

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00439

肿瘤干细胞研究现状

孙志刚, 黄盛东*, 张宝仁

第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] 近年来,对肿瘤干细胞的研究已经成为热点。研究发现一小部分肿瘤细胞具有干细胞特性,即具有自我更新、无限增殖与分化潜能,这部分细胞就是肿瘤干细胞。目前已经在多种肿瘤中发现并鉴定出肿瘤干细胞,包括白血病、乳腺癌、脑肿瘤、肝癌、结肠癌等。本文就肿瘤干细胞的概念、存在证据、研究方法以及临床应用前景作一综述。

[关键词] 肿瘤干细胞;细胞分离;细胞培养;细胞鉴定

[中图分类号] R 730.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0439-04

Cancer stem cells: current status

SUN Zhi-gang, HUANG Sheng-dong*, ZHANG Bao-ren

Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] Recently, study on cancer stem cells has been a focus of study. Cancer stem cell is a small population of cancer cells possessing the properties of stem cells: self-renewal, differentiation and proliferation. To date, the existence of cancer stem cells has been proven in acute and chronic myeloid leukemia, breast cancer, brain tumors, liver cancer and colon cancer, etc. In this article we reviews the current progress on cancer stem cells, including the definition, existing evidence, research methods, and challenges in clinical application.

[KEY WORDS] cancer stem cells; cell separation; cell culture; cell identification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(4): 439-442]

肿瘤干细胞学说^[1]认为,肿瘤干细胞是肿瘤中具有自我更新、无限增殖及分化潜能的细胞,这部分细胞虽只占少部分,但却是肿瘤发生、发展的关键。“肿瘤干细胞”概念的提出为研究肿瘤细胞的生物学特性提供了新思路,并为肿瘤的临床治疗提供了新的靶点,目前已逐渐成为肿瘤防治研究的新的热点。

1 肿瘤干细胞概念

1.1 肿瘤细胞具有异质性 早期的研究认为,肿瘤组织中所有肿瘤细胞均按同样的速度以指数分裂的方式生长,但随后的大量研究证实这一结论与实际观察结果不符。1958年, Hewitt^[2]把小鼠白血病细胞移植到同品系的动物体内,发现移植细胞仅有1%~4%能够形成脾脏内克隆。1971年, Park等^[3]从小鼠腹水中分离出骨髓瘤细胞并体外培养,仅1/10 000~1/1 000肿瘤细胞可形成克隆。1977年, Hamburger等^[4]发现在人肺癌、卵巢癌、神经母细胞瘤的体外培养实验中,仅有1/1 000~1/5 000的肿瘤细胞能在软琼脂上形成克隆。这些研究都显示肿瘤组织中的肿瘤细胞具有异

质性,并不是所有的肿瘤细胞都能够增殖,只有其中小部分肿瘤细胞具有致瘤性。关于肿瘤细胞异质性的解释,人们又提出了肿瘤生长随机假说(stochastic theory)^[5]和层级假说(hierarchy theory)^[6]等。前者认为肿瘤组织中任何细胞都是潜在的肿瘤起始细胞(tumor-initiating cell, T-IC),但其是否进入细胞周期增生分裂是由一些低概率的随机事件控制;后者认为,肿瘤细胞之间功能存在差异,只有少量的细胞能高频度地启动肿瘤的发生。尽管这两种假说都肯定了肿瘤组织中存在少量控制肿瘤生长的肿瘤起始细胞,并较好地解释了肿瘤组织中细胞生长不均一的现象,但对这些起始细胞的性质及其生物学特性尚缺乏令人满意的解释。

1.2 “肿瘤干细胞”概念的提出 Reya等^[1]认为,肿瘤组织一般由3种细胞构成:(1)具有无限增殖能力和形成新的肿瘤克隆的肿瘤细胞,又称肿瘤干细胞;(2)具有有限增殖力但不能形成新的肿瘤克隆的肿瘤细胞;(3)上述两种能力都丧失的肿瘤细胞。其中,肿瘤干细胞在肿瘤组织中起着主要的作用,其通过某些机制不断分裂增殖,一方面进行自我更新,另一方面产生出具有有限分裂和分化能力的肿瘤细胞,促进

[收稿日期] 2007-09-24 **[接受日期]** 2008-03-08

[基金项目] 国家自然科学基金(30471718);上海市科学技术委员会科研计划资助项目(04JC14006). Supported by National Natural Science Foundation of China(30471718)and Research Project Funds of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality(04JC14006).

[作者简介] 孙志刚, 博士生, 主治医师. E-mail: sun910002@yahoo.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25072079-8012, E-mail: huangsd@public6.sta.net.cn

了肿瘤的形成。他们认为,肿瘤起源于肿瘤干细胞,肿瘤干细胞具有干细胞样的特性,有自我更新、无限增殖及多向分化能力;其在肿瘤中虽只占少数,却是肿瘤发生、发展与转移的根源,并认为肿瘤干细胞是正常干细胞累积突变的结果。

2 肿瘤干细胞存在的证据

2.1 血液系统肿瘤干细胞 肿瘤干细胞的研究最初是在白血病中取得突破,在白血病及多发性骨髓瘤中只有极少数肿瘤细胞亚群能广泛增殖^[2]。Lapidot等^[7]在急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)的研究中证实了白血病干细胞的存在,即表面标志为 CD34⁺ CD38⁻ 的白血病细胞。Passequé等^[8]将分离出的细胞植入 NOD/SCID 小鼠体内,发现表型为 CD34⁺ CD38⁻ Thy-1⁻ 细胞是唯一能在这种小鼠体内形成肿瘤细胞,从而证实其为白血病干细胞(leukemia stem cell, LSCs)。

2.2 乳腺肿瘤干细胞 Al-Hajj等^[9]首次在实体肿瘤中证实了肿瘤干细胞的存在。他们应用特异性细胞表面标记及流式细胞技术分离了人乳腺癌细胞并进行了裸鼠接种成瘤实验。结果表明,只需 100 个 CD44⁺ CD24⁻/low 的癌细胞即可在 NOD/SCID 鼠体内形成移植瘤,而未分类细胞需 5 × 10⁴ 个细胞才能再形成肿瘤。这类细胞虽只占乳腺癌细胞的 2%,但却是乳腺癌的起始细胞(BrCa-IC)。

2.3 脑肿瘤干细胞 Singh等^[10-11]用神经干细胞分离培养的方法从髓母细胞瘤、星形细胞瘤、管膜瘤、神经节胶质瘤等的手术标本中分离和鉴定出细胞表面标志为 CD133⁺ 表型的一类细胞,命名为脑肿瘤干细胞(brain tumor stem cell, BTSC)。这部分细胞与正常神经干细胞有着相似的表面标记,即 CD133⁺ 的细胞,占整个肿瘤细胞的 3.5%~46.3%。CD133⁺ 细胞具备增殖、自我更新及多向分化能力。接种于 NOD/SCID 鼠脑,只需 100 个 CD133⁺ 的肿瘤细胞即可形成移植瘤,而 10⁵ 个 CD133⁻ 细胞也不能形成肿瘤。新形成的肿瘤的细胞构成和分化谱与原发肿瘤的构成一致,均表达神经巢蛋白(nestin)抗原、CD133 和神经元特异性抗原阳性。

2.4 肺腺癌干细胞 Kim等^[12]从大鼠细支气管-肺泡管结合部分离出 Sca-1⁺ CD45⁻ Pacam⁻ CD34⁻ 细胞,具有很强的自我更新和分化能力,称之为支气管肺泡干细胞(bronchioalveolar stem cells, BASCs)。BASCs 在正常情况处于静止状态,当体内支气管和肺泡损伤时发生增殖。BASCs 是维持细支气管上皮细胞(Clara 细胞)和肺泡上皮细胞更新的基础,细支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞被认为是肺腺癌的前体细胞,因而 BASCs 分化过程增加了这两种细胞发生肺腺癌的危险性;另外 BASCs 在不典型性增生及肺腺癌 K-ras 基因突变活化的终末支气管和肺泡上皮细胞中的数量明显增加,所以认为 BASCs 可能是肺腺癌的起源细胞。

2.5 前列腺癌 Patrawala等^[13]发现, CD44⁺ 前列腺癌细胞较 CD44⁻ 细胞具有更强的增殖能力、克隆形成能力、致瘤能力与转移性,并且能够高表达有关干细胞的基因,如 Oct-3/4、Bmi、 β -catenin 和 SMO。因此认为表型为 CD44⁺ 的前列腺肿瘤细胞是其肿瘤干细胞。

2.6 胃肠道肿瘤干细胞 Haraguchi等^[14]利用干细胞可将

荧光染料 Hoechst 33342 泵出细胞外的特性,应用 FACS 分析了胃肠道肿瘤如食管癌细胞株(TE1、TE2、TE13)、胃癌细胞株(NUGC3、MKN1、MKN7、MKN28)、结肠癌细胞株(WiDr、SW480、HSC15、CCK81)、胰腺癌细胞株(PK9、PK45H)和肝癌细胞株(HuH7、Hep3B、HepG2)中的 SP(side population, SP)细胞。除肝癌细胞株 HepG2 中未检测到 SP 细胞外,其余细胞株中均检测到 SP 细胞,其比例 0.3%~2.2%。其中的 SP 细胞均具有干细胞样的特性。

2.7 视网膜母细胞瘤干细胞 Seigel等^[15]使用干细胞表面标志物分析与鼠视网膜母细胞瘤中具有肿瘤干细胞特征的细胞亚群,发现少量的视网膜母细胞瘤细胞(<1%)表达干细胞的表面标记 ABCG2(ATP-binding cassette transporter G2 subfamily)、ALDH1(aldehyde dehydrogenase 1)、MCM2(minichromosome maintenance marker 2)、SCA-1(stem cell antigen-1)和 p63,表现出干细胞样特性,尤其是 ABCG2 表达阳性的细胞不仅排斥 Hoechst 染色,而且对 20 多种化疗药物表现出耐药性。国内钟秀凤等^[16]亦证实人视网膜母细胞瘤中存在具有自我增殖及分化能力的肿瘤干细胞。

2.8 黑素瘤干细胞 Fang等^[17]将转移的恶性黑素瘤组织经酶消化后,进行体外培养,得到一种无黏着力的球状细胞(spheroid cells)。这些细胞具有自我更新的特征,能够分化成黑素细胞。小鼠移植瘤实验显示,这些球状细胞有较强的致瘤性。在恶性黑素瘤细胞系中亦鉴定出相似的多能球状细胞,这种具有多功能干细胞性质的细胞大多为 CD20⁺ 的细胞。

2.9 肝脏肿瘤干细胞 Suetsugu等^[18]研究发现,在研究的 3 个肝癌细胞系中,CD133 抗原只在 Huh-7 细胞表面有表达。由 Huh-7 细胞系分离的 CD133⁺ 细胞与 CD133⁻ 细胞相比,在体外有较高的增殖潜能,而其成熟的肝细胞标记谷氨酰胺合成酶和细胞色素 P450 3A4 的 mRNA 低表达。当将 CD133⁺ 或 CD133⁻ 细胞注入 SCID 鼠皮下时,CD133⁺ 细胞可形成肿瘤,而 CD133⁻ 细胞很少形成肿瘤或者根本不能形成肿瘤。因此认为 CD133⁺ 细胞是肝癌干细胞。

2.10 结肠肿瘤干细胞 O'Brien等^[19]在研究结肠癌时,将 CD133 标记的结肠癌细胞接种于 NOD/SCID 鼠肾被囊中,以鉴定结肠癌起始细胞(colon cancer-initiating cell, CC-IC),结果发现 CD133⁺ 细胞可以起始肿瘤,而 CD133⁻ 细胞不具有起始肿瘤的作用。对细胞进行有限稀释后发现,在 5.7 × 10⁴ 个 CD133⁻ 细胞中有 1 个 CC-IC,而 262 个 CD133⁺ 细胞中就有 1 个 CC-IC,后者较前者富集 CC-IC 200 倍以上。并且 CD133⁺ 细胞具有自我更新及分化、增殖能力,认为 CD133⁺ 细胞即结肠肿瘤干细胞。Ricci-Vitiani等^[20]亦得出类似结论。

2.11 其他肿瘤干细胞 Prince等^[21]在研究头颈部鳞癌时发现, CD44⁺ 细胞虽只占肿瘤细胞的不到 10%,但只有这部分细胞具有起始肿瘤的能力,并具有自我更新及分化的特性。Li等^[22]应用异体接种模型,发现具有 CD44⁺ CD24⁺ ESA⁺ 的细胞虽然只占胰腺癌细胞的 0.2%~0.8%,但其致瘤性是其他胰腺癌细胞的 100 倍。CD44⁺ CD24⁺ ESA⁺ 细胞具有自我更新能力、产生分化后代的能力,并且 Shh(sonic hedgehog)信号的表达增高,显示其具有干细胞的特性。

Zhou 等^[23]研究 CD133 在人喉癌细胞系 Hep2 中的表达,并应用免疫磁珠分选技术纯化 CD133⁺ 肿瘤细胞,体外培养并观察其增殖及分化能力。结果显示,在人喉癌细胞系 Hep2 中 CD133⁺ 细胞数目较少,一般均在 5% 以下;CD133⁺ 细胞具有自我更新、较强的增殖能力和分化能力。CD133⁺ 细胞的这些生物学性状与肿瘤干细胞的特性相符。

3 肿瘤干细胞的分离与培养

3.1 应用细胞表面特异性标记进行分选 主要有 2 种手段,荧光激活细胞分选术 (fluorescence activated cell sorting, FACS, 也称流式细胞技术) 和磁性激活细胞分选术 (magnetic activated cell sorting, MACS)。可用于鉴定肿瘤干细胞的特异性表面标记主要有两组^[7,9,24-27]: 一组是正常干细胞/祖细胞的标记。肿瘤干细胞学说认为肿瘤干细胞可能源于正常干细胞的累积突变和(或)祖细胞通过基因突变重新获得自我更新能力^[1,28]。肿瘤干细胞可能带有其组织正常干细胞/祖细胞的特异性表面标记。如 AML 及 CML 中的肿瘤干细胞具有与造血干细胞相同的标记 CD34⁺ CD38⁻^[7,27,29]; 脑肿瘤干细胞具有与神经干细胞相同的标记 CD133^[11,30]。另一组肿瘤干细胞的标记可能是与肿瘤的发展、转移有关的。如 CD24 在乳腺癌^[31]、卵巢癌^[32] 等多种肿瘤细胞中高表达,并与肿瘤的转移和预后有关。Al-Hajj 等^[9]应用这种恶性肿瘤相关标记成功地从乳腺癌中鉴定出肿瘤干细胞。

3.2 SP 细胞的分选 在利用 Hoechst 染料进行造血干/祖细胞的 FACS 分析时,常会发现一群分布特殊的细胞,经过紫外激发后用双波长(450 nm 和 675 nm 以上波长)监测,可以观察到发出微弱的蓝色和红色荧光,在流式二维点阵图上,呈彗尾状分布在造血干/祖细胞主群的一侧,因此称之为侧群(side population, SP)细胞^[33]。目前人们已经在多种组织及肿瘤中发现了 SP 细胞^[34-36],其具有干细胞的特性,即自我更新及多向分化潜能等。

3.3 悬浮培养法分离与培养肿瘤干细胞 应用此法, Singh 等^[9]成功分选出脑肿瘤干细胞, Ponti 等^[37]成功分选出乳腺肿瘤干细胞, Fang 等^[17]成功分选出人黑素瘤干细胞, Gibbs 等^[38]成功分离出干细胞样骨肉瘤细胞。

4 肿瘤干细胞的鉴定

4.1 自我更新 自我更新是干细胞的重要特性。体外培养的细胞常用两种克隆形成试验来检测干细胞的自我更新能力,即细胞球形成试验^[39]和软琼脂克隆形成试验^[4,40]。干细胞能够悬浮生长或在半固体培养基中生长,而普通细胞不附着于固体表面就不能生长,这可能是由干细胞非附着性生长的特性决定的^[41]。肿瘤干细胞也具有这种特性。目前在白血病^[4]、脑肿瘤^[30]、乳腺癌^[9]等的研究中均得到了证实。

4.2 分化潜能 肿瘤干细胞在体外及体内培养时,其产生的后代细胞应该具有分化成熟细胞的表型或具有分化成熟细胞的标志。如 Singh 等^[30]在脑肿瘤干细胞的研究中,将表达 CD133 与 nestin 的细胞在含血清的培养基中进行分化培养 1 周后,大部分细胞均可表达分化神经细胞的标记如 GFAP 和 β -tubulin 3, 而失去表达 CD133 和 nestin 的能力。

这表明 CD133⁺ 细胞具有产生分化成熟后代的能力。

4.3 致瘤能力 Scadden^[42]认为一个细胞同时具有自我更新及分化能力是干细胞的最基本定义。而对于肿瘤干细胞来说,不仅要具有自我更新及分化能力,还必须具有较强的致瘤性。肿瘤干细胞的致瘤能力与其自我更新及分化、增殖的能力有关,也是鉴定肿瘤干细胞最重要的环节。鉴定肿瘤干细胞致瘤能力的通常做法就是将分选的细胞接种于免疫缺陷动物体内,将对照细胞也以相同的方法接种,观察其在一定时间内形成移植瘤的情况(如形成肿瘤的数目、肿瘤的大小及形成肿瘤的时间等)。目前已经鉴定的肿瘤干细胞均进行了此试验,如表型为 CD133⁺ 的脑肿瘤干细胞只需接种 100 个于 NOD/SCID 鼠即可形成移植瘤,而在相同的时间内接种 10⁵ 个 CD133-细胞亦未形成移植瘤^[30]。

5 肿瘤干细胞研究的意义及展望

肿瘤干细胞研究的意义:目前肿瘤干细胞研究的进展为进一步研究肿瘤细胞的生物学特性开辟了新的思路;肿瘤干细胞的研究解释了传统的肿瘤治疗中治疗效果不佳的现象,并为临床治疗肿瘤提供了新的靶点;肿瘤干细胞学说为人类彻底根除肿瘤带来新的希望。

当前针对肿瘤的治疗所取得的成果与所付出的努力完全不相称,可能是由于研究目标选择不当,现有的治疗方法主要是针对肿瘤组织内的大多数细胞,并没有将肿瘤干细胞杀死,即使肿瘤组织消退了,但经过一段时间缓解期后存活的肿瘤干细胞仍然可以重新形成肿瘤,故常有复发和转移。因此只有针对肿瘤干细胞的治疗才能根除肿瘤。但因为干细胞与肿瘤细胞有很多相似性,针对肿瘤干细胞的治疗将导致正常干细胞的严重的受损,这需要对 CSC 的信号转导、表面标志的进一步研究以区别肿瘤干细胞与正常的干细胞。如果可以鉴定出决定肿瘤干细胞生长的关键基因,那将对肿瘤的靶向基因治疗产生革命性转折。因此,在未来的研究中我们需要分离与鉴定出更多的各类肿瘤干细胞,以了解其生物学特性,阐明其分子机制,制订出针对肿瘤干细胞靶向治疗、克服肿瘤干细胞耐药性甚至诱导肿瘤干细胞分化的措施来,这样才能从根本上治愈肿瘤。

[参考文献]

- [1] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, Weissman I L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414: 105-111.
- [2] Hewitt H B. Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukaemia of CBA mice[J]. Br J Cancer, 1958, 12: 378-401.
- [3] Park C H, Bergsagel D E, McCulloch E A. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay[J]. J Natl Cancer Inst, 1971, 46: 411-422.
- [4] Hamburger A W, Salmon S E. Primary bioassay of human tumor stem cells[J]. Science, 1977, 197: 461-463.
- [5] Derkinderen D J, Boxma O J, Koten J W, Den Otter W. Stochastic theory of oncogenesis[J]. Anticancer Res, 1990, 10 (2B): 497-504.
- [6] Zajicek G. On the relevant model for human cancer[J]. Med Hypotheses, 1981, 7: 1139-1146.

- [7] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice[J]. *Nature*, 1994, 367: 645-648.
- [8] Passegué E, Jamieson C H, Ailles L E, Weissman I L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics [J]? *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(Suppl 1): 11842-11849.
- [9] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, Morrison S J, Clarke M F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 3983-3988.
- [10] Singh S K, Hawkins C, Clarke I D, Squire J A, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432: 396-401.
- [11] Singh S K, Clarke I D, Hide T, Dirks P B. Cancer stem cells in nervous system tumors [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 7267-7273.
- [12] Kim C F, Jackson E L, Woolfenden A E, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer [J]. *Cell*, 2005, 121: 823-835.
- [13] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, et al. Highly purified CD44⁺ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 1696-1708.
- [14] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard G F, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system [J]. *Stem Cells*, 2006, 24: 506-513.
- [15] Seigel G M, Campbell L M, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma [J]. *Mol Vis*, 2005, 11: 729-737.
- [16] 钟秀凤, 李永平, 葛坚, 黄冰, 彭福华, 杜建阳, 等. 人视网膜母细胞瘤肿瘤干细胞分离培养 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22: 1177-1181.
- [17] Fang D, Nguyen T K, Leishear K, Finko R, Kulp A N, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 9328-9337.
- [18] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriawaki H. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351: 820-824.
- [19] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick J E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445: 106-110.
- [20] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. *Nature*, 2007, 445: 111-115.
- [21] Prince M E, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf G T, Kaplan M J, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 973-978.
- [22] Li C, Heidt D G, Dalerba P, Burant C F, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 1030-1037.
- [23] Zhou L, Wei X, Cheng L, Tian J, Jiang J J. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line [J]. *Laryngoscope*, 2007, 117: 455-460.
- [24] Hotfilder M, Röttgers S, Rosemann A, Schrauder A, Schrappe M, Pieters R, et al. Leukemic stem cells in childhood high-risk ALL/t(9;22) and t(4;11) are present in primitive lymphoid-restricted CD34⁺ CD19⁻ cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 1442-1449.
- [25] Matsui W, Huff C A, Wang Q, Malehorn M T, Barber J, Tanhecho Y, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells [J]. *Blood*, 2004, 103: 2332-2336.
- [26] Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 1999, 94: 2056-2064.
- [27] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. *Nat Med*, 1997, 3: 730-737.
- [28] Al-Hajj M, Clarke M F. Self-renewal and solid tumor stem cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 7274-7282.
- [29] Terstappen L W, Huang S, Safford M, Lansdorp P M, Loken M R. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺ CD38⁻ progenitor cells [J]. *Blood*, 1991, 77: 1218-1227.
- [30] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, Bonn V E, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 5821-5828.
- [31] Kristiansen G, Winzer K J, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 4906-4913.
- [32] Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161: 1215-1221.
- [33] Goodell M A, Rosenzweig M, Kim H, Marks D F, DeMaria M, Paradis G, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species [J]. *Nat Med*, 1997, 3: 1337-1345.
- [34] Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines [J]. *Cell Cycle*, 2004, 3: 414-415.
- [35] Szotek P P, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos P T, Dinulescu D M, Connolly D, Foster R, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11154-11159.
- [36] Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, Namba H, Ohtsuru A, Saenko V, et al. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively [J]. *Endocrinology*, 2007, 148: 1797-1803.
- [37] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 5506-5511.
- [38] Gibbs C P, Kukekov V G, Reith J D, Tchigrinova O, Suslov O N, Scott E W, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis [J]. *Neoplasia*, 2005, 7: 967-976.
- [39] Reynolds B A, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes [J]. *J Neurosci*, 1992, 12: 4565-4574.
- [40] Thomson S P, Meyskens F L Jr. Method for measurement of self-renewal capacity of clonogenic cells from biopsies of metastatic human malignant melanoma [J]. *Cancer Res*, 1982, 42: 4606-4613.
- [41] Cifone M A. *In vitro* growth characteristics associated with benign and metastatic variants of tumor cells [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1982, 1: 335-347.
- [42] Scadden D T. Cancer stem cells refined [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5: 701-703.