

文章编号: 1004-0374(2009)04-0549-07

# 肿瘤干细胞的认知历程与研发热点

罗海涛\*, 许瑞安

(华侨大学分子药物研究所 & 分子药物教育部工程研究中心, 泉州 362021)

**摘要:** 肿瘤组织中存在一小群能够自我更新、增殖和分化, 对肿瘤的发生、发展、复发、转移起决定作用的细胞, 即肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)。在传统理论方法已不能攻克癌症的情况下, 肿瘤干细胞理论为我们重新认识肿瘤的起源和本质提供了新的方向和视角。从20世纪50年代至今, 随着生物技术的发展, 肿瘤干细胞理论经历了从设想到验证的漫长历程。但该理论自提出之日起便受到来自各方面不同观点的质疑。当今针对肿瘤干细胞癌症治疗主要集中在靶向问题上。因此, 寻找特异的肿瘤干细胞标志物, 探索肿瘤干细胞与周围微环境间的复杂关系以及发现调控其功能的关键信号通路成为当前研究的热点。

**关键词:** 肿瘤干细胞; 认知历程; 靶向策略; 质疑

**中图分类号:** R730.21; Q813 **文献标识码:** A

## Progress in cancer stem cell research

LUO Hai-tao\*, XU Rui-an

(Institute of Molecular Medicine Huaqiao University & Molecular Medicine Engineering Research Center, Ministry of Education, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** Tumours consist of a minority subpopulation of tumor cells (cancer stem cells, CSCs) with stemness properties such as self-renewal, proliferation and differentiation, which is responsible for tumor occurrence, growth and metastasis. In the context of failure in conventional anti-tumor treatments, the theory about cancer stem cell provides a new insight to recognize origin and essence of tumours. From 1950s to the present, this theory has experienced from idea to validation with development in biotechnology. However, since the proposition of cancer stem cell theory, the opposite opinion has existed. Current researches are mainly focusing on targeting strategies, such as in search of specific markers, complex relationships between CSCs and their niche, and mechanism of key pathways that regulate CSCs functions.

**Key words:** cancer stem cells; developments; targeting strategies; questions

癌症是在多因素作用下, 使细胞在基因水平上发生改变, 从而具备无限增殖和转移能力而形成的恶性肿瘤。当前治疗癌症的主要方法为手术、放疗和化疗。近些年, 癌症的治疗又建立起基因治疗、免疫治疗等, 这些方法的目的在于最大限度地杀死肿瘤组织和肿瘤细胞。然而, 治疗结果并不理想, 常会发生肿瘤治疗的不彻底性和复发。肿瘤干细胞理论的提出开启了肿瘤治疗领域的新纪元, 是对癌症本质观念的一种突破。这一假说认为肿瘤组织中存在少量干细胞样的癌细胞亚群, 它可作为维持肿

瘤的源泉, 能够分化为组成肿瘤的大部分细胞, 并使肿瘤具有异质、增殖、浸润等特性, 这一细胞亚群称之为肿瘤干细胞。事实上, 早在20世纪50年代, 一些生物学家的实验结果就已经初步表明了肿瘤干细胞的存在, 这些思想的火花对于这以后的

收稿日期: 2009-05-22; 修回日期: 2009-06-30

基金项目: 国家“863”项目(2005AA216050; 2008AA02Z135)

\*通讯作者 E-mail: luoh1985@hqu.edu.cn

研究提供了广阔的思路。当今的研究主要集中在如何高效地靶向肿瘤干细胞,以便从源头上消灭肿瘤。目前,根据特异性标记已从多种癌症中分离出肿瘤干细胞,并对其进行了分析和鉴定(表 1)。此外,由于肿瘤微环境对于癌症的发生、发展、转移起关键作用,通过阻断肿瘤干细胞与其微环境的关系,如干扰周围炎症环境防止其发生转移<sup>[1]</sup>,已取得了较好的治疗效果。对于肿瘤干细胞调控机制的研究可以从本质上认识其功能,通过与正常干细胞的比较分析,已发现了多条信号通路在肿瘤干细胞中扮演重要角色,其中包括维持干细胞性质的 Wnt、Notch、Hedgehog 通路等<sup>[2]</sup>。然而,在肿瘤干细胞理论发展的同时,一直受到各方面不同观点的质疑。伴随着科学技术手段的不断提高,这些质疑将逐步揭开。

## 1 肿瘤干细胞理论及其相关技术的发展历程

早在 1963 年, Bruce 等<sup>[20]</sup>从 8—10 个月大小的患有自发性白血病的雌性小鼠的胸腺中提取出淋巴瘤细胞,将其静脉注射受体小鼠后可在其脾脏上观察到明显的黄色细胞集落。由此证明了移植的淋巴瘤细胞中有一小群(1%左右)具有干细胞性质的能够在受体小鼠的脾脏上形成集落的亚细胞群。随后 Buick 等<sup>[21]</sup>证明髓系白血病小鼠原始成髓细胞可以在甲基纤维素培养基上形成集落,并表示如能对其中的集落细胞进行检测和分析,将会建立起其与白血病干细胞的关系。1967—1981 年, Fialkow 等<sup>[22-24]</sup>运用将雌性细胞中一条 X 染色体失活,并以 X 染色体-连锁基因(6-磷酸葡萄糖脱氢酶)作为标记的分析方法,对急性髓系白血病(acute myelocytic leukemia, AML)和慢性髓系白血病(chronic myelocytic leukemia,

表 1 不同种类癌症中肿瘤干细胞的标志物

肿瘤类型	肿瘤干细胞标志(鉴定年限)	肿瘤类型	肿瘤干细胞标志(鉴定年限)
结肠癌	CD133 <sup>+</sup> (2007) <sup>[3, 4]</sup> EpCAM <sup>high</sup> CD44 <sup>+</sup> CD166 <sup>+</sup> (2007) <sup>[5]</sup>	卵巢癌	CD44 <sup>+</sup> CD117 <sup>+</sup> (2008) <sup>[12]</sup>
视神经母细胞瘤	ABCG2/ALDH1, Mcm2, SCA-1, p63(2005) <sup>[6]</sup>	胃癌	CD45 <sup>+</sup> GFP <sup>+</sup> (2004) <sup>[13]</sup>
急性髓系白血病	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> (1997) <sup>[7]</sup>	头颈癌	CD44 <sup>+</sup> (2007) <sup>[14]</sup>
乳腺癌	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-/low</sup> Lineage <sup>-</sup> (2003) <sup>[8]</sup>	胰腺癌	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> ESA <sup>+</sup> (2007) <sup>[15]</sup>
脑瘤	CD133 <sup>+</sup> (2003) <sup>[9]</sup>	前列腺癌	CD133 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> Integrin $\alpha_2\beta_1$ <sup>hi</sup> (2007) <sup>[16]</sup>
肺癌	CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> Pecam <sup>-</sup> (2005) <sup>[10]</sup> CD133 <sup>+</sup> (2007) <sup>[11]</sup>	肝癌	CD45 <sup>-</sup> CD90 <sup>+</sup> (2008) <sup>[17]</sup>
		黑色素瘤	CD20 <sup>+</sup> (2005) <sup>[18]</sup> ABC5 <sup>+</sup> (2008) <sup>[19]</sup>

CML)以及特发性血小板增多症患者的研究分析表明,白血病及骨髓异常增生是由其中具有干细胞样的细胞或祖细胞增殖分化而形成的克隆性集落。随后 Griffin 和 Lowenberg<sup>[25]</sup>报道了人类急性髓系白血病(AML)细胞能以较低的频率在羧甲基纤维素培养基上形成集落,并对 AML 中的成集落细胞(AML spleen colony-forming units, AML-CFU)的性质和特点做了大量的分析,但没能对其进行分离纯化。

在当时针对血液系统实验的同时,有关实体瘤的实验也取得了一些成绩。1961 年, Southam 和 Brunschwig<sup>[26]</sup>从 35 例晚期癌症患者体内提取出肿瘤细胞,并将这些细胞以皮下注射的方式分别输入到同一患者体内,结果显示这些细胞致瘤的频率很低,只有达到 100 万个细胞时才能使肿瘤发生。1977 年, Hamburger 和 Salmon<sup>[27]</sup>发现只有 0.02%—0.1% 的小细胞肺癌、卵巢腺癌、神经母细胞瘤、黑色

素瘤等实体瘤细胞能够在特制的培养基上形成集落。这些实验初步证明肿瘤组织中的大部分细胞可能来自其中一些具有干细胞性质的亚细胞群,即肿瘤干细胞。事实上,肿瘤干细胞学说与 19 世纪人们提出的胚胎静息假说类似,当时认为是由于处在静息期的胚胎残余部分得以激活而导致了癌症的发生,并且这个假说当时被很多实验所支持。Sell 和 Pierce<sup>[28]</sup>及 Potter<sup>[29]</sup>进一步延伸和修正了这个假说,他们的结果表明肿瘤中存在一些具有增殖分化功能的细胞,这些细胞与正常组织中的干细胞有着相似的自我更新途径,可能是正常干细胞分化停滞的结果,故两者之间有着十分密切的联系。

先前的实验虽表明肿瘤中存在干细胞性质的细胞群体,但由于技术手段的限制并未对这些细胞进行分离和鉴定。自荧光技术的诞生到流式细胞术的运用,再到各种实验小鼠模型的建立,大大推进了

细胞技术的发展。与此同时, 肿瘤干细胞理论也得到了迅猛的发展。根据细胞表面上的可标记抗原, 利用荧光抗体技术及由此发展而来的高通量多参数的流式细胞技术, 可以对血液系统和实体组织中多种类型的细胞进行鉴定与分析。在细胞技术发展的同时, 实验小鼠模型的建立对研究干细胞的自我更新和无限繁殖功能具有重要的意义。1985年, Czitrom等<sup>[30]</sup>在对抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)的功能和来源进行研究时构建了重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficient, SCID)小鼠模型。随后, 在SCID小鼠模型基础上逐步完善了异体移植系统<sup>[31, 32]</sup>, 但是SCID小鼠模型不能满足对于肿瘤细胞连续的传代移植和AML多亚型分析等的研究<sup>[33]</sup>。因此, 在1992年, Prochazka等<sup>[34]</sup>建立了非肥胖型糖尿病/重症联合免疫缺陷(severe combined immunodeficient and non-obese diabetic, NOD/SCID)小鼠模型。John Dick等随后利用这个模型对各类型的白血病进行大量研究, 并在1997年与Bonnet首次鉴定出白血病干细胞, 这是在肿瘤干细胞研究领域的一大突破, 同时也开辟了肿瘤治疗的另一片天地<sup>[7]</sup>。

2001年, Reya等<sup>[35]</sup>在Nature上发表文章提出当代肿瘤干细胞学说, 认为肿瘤组织存在一小部分具有干细胞性质的肿瘤干细胞, 其具有无限的自我更新、多向分化潜能与高度增殖能力, 能够产生不同表型的肿瘤细胞, 并赋予肿瘤异质、增殖、浸润等特性。随后, 对于这个假说的验证试验进行得如火如荼。

继1977年Hamburger等对实体瘤干细胞的研究, 由于当时条件限制未对这部分细胞进行纯化, 2003年, Al-Hajj等<sup>[8]</sup>首次从实体瘤组织中分离纯化肿瘤干细胞。他们将乳腺癌病理组织标本制成单细胞悬液, 筛选出细胞表面标志为 $ESA^+ CD44^+ CD24^{-/low} Lin^-$ 的致瘤性癌细胞, 发现这类细胞在NOD/SCID小鼠中可持续地形成肿瘤, 并有很强的致瘤性。研究表明, 200个 $ESA^+ CD44^+ CD24^{-/low}$ 乳腺癌细胞便可在受体小鼠体内形成移植瘤, 而1万个 $ESA^- CD44^+ CD24^{-/low}$ 的乳腺癌细胞在相同的时间内未形成肿瘤。同样数量两种表型的细胞, 前者的致瘤时间要早于后者2—3周。这种干细胞样特性的肿瘤细胞, 虽然在数量上只占整个乳腺肿瘤细胞的2%, 但通过有限稀释分析发现, 其致瘤的能力至少是其他表型肿瘤细胞的50倍。至此, 血液系

统与实体瘤中的肿瘤干细胞均得到成功的分离与鉴定, 开启了肿瘤干细胞研究的大门。随后几年内, 脑瘤、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、鼻咽癌等肿瘤中的干细胞样细胞相继得以成功分离(表1), 奠定了肿瘤干细胞理论的研究基础。

## 2 靶向肿瘤干细胞的研发热点

**2.1 靶向肿瘤干细胞特有标记** 利用携带细胞毒药物的抗体靶向相应的肿瘤干细胞特有标记, 或找到与其他种类细胞不同的参数来区分出肿瘤干细胞, 进而特异地消灭这一细胞亚群。但由于肿瘤干细胞在肿瘤组织中存在比例很小(小于5%)以及目前经实验鉴定出的肿瘤干细胞表面标记还十分有限, 并且通过分析细胞表面标记来鉴定其中干细胞的方法对实际应用来说太过复杂, 所以利用携带药物的抗体靶向特殊表面标记存在很大的困难。当前针对靶向肿瘤干细胞特异性标记的研究主要是表面标志物的寻找及内部特异性蛋白的鉴定。Ginestier等<sup>[36]</sup>发现了一种能用于鉴定乳腺肿瘤中干细胞的标志物, 研究表明乳腺癌中ALDH(醛脱氢酶)阳性的肿瘤细胞具有自我更新的干细胞特性, 并且500个这样的细胞便能形成一个肿瘤, 相反, ALDH阴性的细胞不具有这样的特性。此外, Zhang等<sup>[37]</sup>确认了一种具有11个基因的hSAGA复合物可以作为癌干细胞的标记物, 而且USP22作为此复合物中的一部分对细胞的转录具有重要的作用, 将成为癌症治疗的靶标。最近报道了美国俄克拉荷马大学癌症研究院的一项研究成果, 该机构发现一种仅在癌症干细胞中存在的蛋白, 并对靶向该蛋白的化合物进行筛选。研究人员表示如果该药物能够通过人体实验, 有望在十年内开发出针对肿瘤干细胞的新药<sup>[38]</sup>。

**2.2 靶向肿瘤干细胞微环境** 肿瘤干细胞与周围微环境之间有着千丝万缕的联系, 例如受众多细胞因子、配体的调控, 以及各种类型细胞的支持等, 以保持其在肿瘤组织中自我更新的特性(图1)。通过靶向调控肿瘤干细胞的微环境, 使其丧失自我更新的功能, 进而切断肿瘤发展的源泉。目前, 微环境对肿瘤干细胞的调控机制知之甚少, 但最近的一些研究结果对于靶向肿瘤干细胞微环境提供了有力的依据。肿瘤干细胞作为肿瘤转移的元凶<sup>[39]</sup>, 受到周围炎症环境的影响, 因此靶向炎症因素可以防止肿瘤的转移。针对胰腺癌的研究表明, 趋化因子受体CXCR4能够赋予肿瘤干细胞转移的特性, 在去除CXCR4后, 肿瘤干细胞只具有致瘤性而失去转

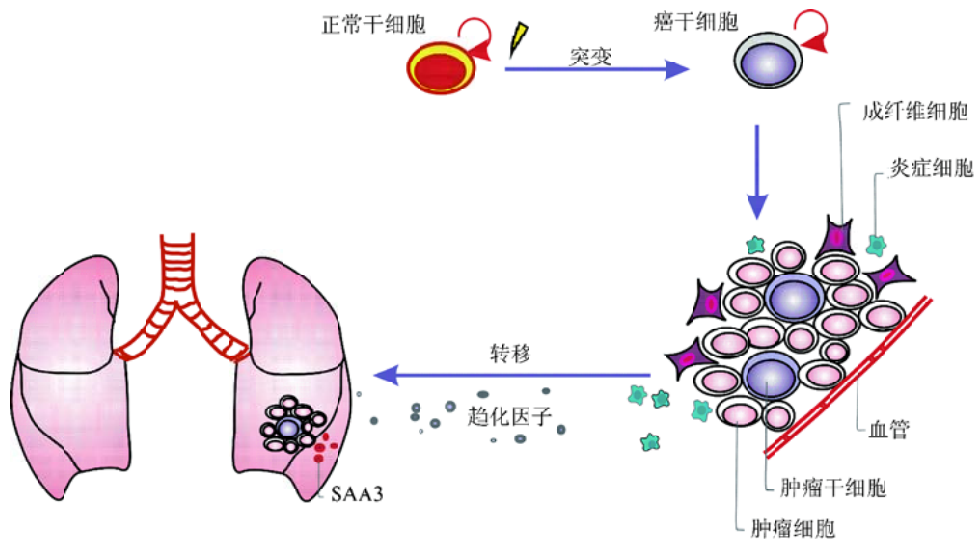


图1 肿瘤干细胞的微环境

移特性，这预示着 CXCR4 作为炎症环境中的靶点对防治肿瘤转移具有重要的意义。最近的一项研究进一步阐明了肿瘤转移的微环境机制<sup>[1]</sup>，结果表明肿瘤细胞受到 S100A8 和 S100A9 等趋化因子的诱导向肺部转移，同时诱导肺部细胞分泌一种血清淀粉样蛋白 A3 (serum amyloid A3, SAA3)，SAA3 通过 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 激活 NF- $\kappa$ B 通路，加速肿瘤细胞的募集并进一步促进趋化因子的分泌 (图 1)。实验结果还证实，靶向抑制 TLR4 或 SAA3 能够降低小鼠肺部肿瘤的转移。

**2.3 靶向肿瘤干细胞关键通路** 肿瘤干细胞与正常干细胞在自我更新方面有着相似的信号通路包括 Wnt/ $\beta$ -catenin、Notch、Hedgehog 等 (图 2)，这些通路在正常干细胞中的紊乱可以导致肿瘤的发生<sup>[2]</sup>。2008 年 10 月，Ding 等<sup>[40]</sup>发表了肿瘤测序计划 (tumour sequencing project, TSP) 的研究结果，其显示 Wnt 作为维持干细胞自我更新的重要通路在肺癌中的突变率达到 15% (188 例肺癌中 29 例存在 Wnt 通路的突变)，其中担任重要角色的蛋白 APC、CTNNB1、GSK3 $\beta$  等均发生了显著的突变。因此，靶向肿瘤干细胞中异常的维持自我更新的通路对消灭肿瘤有着重要的意义。Fan 等<sup>[41]</sup>通过靶向阻断脑瘤细胞中 Notch 通路，发现肿瘤细胞中凋亡及分化数量明显增高，而分化的肿瘤细胞不再具有致癌特性。随后，他们发现阻断 Notch 通路能够明显减少 CD133<sup>+</sup> 脑肿瘤干细胞的数量并促进 nestin<sup>+</sup> 细胞的凋亡。最近的研究表明，应用  $\gamma$ -分泌酶 ( $\gamma$ -Secretase) 抑制剂 (GSIs) 以阻断 Notch 通路 (图 2)，可以抑制乳腺癌干

细胞的生长并消除其自我更新功能，并有望在今后的临床实验中获得成功<sup>[42]</sup>。此外，Clemen 等<sup>[43]</sup>分别用环杷明 (Cyclopamine) 和慢病毒载体 LV-shSMOH 作用于胶质瘤细胞用以阻断维持 CD133<sup>+</sup> 胶质瘤干细胞自我更新的 Hedgehog-Gli1 通路 (图 2)，结果表明经环杷明处理 20 d 的胶质瘤球全部被杀死，且经转染慢病毒载体的细胞也受到明显抑制，而用 DNA 损伤剂 TMZ 处理的细胞由于不能杀死其中的肿瘤干细胞故效果不如前两者。

### 3 目前质疑肿瘤干细胞理论的焦点

目前，人们对于肿瘤发生与发展的认识除了肿瘤干细胞模型以外，主要还存在一种与之相对的理论，即克隆进化模型。该模型认为肿瘤细胞是经过长期的克隆演变进化而来：肿瘤起源于正常的细胞，这些细胞突变后产生了异常的子代细胞克隆，而这些子代细胞继续突变，如此经过数代的突变累积，最终产生大量遗传变异的癌细胞并促成了肿瘤组织的异质性<sup>[44]</sup>。最近，来自不同实验室的研究结果均对肿瘤干细胞模型提出了质疑，而偏向于支持克隆进化模型。2007 年 3 月 Dana-Farber 癌症研究院 Shipitsin 等<sup>[45]</sup>的研究在分子水平上对“肿瘤干细胞”理论提出了质疑。研究小组通过基因扫描等技术，对人类乳腺癌样本中 CD44<sup>+</sup> 与 CD24<sup>+</sup> 细胞之间进行分子以及表型的分析，结果表明这两种细胞在基因表达水平及表观遗传方面并不相同，这与肿瘤干细胞理论所解释的 CD24<sup>+</sup> 细胞是 CD44<sup>+</sup> 细胞的后代的说法相悖，进而这种异质性与克隆进化模型更为相符。对于肿瘤干细胞理论的质疑很大一部分是来

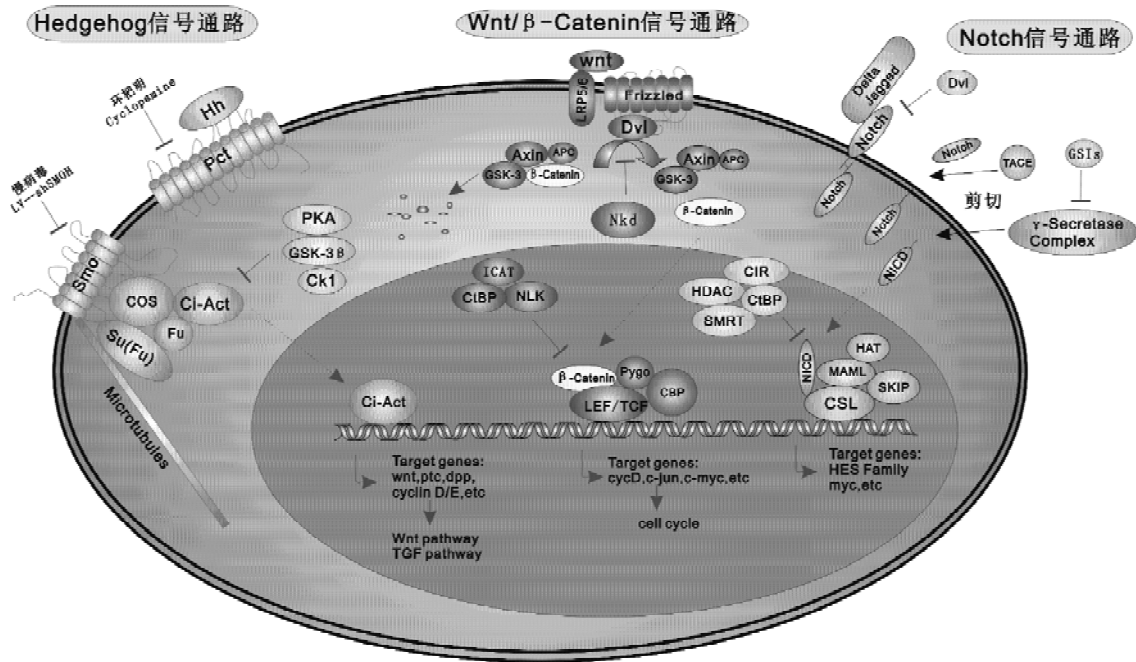


图2 肿瘤干细胞主要通路及靶向图示

Hedgehog (Hh) 信号通路: Hh 配体与 Pct 受体结合, 解除了 Pct 受体对膜蛋白 Smo 的抑制作用。后者促使锚定在微管上的 Cos 复合物 (Cos-Fu-Su(Fu)-Ci) 脱离微管, 将有正调节活性的锌指转录因子 (Ci) 从中释放出来, 进入细胞核诱导目的基因的表达。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路: 当 Wnt 配体作用于受体及辅助受体后, 激活 Dvl 蛋白, 进而解除了“蛋白降解复合物”(GSK3 $\beta$ -APC-Axin) 对  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 的降解, 使其进入细胞核与转录因子 LEF/TCF 等作用激活靶基因转录。Notch 信号通路: 当 Notch 受体被相邻细胞的 Delta/Jagged 配体激活后, 分别经过由肿瘤坏死因子-转化酶 (TNF- $\alpha$ -converting enzyme, TACE) 以及  $\gamma$ -分泌酶 ( $\gamma$ -Secretase) 两次剪切, 在胞内释放 Notch 蛋白的活化形式——NICD, NICD 进入核内与转录因子作用诱导靶基因的表达。

自实验方面的因素。目前针对肿瘤干细胞检测的一个普遍的方法是异种异体移植实验 (xenotransplantation), 即具有免疫缺陷的 NOD/SCID 鼠成瘤性测试。但这一实验方法近年来受到一些学者的质疑。来自澳大利亚墨尔本大学的 Strasser 小组认为异体移植实验掩盖了微环境对肿瘤细胞的影响, 由于人与鼠体内的微环境的不同, 不能够说明在鼠体内有致瘤性的那些来自人的癌细胞即为肿瘤干细胞<sup>[46, 47]</sup>。他们认为人的肿瘤细胞之所以能够在鼠体内存活并成瘤, 可能是由于这些细胞得到了某些特性从而能够适应新的环境, 而非这些细胞是具有自我更新功能的癌干细胞。为了消除异种异体移植的复杂性, Kelly 等<sup>[46]</sup>进行了同种异体移植 (allografting) 实验, 他们从三种转基因小鼠中分离出淋巴瘤细胞, 以  $10-10^5$  个的细胞数量分别注入组织相容性受体小鼠体内, 结果表明 10 个淋巴瘤细胞即可在受体小鼠内成瘤, 只不过比注入  $10^5$  个细胞需要的成瘤时间要长。最近, Quintana 等<sup>[48]</sup>利用 NOD/SCID interleukin-2 receptor gamma chain null (Il2rg<sup>-/-</sup>) 受体小鼠等手段

优化了异种异体移植系统, 并利用有限稀释和单细胞移植等方法对人黑色素瘤细胞进行了致瘤性分析, 结果表明约四分之一的黑素瘤细胞可在小鼠体内形成肿瘤。以上研究表明肿瘤组织中的大部分细胞均具有致瘤性, 这与肿瘤干细胞理论所描述的肿瘤组织中只有一小部分癌干细胞作为肿瘤源泉的说法相悖。

#### 4 展望

近年来, 肿瘤干细胞理论得到越来越多研究者的重视, 也被越来越多的实验所支持, 但该理论自提出之日起, 就受到了各方面不同观点的质疑。然而, 恰恰是由于这些挑战的存在, 肿瘤干细胞理论才能得以快速地发展。伴随着该理论的日益完善, 其自身存在的问题也逐步显露出来。利用各种方法分选出来的肿瘤干细胞是否依旧保持其原有性质, 肿瘤干细胞的检测标准是否科学等诸如此类的问题在当今科学领域还不能明确回答。这些问题的解决需要技术手段的不断提高和实验条件的不断优化。当前肿瘤干细胞的研究尚处于起步阶段, 未来的研

究将集中于肿瘤干细胞特异性标志物的寻找与鉴定,探索肿瘤干细胞的起源与形成机制,以及对调控肿瘤干细胞的特异性信号传导通路的发现,这些研究将有助于进一步阐明肿瘤的发生、发展和转移的机制,为肿瘤的诊断及治疗提供更为有效的手段。

### [参 考 文 献]

- [1] Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, et al. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(11): 1349-55
- [2] Kim C, Dirks P. Cancer and stem cell biology: how tightly intertwined? *Cell Stem Cell*, 2008, 3(2): 147-50
- [3] O'Brien C, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 2007, 445(7123): 106-10
- [4] Ricci-Vitiani L, Lombardi D, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 2007, 445(7123): 111-5
- [5] Dalerba P, Dylla S, Park I, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10158-63
- [6] Seigel G, Campbell L, Narayan M, et al. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis*, 2005, 11(12): 729-37
- [7] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-7
- [8] Al-Hajj M, Wicha M, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-8
- [9] Singh S, Hawkins C, Clarke I, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401
- [10] Kim C, Jackson E, Woolfenden A, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 2005, 121(6): 823-35
- [11] Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, 2007, 15(3): 504-14
- [12] Zhang S, Balch C, Chan M, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4311-20
- [13] Houghton J, Stoicov C, Nomura S, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*, 2004, 306(5701): 1568-71
- [14] Prince M, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(3): 973-8
- [15] Li C, Heidt D, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1030-7
- [16] Miki J, Furusato B, Li H, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res*, 2007, 67(7): 3153-61
- [17] Yang Z, Ngai P, Ho D, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-28
- [18] Fang D, Nguyen TK, Leishear K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9328-37
- [19] Schatton T, Murphy G, Frank N, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 2008, 451(7176): 345-9
- [20] Bruce WR, Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation *in vivo*. *Nature*, 1963, 199: 79-80
- [21] Buick RN, Till JE, McCulloch EA. Colony assay for proliferative blast cells circulating in myeloblastic leukaemia. *Lancet*, 1977, 1(8016): 862-3
- [22] Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, et al. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem-cell. *Blood*, 1981, 58(5): 916-9
- [23] Fialkow PJ, Singer JW, Adamson JW, et al. Acute nonlymphocytic leukemia-heterogeneity of stem-cell. *Blood*, 1981, 57(6): 1068-73
- [24] Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967, 58(4): 1468-71
- [25] Griffin JD, Lowenberg B. Clonogenic cells in acute myeloblastic-leukemia. *Blood*, 1986, 68(6): 1185-95
- [26] Southam C, Brunschwig A. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. *Cancer*, 1961, 14(5): 971-8
- [27] Hamburger A, Salmon S. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 1977, 197(4302): 461-3
- [28] Sell S, Pierce G. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest*, 1994, 70(1): 6-22
- [29] Potter V. Phenotypic diversity in experimental hepatomas: the concept of partially blocked ontogeny. The 10th Walter Hubert Lecture. *Br J Cancer*, 1978, 38(1): 1-23
- [30] Czitrom A, Edwards S, Phillips R, et al. The function of antigen-presenting cells in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*, 1985, 134(4): 2276-80
- [31] McCune J, Namikawa R, Kaneshima H, et al. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*, 1988, 241(4873): 1632-9
- [32] Kamel-Reid S, Letarte M, Sirard C, et al. A model of human acute lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice. *Science*, 1989, 246(4937): 1597-600
- [33] Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4): 311-21
- [34] Prochazka M, Gaskins H, Shultz L, et al. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(8): 3290-4
- [35] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer,

- and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-11
- [36] Ginestier C, Hur M, 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(5): 555-67
- [37] Zhang XY, Varthi M, Sykes SM, et al. The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression. *Mol Cell*, 2008, 29(1): 102-11
- [38] University of Oklahoma. Cancer stem cells isolated: could lead to new drugs to stop cancer from returning[EB/OL]. 2008, September 12. from <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/09/080911140813.htm>
- [39] Hermann P, Huber S, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3): 313-23
- [40] Ding L, Getz G, Wheeler D, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 2008, 455(7216): 1069-75
- [41] Fan X, Matsui W, Khaki L, et al. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7445-52
- [42] Grudzien P, Strack P, Golde T, et al. Inhibition of Notch signaling reduces the stem-like cell population in T47D breast cancer cells and prevents mammosphere formation. *Amer Assoc Cancer Res*, 2009, abstract 106
- [43] Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, et al. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol*, 2007, 17(2): 165-72
- [44] Campbell L, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*, 2007, 6(19): 2332-8
- [45] Shipitsin M, Campbell L, Argani P, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 2007, 11(3): 259-73
- [46] Kelly P, Dakic A, Adams J, et al. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*, 2007, 317(5836): 337
- [47] Adams J, Strasser A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4018-21
- [48] Quintana E, Shackleton M, Sabel M, et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 2008, 456(7222): 593-8