP 从而杀死肿瘤干细胞,是一项较新的乳腺癌治疗方式的研究,提示研究者可通过 FunctionFIRST™平台发现更多针对肿瘤干细胞特异表面抗原的单克隆抗体。乳腺肿瘤干细胞表面有许多特异的标记,如 CD44、CD133 等,针对这些表面标记的靶向免疫治疗也值得深入研究,前景值得期待。

Ribacka 等^[39]提出,溶瘤病毒可以通过感染方式进入细胞,故其也许可以抵抗肿瘤干细胞的防御机制。溶瘤腺病毒可根据谱系特征性细胞表面标志、有功能障碍的干细胞信号通路或者上调的致癌基因来识别肿瘤干细胞,进而感染并攻击肿瘤干细胞。由于大多数人都经受过各种野生型的腺病毒感染,故正常干细胞可能对腺病毒具有天然的抵抗力,这使得溶瘤腺病毒将特异杀伤肿瘤干细胞,而不损害正常干细胞。

诱导肿瘤干细胞分化是一种新的靶向治疗方法。肿瘤干细胞被诱导分化后失去自我更新能力,于是无法形成新的肿瘤。全反维甲酸(RA)就是一种诱导细胞分化的药物,它和维生素 A 类似物可以促进上皮细胞分化和通过调节信号转导来逆转肿瘤的进一步生长^[32]。研究者曾应用全反维甲酸加上后期的化疗来治疗急性早幼粒细胞白血病和一些实体肿瘤^[40]。另外,骨形态发生蛋白(BMP-4)是一种无毒性的效应分子,它可以减少干细胞样肿瘤形成细胞增殖和诱导神经分化标记的表达,阻断人神经胶质瘤细胞的肿瘤形成效应^[41]。诱导乳腺肿瘤干细胞分化的药物有待进一步研发。这种治疗方式对于乳腺癌的根治来说很有意义。

近年来的肿瘤研究提出了一种新的肿瘤生长模式——肿瘤干细胞生态位(tumor stem cell niche)^[42]。该模式表明,肿瘤组织中存在肿瘤干细胞生态位,每个生态位包括由特殊血管床结构来支持的一群肿瘤干细胞,其中血管床由间质细胞和细胞外基质组成。位于生态位中的肿瘤干细胞不断进行不对称分裂,一部分子代细胞停留在生态位中继续生长,其余的子代细胞则离开生态位,进一步增殖并最终死亡。肿瘤干细胞生态位通过提供子代肿瘤细胞来支配肿瘤组织的持续生长。血管生成抑制剂(如血管内皮生长因子抑制剂贝伐单抗)可以减少肿瘤干细胞生态位的血供。Baguley^[43]认为,目前的化

疗药物与血管生成抑制剂联合应用可能减少肿瘤干细胞的数量,这不同于传统的针对癌细胞本身的化疗。肿瘤干细胞生态位的概念为研究者提供了一种新思路来发现新的治疗方法。

5 结语

乳腺肿瘤干细胞概念的提出是人类认识乳腺癌发病机制的一大进步,为乳腺癌发病机制、早期诊断和根治方法的研究提供了新的方向。但是,乳腺肿瘤干细胞的研究仍存在诸多问题。虽然学者们发现了许多乳腺肿瘤干细胞筛选标记和方法,但是仍未形成共识。如何有效综合利用这些筛选标记,以及通过研究发现更为精确高效的筛选标记是迫切需要解决的问题。乳腺肿瘤干细胞被证实具有治疗抵抗效应,但是其机制非常复杂。以上所述乳腺肿瘤干细胞治疗抵抗效应机制还需要更多的研究数据支持。乳腺肿瘤干细胞靶向治疗的研究带给人们根治乳腺癌的希望,这将是乳腺癌治疗发展中的一大飞跃性的突破。

【关键词】 乳腺肿瘤干细胞;筛选方法;治疗抵抗;靶向治疗

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

参考文献

- [1] 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.
- [2] Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest*, 2005,115:1503-1521.
- [3] Spillane JB, Henderson MA. Cancer stem cells: a review. *ANZ J Surg*, 2007,77:464-468.
- [4] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*,2005,5:275-284.
- [5] Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990,110:1001-1020.
- [6] Al Hajj M, Wicha MS, Benito Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100:3983-3988.
- [7] Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 2006, 439:84-88.
- [8] Hwang Verslues WW, Chang KJ, Lee HP, et al. Breast cancer stem cells and tumor suppressor genes. *J Formos Med Assoc*, 2008, 107:751-766.
- [9] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter *crp1/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.
- [10] Donnenberg VS, Landreneau RJ, Donnenberg RD. Tumorigenic stem and progenitor cells: implications for the therapeutic index of anti-cancer agents. *J Control Release*, 2007,122: 385-391.
- [11] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells*,2006,24:506-513.
- [12] Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res*,2007,67:3716-3724.

- [13] Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, et al. Functional and molecular characterization of mammary side population cells. *Breast Cancer Res*, 2003, 5;R1-R8.
- [14] Xu JX, Morii E, Liu YL, et al. High tolerance to apoptotic stimuli induced by serum depletion and ceramide in side-population cells; high expression of CD55 as a novel character for side-population. *Exp Cell Res*, 2007, 313;1877-1885.
- [15] Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, et al. Breast breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*, 2008, 10;R10.
- [16] Ginestier C, Hur MH, Charafe Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 2007, 1;555-567.
- [17] Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 2007, 11;259-273.
- [18] Zhou ZH, Ping YF, Yu SC, et al. A novel approach to the identification and enrichment of cancer stem cells from a cultured human glioma cell line. *Cancer Letters*, 2009, 281;92-99.
- [19] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 2005, 65;5506-5511.
- [20] Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84;2302 - 2306.
- [21] 谢竞,周艳,唐鹏,等. 克隆柱法提取 MCF-7 乳腺癌细胞系中癌干细胞. *中华乳腺癌杂志:电子版*, 2009, 3;187-194.
- [22] Chuthapisith S, Eremin J, El Sheemey M, et al. Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surg Oncol*, 2010, 19;27-32.
- [23] Cairns J. Cancer and the immortal strand hypothesis. *Genetics*, 2006, 174;1069-1072.
- [24] Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 2005, 23;1169-1177.
- [25] Hirschmann Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101;14228-14233.
- [26] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5;275-284.
- [27] Steiniger SCJ, Coppinger JA, Kruger JA, et al. Quantitative mass spectrometry identifies drug targets in cancer stem cell-containing side population. *Stem Cells*, 2008, 26;3037-3046.
- [28] Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One*, 2008, 3;e2428.
- [29] Bao F, Polk P, Nordberg ML, et al. Comparative gene expression analysis of a chronic myelogenous leukemia cell line resistant to cyclophosphamide using oligonucleotide arrays and response to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Res*, 2007, 31;1511-1520.
- [30] Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24^(-/low)/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98;1777-1785.
- [31] Li X, Lewis MT, Huang J, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100;672-679.
- [32] Massard C, Deutsch E, Soria JC. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol*, 2006, 17;1620-1624.
- [33] Pardoll R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3;895-902.
- [34] Dave B, Chang J. Treatment Resistance in Stem Cells and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2009, 14;79-82.
- [35] Yang CH, Huang CJ, Yang CS, et al. Gefitinib reverses chemotherapy resistance in gefitinib-insensitive multidrug resistant cancer cells expressing ATP-binding cassette family protein. *Cancer Res*, 2005, 65;6943-6949.
- [36] Takigawa N, Takeyama M, Kozuki T, et al. Combination of SN-38 with gefitinib or imatinib overcomes SN-38-resistant small-cell lung cancer cells. *Oncol Rep*, 2007, 17;983-987.
- [37] Erfurt C, Emmerling S, Klotz C, et al. Melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan as a new target antigen for CD4⁺ T cells in melanoma patients. *Int J Cancer*, 2009, 124;2341-2346.
- [38] Gupta AK, Ferry A, Amoozgar M, et al. A monoclonal antibody targeting the breast cancer stem cell marker melanoma-

associated chondroitin sulfate proteoglycan improves survival and demonstrates anti-tumor activity *in vivo*. EJC Supplements, 2008,6:165-165.

- [39] Ribacka C, Pesonen S, Hemminki A. Cancer, stem cells, and oncolytic viruses. AnnMed, 2008,40:496-505.
- [40] Ohno R, Asou N, Ohnishi K. Treatment of acute promyelocytic leukemia: strategy toward further increase of cure rate. Leukemia,2003,17:1454-1463.
- [41] Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. Nature,2006,444:761-765.
- [42] Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. Nature Rev Cancer,2005,5:311-321.
- [43] Baguley BC. Tumor stem cell niches; a new functional framework for the action of anticancer drugs. Recent Pat Anticancer Drug Discov,2006,1:121-127.

(收稿日期:2009-07-20)

(本文编辑:明佳)

肖锡岗,房林. 乳腺肿瘤干细胞筛选方法和治疗抵抗研究进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2010,4(3):329-338.