

DOI: 10.13376/j.cblls/2014153

文章编号: 1004-0374(2014)10-1067-06

乳腺癌干细胞分选及相关信号通路研究进展

吴海歌*, 吴 晨, 姚子昂, 高晨慧, 李 倩

(大连大学生命科学与技术学院, 大连 116622)

摘 要: 肿瘤干细胞是指存在于肿瘤组织中的具有干细胞特性, 即能够多向分化和自我更新的一类细胞群。随着肿瘤干细胞概念的提出, 乳腺癌干细胞成为当今科研领域的一个研究热点。因此, 了解如何分选乳腺癌干细胞及如何维持其“干性”对治疗及预防乳腺癌具有至关重要的意义。主要从乳腺癌干细胞分选、相关信号通路、上皮-间充质转换 (EMT) 等方面进行综述。

关键词: 乳腺癌干细胞; 干细胞分选; 信号通路

中图分类号: Q813; R737.9 文献标志码: A

Progress in the sorting and signaling pathways of breast cancer stem cells

WU Hai-Ge*, WU Chen, YAO Zi-Ang, GAO Chen-Hui, LI Qian

(School of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract: Cancer stem cells are a group of cells in tumor tissue which have properties of stem cells and the ability of both multi-directional differentiation and self-renewing. In recent years, with the concept of cancer stem cells proposed, much work has been focused on breast cancer stem cells (BCSC). Understanding how to sorting BCSC and how to maintain the "stem" is crucial for treatment and prevention of breast cancer. In this paper, the progress in sorting of BCSC, related signaling pathways and epithelial-mesenchymal transition (EMT) is summarized.

Key words: breast cancer stem cells; sorting of stem cells; signaling pathway

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。在我国, 乳腺癌已成为城市女性发病率最高的恶性肿瘤, 占女性恶性肿瘤的 17% 左右, 且发病率呈快速增长趋势。随着对肿瘤研究的不断深入, 研究人员发现同正常组织起源于干细胞一样, 肿瘤组织可能起源于相应的干细胞, 即肿瘤干细胞。1997 年, 肿瘤干细胞在急性髓系白血病中得到分离鉴定后, 关于肿瘤干细胞的研究也随之增加^[1]。2003 年, Al-Hajj 等^[2] 分离鉴定出 CD44⁺CD24^{-low} Lineage⁻ 的细胞为人类乳腺癌干细胞, 给乳腺癌的治疗研究提供了新的方向。

1 肿瘤干细胞与乳腺癌干细胞

随着近几年科技的进步, 科学家们重新评估了以干细胞为基础的肿瘤生物学研究。癌症可能是一种干细胞疾病已逐渐被人们所接受。根据评估研究报告, 正常组织干细胞转化为肿瘤细胞的可能性概

括为以下几点。(1) 由于干细胞具有寿命长、分裂慢等特征, 故干细胞在组织中有足够长的时间来积累癌变所需的突变基因, 而体细胞能够通过周期性血液流动而不断更换, 从而寿命长的干细胞暴露和遭受基因毒性损伤的时间比正常体细胞的时间要长。(2) 分子信号通路 (Wnt、Notch、Hedgehog、PTEN)^[3] 在控制干细胞的自我更新中起到至关重要的作用, 但在肿瘤细胞中, 这些通路通常是异常的。(3) 肿瘤干细胞具有正常干细胞的某些特征, 如相对未分化的状态、自我更新的能力和细胞保护机制的激活 (即端粒酶活性、过度表达抗凋亡蛋白和跨膜分子流动性增加), 并且具有很强的迁移能力。在血癌、脑癌以及乳腺癌的研究中, 有明确的证据

收稿日期: 2014-05-22; 修回日期: 2014-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373429); 国家自然科学基金青年科学基金项目(30901875)

*通信作者: E-mail: wuhaige30@hotmail.com

表明肿瘤的产生和维持是通过干细胞(祖细胞)的突变实现的^[1-2,4-6]。

事实表明,只有一小部分的肿瘤细胞(称为“肿瘤起始细胞”或“肿瘤干细胞”)保持了移植到免疫缺陷小鼠后能够形成新的肿瘤的能力,而且肿瘤起始细胞显示了干/祖细胞特性,尤其是自我更新能力和重新建立肿瘤异质性的能力。在乳腺癌细胞中,将具有肿瘤起始,以及自我复制和自我更新能力的细胞称为乳腺癌干细胞^[7-9]。

2 乳腺癌干细胞的分选

2003年,Al-Hajj等^[2]研究显示,基于细胞表面独特抗原的表达成功分离出乳腺癌干细胞,为根治乳腺癌疾病提供了新的思路。因此,如何分选乳腺癌干细胞对探究乳腺癌干细胞调控机制以及明确乳腺癌发病机理具有至关重要的意义。

2.1 细胞表面分子标记的筛选——CD44/CD24

CD44是乳腺癌和其他多种肿瘤分选干细胞的一个重要标志^[2,10]。将患者的乳腺肿瘤干细胞植入小鼠的乳腺脂肪垫中,通过使用非侵袭成像系统已经证明了来自原发性肿瘤的CD44细胞具有高致瘤性^[10]。

CD44⁺/CD24⁻的乳腺癌细胞具有肿瘤起始的特性。这种具有致瘤性表型的细胞与干细胞样的特征^[2,11],如侵袭性、转移性、治疗抵抗性以及不良预后相关^[11-15]。

虽然CD44⁺CD24^{-low}细胞系能够富集肿瘤干细胞,表达干细胞标记,但CD44⁺CD24^{-low}在乳腺癌细胞系和体内原发性肿瘤中的表达会发生变化。事实上,该标记并不能够始终富集肿瘤干细胞^[16]。不仅乳腺癌干细胞的表面标志具有表型异质性,血液系统恶性肿瘤中的多种细胞也具有表型异质性^[2,17]。

2014年,Liu等^[18]研究表明,通过CD44⁺CD24⁻标记的乳腺癌干细胞具有间充质样细胞表型,也具有较高的侵袭能力和相对低的增殖能力。该标记的细胞位于具有侵袭性肿瘤的边缘。

2.2 细胞表面分子标记的筛选——CD133

CD133分子是一种跨膜糖蛋白,随着细胞分化其表达迅速下调^[19]。已有研究结果表明,CD133⁺肿瘤细胞具有很强的自我更新、增殖能力和多向分化潜能,提示CD133是多数肿瘤干细胞的表面标记^[4]。*Brcal*乳腺肿瘤细胞已经被证明含有能展示干细胞特点的CD133和CD44⁺CD24⁻标记^[20]。同样地,带有CD133标记的肿瘤干细胞已在雌激素

受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体(HER2)均阴性的三阴性乳腺癌(TNBC)中被证实^[21]。

2.3 ALDEFLUOR分析法——ALDH

乙醛脱氢酶1(aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1)是细胞内可以将醛类氧化为乙酸的一种解毒酶。ALDEFLUOR分析法是以检测ALDH1的活性为基础,细胞内ALDH1活性高的细胞能被荧光标记,从而可以被检测和分选出来。ALDH1在干细胞中表达增高,对维持干细胞“干性”起着重要作用。ALDH1在肿瘤干细胞中也有表达。在一项研究中,ALDH-Bri细胞在乳腺浸润性导管癌的上皮细胞中比例显著,富集了具有致瘤能力且与CD44、CD24部分重叠的亚群^[22-23]。ALDH⁺标记的乳腺癌干细胞具有上皮细胞样表型,也具有较强的增殖能力,该标记的细胞多位于具有侵袭性肿瘤的中心^[18]。

2.4 侧群细胞分选技术

在多种人类血液肿瘤和实体瘤细胞中,通过使用流式细胞术结合荧光染料的泵出,已经证明了侧群(side population, SP)细胞具有干细胞性质^[24]。由于干细胞膜表面高表达的ATP结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白能够将荧光染料Hoechst33342泵出细胞外而使细胞不被染色,从而能够被流式细胞仪分选出来,将其分选出的细胞称为侧群(SP)细胞。Patrawala等^[25]采用侧群细胞分选术从乳腺癌细胞系MCF-7中分选的SP细胞约占总细胞的0.2%。与非SP细胞相比,SP细胞具有成瘤所需细胞数少、成瘤性强、潜伏期短等特点。Wu等^[26]认为,SP细胞与非SP细胞在增殖和分化能力上所表现的差异性可能是染料对细胞的毒性所造成的。研究表明,侧群细胞在不同的乳腺癌细胞系中只占一个相当小的比例(0.05%~5%)^[27]。然而,最近的研究证实,将SP细胞作为CSC的一个亚群存在一些问题,由于SP细胞和非SP细胞间存在交叉污染,故不能充分说明SP细胞的干性,导致结果不清晰^[26]。综上所述,SP细胞是否等同于肿瘤干细胞仍需要进一步的研究。

3 乳腺癌干细胞相关信号通路

乳腺癌干细胞生长缓慢,其增殖和自我更新需要相关信号通路的激活。目前,3条信号通路已经被确定:Wnt、Hedgehog以及Notch信号通路。在乳腺中,这3条信号通路在干细胞的自我更新中发挥重要作用。新近发现的Hippo信号通路能够抑制

细胞的生长增殖, 诱导细胞凋亡。肿瘤干细胞特定通路的潜在异常可能导致肿瘤的发生。

3.1 Wnt信号通路

Wnt 信号通路在多细胞生物体内是保守的。Wnt 的配体是一种调节组织稳态的胞外分泌糖蛋白。 β -catenin 是一种黏附相关蛋白, 可以进入细胞核, 从而介导 Lef/Tcf 的转录, 并激活 wnt 靶向基因^[28]。而 Wnt 的配体与 Wnt 受体的结合可以防止 β -catenin 的降解。 β -catenin 作为 Wnt 信号通路的下游靶基因, 具有前致癌作用。HER2 是一种原癌基因, 作为重要的乳腺癌预后判断因子, HER2 能够刺激 β -catenin 的活化, 从而导致下游靶基因 LEF 的表达增加^[29]。

Wnt 信号通路在乳腺癌干细胞中被激活^[30-32]。2013 年, Lamb 等^[33]利用微球体培养技术富集 MCF-7 中的乳腺癌干细胞, 将 MCF-7 中的乳腺癌干细胞与附着的单层细胞进行比较, 通过 β -catenin 蛋白表达量与下游靶基因 AXIN2、LEF1 的增加, 以及 DKK1 蛋白表达量的降低, 判断了乳腺癌干细胞中 WNT 信号被激活。

总而言之, 包括 β -catenin 在内的 Wnt 信号通路的所有信号分子, 均参与了干细胞向肿瘤干细胞的转化。在乳腺癌干细胞中可以观察到 β -catenin 的增加^[34]。经典的 Wnt 信号能够维持干细胞的自我更新和未分化状态^[35]。wnt 在小鼠乳腺中的过度表达将会增加乳腺肿瘤的形成^[34,36]。在由携带 wnt-1 基因的小鼠乳腺肿瘤病毒诱导的乳腺肿瘤中, 同样能够分离出肿瘤干细胞^[36-37]。

3.2 Notch信号通路

Notch 受体是一种保守的跨膜蛋白, 通过与临近细胞表面 Notch 配体作用, 调节细胞的生长和分化。Notch 受体具有大的胞外成分和较小的胞内成分^[38-39]。哺乳动物有 4 种 Notch 受体 (Notch1~4) 和同样为跨膜蛋白的 5 种配体 (DLL), 分别为 Delta-like (DLL) 1、DLL 3、DLL 4 以及 Jagged 1、Jagged 2。该配体与 Notch 受体的结合, 可诱导受体裂解, 裂解后的胞内成分称为 NICD (cytoplasmic domain)。NICD 随后进入细胞核内, 并通过与其转录阻遏物 CSL 结合, 从而激活 Notch 靶基因。这些基因的激活可能导致肿瘤细胞的过度增殖, 以及肿瘤细胞凋亡受到抑制^[40]。Notch 信号通路在乳腺癌干细胞中已经被证明, 并且通过 Notch 抗体可抑制 Notch 信号通路^[34,41]。

Notch 受体在干细胞和早期祖细胞中均有表

达^[42]。Notch-4 的过表达已经被证明能够抑制乳腺上皮细胞的体外分化, 并在体内正常乳腺组织生长的同时促进乳腺肿瘤的发展^[43-44]。2010 年, Harrison 等^[43]发现在乳腺癌干细胞中, Notch4 的活性增强, 而抑制 Notch4 的信号转导则可以降低乳腺癌干细胞的数量。

3.3 Hedgehog信号通路

在肿瘤干细胞中, Hedgehog 信号通路高度活化, 这与肿瘤干细胞的自我更新密切相关。Hedgehog 信号通路有 3 个糖蛋白配体: Shh、Dhh 和 Ihh。这些配体与细胞膜跨膜受体 Patch (Ptch1) 结合, 从而活化另一种跨膜受体 Smo。Smo 的活化导致一系列转录因子活化, 如 Gli 蛋白的活化, 活化的 Gli 蛋白进入细胞核内并激活参与细胞增殖的几个基因, 如细胞周期蛋白 (cyclins)、原癌基因 (c-Myc)、表皮生长因子 (EGF), 以及血管内皮生长因子 (VEGF)^[45]。

Tanaka 等^[46]研究发现, hedgehog 信号通路的激活打破了乳腺癌干细胞的稳定状态, 促使干细胞进行分化与自我更新。在乳腺癌干细胞中, Ptch1、Gli1 和 Gli2 的表达增加^[47-48]。此外, 抑制 Gli1 的表达能够降低乳腺癌干细胞的增殖^[46]。同时, Hedgehog 与乳腺癌干细胞的细胞间隔形成, 以及细胞与基质间的相互作用有关, 为乳腺癌干细胞脱离基底膜和远处转移提供支持^[49]。

在肿瘤和器官的发生发展中, Wnt、Notch、Hedgehog 这 3 条主要的信号通路之间存在信号之间的相互作用, 但这种关系是复杂的, 需要更进一步的研究^[50-52]。

3.4 Hippo信号通路

Hippo 信号通路在各种属间是高度保守的。Hippo 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 属于 Ste20 样激酶家族。该通路由上游调节分子、核心分子和主效应分子 3 部分组成。其中, 上游分子、核心分子两部分属于抑癌基因, 主要效应分子属于癌基因。TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, 又称 WWTR1) 是 Hippo 信号通路下游起作用的一个转录共激活因子, TAZ 蛋白水平增高与人类癌症 (如乳腺癌) 相关。TAZ 与细胞的增殖、迁移与转化能力密切相关^[53]。Cordenonsi 等^[54]研究表明, 乳腺癌干细胞的自我更新和肿瘤起始能力需要 TAZ 的激活。

2014 年, Bartucci 等^[55]将具有迁移能力的乳腺癌干细胞和不具有迁移能力的乳腺癌细胞的 TAZ

基因表达进行比较,发现在已分化、没有致瘤性的乳腺癌细胞中,TAZ的过表达导致细胞转化为具有致瘤性和具有迁移能力的细胞;相反,在乳腺癌干细胞中,TAZ表达的减少,降低了细胞的迁移性和抗化疗能力。

4 乳腺癌干细胞与EMT和MET

上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程。Mani等^[56]研究表明,肿瘤干细胞和EMT状态的获得具有极其密切的联系。Weinberg实验小组报道,通过EMT诱导的内皮细胞获得了干细胞的特性^[57-58]。

EMT在诱导细胞基因表达模式上与在肿瘤干细胞中EMT诱导细胞转化的基因表达模式是相似的^[56]。Notch、Hedgehog、Wnt、Hippo、TGF β 和NF- κ B等与肿瘤干细胞相关的信号通路,同样在诱导EMT中发挥作用^[54,59-61]。

通过EMT,上皮细胞失去了细胞极性,失去与基底膜的连接等上皮表型,获得了具有较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型^[62]。重要的是,EMT过程是可逆的。内皮细胞的产生可以通过E-钙黏蛋白的表达,以及细胞极性的确立,这个过程称为间充质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)。

Liu等^[18]研究表明,乳腺癌干细胞具有间充质细胞样和上皮细胞样两种表型。CD44⁺CD24⁻的乳腺癌干细胞具有间充质样细胞表型,具有较高的侵袭能力和相对低的增殖能力;ALDH⁺的乳腺癌干细胞具有上皮细胞样表型。通过肿瘤微环境的改变,乳腺癌干细胞进行EMT和MET的相互转换,这种可塑性对肿瘤细胞获得转移和侵袭能力是必要的,并且每种状态在癌症的扩散中都发挥作用。

5 结语

通过肿瘤干细胞表面标志分选出乳腺癌干细胞,因乳腺癌干细胞被鉴定出多种亚型,又因其具有异质性,故各种亚型并不完全是肿瘤干细胞,因此,还要对分选出的乳腺癌干细胞进行进一步的富集与纯化。通过研究乳腺癌干细胞与乳腺干细胞信号通路之间的异同,寻找药物靶点,在不损坏正常干细胞和细胞的前提下,对乳腺癌干细胞开展靶向治疗。通过研究微环境对乳腺癌干细胞的影响,了解其耐药机制以及抗化疗原因,最大程度地降低肿

瘤细胞的转移和侵袭能力。

尽管还有很多问题没有解决,但乳腺癌干细胞对乳腺癌的诊断、预后判断以及靶向治疗等方面有着极其重要的影响。因此,希望通过对乳腺癌干细胞的研究达到根治乳腺癌的目的。

[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(7): 730-7
- [2] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-8
- [3] Karamboulas C, Ailles L. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(2): 2481-95
- [4] de Mendoza FH, Rodriguez EA. Cancer stem cells in brain tumors[M]//Stem cells in cancer: should we believe or not? Netherlands: Springer, 2014: 229-43
- [5] Kuchler V, Polson ES, Patel A, et al. Induced differentiation of brain tumour stem cells[M]//Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 11. Netherlands: Springer, 2014: 149-58
- [6] Hu J, Yuan X, Xu Q, et al. Cancer stem cells in glioblastoma[M]//Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 1. Netherlands: Springer, 2012: 113-20
- [7] Takahashi RU, Takeshita F, Fujiwara T, et al. Cancer stem cells in breast cancer. *Cancers: Basel*, 2011, 3(1): 1311-28
- [8] Battula VL, Shi Y, Evans KW, et al. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest*, 2012, 122(6): 2066-78
- [9] Velasco-Velazquez MA, Homsí N, De La Fuente M, et al. Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(4): 573-7
- [10] Liu H, Patel MR, Prescher JA, et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(42): 18115-20
- [11] 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(13): 5506-11
- [12] Zhang Y, Toy KA, Kleer CG. Metaplastic breast carcinomas are enriched in markers of tumor-initiating cells and epithelial to mesenchymal transition. *Mod Pathol*, 2012, 25(2): 178-84
- [13] Ratajczak M, Tarnowski M, Staniszevska M, et al. Mechanisms of cancer metastasis: involvement of cancer stem cells? *Minerva Med*, 2010, 101(3): 179-91
- [14] Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, et al. Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer. *Int J Cancer*, 2012, 130(11): 2568-79
- [15] Idowu MO, Kmiecik M, Dumur C, et al. CD44⁺/CD24^{-low}

- cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Hum Pathol*, 2012, 43(3): 364-73
- [16] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72
- [17] Mallon BS, Chenoweth JG, Johnson KR, et al. StemCellDB: the human pluripotent stem cell database at the National Institutes of Health. *Stem Cell Res*, 2013, 10(1): 57-66
- [18] Liu S, Cong Y, Wang D, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(1): 78-91
- [19] Brescia P, Ortensi B, Fornasari L, et al. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells*, 2013, 31(5): 857-69
- [20] Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, et al. Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(1): R10
- [21] Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, et al. CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 2013, 32(5): 544-53
- [22] Alison MR, Guppy NJ, Lim SM, et al. Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *J Pathol*, 2010, 222(4): 335-44
- [23] 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(5): 555-67
- [24] Ibrahim SF, Diercks AH, Petersen TW, et al. Kinetic analyses as a critical parameter in defining the side population (SP) phenotype. *Exp Cell Res*, 2007, 313(9): 1921-6
- [25] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6207-19
- [26] Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett*, 2008, 268(1): 1-9
- [27] Christgen M, Ballmaier M, Bruchhardt H, et al. Identification of a distinct side population of cancer cells in the Cal-51 human breast carcinoma cell line. *Mol Cell Biochem*, 2007, 306(1-2): 201-12
- [28] Holland JD, Klaus A, Garratt AN, et al. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25(2): 254-64
- [29] Khalil S, Tan GA, Giri DD, et al. Activation status of Wnt/β-catenin signaling in normal and neoplastic breast tissues: relationship to HER2/neu expression in human and mouse. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33421
- [30] Woodward WA, Chen MS, Behbod F, et al. WNT/β-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(2): 618-23
- [31] Collu GM, Brennan K. Cooperation between Wnt and Notch signalling in human breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2007, 9(3): 105
- [32] van Amerongen R, Bowman AN, Nusse R. Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/β-catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(3): 387-400
- [33] Lamb R, Ablett MP, Spence K, et al. Wnt pathway activity in breast cancer sub-types and stem-like cells. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67811
- [34] Li X, Ren J. Isolation of CD44⁺/CD24^{-low} and side population cells from MDA-MB-453 cells and the analysis of their activation of Wnt and Notch pathway. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 2008, 40(5): 471-5
- [35] Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*, 2009, 433(1-2): 1-7
- [36] Vaillant F, Asselin-Labat ML, Shackleton M, et al. The mammary progenitor marker CD61/β3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7711-7
- [37] Li Y, Welm B, Podsypanina K, et al. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15853-8
- [38] Van de Walle I, Waegemans E, De Medts J, et al. Specific Notch receptor-ligand interactions control human TCR-αβ/γδ development by inducing differential Notch signal strength. *J Exp Med*, 2013, 210(4): 683-97
- [39] Koch U, Radtke F. Notch and cancer: a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(21): 2746-62
- [40] Rizzo P, Osipo C, Foreman K, et al. Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene*, 2008, 27(38): 5124-31
- [41] Farnie G, Clarke RB. Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling. *Stem Cell Rev*, 2007, 3(2): 169-75
- [42] Aguirre A, Rubio ME, Gallo V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*, 2010, 467(7313): 323-7
- [43] Harrison H, Farnie G, Howell SJ, et al. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 709-18
- [44] Bolos V, Mira E, Martinez-Poveda B, et al. Notch activation stimulates migration of breast cancer cells and promotes tumor growth. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(4): R54
- [45] Cohen MM Jr. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A*, 2003, 123A(1): 5-28
- [46] Tanaka H, Nakamura M, Kameda C, et al. The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44⁺CD24^{-low} subpopulation and the side population of breast cancer cells. *Anticancer Res*, 2009, 29(6): 2147-57
- [47] Liu S, Dontu G, Mantle ID, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant

- human mammary stem cells. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6063-71
- [48] Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 2007, 11(3): 259-73
- [49] Kasper M, Jaks V, Fiaschi M, et al. Hedgehog signalling in breast cancer. *Carcinogenesis*, 2009, 30(6): 903-11
- [50] Collu GM, Hidalgo-Sastre A and Brennan K. Wnt-Notch signalling crosstalk in development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(18): 3553-67
- [51] Hayward P, Kalmar T, Arias AM. Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development*, 2008, 135(3): 411-24
- [52] Mascaro Cordeiro B, Dias Oliveira I, de Seixas Alves MT, et al. SHH, WNT, and NOTCH pathways in medulloblastoma: when cancer stem cells maintain self-renewal and differentiation properties. *Childs Nerv Syst*, 2014, 30(7): 1165-72
- [53] Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(4): 246-57
- [54] Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell*, 2011, 147(4): 759-72
- [55] Bartucci M, Dattilo R, Moriconi C, et al. TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. *Oncogene*, 2014 [Epub ahead of print]
- [56] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008, 133(4): 704-15
- [57] Battula VL, Shi Y, Evans KW, et al. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest*, 2012, 122(6): 2066-78
- [58] Battula VL, Evans KW, Hollier BG, et al. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2010, 28(8): 1435-45
- [59] Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(3): 211
- [60] Shin SY, Rath O, Zebisch A, et al. Functional roles of multiple feedback loops in extracellular signal-regulated kinase and Wnt signaling pathways that regulate epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 2010, 70(17): 6715-24
- [61] Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, et al. Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer. *Cancer Res*, 2011, 71(22): 7061-70
- [62] Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*, 2008, 27(55): 6958-69