

肿瘤干细胞生物学特性及其干性维持机制的研究进展

张文静¹, 赵可旭¹, 张可越¹, 陈晓阳¹, 郝明炫¹, 杨昭^{1,2*}

1 北京化工大学生命科学与技术学院 分子诊断技术创新研究中心, 北京 100029

2 塔里木大学生命科学与技术学院 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室,
新疆 阿拉尔 843300

张文静, 赵可旭, 张可越, 陈晓阳, 郝明炫, 杨昭. 肿瘤干细胞生物学特性及其干性维持机制的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 391-418.

ZHANG Wenjing, ZHAO Kexu, ZHANG Keyue, CHEN Xiaoyang, HAO Mingxuan, YANG Zhao. Advances in the biological characteristics and stem maintenance mechanisms of tumor stem cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 391-418.

摘 要: 肿瘤是威胁人类健康和社会发展最为严重的疾病之一, 也是全球第二大常见疾病死因。最新统计数据显示, 恶性肿瘤在发达国家已取代心血管疾病成为第一大疾病死因。肿瘤的耐药、转移和复发, 仍然是临床治疗中亟需解决的难题。肿瘤干细胞(tumor stem cells, TSCs)是一类具有自我更新、分化潜能、高致瘤性和高耐药性等特征的细胞亚群, 能够抵抗化疗等非特异性治疗手段, 在肿瘤发生、转移、耐药和复发中发挥关键作用。肿瘤干细胞标志物、干性维持机制、微环境和代谢重编程等领域已成为了研究热点, 最新研究成果为肿瘤干细胞的鉴定和靶向治疗提供了新的靶标和策略。本文对肿瘤干细胞的表面标志物(CD133 和 CD44 等)、自我更新和上皮细胞间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)信号通路(Wnt/ β -catenin 和 Hedgehog 等)、微环境特征、代谢重编程(糖酵解和氧化磷酸化等), 及其在肿瘤的起始、发展、转移和耐药中的作用进行了综述。
关键词: 肿瘤干细胞; 表面标志物; 自我更新; 转移; 微环境; 代谢重编程; 耐药

资助项目: 北京化工大学-中日友好医院生物医学转化工程研究中心联合基金(XK2023-21); 2021年新疆维吾尔自治区科协青年人才托举工程项目; 国家生物药技术创新中心核酸药物“揭榜挂帅”技术攻关项目(NCTIB2022HS01016); 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划项目(2022AB022)

This work was supported by the the Joint Project of Biomedical Translational Engineering Research Center of Beijing University of Chemical Technology-China-Japan Friendship Hospital (XK2023-21), the Young Elite Scientists Sponsorship Program by Xinjiang Uygur Autonomous Region Association for Science and Technology (2021), “Open Competition to Select the Best Candidates” Key Technology Program for Nucleic Acid Drugs of NCTIB (NCTIB2022HS01016), and the Scientific and Technological Research Project of Xinjiang Production and Construction Corps (2022AB022).

*Corresponding author. Tel: +86-10-64421335, E-mail: yangzhao@mail.buct.edu.cn

Received: 2023-08-22; Accepted: 2023-10-13

Advances in the biological characteristics and stem maintenance mechanisms of tumor stem cells

ZHANG Wenjing¹, ZHAO Kexu¹, ZHANG Keyue¹, CHEN Xiaoyang¹, HAO Mingxuan¹, YANG Zhao^{1,2*}

¹ Innovation Center of Molecular Diagnostics, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

² Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production and Construction Corps, College of Life Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

Abstract: Tumor is one of the most serious diseases that threaten human health and social development, and it is the second most common cause of death worldwide. The latest statistics show that malignant tumors have surpassed cardiovascular disease as the leading cause of death in developed countries. Drug resistance, metastasis, and recurrence of tumors continue to present urgent challenges in clinical treatment. Tumor stem cells (TSCs) are a specific subset of cells that possess high capabilities of self-renewal, differentiation potential, tumorigenicity and drug resistance. They are resistant to non-specific treatment methods such as chemotherapy and radiotherapy, and play a crucial role in tumor initiation, metastasis, drug resistance, and recurrence. The surface markers, stemness maintenance mechanisms, microenvironment, and metabolic reprogramming of TSCs have become areas of intense research focus. The latest research results provide novel targets and strategies for the identification of TSCs and targeted therapy. This paper reviews the surface markers (CD133, CD44, etc.), self-renewal and epithelial mesenchymal transition (EMT) signaling pathways (Wnt/ β -catenin, Hedgehog, etc.), microenvironment characteristics, metabolic reprogramming (glycolysis, oxidative phosphorylation, etc.) and their roles in the initiation, development, metastasis and drug resistance of TSCs.

Keywords: tumor stem cells; surface marker; self-renewal; metastasis; microenvironment; metabolic reprogramming; drug resistance

肿瘤是机体在内、外各种致癌因素的长期协同作用下,局部组织细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控,导致细胞异常增殖而形成的新生物。根据国际肿瘤研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)调查数据显示,2020年全球新增恶性肿瘤病例1 930万,死亡病例1 000万^[1-2]。一项数据统计显示,2022年中国约有482万新增恶性肿瘤病例,321万恶性肿瘤死亡病例^[3]。2019年 *The Lancet* 在线发表的一项前瞻性城市乡村研究显示,恶性肿瘤

已取代心血管疾病成为高收入国家的主要致死疾病,其死亡率是心血管疾病的两倍。随着心血管疾病发病率持续下降,恶性肿瘤可能在几十年内超越心血管疾病成为人类死亡的首要原因。因此,深入研究肿瘤的发病机制和生物学特性,对肿瘤的预防和治疗意义重大。

肿瘤干细胞(tumor stem cells, TSCs)表面标志物是指在TSCs细胞膜上特异性高表达的生物分子,其通常与TSCs的干性维持和致瘤能力相关,可用于TSCs的分离、鉴定和靶向治疗^[4]。

许多促进正常干细胞生存、增殖、自我更新和分化特性的信号通路在肿瘤发生或 TSCs 中被异常激活或抑制。内源性或外源性 microRNAs 调控这些复杂的通路。这些信号通路也可诱导 TSCs 下游基因的表达,如细胞因子、生长因子、凋亡基因、抗凋亡基因、增殖基因和转移基因。这些信号通路通过信号中介相互交织的网络来调控 TSCs 的生长^[5]。

TSCs 与肿瘤微环境在肿瘤发生发展过程中有着复杂的作用,肿瘤微环境中的细胞在维持 TSCs 的干性、肿瘤生长、转移等过程中起着重要的作用。TSCs 的生存需要称为干细胞龛的特定的肿瘤微环境^[4]。TSCs 与肿瘤微环境关系紧密,肿瘤不仅可以适应肿瘤微环境的变化,还可以改变、影响肿瘤微环境;而肿瘤微环境不仅可以影响 TSCs 的自我更新能力,还可以诱导正常细胞和非 TSCs 向 TSCs 转变^[6]。

上皮细胞间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)在胚胎发育和肿瘤发生中具有重要作用,EMT 可使上皮性肿瘤细胞获得间充质细胞表型,增强肿瘤细胞的侵袭、转移能力和自我更新能力等干细胞样特性,多种转录因子、信号转导通路、microRNAs 和细胞微环境等因素共同调控此过程^[7]。EMT 与 TSCs 之间有密不可分的联系,可以促进肿瘤细胞获得干细胞特征,具有干细胞特征的肿瘤细胞高表达 EMT 标记分子, microRNAs 可同时调控 EMT 和细胞干性^[8]。

肿瘤代谢是指肿瘤细胞通过各种代谢途径来满足增加的生物能量和生物合成的需求。分化的肿瘤细胞与 TSCs 之间都存在着代谢的重塑和异常改变,即代谢重编程^[9]。相比于正常分化的细胞,即使在供氧充足的情况下,肿瘤细胞也主要是通过糖酵解途径(而非三羧酸循环和氧化磷酸化途径)来分解摄入过量葡萄糖,

这就是著名的 Warburg 效应^[10]。当今的 Warburg 效应已经不再局限于糖酵解和三羧酸循环的改变,脂肪酸代谢、氨基酸代谢等诸多代谢通路的改变也被囊括到 Warburg 效应中来^[11]。TSCs 的代谢重编程能有效调控细胞的增殖、生长、迁移和侵袭等重要的生命活动。

TSCs 是近年来肿瘤理论研究的热点之一,越来越多的证据表明 TSCs 与肿瘤的起始、发展、转移和耐药存在密切联系。TSCs 是肿瘤组织内能够自我更新并有肿瘤再生能力的细胞^[12],其自我更新和分化能力有助于肿瘤生长的起始和维持,在肿瘤患者的不良预后中担任重要角色^[13]。TSCs 相较于分化的肿瘤细胞,在药物处理或营养缺乏条件下,具有更强的突变和适应能力,从而导致治疗耐药性的产生。肿瘤遗传学的发展证明肿瘤是一种异质性疾病,而 TSCs 是导致肿瘤异质性的主要原因^[14]。TSCs 模型的提出,最早是基于急性粒细胞白血病中的发现,后续多个研究报道了 TSCs 在实体肿瘤中存在,包括乳腺癌^[15]、肺癌^[16]、胰腺癌^[17]、前列腺癌^[18]和脑癌^[19]等。进一步了解 TSCs 的生物学特性和干性维持机制,对于开发肿瘤诊断和治疗新方法具有重要的现实意义和价值,可能为肿瘤患者带来新希望。

1 TSCs 表面标志物

随着 TSCs 学说的提出和研究的深入,科学家鉴定了越来越多的 TSCs 潜在表面标志物,如 CD34、CD133、CD44、CD24、CD90、上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)和 CD166 等。

1.1 CD34

CD34 是高度糖基化的 I 型跨膜糖蛋白,与内皮细胞和血管生成有关^[20]。CD34 是第一个被发现的 TSCs 表面标志物。1994 年, Dick 等^[20-21]

在急性髓系白血病中分离出 CD34⁺CD38⁻人类白血病细胞,发现将其移植到免疫缺陷小鼠后,可以导致小鼠患有急性白血病。分离的 CD34⁺CD38⁻细胞因具有自我更新和高致瘤性特征,被命名为白血病干细胞(leukemia stem cells, LSCs)。CD34 后续被证明为多种 TSCs 的潜在标志物,包括肝癌^[22]和非小细胞肺癌^[23]等。

Park 等^[24]利用流式细胞术评估了 7 个肝癌细胞株中 CD34⁺细胞群的比例,发现 PLC/PRF/5 肝癌细胞中 CD34⁺细胞的比例为 3%–6%,高于其他 6 个细胞株,并将其定义为肝细胞癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)。异种移植实验发现从 PLC/PRF/5 细胞中分离出来的 CD34⁺细胞群在免疫缺陷小鼠中只接种 100 个细胞就形成了异种移植瘤,而 CD34⁻细胞群则需要接种 100 000 个细胞及以上才能形成肿瘤,表明 CD34⁺ PLC/PRF/5 细胞更容易致瘤,具有 LCSCs 的特征。免疫组化结果显示,人移植瘤组织表达了人肝特异性蛋白(liver specific protein, LSP)、白蛋白(albumin, ALB)、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、 α -抗胰蛋白酶(α -antitrypsin, α -PNL)和 EpCAM,进一步证实了 CD34⁺ PLC/PRF/5 细胞即为 LCSCs。

1.2 CD133

CD133 是一种五戊聚糖跨膜糖蛋白,能够与血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)相互作用参与信号转导^[25]。1997 年,Weigmann 等^[25]通过设计一种靶向小鼠神经上皮细胞的单克隆抗体,并通过免疫电子显微镜观察到该抗体在神经上皮细胞顶端质膜的突起处产生免疫反应,其识别的抗原是 CD133 分子。在后续研究中,CD133 被发现是多种 TSCs 的潜在标志物,如肺癌^[26]、结肠癌^[27]、前列腺癌^[28]、肝癌^[29]、胰腺癌^[30]和肾癌^[31]等。

Mersakova 等^[32]用荧光标记的抗体对 30 名结肠癌患者样本的原代肿瘤细胞进行染色,然后通过流式细胞术对荧光抗体检测中分离出来的细胞表面的 CD133 标志物的表达进行分析,得到了 26.5% CD133⁺和 73.5% CD133⁻结肠癌细胞。此外,研究人员比较原发瘤和转移瘤所有样本中 CD133⁺细胞的百分比,发现转移瘤中 CD133⁺细胞的百分比明显高于原发瘤。以上结果说明 CD133⁺肿瘤细胞能够分化出异质性肿瘤细胞,且促进转移瘤的发展。

笔者团队^[33]从一名 57 岁诊断为 T3aN1M0 期肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)的男性患者标本中分选了 CD133⁺和 CD133⁻ RCC 细胞,只有 CD133⁺细胞具有球形形成能力;将分离的 CD31⁻CD45⁻、CD31⁻CD45⁻CD133⁻和 CD31⁻CD45⁻CD133⁺ RCC 细胞移植到 NOD/SCID 小鼠皮下发现接受 10 000 个 CD31⁻CD45⁻CD133⁺细胞的小鼠中几乎都出现了可见肿瘤,接受 10 个细胞的小鼠中 25%出现了肿瘤;移植另外两种细胞类型的小鼠(10 000 个/只)超过 50%无肿瘤;表明从 RCC 分离的 CD133⁺细胞具有 TSCs 性质。接下来对癌细胞进行了单细胞外显子组测序。测序结果发现了 *KCP*、*LOC440040* 和 *LOC440563* 基因突变是新的肾癌干细胞(renal cancer stem cells, RCSCs)驱动因子,且 *KCP*、*LOC440040* 和 *LOC440563* 突变至少存在于 20% 的患者中,是 RCC 细胞转化为 RCSCs 的重要驱动因素。

1.3 CD44

CD44 是一种 I 型跨膜糖蛋白,是透明质酸(hyaluronic acid, HA)的受体,参与细胞间相互作用、细胞黏附和迁移^[34]。1985 年,Underhill 等^[35]为了确定 HA 在细胞表面的结合位点,从 SV-3T3 细胞中发现了一个 50 kb 的蛋白质,即表面标志物 CD44。CD44 已被发现为乳腺癌^[36]、

肺癌^[37]、结直肠癌^[38]、前列腺癌^[39]、肝癌^[40]和胰腺癌^[41]等 TSCs 的潜在标志物。

Kim 等^[42]从结肠癌 Caco-2 细胞亚群中分选并计数得到 23.4% 的 CD44⁺CD133⁺细胞、75.0% 的 CD44⁻CD133⁺细胞和 1.6% 的 CD44⁻CD133⁻细胞。研究人员进行细胞周期分析发现 CD44⁺CD133⁺细胞体积更大, 有丝分裂活性更强; 然后将细胞悬浮液皮下注射到 NOD.Cg-PrkdC^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}-(NSG)小鼠中发现 CD44⁺CD133⁺ Caco-2 细胞在免疫缺陷的 NSG 小鼠中形成了肿瘤, 且只有 CD44⁺CD133⁺ Caco-2 来源的原发肿瘤细胞亚群具有致瘤潜能, 并且 CD44⁺CD133⁺细胞在二次异种移植中比在初次移植中生长更快。基因表达分析显示, 在 CD44⁺CD133⁺细胞中, Wnt/ β -catenin 通路被过度激活, 小分子 Wnt/ β -catenin 信号抑制剂能够显著抑制该亚群的生长和致瘤潜能。以上结果表明 Caco-2 细胞的 CD44⁺CD133⁺亚群细胞在致瘤细胞中高度富集。

笔者团队^[43]采用膀胱癌特异性抗体 BCMab1 与 CD44 抗体组合, 从 3 例膀胱癌组织中分选了膀胱癌干细胞(bladder cancer stem cells, BCSCs)、膀胱癌非干细胞(bladder cancer non-stem cells, BCNSCs)、膀胱上皮干细胞(bladder epithelial stem cells, BESC)和膀胱上皮非干细胞(bladder epithelial non-stem cells, BENSCs), 并对其进行单细胞 MALBAC 扩增和全外显子测序。通过进化分析发现 BCSCs 起始于 BESC 的突变或 BCNSCs 的去分化。此外, 还在 BCSCs 中发现了 21 个关键的改变基因, 其中有 6 个基因未曾在膀胱癌中报道(*ETS1*、*GPRC5AMKLI*、*PAWR*、*PITX2* 和 *RGS9BP*)。功能实验表明, *ARID1A*、*GPRC5A* 和 *MLL2* 共突变显著增强了 BCNSCs 转化成 BCSCs 的能力。

1.4 CD24

CD24 是一种小型的糖磷脂酰肌醇锚定的细胞表面受体, 是细胞表面黏附和信号转导分子^[44]。1983 年, Hofman 等^[44]根据 B 细胞亚群的染色模式, 用针对独特 B 细胞抗原的 BA-1 单抗来定位 B 细胞亚群, 首次定位到 CD24 抗原在 70%–80% 的 Ig 阳性细胞和所有成熟粒细胞中表达。CD24 已被发现为乳腺癌^[45]、胃癌^[46]、肝癌^[47]和膀胱癌^[48]等 TSCs 的潜在标志物。

Ooki 等^[49]发现 CD24 作为 TSCs 标志物在尿路上皮 TSCs 中过表达。由于不清楚 CD24 对尿路上皮 TSCs 干性的影响以及是否可以作为膀胱尿路上皮癌(urothelial carcinoma of the bladder, UCB)的标志物, Ooki 等^[49]首先通过 Western blotting 评估了成球细胞与 BFTC 905、909 和 5637 细胞系中匹配的亲本细胞的 CD24 表达水平, 发现成球细胞比匹配的亲代细胞表达更高的 CD24; CD24 敲低实验结果表明 CD24 敲低组(CD24-sh)细胞与对照细胞(CD24-Ctrl)相比, CD24-sh 细胞在第一次和第二次传代时产生的球更少、更小, 且球状 CD24-sh 细胞侵袭性降低; 研究人员使用化疗药物分析球状 CD24-sh 细胞的生存能力, 发现球状 CD24-sh 细胞比球状 CD24-Ctrl 细胞对顺铂处理更敏感, CD24 基因敲除显著降低了球形细胞对顺铂处理的抗凋亡能力; 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测 CD24-sh 细胞和 CD24-Ctrl 细胞中 15 个潜在 TSCs 相关分子的 mRNA 表达水平, 结果显示 CD24 基因敲除导致大量 TSCs 相关分子下调; 异种移植瘤实验表明在注射 CD24-Ctrl BFTC 909 和 CD24-Ctrl BFTC 905 细胞后的 70 d 随访期内, 5 只小鼠共 10 个侧翼分别出现 7 个和 8 个肿瘤, 相比之下, CD24-sh 球形细胞的肿瘤起始频率降低(CD24-sh BFTC 909 和 CD24-sh BFTC 905 细胞

在小鼠的每 10 个侧翼分别出现 3 个和 4 个肿瘤);然后研究人员从病人来源肿瘤异种移植模型分离出高表达和低表达 CD24 的细胞,与低表达 CD24 的细胞相比,高表达 CD24 的细胞表现出更强的球形形成和化学耐药能力,TSCs 相关分子表达更高,在小鼠中产生的肿瘤更大;接下来研究人员检测 48 个尿液样本(24 个 UCB 和 24 个对照组)中 CD24 表达水平,结果显示 UCB 患者尿液中 CD24 的表达水平显著高于对照组,且 CD24 检测肿瘤的敏感性和特异性分别为 45.8%和 95.8%;为了增加敏感性,研究人员通过评估尿液样本中 15 个 TSCs 相关的候选分子,选择了 3 个分子(CD24、CD49 和 NANOG)组成的小组,在一个独立的队列中,这 3 种分子联合使用的敏感性和特异性分别为 81.7%和 74.3%,84 例和 207 例对照的敏感性和特异性分别为 82%和 76%。总的来说以上结果表明 CD24 在尿路上皮 TSCs 的干性特征中起着关键作用且有潜力作为 UCB 检测的表面标志物。

1.5 CD90

CD90 是一种糖基磷脂酰肌醇锚定的糖蛋白,编码蛋白被广泛用作造血干细胞的标记物^[50]。1964 年,Reif 等^[50]首次在所测试的 6 个小鼠品系中的每一个胸腺和神经组织中都发现了相同的 CD90 抗原。CD90 已被发现为肝癌^[51]、胃癌^[52]和白血病^[53]等 TSCs 的潜在标志物。

Shu 等^[52]通过流式细胞仪分析来评估胃癌细胞系成球后干细胞标志物 CD90 的表达,结果表明,SNU-5 和 SNU-16 细胞的 CD90⁺细胞比例分别增加到 6.18%和 8.25%。纯化的 CD90⁺细胞皮下注射到裸鼠体内,结果表明,SNU-5 细胞系只需 200 个 CD44⁻CD90⁺细胞就能在 33.3%的小鼠中产生肿瘤,而 CD44⁻CD90⁻细胞则至少需要 2×10^4 个细胞才能形成肿瘤。由此

可以看出,CD90⁺细胞比 CD90⁻细胞表现出更强的致瘤性。

Liu 等^[54]选择 30 只 SD 雄性健康大鼠,10 只给水作为正常对照组,10 只进行开腹手术作为假手术组,其余 10 只为肝癌模型组,3 组 CD90 的相对表达量分别为 1.18 (± 0.02)、1.19 (± 0.02)、54.38 (± 24.48)。研究人员采用 qRT-PCR 检测 HCC 组织中的相关炎症因子。相关分析结果显示,白细胞介素-6 (interleukin, IL-6)、单核细胞螯合蛋白-1 (monocyte chelating protein, MCP-1)和转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor, TGF- β)的表达变化与 CD90 上调呈显著正相关,且炎症因子与肿瘤的大小、重量呈正相关,说明 CD90 可以通过增加炎症因子表达来促进肿瘤的生长。

1.6 EpCAM

EpCAM 是一种 I 型跨膜多肽,与细胞黏附、增殖、分化和迁移相关,在大多数正常上皮细胞和胃肠道癌上表达^[55]。1979 年 EpCAM 首次被 Herlyn 等发现,最初被描述为人结肠癌的显性表面抗原^[55]。EpCAM 已被发现作为非小细胞肺癌^[56]、结直肠癌^[57]、肝癌^[58]和胰腺癌^[59]等 TSCs 的潜在标志物。

Hwang 等^[60]对获得的人类肝细胞癌组织样本进行 EpCAM 的免疫组化染色,发现有 35.0%的肝细胞癌细胞表达了 EpCAM⁺。然后研究人员又从 25 名接受活体肝移植的肝细胞癌患者中收集术前和术后第 1 天和第 7 天的外周血样,通过流式细胞术检测 EpCAM⁺,发现术前和术后第 1 天,复发的肝细胞癌患者的 EpCAM⁺循环肿瘤细胞数量明显高于没有复发的肝细胞癌患者,说明 EpCAM 循环肿瘤细胞可以在术前和活体肝移植后 1 d 作为关键的表面标志物。

Mederer 等^[61]收集潜在治愈性肿瘤切除术

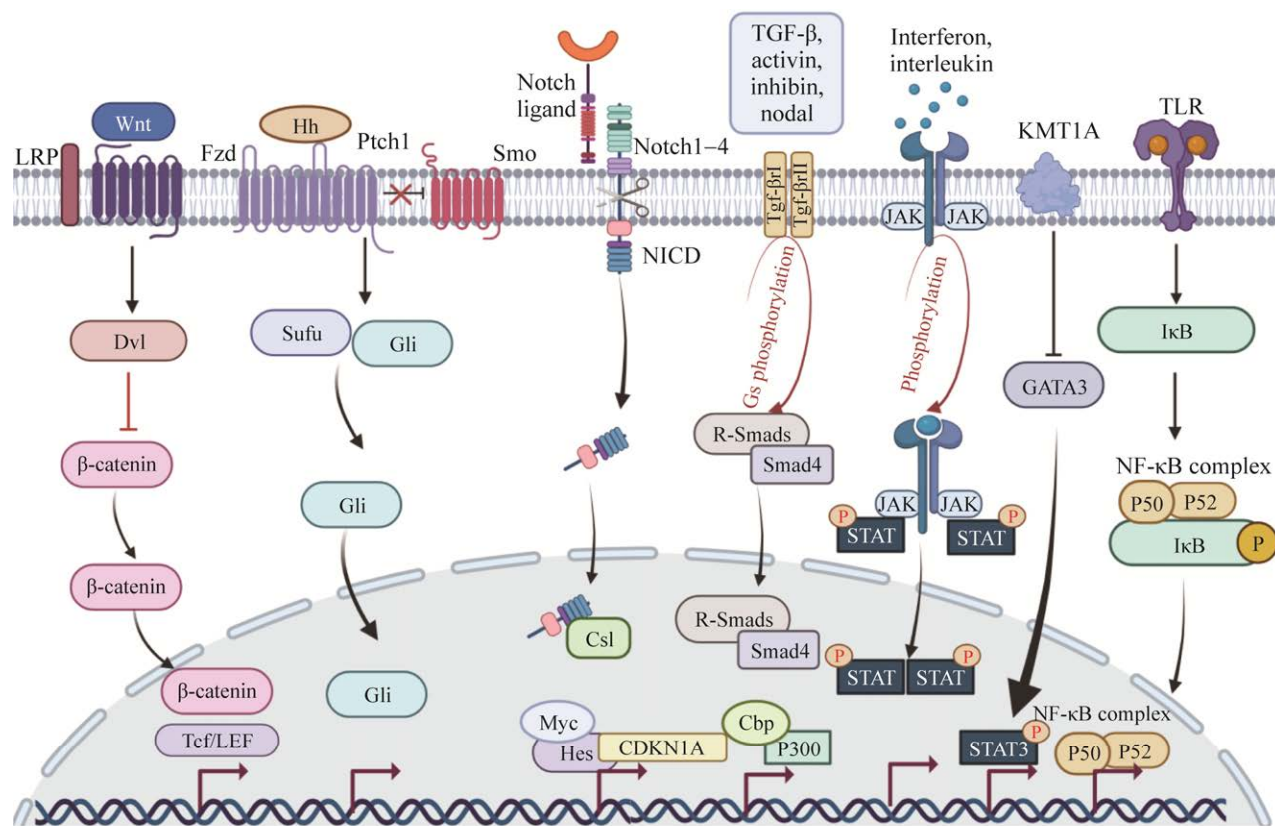


图1 肿瘤干细胞常见信号通路

Figure 1 Common signal pathways of tumor stem cell. LEF: Late expression factor gene; LRP: Lung resistance-related protein; NICD: Notch intracellular domain; TGF- β : Transforming growth factor- β ; JAK: Janus kinase; STAT: Signal transducer and activator of transcription T; LR: Toll-like receptors.

He 等^[70]通过生物信息学等实验分析发现, 非小细胞肺癌细胞系(H358、H1975、H1299、H1650、A549 和 SPC-A1)与正常人支气管上皮细胞系(BEAS-2B)相比, 一种人源特异性长链非编码 RNA (*LncRNA*), *PKMYT1AR* (*PKMYT1* 相关的 *LncRNA*)的表达增加。体外实验表明, *PKMYT1AR* 敲除抑制了 A549 和 SPC-A1 细胞的增殖, 而 *PKMYT1AR* 高表达则显著克服了这种表型。此外, 与对照 shRNA 细胞相比, *PKMYT1AR* 敲除细胞的集落形成能力也显著降低。体内实验表明, *PKMYT1AR* 基因敲除显著延缓了小鼠体内肿瘤进展。创面愈合和 Transwell 实验发现与对照组相比, *PKMYT1AR*

敲除细胞的迁移能力受到显著抑制。机制研究表明, *PKMYT1AR* 在非小细胞肺癌癌组织和细胞系中作为一种 *LncRNA* 阻断 *miR-485-5p* 对 *PKMYT1* 的抑制作用, 从而上调 *PKMYT1* 的表达。*PKMYT1* 通过与 β -catenin 蛋白相互作用, 阻断 E3-ligase-SCF β -TrCP 识别, 导致 β -catenin 蛋白的稳定和 Wnt 信号的组成性激活, 从而促进 TSCs 的自我更新, 导致肿瘤的发展和转移。

2.2 Hedgehog 信号通路

1980 年 Nüsslein-Volhard 等^[71]在筛选影响果蝇胚胎发育的基因时, 首次发现了 *Hedgehog* (*Hh*)基因。经典的 Hh 信号通路负责胚胎发育, 调节干细胞更新和肿瘤中的组织稳态。对 Hh

信号的反应主要由肿瘤抑制因子 *Ptc* 和原癌基因 *Smo* 这 2 个跨膜蛋白来控制。*Ptc* 蛋白的下游分子是 G 蛋白偶联受体蛋白 *Smo*，在 Hedgehog 缺失的情况下，*Ptc* 通过未知的方式间接抑制 *Smo* 蛋白，而 Hedgehog 与 *Ptc* 的结合则解除该抑制，从而激活 *Smo* 及其下游通路，诱导靶基因的转录和与发育相关蛋白的表达^[72] (图 1)。

笔者团队^[73]使用 BCMab1 与 anti-CD44 抗体鉴定出 BCMab1⁺CD44⁺细胞亚群为 BCSCs，其通过激活 Hedgehog 信号通路促进了 BCSCs 的干性维持。通过对 BCMab1⁺CD44⁺细胞和 BCMab1⁻CD44⁻细胞进行转录组芯片分析发现，BCMab1⁺CD44⁺细胞中的糖转移酶 GALNT1 mRNA 水平比 BCMab1⁻CD44⁻细胞高 7 倍以上。免疫组化染色也证实膀胱癌组织中 GALNT1 高表达。敲低 GALNT1 显著降低了 BCSCs 肿瘤球的形成。GALNT1 促进 BCSCs 干性维持的机制为高表达的 GALNT1 通过介导 Shh 的 O-linked 糖基化促进 Hedgehog 通路的激活，从而促进 BCSCs 的自我更新和膀胱肿瘤的发生。

Wu 等^[74]对从原发性肝癌肿瘤组织中分离出来的 CD13⁺CD133⁺细胞和 CD13⁻CD133⁻细胞进行转录组芯片分析，发现 LncHDAC2 在 LCSCs 中表达水平较高。研究人员在原发性肝癌细胞中反义清除 LncHDAC2 进行球体形成实验，观察到 LncHDAC2 耗尽显著抑制了球体的形成。随后研究人员将 LncHDAC2 KO 和 sgCtrl 细胞注射到 BALB/c 裸鼠体内，发现与 sgCtrl 处理的细胞相比，LncHDAC2 KO 细胞肿瘤增殖显著减少。限制性稀释异种移植瘤分析发现 LncHDAC2 敲除显示出更弱的肿瘤启动能力和致瘤细胞产生频率。此外通过慢病毒建立了稳定过表达 LncHDAC2 的 HCC 原代细胞，发现过表达 LncHDAC2 促进了体外肿瘤球形成，同

时增强了致瘤细胞产生频率和体内肿瘤增殖。机制分析发现在 LCSCs 中，LncHDAC2 与 HDAC2 相互作用，将 NuRD 复合物募集到 *Ptch1* 基因的启动子上，从而阻遏 *Ptch1* 的转录，进而激活 Hedgehog 信号通路，从而促进 LCSCs 的自我更新和肿瘤的生长。

2.3 Notch 信号通路

Notch 基因发现于 1919 年，其在人类肿瘤中的作用首先是通过 T 细胞急性淋巴细胞白血病中染色体 9-7 易位的研究发现的^[75]。*Notch* 信号通路包括 *Notch* 受体、*Notch* 配体、配体-DNA 结合蛋白调节分子。*Notch* 信号通过结合一个细胞上的跨膜配体与相邻细胞上的 *Notch* 受体类似物(*Notch1*、*Notch2*、*Notch3* 或 *Notch4*) 结合，然后被早老素依赖性的 γ -分泌酶水解断裂，形成可溶性的 NICD 并转移至核内与转录因子 Csl 结合，从而激活转录抑制因子，进而调节下游靶基因的功能。*Notch* 信号通路的重要靶基因包括 *Hes* 家族基因(作为转录抑制因子，与 TSCs 表型相关)、原癌基因 *Myc* 和 *CDKN1A*^[76] (图 1)。

FAM19A 是一种内质网应激相关蛋白，是参与胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSCs)入侵的关键候选蛋白之一。Liu 等^[77]通过分析单细胞测序数据集发现 FAM129A 在胶质瘤组织中高表达，且优先在 GSCs 中表达；免疫组化染色证实 FAM129A⁺细胞主要分布在肿瘤浸润区，共聚焦成像证实这些 FAM129A⁺细胞主要为浸润区 GSCs；细胞活力实验显示，沉默 FAM129A 可抑制 GSCs 的增殖，过表达后细胞增殖加速；肿瘤球形成实验显示，FAM129A 被破坏或富集造成 GSCs 球体形成的下降或升高；限制性稀释实验评估消除或补充 FAM129A 分别导致自我更新的抑制或促进；然后实验人员采用 EdU 细胞增殖实验发现下调 FAM129A 会

降低 GSCs 的 DNA 复制, GSCs 自我更新相关转录因子 SOX2 和 OLIG2 表达下降; 异种移植瘤实验显示 shFAM129A 小鼠的存活时间明显长于 shNT 小鼠, 且 shNT 小鼠比 shFAM129A 小鼠的肿瘤更大; Transwell 实验干扰 FAM129A 的体外表达, 发现 GSCs 的侵袭能力减弱, 过表达 FAM129A 后, GSCs 侵袭增强; 在机制上, FAM129A 通过与 Notch1 胞内结构域(NICD1) 结合并阻止其降解, 作为 Notch 信号的正调控因子, 激活 Notch 信号通路从而促进 GSCs 的自我更新、侵袭和迁移。

2.4 TGF- β 信号通路

TGF- β 、激活素、抑制素、Nodal 和 BMP 等配体在细胞表面结合跨膜受体 I 型和 II 型的复合物, 通过组成型活性的 II 型受体激酶诱导 I 型受体中 GS 域(富含甘氨酸和丝氨酸残基)的磷酸化, GS 域的磷酸化可以招募受体调控的 SMADs (R-SMADs)。R-SMADs 与常见的 SMAD4 形成复合物, 激活的 SMAD 复合物转移到细胞核中, 进而调节靶基因的转录, 如 *p300*、*CBP*^[78] (图 1)。TGF- β 在肿瘤发展中具有双重作用, 在恶性肿瘤早期, 肿瘤或基质细胞分泌的 TGF- β 通过诱导细胞周期阻滞和促进细胞凋亡发挥抑癌作用, 它还可以通过调节免疫系统和肿瘤微环境来促进肿瘤细胞的侵袭和转移。然而, 随着肿瘤的发展, 肿瘤细胞可以获得对 TGF- β 的抵抗性, 使其失去抑制作用, 甚至逆转为促进细胞转化和增殖的作用, 这对肿瘤的进展和转移具有重要影响^[79]。

Wang 等^[80]发现了一个肝癌祖细胞特异性基因 *RALY* RNA 结合蛋白样(RALYL), 用 RT-PCR 和 Western blotting 检测 RALYL 在 Huh 7、Hep 3B 和 H2M 细胞中均以高水平表达。qRT-PCR 实验结果表明 RALYL 过表达上调了干细胞相关标志物 AFP、CD133、NANOG、

SOX 2 和 c-Myc 水平; 成球实验显示 RALYL 过表达显著增强了初级和次级球状体形成频率; 细胞迁移和侵袭实验显示 RALYL 过表达显著增强了肝癌细胞的转移能力和异种移植瘤小鼠转移性结节的形成, 同时 Western blotting 结果显示 RALYL 可下调上皮标记物 E-cadherin 的表达和上调 EMT 相关转录因子(SNAIL、SLUG)。研究人员用两种常用的化疗试剂以不同浓度处理后, RALYL 过表达细胞的细胞存活率显著高于对照。RALYL 的高表达是通过减少 N6-甲基腺苷(n6-methyladenosine, m6A)修饰上调 *TGF- β 2* mRNA 的稳定性, 促进 HCC 细胞中 TGF- β 2 的表达, TGF- β 2 调节干细胞相关 PI3 K/AKT 和 STAT3 途径, 从而促进 HCC 的干性特征、转移还有化疗耐药性。

2.5 JAK/STAT3 信号通路

JAK/STAT3 信号通路是一条由细胞因子刺激的信号转导通路, 该通路包括酪氨酸激酶相关受体、酪氨酸激酶 JAK (JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2) 和产生效应的转录因子 STAT (STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6)。来自干扰素、白细胞介素、生长因子或其他化学信号激活酪氨酸激酶相关受体, 从而激活 JAK 的激酶功能, 导致对自身的磷酸化, 接下来 STAT 蛋白结合到被磷酸化的受体上, 被 JAK 磷酸化, 被磷酸化的 STAT 蛋白结合到另一个被磷酸化的 STAT 蛋白上并且易位到细胞核中, 在细胞核中, 它结合到 DNA 上并启动转录那些响应 STAT 的基因, 7 种 STAT 基因每种都结合到各不相同的 DNA 序列上, 启动 DNA 序列的表达, 从而驱动肿瘤细胞增殖、存活、侵袭和转移, 同时强烈抑制抗肿瘤免疫反应^[81-82] (图 1)。

Wang 等^[83]用 pan-JAK 小分子抑制剂 AZD1480 治疗乳腺癌细胞株 HCC1937 显著降低了其

TSCs (CD44⁺/CD24⁺)的活力。然后,通过 qRT-PCR 分析,结果显示 AZD1480 阻断 JAK/STAT3 下调了乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSCs)中几个关键的脂质代谢基因,包括脂肪酸氧化的限速酶肉碱棕榈酰转移酶 1 (rate limiting enzyme carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1),说明 JAK 调节 BCSCs 的脂质代谢,且 BCSCs 细胞表现出升高的脂肪酸氧化率(fatty acid oxidation rate, FAO),抑制 FAO 降低了它们的肿瘤球形成潜力和肿瘤球起始细胞的数量。从机制上进行分析发现,人类脂肪细胞来源的瘦素,通过激活 JAK/STAT3,促进 STAT3 磷酸化,p-STAT3 进入细胞核与 *CPT1B* 启动子结合,促进其转录,*CPT1B* 酶编码脂肪酸氧化的关键酶从而促进了脂质代谢的过程,进而促进 BCSCs 的自我更新。

2.6 KMT1A/GATA3/STAT3 信号通路

之前的数据显示 KMT1A 在恶性血液病和实体瘤中高度表达^[84-85],编码一种进化保守的组蛋白甲基转移酶,催化 H3K9me3 修饰,在异染色质形成和基因沉默中发挥重要作用^[86]。笔者团队^[87]对来自于人原发膀胱癌组织和膀胱癌细胞株 EJ 的 BCSCs 和 BCNSCs 进行了转录组芯片分析,发现 BCSCs 中差异表达基因显著富集在组蛋白甲基化信号通路中。其中,组蛋白甲基转移酶 KMT1A 在膀胱癌样本(451%)、BCSCs (489%)和肿瘤球细胞(537%)中显著高表达。更重要的是,与 shCtrl BCSCs 相比,KMT1A 的缺失显著减少了 82%的肿瘤球数量和 84%的 CD44 阳性细胞数量,并显著抑制了 BCSCs 异种移植瘤的形成。机制研究表明,KMT1A 蛋白利用其甲基转移酶活性催化 *GATA3* 基因启动子区域(-1 351—1 172 bp)的组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸进行三甲基化修饰(H3K9me3),从而阻遏其转录;而 *GATA3* 蛋白能够直接与 *STAT3* 基因

的启动子区域(-1 710—1 530 bp)结合,并阻遏其转录。因此,组蛋白甲基转移酶 KMT1A 介导的 *GATA3* 基因的转录阻遏,促进了 *STAT3* 的表达上调和磷酸化激活(图 1)。以上研究表明,KMT1A-GATA3-STAT3 是一条全新的 BCSCs 自我更新信号通路。

2.7 NF-κB 信号通路

核因子 κB (nuclear factor kappa-B, NF-κB)是一种转录因子家族,由 5 种成员组成: RelA (p65)、c-Rel、RelB、p50 (NF-κB1)和 p52 (NF-κB2),它们可以形成各种异源二聚体或者同源二聚体,并通过与启动子的 κB 位点结合来激活大量基因^[88]。NF-κB 通路通过诱导 *cyclin D1*、*D2*、*D3*、*cyclin E*、*CDK2* 和 *c-Myc* 等多种调控细胞增殖基因的表达来促进细胞生长,还可以激活几个参与抑制外源性和内源性凋亡基因的转录,如抑制蛋白 FLIP、BCL2、BclxL 和一些 IAPs,抑制凋亡使突变的癌前和恶性细胞积累,促进肿瘤的发展,NF-κB 也被发现通过调节 TNF、IL1 和 IL6 等细胞因子的产生,在肿瘤新血管的形成中发挥重要作用^[89](图 1)。

G 蛋白偶联受体 50 (g-protein coupled receptor, GPR50)是参与抗增殖作用,Biswas 等^[90]通过比较参与癌细胞进展的基因,发现 TSCs 中 GPR50 的表达水平上调,UALCAN 数据集证实了三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)组织中 GPR50 的高表达。GPR50 下调后,TSCs 干性特征被改变,即球体形成能力下降,干性标记物表达降低,细胞活力下降约 20%,第 4 代增殖能力下降 70%,48 h 细胞迁移能力下降一半;进行机制研究发现 GPR50 沉默可下调 NF-κB 信号通路,即 GPR50 通过靶向 NF-κB 信号通路调控乳腺癌 TSCs 干性特征。

糖基化是由高尔基体和内质网中驻留糖基转移酶介导的翻译后修饰过程,异常的蛋白糖

基化有助于侵袭性癌症的产生,包括胰腺癌。Leon 等^[91]通过蛋白质组学分析发现了 CD44 为糖基转移酶 C1GALT1 缺陷胰腺癌模型中介导异常糖基化的蛋白;在胰腺癌细胞中 C1GALT1 的缺失被发现增强了 TSCs 特征(肿瘤球的形成)和自我更新标记物(NANOG、SOX9 和 KLF4)的表达,敲低 C1GALT1 中 CD44 的表达后发现降低了 NANOG 的表达和干性特征的维持;接下来的机制研究发现 CD44 介导的异常糖基化激活了 ERK/NF- κ B 信号通路,导致胰腺癌细胞中 NANOG 表达增加,从而促进 TSCs 特征的改变。

3 TSCs 与肿瘤微环境

3.1 细胞

3.1.1 肿瘤相关巨噬细胞

肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs)是肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中最丰富的浸润性免疫细胞之一(图 2)。TAMs 可根据功能分为 M1-TAMs 和 M2-TAMs 两种不同的表型。M1-TAMs 发挥了促炎和抗肿瘤的作用。M2-TAMs 则在抗炎和促进肿瘤发生过程中发挥作用, M2-TAMs 可以促进肿瘤的发生,刺激血管生成,增强肿瘤细胞的侵袭、运动和内渗性。M2-TAMs 还可以抑制免疫反应,从而帮助肿瘤细胞逃避免疫监视,提高肿瘤的耐药性。这两种极化形式在特定情况下和某些刺激物的存在下是可以相互转换的^[92]。

Wang 等^[93]将 CD44⁺/CD133⁺的人来源肝细胞癌系 HepG2 细胞和 M2-TAMs (TAMs CM 和 M2 MCyto)共培养,流式细胞术发现,共培养细胞的平均百分比分别增加了 14.1%和 35.9%,而 HepG2 单培养时只有 0.6%。同样, HepG2 细胞肿瘤干性标志物 NANOG、SOX2 和 OCT4 的表达也明显增加。功能研究显示,与 M2-TAMs

共培养后, HepG2 肿瘤球的数量增加到 29.8 个和 46 个,高于 HepG2 单培养的 17.5 个球体。机制研究表明,与 HepG2 单培养介质相比,细胞因子 CXCL1 和 CXCL2 在 M2-TAMs 单培养以及 HepG2 细胞/M2-TAMs 共培养的介质中明显地上调,但在无 M2-TAMs 共培养的 HepG2 细胞中没有变化,表明共培养介质中 CXCL1 和 CXCL2 的分泌增加来自 M2-TAMs,即 M2-TAMs 分泌的 CXCL1 和 CXCL2 促进了 HCC 的 TSCs 的干性维持和耐药性。

3.1.2 肿瘤相关成纤维细胞

肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)是存在于肿瘤内或包裹肿瘤的成纤维细胞(图 2)。在肿瘤基质的非免疫细胞类型中, CAFs 是几乎所有实体瘤中最丰富的细胞,且 CAFs 是异质的,其成熟的不同阶段由不同的细胞亚群组成。CAFs 作为 TSCs 分化的终产物之一,通过细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecules, ICAM)和细胞因子,如肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGFs)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和 IL-6,来促进肿瘤细胞的存活、增殖和转移^[94]。

Zhao 等^[95]从胃切除术后 2 年内有或没有肝转移的胃癌患者中分离出 CAFs。通过 RNA 测序和体内实验,发现了具有高肾小球上皮细胞整合膜蛋白(podoplanin, PDPN)表达的 CAFs 亚群, PDPN 是一种 I 型跨膜糖蛋白,与胃癌转移相关。功能实验表明,与 PDPN(+) CAFs 共培养时,比与 PDPN(-) CAFs 共培养或单独培养时相比, HGC27 和 AGS 胃癌细胞显示出更强的迁移能力。TCGA 数据库中胃癌患者的肿瘤组织分析显示 PDPN 在胃癌组织中的表达明显高于正常胃组织,且 PDPN 与更短的生存期相关。机制研究表明, PDPN(+) CAFs 通过 FAK/AKT 磷酸化分泌 POSTN 来调节 TSCs。此外, POSTN 还可以激活

胃癌细胞中的 FAK/YAP 信号通路,产生更多的 IL-6,进而诱导 PDPN(+) CAFs 中 PI3K/AKT 的磷酸化,延长 PDPN(+) CAFs 中 PI3K/AKT 通路的激活,维持了 POSTN 的产生以及对 TSCs 富集和胃癌细胞迁移的影响。

3.2 基质

3.2.1 缺氧

TME 中缺氧的微环境是低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)及其与干性相关信号通路和转录因子等蛋白相互作用形成的(图 2)。对 TSCs 的影响主要表现在促进其自我更新、激活干细胞相关信号通路、促进 EMT 进展

导致恶性肿瘤和远处肿瘤转移,以及血管生成失调^[96]。

Ye 等^[97]发现低氧会显著增加 GSCs 培养基上清液中的 HMGB1 浓度,在 HMGB1 敲除的 GSCs 中,细胞生存能力下降。肿瘤球形成实验中发现 HMGB1 的敲除明显抑制了 GSCs 在缺氧条件下的肿瘤球形成能力。体外限制性稀释实验中 HMGB1 的沉默导致 GSCs 在缺氧条件下自我更新能力下降。且 EdU 染色实验证明, HMGB1 的缺失损害了 GSCs 在缺氧条件下的增殖。机制研究表明,缺氧诱导的 HMGB1 与 RAGE 受体结合,激活了 RAGE 依赖的 ERK1/2 信号通

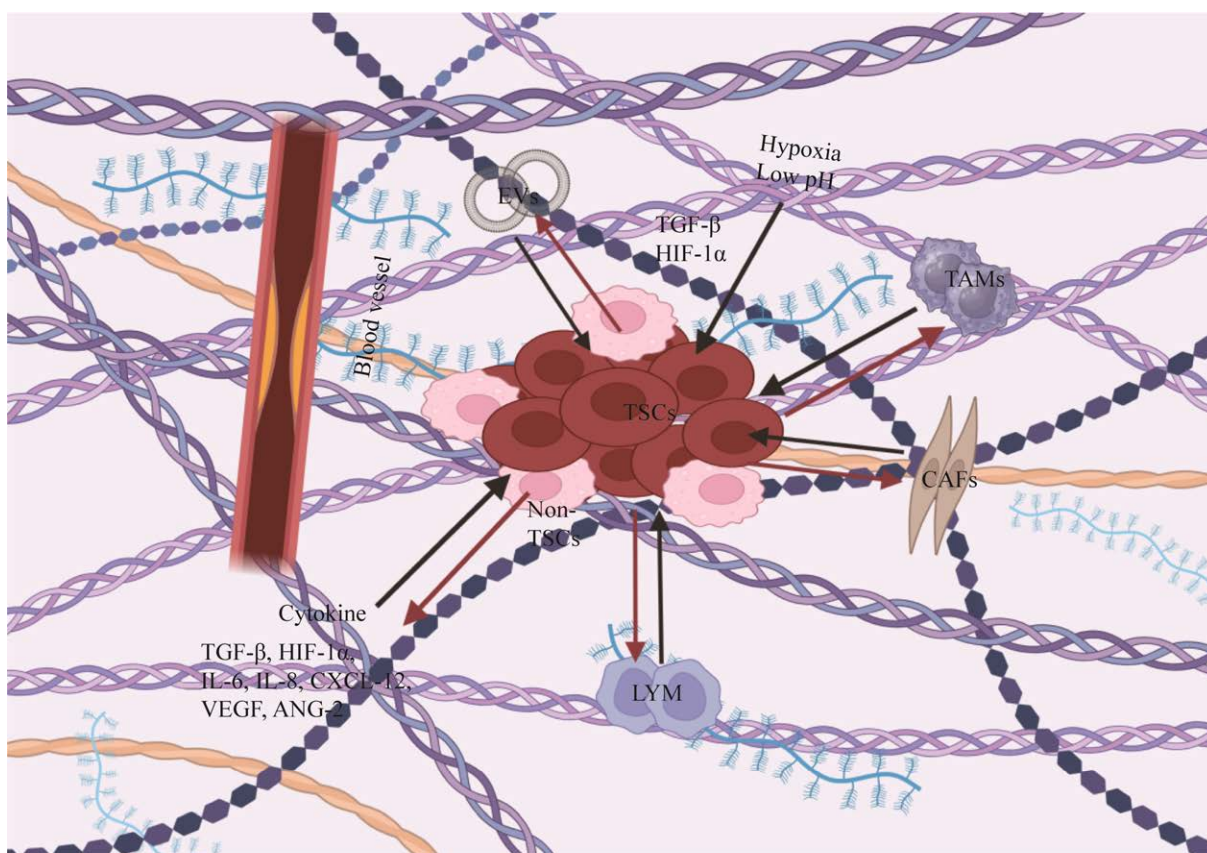


图 2 肿瘤干细胞与微环境相互作用

Figure 2 Interaction between tumor stem cell and microenvironment. EVs: Extracellular vesicles; TAMs: Tumor associated macrophages; CAFs: Cancer-associated fibroblasts; LYM: Lymphocyte; TGF-β: Transforming growth factor-β; HIF-1α: Hypoxia inducible factor-1α; IL-6: Interleukin-6; IL-8: Interleukin-8; VEGF: Vascular endothelial growth factor; ANG-2: Angiopoietin-2.

路, 并通过促进细胞周期的进展维持 GSCs 的增殖和自我更新。

3.2.2 细胞外囊泡

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)通常被分为外泌体、微囊泡(microvesicle, MVs)和凋亡体, 膜封闭的 EVs 可以由任何细胞类型释放。EVs 在细胞外环境中很稳定, 可以成为各种分子的载体, 如蛋白质、脂类和不同类型的 RNA。越来越多的证据表明, 来自 TSCs 的 EVs 可以促进肿瘤细胞的生存、EMT 和运动, 以及内皮细胞的血管生成^[98](图 2)。

Chung 等^[99]用亚致死剂量的顺铂或吉西他滨处理 MB49 小鼠非肿瘤干细胞(non-stem cancer cells, NSCCs), 并收集 EVs, 以测试它们在化疗条件下对 TSCs 功能的影响。用化疗后的 EVs 在 TSCs 培养液中预处理 MB49 TSCs 细胞, 在四甲基偶氮唑盐实验和克隆形成实验中, 发现 NSCCs EVs 增强了 TSCs 细胞对顺铂和吉西他滨的耐药性。数据表明化疗可以消除大部分的肿瘤细胞, 然而在它们死亡之前, 这些细胞释放的 EVs 可以支持 TSCs 在这些治疗条件下的生存, 最终导致耐药性和疾病进展。并且, NSCCs-EVs 能促进 MB49 TSCs 集落形成, 与 PBS 对照组相比, 用 NSCCs-EVs 处理 MB49 TSCs 细胞增强了其迁移和侵袭能力。除 ALDH1- α 1 外, 几乎所有的 TSCs 标志物在 NSCCs-EVs 处理后的表达都比 PBS 对照组有更大的提升。机制研究表明, NSCCs 释放的 EVs 含有富含核糖体蛋白的载体, 可以被 TSCs 吸收和利用, 快速诱导蛋白质的合成, 使 TSCs 能够适应动态的肿瘤环境。

3.3 细胞因子

3.3.1 缺氧相关

低氧生态位主要通过 HIF 的诱导, HIF 属于 bHLH-PAS 转录因子家族, 调节许多基因,

在氧稳态、葡萄糖和铁代谢以及红细胞生成中发挥作用。越来越多的证据表明, HIFs 是 TSCs 亚群维持的主要调节因子之一, 在调节 TSCs 增殖、自我更新和致瘤性方面发挥作用(图 2)。HIF-1 α 或 HIF-2 α 过表达及其在 TSCs 维持中的相互作用已在许多肿瘤类型中被观察到, 如胶质母细胞瘤、结肠癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌和卵巢癌^[100]。赖氨酸氧化酶(lysine oxidase, LOX)是一种交联细胞外基质蛋白(如胶原蛋白)并促进乳腺癌转移的酶, 而 LOX 的释放受 HIF-1 α 的调节。Ko 等^[101]发现来自高转移性 MDA-MB-231 细胞的放射治疗耐药 RT-R-MDA-MB-231 细胞比其他 RT-R231 细胞产生更多的 TSCs, 因此评估了 RT-MDA-MB-231 细胞与 MDA-MB231 细胞中 HIF-1 α 和 LOX 的表达水平, 发现 RT-R-MDA-MB-231 细胞与 MDA-MB-231 细胞相比, HIF-1 α 表达增加, LOX 分泌增加。移植 RT-R-MDA-MB-231 细胞的小鼠肿瘤生长增强, TSCs 标志物 CD44、Notch-4 和 Oct3/4 表达增加。此外, 与注射 MDA-MB-231 细胞的小鼠相比, 注射 RT-R-MDA-MB-231 细胞的小鼠肿瘤组织中 HIF-1 α 水平更高, 血浆中 LOX 分泌增加, 诱导的交联胶原水平更高。这些结果表明, RT-R-MDA-MB-231 细胞通过 HIF-1 α -LOX 促进转移前生态位的形成, 从而促进肿瘤进展。

TGF- β (包括 TGF β -1、TGF β -2 和 TGF β -3)是一个蛋白质家族的一部分, 是通过缺氧来调节的, 低氧诱导肿瘤细胞分泌 TGF- β , 并促进几种类型肿瘤的血管生成(图 2)。Ghosh 等^[102]研究表明, 在低氧条件下, TAMs 和 Tregs 通过提高 TGF- β 表达水平, 然后通过 PKC α /P38/c-Fos 信号通路促进葡萄糖神经酰胺合成酶对黑色素瘤 TSCs 的诱导, 实现 TSCs 的自我更新。

其他细胞因子如纤连蛋白(fibronectin, FN)的过度表达同样与外部压力因素(如缺氧)引发

的衰老有关。血栓软骨素在血管周围的表达使 TSCs 处于休眠状态, 而内皮细胞产生的肌腱蛋白 C (tenascin, TNC) 和 FN 会加速 TSCs 的生长。这些让 TSCs 离开休眠状态的分子(TNC、FN 等)的产生与缺氧有关, 这表明缺氧也可能通过让次要部位的 TSCs 离开休眠状态而促进肿瘤转移和发展^[103]。

3.3.2 肿瘤生长相关

IL-6 是一种重要的细胞因子, 可由淋巴样和某些非淋巴样细胞产生, 如 T 淋巴细胞、巨噬细胞, 与细胞的增殖、分化和成熟有关。IL-6 通过激活信号通路、刺激 EMT 和诱导血管生成等促进肿瘤的生长、转移和侵袭(图 2)。Pradhan 等^[104]在 CAFs 和口腔癌细胞共同培养后, 发现 TSCs 标志物 CD133 和 ALDH-1 的表达明显增加, ELISA、免疫荧光法和 Western blotting 分析发现 TSCs 的内源性 CXCL-12 和 IL-6 水平明显提高, 同时和对照组相比, 血管生成、增殖、侵袭能力均发生增强, 这进一步证实了细胞因子可以促进 TSCs 干性并诱导 TSCs 的形成。

3.3.3 血管生成相关

血管生成是维持微环境的重要组成部分, 也在免疫逃避、过度增殖、转移和治疗耐药中发挥核心作用。干细胞通过血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管生成素-2 (angiopoietin-2, Ang-2)、TGF- β 1、IL-6 和白介素-8 (interleukin, IL-8) 等因子启动血管的生成, 而血管生成拟态也受干性途径的调控(图 2)。Zhao 等^[105]用 VEGF 处理细胞, 发现 VEGF 增加了 HER2 TNBC MDA-MB-231 的乳腺球形成和 ALDH1 活性, 肿瘤起始细胞的丰度和肿瘤转移潜能。进一步探究发现, VEGF 通过快速刺激 VEGFR-2/JAK2/STAT3 结合, 激活 STAT3 结合 Myc 和 SOX2 启动子并诱导其表达。这 3 个转录因子一旦上调, 就会促进其他转录因子的持续

激活, 从而形成一个前馈激活回路, 驱动自我更新程序。因此, VEGF 不仅有血管生成作用, 还通过 VEGFR-2/STAT3 信号通路促进肿瘤起始细胞自我更新。

3.3.4 细胞外基质

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)作为 TME 的核心成分, 通过影响血管生成和细胞硬度来调节 TSCs 的分化^[106](图 2)。

Biondani 等^[107]通过使用由 100% matrigel (一种富含层状蛋白的基底膜提取物, 代表肿瘤发展初期的基质微环境)组成的基质, 加上增加 I 型胶原蛋白浓度至 100% 的 I 型胶原蛋白, 生成了一系列 3D 有机型培养平台来探究 ECM 如何调控胰腺癌 TSCs 的动态。利用这些培养平台, 其发现在早期肿瘤 ECM 上生长时, TSCs 致力于通过分泌高水平的促血管生成/生长因子来激活其生长程序, 并将其组装成 VEGF/vegfr2 介导的血管拟态网络, 最终转分化为内皮样网络。同时, 在使用 matrigel 时, 分化程度更高的肿瘤细胞群的生长速度有所降低, 而由 TSCs 高度分泌的 VEGFR-2 刺激肿瘤产生高的侵袭能力。但 ECM 硬度的区分对 TSCs 影响尚未有定论, 因此本文不作赘述。

4 TSCs 迁移/转移/EMT

EMT 通过下调 E-钙黏蛋白(E-cadherin)和上调波形蛋白(vimentin)、腺苷酸酰化酶(fibronectin)使细胞获得间充质特性。E-cadherin 是上皮细胞表型的关键标志, 是一种跨膜蛋白, 负责将相邻细胞相互锚定并形成粘连, 其细胞质成分通过 α -和 β -连环蛋白与肌动蛋白细胞骨架相连。Snail、Zeb 和 Twist 是众所周知的 E-cadherin 抑制物, 它们通过以高甲基化和组蛋白去乙酰化的形式诱导 E-cadherin 启动子的表观遗传沉默来发挥作用。Vimentin 是一种中间丝蛋白质,

是间充质细胞区别于上皮细胞的标志物,影响细胞与细胞以及细胞与 ECM 之间的黏附。EMT 通过下调 E-cadherin 和上调 vimentin 使细胞的运动和侵袭能力增强,从而促进 TSCs 的转移和侵袭,同时刺激肿瘤细胞获得干性,使 TSCs 自我更新等特性增强^[108](图 3)。

4.1 Wnt/ β -catenin 信号通路

Tang 等^[109]通过微阵列对 80 对乳腺癌组织和癌旁正常组织及 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 的 BCSCs 球形细胞中 LncCCAT1 的表达水平进行了分析,发现 LncCCAT1 在乳腺癌组织和 BCSCs 中高度表达。CCK-8 和 EdU 检测表明,过表达 LncCCAT1 显著促进贴壁细胞增殖。流式细胞仪分析表明,LncCCAT1 过表达增加了贴壁细胞中 BCSCs 的比例。成球实验表明,LncCCAT1 过表达显著提高了乳腺癌细胞的成球效率。Transwell 实验表明,在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中,LncCCAT1 过表达促进细胞迁移和侵袭。机制研究表明,LncCCAT1 通过竞争性结合 miR-204/211 增强 TCF4 水平,并通过与 miR-148a/152 和 ANXA2 相互作用促进 β -catenin 核易位,导致 Wnt/ β -catenin 信号转导、EMT 和 LncCCAT1 转录的激活,从而促进

BCSCs 的自我更新、转移和侵袭。

4.2 TGF- β 信号通路

死亡关联蛋白激酶 1 (death associated protein kinase 1, DAPK1) 已经被证明参与多种肿瘤的发生。有研究表明,在结肠癌组织中 DAPK1 的表达被显著抑制,Yuan 等^[110]通过 Western blotting 实验发现正常结肠黏膜上皮细胞 NCM460 中 DAPK1 的表达量均高于绝大多数结肠癌细胞(SW480、SW620)。功能实验表明,DAPK1 表达下调显著提高了 SW480 和 DLD1 的成球能力;在化疗药物(氟尿嘧啶、顺铂和阿霉素)治疗后,更多的 sh-DAPK1 细胞存活;下调 DAPK1 的表达后,两株细胞的凋亡率均显著降低;同时下调 DAPK1 显著抑制了上皮标志物 E-cadherin 和 Zo-1 的表达,并在蛋白水平和 mRNA 水平上增强了间质标志物 N-cadherin 的表达,可显著促进 SW480 和 DLD1 细胞在 Transwell 和伤口愈合实验中的迁移。进行机制分析后发现下调 DAPK1 后,TGF- β 1 和 TGF- β 受体 ACVR2A 的表达均上调,ACVR2A 诱导 Smad2 表达的上调从而激活 TGF- β 信号通路;同时 Wnt 受体的表达也上调从而激活 Wnt 信号通路。TGF- β 和 Wnt 信号通路的激活促进了 Zeb1 在细胞中的表

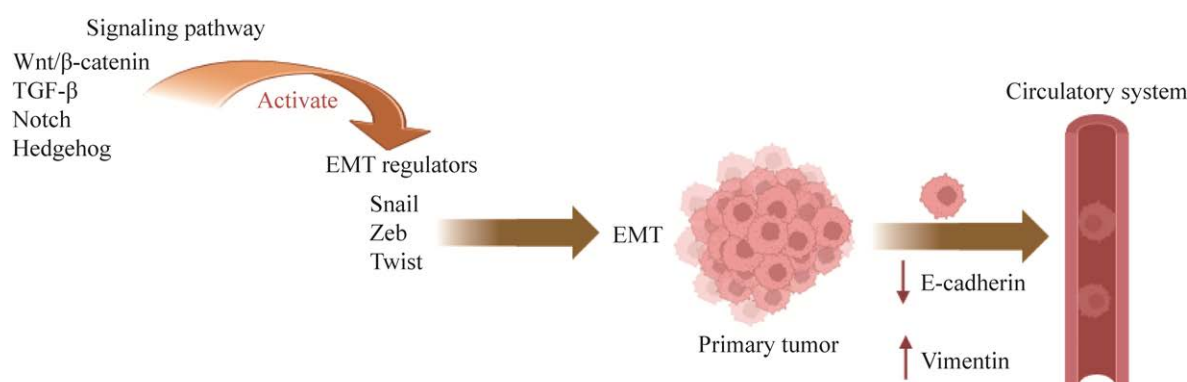


图 3 信号通路导致上皮向间充质转变

Figure 3 Signal pathways lead to epithelial to mesenchymal transition. EMT: Epithelial mesenchymal transition.

达,促进了结肠癌的 EMT 进展、TSCs 化疗耐药性和干性。

4.3 Notch 信号通路

Jing 等^[11]通过研究 Oncomine 数据库中 EMT 和 TSCs 相关标记物的表达发现肝癌 TSCs 典型表面标志物 Slug 和 TSCs 表面标志物 (CD44、CD90 和 EpCAM mRNA 水平在肝癌组织中均高于正常组织;按 EpCAM 分组,与阴性组相比,EpCAM 阳性组缺氧相关因子 HIF-1 α 丰富;进一步验证肝癌细胞中 EMT 与 TSCs 的关系发现过表达的 HIF-1 α 诱导的 EMT 表现为 E-cadherin 减少、N-cadherin 和 Slug 增加;Western blotting 检测结果表明,过表达 HIF-1 α 可以诱导 TSCs 相关表面标记物 CD44、CD90 和 EpCAM 的表达,以及 TSCs 相关转录因子 OCT4、Bmi1 和 Nanog 的表达。当 EMT 被 Slug-siRNA 转染灭活时,HIF-1 α 对 TSCs 相关蛋白的诱导作用被削弱;球体形成和集落形成实验发现过表达 HIF-1 α 的细胞表现出更强的球形形成能力,同时也促进了细胞中更强的群体形成能力;在 Transwell 实验和创面愈合实验中,HIF-1 α 过表达促进了细胞的迁移和侵袭;进行机制研究发现 HIF-1 α 通过与 Notch 细胞内结构域直接相互作用激活 Notch1 信号通路促进肝癌 TSCs 的 EMT 过程和干性特征的维持。

4.4 Hedgehog 信号通路

吸烟是一个常见的致癌因素,Sun 等^[12]首先将 UM-UC3 和 EJ 膀胱癌细胞在无血清培养基后形成肿瘤球,肿瘤球中膀胱癌 TSCs 标志物 CD44、CD133、ALDH1A1、OCT4 和 NANOG 表达水平显著上调;流式细胞术分析发现,球形细胞中 CD44 阳性细胞比例增加,以上结果显示了 UM-UC3 和 EJ 细胞的 TSCs 特点;然后研究人员用不同浓度的香烟提取物(cigarette smoke

extract, CSE)处理 UM-UC3 和 EJ 肿瘤球 7 d,数据表明 CSE 处理后肿瘤球的大小和数量增加,膀胱 TSCs 标志物表达水平也明显升高,免疫荧光染色也显示 CSE 增加了 CD44 阳性球形细胞的比例,呈剂量依赖性,且流式细胞术分析显示,CSE 增加了这些球形细胞中 CD44 阳性细胞的百分比。Transwell 和 Western blotting 实验分析表明 CSE 处理可显著增加膀胱癌 TSCs 侵袭能力,上皮细胞标志物 E-cadherin 和 Zo-1 蛋白表达降低,而间质细胞标志物 vimentin 和 N-cadherin 蛋白表达升高;机制分析发现,CSE 治疗增加了 Shh、Smo、Gli1 和 Gli2 在 UM-UC-3 和 EJ 肿瘤球形形成细胞中的表达,即 CSE 通过激活 Hedgehog 信号通路促进了膀胱癌 TSCs 的干性和 EMT。

5 TSCs 代谢特点

5.1 糖酵解

糖酵解是所有生物体进行葡萄糖分解代谢所必须经历的共同阶段(图 4)。在 TSCs 中,有着比分化的肿瘤细胞更高的葡萄糖摄取、糖酵解酶的表达、乳酸的生成以及 ATP 含量显著增加,还有较低的活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平来维持 TSCs 稳态。

细胞黏附分子 CD44v10 与肿瘤浸润和恶性相关。Guo 等^[13]通过免疫组化分析发现 CD44v10 在 4 种人乳腺癌细胞株(MDA-MB-468、MDA-MB-231、Hs578t 和 BT-549)中的表达高于人正常乳腺上皮细胞(MCF 10A),并对 CD44v10 的 BT-549 细胞转录组谱进行 RNA 测序和功能注释发现 CD44v10 过表达细胞中糖酵解相关基因上调。功能研究表明 CD44v10 的异位表达增加了葡萄糖消耗和乳酸分泌,并降低了细胞内 ROS 水平,显著增加了 TNBC 细胞球体的形成。在机制上,CD44v10 通过上调葡萄

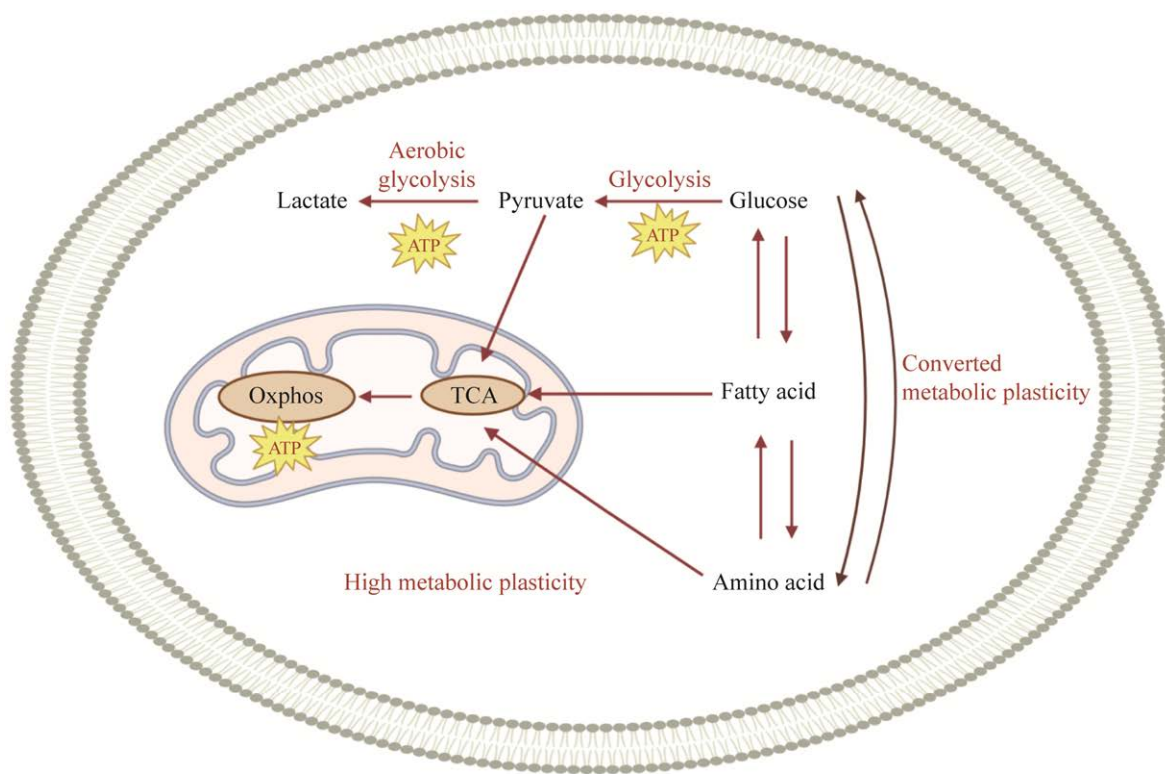


图4 肿瘤干细胞主要代谢途径

Figure 4 Main metabolic pathways of tumor stem cell. TCA: Tricarboxylic acid cycle.

糖摄取的关键限速因子 GLUT1 的表达促进糖酵解,从而促进 TNBC 中 TSCs 的自我更新。

肿瘤相关的 HectH9 是一种新型葡萄糖调节剂。Lee 等^[114]发现 HectH9 在前列腺癌细胞中受低氧条件的刺激而表达上调。功能研究表明, HectH9 的缺失增加了 ROS 的产生,降低了肿瘤球的数量和大小。分析机制发现 HectH9 和己糖激酶 2 (hexokinase, HK2)存在内源性相互作用, HectH9 作为 HK2 的 E3 连接酶促进 HK2 的泛素化,调控 HK2 的线粒体定位,线粒体结合的 HK2 与 ATP 辅因子协同作用,催化葡萄糖磷酸化并启动糖酵解。综上所述, HectH9/HK2 通路通过调控肿瘤细胞代谢进而调控 TSCs 的自我更新。

5.2 氧化磷酸化

氧化磷酸化在 TSCs 代谢中发挥着至关重

要的作用(图 4)。偏向于氧化磷酸化的 TSCs 有着更低的葡萄糖消耗速率和乳酸生成速率,产能速率也较慢,但可以产生更多的 ATP,也有更高的线粒体质量。

实体瘤供氧不均导致缺氧区和常氧区。缺氧细胞分泌乳酸增加,形成酸性 TME,这种酸性 TME 与肿瘤转移呈正相关。Liu 等^[115]对不同分期结肠癌患者肿瘤标本中常氧 TSCs 进行定量分析发现常氧性 TSCs 与结肠癌的发展和转移呈正相关。体外实验结果表明,在乳酸的作用下,常氧 TSCs 的侵袭和转移能力增强。体内实验结果表明,与对照组预处理细胞的小鼠相比,乳酸预处理细胞形成了更多的转移灶。同时进行免疫荧光和免疫印迹分析结果表明,用乳酸处理后,常氧 TSCs 中上皮标志物 E-cadherin 表达减少,间充质标志物 vimentin 表

达增加。代谢分析表明,经乳酸处理后,常氧 TSCs 的氧化磷酸化活性增强,而低氧 TSCs 几乎没有改变。在分子水平上,乳酸氧化的主要调节因子 PGC-1 α 在常氧 TSCs 中的表达增高。此外,PGC-1 α 基因敲除可显著降低常氧 TSCs 的转移潜能。综上所述,在结肠癌常氧 TSCs 中,PGC-1 α 协同乳酸氧化促进 OXPHOS 过程,促进了常氧 TSCs 的转移和侵袭。

5.3 代谢适应

TSCs 具有广泛的代谢适应性,在其生存过程中主要依赖糖酵解还是氧化磷酸化是不确定的。不同亚群的 TSCs 代谢模式有所不同,而代谢的改变依赖于多种因素,例如癌基因、抑癌基因、低氧微环境、mtRNA 突变、遗传因素和增殖速率等的改变^[116]。Liu 等^[117]通过免疫荧光检测发现,BCSCs 以不同的间充质样和上皮样状态存在,间充质样 TSCs 比上皮样 TSCs 更依赖糖酵解。代谢适应能使 TSCs 在生长过程中更好地适应环境的改变,有利于其生存、这些代谢改变可能是 TSCs 高增殖、侵袭性和耐药的原因。

5.4 脂代谢

近年来,随着对 TSCs 代谢的深入研究,发现 TSCs 中的脂肪酸代谢也非常活跃(图 4)。主要表现在脂肪酸从头合成异常活跃,提高胞内脂肪酸(fatty acid, FA)合成和胆固醇的合成来供能;FA 的 β 氧化也会增强来提高能量利用率。

Liu 等^[118]利用生物信息学分析在乳腺癌 TSCs 中发现了一种新的与代谢相关的 *LncRNA*, 被称为 LncROPm (磷脂代谢调控因子),同时 RNA 荧光原位杂交和细胞分离实验均显示 LncPOM 主要存在于乳腺癌 TSCs 的细胞质中;在乳腺癌 TSCs 中敲低 LncROPm 显著降低了干性相关基因(*SOX2*、*NANOG*、*OCT4* 和 *KIF4*)的表达,减小了形成球体的大小,并降低了连续

传代过程中的自我更新能力;而 LncPOM 在非乳腺癌 TSCs 中的过表达显著促进了 TSCs 相关基因的表达,增加了肿瘤球形成的大小和形成效率;生物信息学分析和 qRT-PCR 实验发现了 PLA2G16 是 LncPOM 的潜在靶基因,LncROPm 通过直接结合 PLA2G16 的 3'-UTR 来调节 PLA2G16 的表达,增加 mRNA 的稳定性,增加的 PLA2G16 促进 BCSCs 的磷脂代谢和游离脂肪酸(尤其是花生四烯酸)的产生,从而激活 PI3K/AKT、Wnt/ β -catenin 和 Hippo/YAP 信号通路,最终参与乳腺癌 TSCs 的维持。重要的是,LncROPm 和 PLA2G16 显著促进了 BCSCs 的化疗耐药。

5.5 氨基酸代谢

氨基酸除了作为蛋白质的组成部分外,还作为中间代谢物参与许多生物合成途径(图 4)。氨基酸代谢则是 TSCs 中的另一种代谢途径。TSCs 中存在必需氨基酸代谢,例如赖氨酸,而非必需氨基酸也可能作为必需氨基酸来满足异常增殖的需要,例如谷氨酰胺。

Ghanbari Movahed 等^[119]在球形诱导条件下培养 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞,两株细胞在 24–48 h 均形成球形;用阿霉素来处理球形细胞和单层细胞,球形细胞比单层细胞对药物治疗更耐药;流式细胞术评估球形细胞和单层细胞 CD44 和 CD24 亚群,CD44⁺CD24⁻ MCF-7 球形细胞和单层细胞分别占细胞总数的 50%和 14.1%,CD44⁺CD24⁻ MDA-MB-231 球形细胞和单层细胞分别占细胞总数的 90.7%和 47.6%;qRT-PCR 检测结果表明 MCF-7 和 MDA-MB-231 球体中两种干细胞标记物的基因表达显著升高(MCF-7 中 NANOG: 5.8 倍和 OCT4: 4.2 倍,MDA-MB-231 中 NANOG: 3.2 倍和 OCT4: 2.2 倍);以上这些结果说明 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞具有 TSCs 的特征;接下来利用高效

液相色谱法研究 MCF-7 和 MDA-MB-231 球形培养基中的氨基酸图谱的改变, 在分析的 20 种不同氨基酸中, 有 19 种氨基酸在两种细胞系的球形形成过程中减少。结果表明, MCF-7 球形培养基中谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸和赖氨酸的含量显著降低。MDA-MB-231 球形细胞培养液中甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸含量明显降低, 丝氨酸含量无明显升高。此外, MCF-7 和 MDA-MB-231 中只有一种氨基酸(组氨酸和丝氨酸)增加, 但不显著; 这些发现表明, 在 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞系中氨基酸通过氨基酸代谢在维持 TSCs 干性过程中发挥作用。

6 总结与展望

大量研究表明, TSCs 广泛存在于不同类型的肿瘤中, 是多种肿瘤潜在的治疗靶点, 为肿瘤的治疗提供了新的指征和方向。虽然大多数肿瘤细胞可以通过放疗和化疗被清除, 但关键的致瘤性 TSCs 存活下来, 使它们能够诱导肿瘤复发和转移。因此, 全面、清晰地了解 TSCs 的生物学特点和干性维持机制是开发肿瘤治疗方法的必要条件。本文介绍了 TSCs, 总结了 TSCs 的表面标志物类型, 并讨论了调控 TSCs 自我更新、EMT 的主要途径, 对 TSCs 独特的代谢机制进行了阐述。

对 TSCs 表面标志物进行研究, 能更准确地筛选分离 TSCs, 建立 TSCs 模型, 从而研究其分子机制。TSCs 中信号通路的异常、特殊的微环境和代谢重编程都能促进肿瘤的发生、发展、转移和复发。因此, 通过靶向 TSCs 相关信号通路、调控 TSCs 微环境以及靶向 TSCs 代谢弱点可以达到肿瘤靶向治疗的目的, 有望为肿瘤治疗带来新希望。

然而, 对 TSCs 的研究还处于起步阶段, 还有许多问题亟须解决。

首先, TSCs 的分离是 TSCs 研究的一大瓶颈。目前分离 TSCs 的方法主要是利用其表面标志物, 但是只有少数特异性 TSCs 的细胞表面标志物被识别和验证, 且很多都是与正常干细胞所共有的。所以需要进一步研究发现与正常干细胞不同的特异性表面标志物。例如 Lin 等^[120]通过免疫荧光、免疫磁分离法等发现分离了食管癌干细胞(esophageal cancer stem cells, ECSCs) CD14⁺细胞。后续研究中研究人员进行了增殖、迁移、侵袭和致瘤性分析, 一系列结果表明原代 CD14⁺细胞具有 CSCs 特征, 作为 ECSC 的新型表面标记物具有潜在实用性。只有一种表面标志物可能不足以识别 TSCs。因此, 可以采用多种表面标志物用于分选。例如笔者团队^[73]联合应用 BCMab1 抗体和 CD44 抗体, 精准地分离出了 BCSCs (BCMab1⁺CD44⁺亚群)。

其次, 肿瘤具有异质性, 而近年来有研究表明 TSCs 是导致异质性的主要原因。肿瘤内部各组分间互相作用, 一方面可引起不同代谢表型改变, 另一方面可改变 TME 异质性; 同时, 微环境对肿瘤细胞的压力可使其内部组分发生适应性改变。此外, 肿瘤内细胞信号通路的异常激活或抑制也是导致 TSCs 异质性的因素^[14]。然而对于肿瘤内部空间结构的揭示尚不完全; 对肿瘤内部变化进行动态、整体的检测仍存在技术方面的限制; 再者, 目前尚缺乏深入探索肿瘤异质性和动态演进过程的动物模型。以上原因导致对 TSCs 异质性揭示的过程中仍有诸多挑战。今后可以利用单细胞测序与新开发的计算工具相结合, 可以更精准地揭示肿瘤演化, 并阐明遗传和表观遗传 TSCs 异质性的潜在分子机制; 应寻找 TSCs 异质性形成的共同机制,

寻找具有共性的调控分子,以阻断肿瘤异质性的形成和演进(如 APOBEC 抑制剂可从肿瘤信号通路上游抑制肿瘤突变的形成进而抑制肿瘤异质性克隆的形成);同时,进一步阐明维持肿瘤异质性的细胞间互相作用的分子机制^[121]。

对 TSCs 领域进一步研究有望解决这些问题,并最终在肿瘤靶向治疗中发挥重要作用。然而,针对单个分子或途径可能不会带来最有效的肿瘤治疗效果。因此,通过组合治疗方法,例如利用纳米材料靶向 TSCs 与化疗/放疗/免疫治疗相结合可以达到更好的治疗效果。

REFERENCES

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] 刘宗超,李哲轩,张阳,周彤,张婧莹,游伟程,潘凯枫,李文庆. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
LIU ZC, LI ZX, ZHANG Y, ZHOU T, ZHANG JY, YOU WC, PAN KF, LI WQ. Interpretation of the 2020 global cancer statistical report[J]. Electronic Journal of Comprehensive Tumor Therapy, 2021, 7(2): 1-14 (in Chinese).
- [3] XIA CF, DONG XS, LI H, CAO MM, SUN DQ, HE SY, YANG F, YAN XX, ZHANG SL, LI N, CHEN WQ. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chinese Medical Journal, 2022, 135(5): 584-590.
- [4] 修一冉,马秀梅. 肿瘤干细胞标志物研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(A5): 69-71, 3.
XIU YR, MA XM. Research progress on tumor stem cell biomarkers[J]. World's Latest Medical Information Digest, 2018, 18(A5): 69-71, 3 (in Chinese).
- [5] YANG LQ, SHI PF, ZHAO GC, XU J, PENG W, ZHANG JY, ZHANG GH, WANG XW, DONG Z, CHEN F, CUI HJ. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, 5: 8.
- [6] 沈文姝,韩秋菊,张建. 免疫微环境对肿瘤干细胞影响研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2019, 46(7): 654-662.
SHEN WS, HAN QJ, ZHANG J. Research progress on the impact of immune microenvironment on tumor stem cells[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2019, 46(7): 654-662 (in Chinese).
- [7] LAMBERT AW, WEINBERG RA. Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells[J]. Nature Reviews Cancer, 2021, 21(5): 325-338.
- [8] ZHANG Y, WEINBERG RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities[J]. Frontiers of Medicine, 2018, 12(4): 361-373.
- [9] 郑诗凡,马皎. 肿瘤干细胞代谢在肿瘤发展中作用的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2022, 42(6): 825-832.
ZHENG SF, MA J. Research progress on the role of tumor stem cell metabolism in tumor development[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Edition), 2022, 42(6): 825-832 (in Chinese).
- [10] WARBURG O, WIND F, NEGELEIN E. The metabolism of tumors in the body[J]. The Journal of General Physiology, 1927, 8(6): 519-530.
- [11] HSU PP, SABATINI DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond[J]. Cell, 2008, 134(5): 703-707.
- [12] ERKISA M, KARAKAS D, ULUKAYA E. Cancerstem cells: root of the evil[J]. Critical Reviews in Oncogenesis, 2019, 24(1): 69-87.
- [13] 邢正操,樊秋菊,吴宏梅. 肿瘤干细胞的代谢[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(9): 1041-1047.
XING ZC, FAN QJ, WU HM. Metabolism of tumor stem cells[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 36(9): 1041-1047 (in Chinese).
- [14] NAZ F, SHI MR, SAJID S, YANG Z, YU CY. Cancer stem cells: a major culprit of intra-tumor heterogeneity[J]. American Journal of Cancer Research, 2021, 11(12): 5782-5811.
- [15] AL-HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A, MORRISON SJ, CLARKE MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(7): 3983-3988.

- [16] LIUPP, LIAO J, TANG ZJ, WU WJ, YANG J, ZENG ZL, HU Y, WANG P, JU HQ, XU RH, HUANG P. Metabolic regulation of cancer cell side population by glucose through activation of the Akt pathway[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2014, 21(1): 124-135.
- [17] LI CW, LEE CJ, SIMEONE DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells[M]//Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2009: 161-173.
- [18] COLLINS AT, BERRY PA, HYDE C, STOWER MJ, MAITLAND NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(23): 10946-10951.
- [19] SINGHSK, CLARKE ID, TERASAKI M, BONN VE, HAWKINS C, SQUIRE J, DIRKS PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. *Cancer Research*, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [20] LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J, MURDOCH B, HOANG T, CACERES-CORTES J, MINDEN M, PATERSON B, CALIGIURI MA, DICK JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice[J]. *Nature*, 1994, 367(6464): 645-648.
- [21] UCKUN FM, SATHER H, REAMAN G, SHUSTER J, LAND V, TRIGG M, GUNTHER R, CHELSTROM L, BLEYER A, GAYNON P. Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 1995, 85(4): 873-878.
- [22] PARK SC, ZENG CJ, TSCHUDY-SENEY B, NGUYEN NT, EUN JR, ZHANG YL, RAMSAMOOJ R, ZHANG YH, ZHAO M, THEISE ND, ZHOU HJ, ZERN MA, DUAN YY. Clonogenically culturing and expanding CD34⁺ liver cancer stem cells *in vitro*[J]. *Stem Cells and Development*, 2015, 24(13): 1506-1514.
- [23] LUO WW, ZHANG DY, MA SM, WANG CY, ZHANG Q, WANG HF, HE KY, LIU ZX. MiR-27a is highly expressed in H1650 cancer stem cells and regulates proliferation, migration, and invasion[J]. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2018, 14 (supplement): S1004-S1011.
- [24] PARK SC, NGUYEN NT, EUN JR, ZHANG YL, JUNG YJ, TSCHUDY-SENEY B, TROTSYUK A, LAM A, RAMSAMOOJ R, ZHANG YH, THEISE ND, ZERN MA, DUAN YY. Identification of cancer stem cell subpopulations of CD34⁺ PLC/PRF/5 that result in three types of human liver carcinomas[J]. *Stem Cells and Development*, 2015, 24(8): 1008-1021.
- [25] WEIGMANN A, CORBEIL D, HELLWIG A, HUTTNER WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(23): 12425-12430.
- [26] XU Z. CD133⁺ cancer stem cells in lung cancer[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2013, 18(2): 447.
- [27] ZHOU F, MU YD, LIANG J, LIU ZX, CHEN HS, ZHANG JF. Expression and prognostic value of tumor stem cell markers ALDH1 and CD133 in colorectal carcinoma[J]. *Oncology Letters*, 2014, 7(2): 507-512.
- [28] TREROTOLA M, RATHORE S, LAL GOEL H, LI J, ALBERTI S, PIANTELLI M, ADAMS D, JIANG Z, LANGUINO LR. CD133, Trop-2 and alpha2beta1 integrin surface receptors as markers of putative human prostate cancer stem cells[J]. *American Journal of Translational Research*, 2010, 2(2): 135-144.
- [29] PIAO LS, HUR W, KIM TK, HONG SW, KIM SW, CHOI JE, SUNG PS, SONG MJ, LEE BC, HWANG D, YOON SK. CD133⁺ liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Letters*, 2012, 315(2): 129-137.
- [30] NOMURA A, BANERJEE S, CHUGH R, DUDEJA V, YAMAMOTO M, VICKERS SM, SALUJA AK. CD133 initiates tumors, induces epithelial-mesenchymal transition and increases metastasis in pancreatic cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 8313-8322.
- [31] FLOREK M, HAASE M, MARZESCO AM, FREUND D, EHNINGER G, HUTTNER WB, CORBEIL D. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer[J]. *Cell and Tissue Research*, 2005, 319(1): 15-26.
- [32] MERSAKOVA S, JANIKOVA K, KALMAN M, MARCINEK J, GRENDAR M, VOJTKO M, KYCINA R, PINDURA M, JANIK J, MIKOLAJCIK P, GABONOVA E, LACA L, MEJSTRIKOVA E, HALASOVA E, STRNADEL J, LASABOVA Z. Cancer stem cell marker expression and methylation status in patients with colorectal cancer[J]. *Oncology Letters*,

- 2022, 24: 231.
- [33] LI C, WU S, YANG Z, ZHANG XL, ZHENG Q, LIN L, NIU ZX, LI RQ, CAI ZM, LI L. Single-cell exome sequencing identifies mutations in KCP, LOC440040, and LOC440563 as drivers in renal cell carcinoma stem cells[J]. *Cell Research*, 2017, 27(4): 590-593.
- [34] ZHENG Y, WANG L, YIN LM, YAO ZR, TONG RZ, XUE JX, LU Y. Lung cancer stem cell markers as therapeutic targets: an update on signaling pathways and therapies[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 873994.
- [35] UNDERHILL CB, THURN AL, LACY BE. Characterization and identification of the hyaluronate binding site from membranes of SV-3T3 cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(13): 8128-8133.
- [36] RICARDO S, VIEIRA AF, GERHARD R, LEITAO D, PINTO R, CAMESELLE-TEIJEIRO JF, MILANEZI F, SCHMITT F, PAREDES J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2011, 64(11): 937-946.
- [37] ZHANG CY, WANG H, WANG X, ZHAO CL, WANG HY. CD44, a marker of cancer stem cells, is positively correlated with PD-L1 expression and immune cells infiltration in lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Cell International*, 2020, 20(1): 1-8.
- [38] OZAWA M, ICHIKAWA Y, ZHENG YW, OSHIMA T, MIYATA H, NAKAZAWA K, GUAN HB, SHIOZAWA M, AKAIKE M, WATANABE K, OTA M, FUJII S, KUNISAKI C, ISHIKAWA T, TANAKA K, AKIYAMA H, ENDO I, TANIGUCHI H. Prognostic significance of CD44 variant 2 upregulation in colorectal cancer[J]. *British Journal of Cancer*, 2014, 111(2): 365-374.
- [39] KALANTARI E, ASGARI M, NIKPANAH S, SALARIEH N, LARI MHA, MADJD Z. Co-expression of putative cancer stem cell markers CD44 and CD133 in prostate carcinomas[J]. *Pathology & Oncology Research*, 2017, 23(4): 793-802.
- [40] ASAI R, TSUCHIYA H, AMISAKI M, MAKIMOTO K, TAKENAGA A, SAKABE T, HOI S, KOYAMA S, SHIOTA G. CD44 standard isoform is involved in maintenance of cancer stem cells of a hepatocellular carcinoma cell line[J]. *Cancer Medicine*, 2019, 8(2): 773-782.
- [41] SKODA J, HERMANOVA M, LOJA T, NEMEC P, NERADIL J, KARASEK P, VESELSKA R. Co-expression of cancer stem cell markers corresponds to a pro-tumorigenic expression profile in pancreatic adenocarcinoma[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159255.
- [42] KIM J, CHOI KW, LEE J, LEE J, LEE S, SUN RJ, KIM J. Wnt/ β -catenin signaling inhibitors suppress the tumor-initiating properties of a CD44⁺CD133⁺ subpopulation of Caco-2 cells[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(7): 1644-1659.
- [43] YANG Z, LI C, FAN ZS, LIU HJ, ZHANG XL, CAI ZM, XU LQ, LUO J, HUANG Y, HE LY, LIU CX, WU S. Single-cell sequencing reveals variants in ARID1A, GPRC5A and MLL2 driving self-renewal of human bladder cancer stem cells[J]. *European Urology*, 2017, 71(1): 8-12.
- [44] HOFMAN FM, YANAGIHARA E, BYRNE B, BILLING R, BAIRD S, FRISMAN D, TAYLOR CR. Analysis of B-cell antigens in normal reactive lymphoid tissue using four B-cell monoclonal antibodies[J]. *Blood*, 1983, 62(4): 775-783.
- [45] de BEÇA FF, CAETANO P, GERHARD R, ALVARENGA CA, GOMES M, PAREDES J, SCHMITT F. Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2013, 66(3): 187-191.
- [46] GÓMEZ-GALLEGOS AA, RAMÍREZ-VIDAL L, BECERRIL-RICO J, PÉREZ-ISLAS E, HERNANDEZ-PERALTA ZJ, TOLEDO-GUZMÁN ME, GARCÍA-CARRANCÁ A, LANGLEY E, HERNÁNDEZ-GUERRERO A, LÓPEZ-CASILLAS F, HERRERA-GOEPFERT R, OÑATE-OCAÑA LF, ORTIZ-SÁNCHEZ E. CD24⁺CD44⁺CD54⁺EpCAM⁺ gastric cancer stem cells predict tumor progression and metastasis: clinical and experimental evidence[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2023, 14(1): 1-16.
- [47] CHEN BD, HUI YF, ZHANG HB, FAN LF, SI MH, YANG GS. Expression of CD90/EpCAM/CD24 in hepatocellular carcinoma cell lines at various stages of differentiation[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2013, 21(9): 688-691.
- [48] OOKI A, van den BUSSCHE CJ, KATES M, HAHN NM, MATOSO A, McCONKEY DJ, BIVALACQUA TJ, HOQUE MO. CD24 regulates cancer stem cell (CSC)-like traits and a panel of CSC-related molecules serves as a non-invasive urinary biomarker for the

- detection of bladder cancer[J]. *British Journal of Cancer*, 2018, 119(8): 961-970.
- [49] OOKI A, del CARMEN RODRIGUEZ PENA M, MARCHIONNI L, DINALANKARA W, BEGUM A, HAHN NM, van den BUSSCHE CJ, RASHEED ZA, MAO SF, NETTO GJ, SIDRANSKY D, HOQUE MO. YAP1 and COX2 coordinately regulate urothelial cancer stem-like cells[J]. *Cancer Research*, 2018, 78(1): 168-181.
- [50] REIF AE, ALLEN JM. The akr thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1964, 120(3): 413-433.
- [51] THAKOLWIBOON S. Heterogeneity of the CD90⁺ population in different stages of hepatocarcinogenesis[J]. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 2014, 7(10): 296-302.
- [52] SHU X, LIU HQ, PAN YZ, SUN LC, YU L, SUN LX, YANG ZH, RAN YL. Distinct biological characterization of the CD44 and CD90 phenotypes of cancer stem cells in gastric cancer cell lines[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2019, 459(1/2): 35-47.
- [53] FELLER N, KELDER A, WESTRA G, OSSENKOPPELEGJ, SCHUURHUIS GJ. Positive selection for CD90 as a purging option in acute myeloid leukemia stem cell transplants[J]. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2008, 74B(1): 9-16.
- [54] LIU ZH, BAI MJ, LI JQ, YAN SH, YE XW, BU JG, CHEN CY. Correlation between inflammatory cytokines and liver cancer stem cell markers in DEN-induced liver cancer rats[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2021, 25(2): 710-721.
- [55] HERLYN D, HERLYN M, STEPLEWSKI Z, KOPROWSKI H. Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma[J]. *European Journal of Immunology*, 1979, 9(8): 657-659.
- [56] MASCIARE V, GRISENDI G, BANCHELLI F, D'AMICO R, MAIORANA A, SIGHINOLFI P, STEFANI A, MORANDI U, DOMINICI M, ARAMINI B. CD44⁺/EPCAM⁺ cells detect a subpopulation of ALDH^{high} cells in human non-small cell lung cancer: a chance for targeting cancer stem cells?[J]. *Oncotarget*, 2020, 11(17): 1545-1555.
- [57] HAN SS, ZONG SQ, SHI Q, LI HJ, LIU SS, YANG W, LI W, HOU FG. Is ep-CAM expression a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer? A systematic meta-analysis[J]. *EBioMedicine*, 2017, 20: 61-69.
- [58] KRAUSE J, FELDEN J, CASAR C, FRÜNDT TW, GALASKI J, SCHMIDT C, JUNG C, ITTRICH H, WEIDEMANN SA, KRECH T, HEUMANN A, LI J, FISCHER L, SAUTER G, LOHSE AW, WEGE H, SCHULZE K. Hepatocellular carcinoma: intratumoral EpCAM-positive cancer stem cell heterogeneity identifies high-risk tumor subtype[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 1-12.
- [59] ISHIWATA T, MATSUDA Y, YOSHIMURA H, SASAKI N, ISHIWATA S, ISHIKAWA N, TAKUBO K, ARAI T, AIDA J. Pancreatic cancer stem cells: features and detection methods[J]. *Pathology & Oncology Research*, 2018, 24(4): 797-805.
- [60] HWANG HS, YOO JE, HAN DH, CHOI JS, LEE JG, JOO DJ, KIM MS, KIM SI, CHOI GH, PARK YN. Circulating cancer stem cells expressing EpCAM/CD90 in hepatocellular carcinoma: a pilot study for predicting tumor recurrence after living donor liver transplantation[J]. *Gut and Liver*, 2022, 16(3): 443-455.
- [61] MEDERER T, ELSNER F, ROBOLD T, GROßER C, NEU R, RIED M, BLEICHER S, SCHAMBERGER T, BLOCHBERGER I, HOFMANN HS, KLEIN CA. EpCAM-positive disseminated cancer cells in bone marrow impact on survival of early-stage NSCLC patients[J]. *Lung Cancer*, 2022, 167: 73-77.
- [62] YANG YM, SANDERS AJ, DOU QP, JIANG DG, LI AX, JIANG WG. The clinical and theranostic values of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)/CD166 in human solid cancers[J]. *Cancers*, 2021, 13(20): 5187.
- [63] BOWEN MA, PATEL DD, LI X, MODRELL B, MALACKO AR, WANG WC, MARQUARDT H, NEUBAUER M, PESANDO JM, FRANCKE U. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1995, 181(6): 2213-2220.
- [64] EIASHMAWY NE, SALEM ML, ABD ELFATTAH EE, KHEDR EG. Targeting CD166⁺ lung cancer stem cells: molecular study using murine dendritic cell vaccine[J].

- Toxicology and Applied Pharmacology, 2021, 429: 115699.
- [65] HAN SS, YANG W, ZONG SQ, LI HJ, LIU SS, LI W, SHI Q, HOU FG. Clinicopathological, prognostic and predictive value of CD166 expression in colorectal cancer: a meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(38): 64373-64384.
- [66] NGUYEN PH, GIRAUD J, CHAMBONNIER L, DUBUS P, WITTKOP L, BELLEANNÉE G, COLLET D, SOUBEYRAN I, EVRARD S, ROUSSEAU B, SENANT-DUGOT N, MÉGRAUD F, MAZURIER F, VARON C. Characterization of biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma[J]. *Clinical Cancer Research*, 2017, 23(6): 1586-1597.
- [67] GUAN SS, WU CT, LIAO TZ, LUO TY, LIN KL, LIU SH. Indium-111-labeled CD166-targeted peptide as a potential nuclear imaging agent for detecting colorectal cancer stem-like cells in a xenograft mouse model[J]. *EJNMMI Research*, 2020, 10(1): 13.
- [68] NUSSE R, VARMUS HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome[J]. *Cell*, 1982, 31(1): 99-109.
- [69] NG L, KAUR P, BUNNAG N, SURESH J, SUNG I, TAN Q, GRUBER J, TOLWINSKI N. WNT signaling in disease[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 826.
- [70] HE YM, JIANG XL, DUAN LC, XIONG QX, YUAN YX, LIU PS, JIANG LP, SHEN QS, ZHAO S, YANG CP, CHEN YB. LncRNA PKMYT1AR promotes cancer stem cell maintenance in non-small cell lung cancer *via* activating Wnt signaling pathway[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 156.
- [71] NÜSSLEIN-VOLHARD C, WIESCHAUS E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*[J]. *Nature*, 1980, 287(5785): 795-801.
- [72] ZHENG X, ZENG W, GAI XH, XU QR, LI C, LIANG ZY, TUO H, LIU QG. Role of the hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma (review)[J]. *Oncology Reports*, 2013, 30(5): 2020-2026.
- [73] LI C, DU Y, YANG Z, HE LY, WANG YY, HAO L, DING MX, YAN RP, WANG JS, FAN ZS. GALNT1-mediated glycosylation and activation of sonic hedgehog signaling maintains the self-renewal and tumor-initiating capacity of bladder cancer stem cells[J]. *Cancer Research*, 2016, 76(5): 1273-1283.
- [74] WU JY, ZHU PP, LU TK, DU Y, WANG YY, HE LY, YE BQ, LIU BY, YANG LL, WANG J, GU Y, LAN J, HAO YJ, HE L, FAN ZS. The long non-coding RNA LncHDAC2 drives the self-renewal of liver cancer stem cells *via* activation of hedgehog signaling[J]. *Journal of Hepatology*, 2019, 70(5): 918-929.
- [75] ELLISEN LW, BIRD J, WEST DC, LEE SORENG A, REYNOLDS TC, SMITH SD, SKLAR J. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms[J]. *Cell*, 1991, 66(4): 649-661.
- [76] CLARA JA, MONGE C, YANG YZ, TAKEBE N. Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells—a clinical update[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2020, 17(4): 204-232.
- [77] LIU GH, ZHANG P, CHEN S, CHEN ZR, QIU YM, PENG P, HUANG WD, CHENG FL, ZHANG Y, LI H, XIAO QG, MAO F, WANG BF, JIANG XB, WAN F, GUO DS, YU XJ. FAM129A promotes self-renewal and maintains invasive status *via* stabilizing the notch intracellular domain in glioma stem cells[J]. *Neuro-Oncology*, 2023, 25(10): 1788-1801.
- [78] SCHMIERER B, HILL CS. TGFβ-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(12): 970-982.
- [79] ZHAOHD, WEI J, SUN J. Roles of TGF-β signaling pathway in tumor microenvironment and cancer therapy[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 89(Pt B): 107101.
- [80] WANG X, WANG J, TSUI YM, SHI CR, WANG Y, ZHANG X, YAN Q, CHEN M, JIANG C, YUAN YF, WONG CM, LIU M, FENG ZY, CHEN HL, NG IOL, JIANG LX, GUAN XY. RALYL increases hepatocellular carcinoma stemness by sustaining the mRNA stability of TGF-β2[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1518.
- [81] HUYNH J, ETEMADI N, HOLLANDE F, ERNST M, BUCHERT M. The JAK/STAT3 axis: a comprehensive drug target for solid malignancies[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2017, 45: 13-22.
- [82] NGUYEN PM, PUTOCZKI T, ERNST M. STAT3-activating cytokines: a therapeutic opportunity for inflammatory bowel disease?[J]. *Journal of*

- Interferon & Cytokine Research, 2015, 35: 340-350.
- [83] WANG TY, FAHRMANN JF, LEE H, LI YJ, TRIPATHI SC, YUE CY, ZHANG CY, LIFSHITZ V, SONG J, YUAN Y, SOMLO G, JANDIAL R, ANN D, HANASH S, JOVE R, YU H. JAK/STAT3-regulated fatty acid β -oxidation is critical for breast cancer stem cell self-renewal and chemoresistance[J]. Cell Metabolism, 2018, 27(1): 136-150.e5.
- [84] DONG C, WU Y, WANG Y, WANG C, KANG T, RYCHAHOU PG, CHI Y, EVERS BM, ZHOU BP. Interaction with Suv39H1 is critical for snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(11): 1351-1362.
- [85] YOKOYAMA Y, HIEDA M, NISHIOKA Y, MATSUMOTO A, HIGASHI S, KIMURA H, YAMAMOTO H, MORI M, MATSUURA S, MATSUURA N. Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility *in vitro* and drives tumor formation *in vivo*[J]. Cancer Science, 2013, 104(7): 889-895.
- [86] BULUT-KARSLIOGLU A, de la ROSA-VELÁZQUEZ IA, RAMIREZ F, BARENBOIM M, ONISHI-SEEBACHER M, ARAND J, GALÁN C, WINTER GE, ENGIST B, GERLE B, O'SULLIVAN RJ, MARTENS JHA, WALTER J, MANKE T, LACHNER M, JENUWEIN T. Suv39h-dependent H3K9me3 marks intact retrotransposons and silences LINE elements in mouse embryonic stem cells[J]. Molecular Cell, 2014, 55(2): 277-290.
- [87] YANG Z, HE LY, LIN KS, ZHANG Y, DENG AH, LIANG Y, LI C, WEN TY. The KMT1A-GATA3-STAT3 circuit is a novel self-renewal signaling of human bladder cancer stem cells[J]. Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2017, 23(21): 6673-6685.
- [88] DOLCET X, LLOBET D, PALLARES J, MATIAS-GUIU X. NF- κ B in development and progression of human cancer[J]. Virchows Archiv, 2005, 446(5): 475-482.
- [89] VAZQUEZ-SANTILLAN K, MELENDEZ-ZAJGLA J, JIMENEZ-HERNANDEZ L, MARTÍNEZ-RUIZ G, MALDONADO V. NF- κ B signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target?[J]. Cellular Oncology, 2015, 38(5): 327-339.
- [90] BISWAS PK, PARK SR, AN J, LIM KM, DAYEM AA, SONG K, CHOI HY, CHOI Y, PARK KS, SHIN HJ, KIM A, GIL M, SAHA SK, CHO SG. The orphan GPR50 receptor regulates the aggressiveness of breast cancer stem-like cells *via* targeting the NF- κ B signaling pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 2804.
- [91] LEON F, SESHACHARYULU P, NIMMAKAYALA RK, CHUGH S, KARMAKAR S, NALLASAMY P, VENGOJI R, RACHAGANI S, COX JL, MALLYA K, BATRA SK, PONNUSAMY MP. Reduction in O-glycome induces differentially glycosylated CD44 to promote stemness and metastasis in pancreatic cancer[J]. Oncogene, 2022, 41(1): 57-71.
- [92] PAN YY, YU YD, WANG XJ, ZHANG T. Tumor-associated macrophages in tumor immunity[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 583084.
- [93] WANG HC, HAUNG LY, WANG CJ, CHAO YJ, HOU YC, YEN CJ, SHAN YS. Tumor-associated macrophages promote resistance of hepatocellular carcinoma cells against sorafenib by activating CXCR2 signaling[J]. Journal of Biomedical Science, 2022, 29(1): 99.
- [94] LIAO ZH, TAN ZW, ZHU PC, TAN NS. Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment-accomplices in tumor malignancy[J]. Cellular Immunology, 2019, 343: 103729.
- [95] ZHAO ZX, ZHANG YQ, GUO EG, ZHANG Y, WANG YN. Periostin secreted from podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts promotes metastasis of gastric cancer by regulating cancer stem cells *via* AKT and YAP signaling pathway[J]. Molecular Carcinogenesis, 2023, 62(5): 685-699.
- [96] QUESENBERRY P. Stem cell reviews and reports: cancer stem cells and aging section[J]. Stem Cell Reviews and Reports, 2017, 13(1): 6.
- [97] YE CF, LI H, LI YC, ZHANG Y, LIU GH, MI HL, LI HL, XIAO QG, NIU L, YU XJ. Hypoxia-induced HMGB1 promotes glioma stem cells self-renewal and tumorigenicity *via* RAGE[J]. iScience, 2022, 25(9): 104872.
- [98] SCIOLI MG, TERRIACA S, FIORELLI E, STORTI G, FABBRI G, CERVELLI V, ORLANDI A. Extracellular vesicles and cancer stem cells in tumor progression: new therapeutic perspectives[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(19): 10572.
- [99] CHUNG WM, MOLONY RD, LEE YF. Non-stem

- bladder cancer cell-derived extracellular vesicles promote cancer stem cell survival in response to chemotherapy[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, 12(1): 1-12.
- [100] HAJIZADEH F, OKOYE I, ESMAILY M, GHASEMI CHALESHTARI M, MASJEDI A, AZIZI G, IRANDOUST M, GHALAMFARSA G, JADIDI-NIARAGH F. Hypoxia inducible factors in the tumor microenvironment as therapeutic targets of cancer stem cells[J]. *Life Sciences*, 2019, 237: 116952.
- [101] KO YS, RUGIRA T, JIN HN, JOO YN, KIM HJ. Radiotherapy-resistant breast cancer cells enhance tumor progression by enhancing premetastatic niche formation through the HIF-1 α -LOX axis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 8027.
- [102] GHOSH S, JUIN SK, BHATTACHARYYA MAJUMDAR S, MAJUMDAR S. Crucial role of glucosylceramide synthase in the regulation of stem cell-like cancer cells in B16F10 murine melanoma[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2021, 60(12): 840-858.
- [103] CLEMENTE-GONZÁLEZ C, CARNERO A. Role of the hypoxic-secretome in seed and soil metastatic preparation[J]. *Cancers*, 2022, 14(23): 5930.
- [104] PRADHAN R, PAUL S, DAS B, SINHA S, DASHSR, MANDAL M, KUNDU CN. Resveratrol nanoparticle attenuates metastasis and angiogenesis by deregulating inflammatory cytokines through inhibition of CAFs in oral cancer by CXCL-12/IL-6-dependent pathway[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2023, 113: 109257.
- [105] ZHAO D, PAN C, SUN J, GILBERT C, DREWS-ELGER K, AZZAM DJ, PICON-RUIZ M, KIM M, ULLMER W, EL-ASHRY D, CREIGHTON CJ, SLINGERLAND JM. VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2[J]. *Oncogene*, 2015, 34(24): 3107-3119.
- [106] BROWN Y, HUA SS, TANWAR PS. Extracellular matrix-mediated regulation of cancer stem cells and chemoresistance[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2019, 109: 90-104.
- [107] BIONDANI G, ZEEBERG K, GRECO MR, CANNONE S, DANDO I, DALLA POZZA E, MASTRODONATO M, FORCINITI S, CASAVOLA V, PALMIERI M, RESHKIN SJ, CARDONE RA. Extracellular matrix composition modulates PDAC parenchymal and stem cell plasticity and behavior through the secretome[J]. *The FEBS Journal*, 2018, 285(11): 2104-2124.
- [108] 郭华, 张宁. 上皮间充质转化与肿瘤干细胞的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(15): 941-945.
- GUO H, ZHANG N. Epithelial-mesenchymal transition and stemness of cancer cells[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2013, 40(15): 941-945 (in Chinese).
- [109] TANG TT, GUO CY, XIA TS, ZHANG R, ZEN K, PAN Y, JIN L. LncCCAT1 promotes breast cancer stem cell function through activating WNT/ β -catenin signaling[J]. *Theranostics*, 2019, 9(24): 7384-7402.
- [110] YUAN WZ, JI JT, SHU Y, CHEN JH, LIU SG, WU L, ZHOU ZL, LIU ZY, TANG Q, ZHANG XD, SHU XG. Downregulation of DAPK1 promotes the stemness of cancer stem cells and EMT process by activating ZEB1 in colorectal cancer[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2019, 97(1): 89-102.
- [111] JING L, RUANZP, SUN HF, LI Q, HAN LL, HUANG LX, YU SZ, WANG Y, GUO H, JIAO M. Epithelial-mesenchymal transition induced cancer-stem-cell-like characteristics in hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(10): 18448-18458.
- [112] SUN XC, SONG J, LI EL, GENG H, LI Y, YU DX, ZHONG CY. Cigarette smoke supports stemness and epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer stem cells through SHH signaling[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2020, 13(6): 1333-1348.
- [113] GUO Q, QIU YQ, LIU YW, HE YQ, ZHANG GL, DU Y, YANG CX, GAO F. Cell adhesion molecule CD44v10 promotes stem-like properties in triple-negative breast cancer cells via glucose transporter GLUT1-mediated glycolysis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(11): 102588.
- [114] LEE HJ, LI CF, RUAN DN, HE JB, MONTAL ED, LORENZ S, GERNUN GD, CHAN CH. Non-proteolytic ubiquitination of hexokinase 2 by HectH9 controls tumor metabolism and cancer stem cell expansion[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2625.
- [115] LIU S, ZHAO H, HU YB, YAN C, MI YL, LI XL, TAO DD, QIN JC. Lactate promotes metastasis of normoxic colorectal cancer stem cells through PGC-1 α -mediated

- oxidative phosphorylation[J]. *Cell Death & Disease*, 2022, 13: 651.
- [116] YADAV UP, SINGH T, KUMAR P, SHARMA P, KAUR H, SHARMA S, SINGH S, KUMAR S, MEHTA K. Metabolic adaptations in cancer stem cells[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 1010.
- [117] LIU SL, CONG Y, WANG D, SUN Y, DENG L, LIU YJ, MARTIN-TREVINO R, SHANG L, McDERMOTT SP, LANDIS MD, HONG S, ADAMS A, D'ANGELO R, GINESTIER C, CHARAFE-JAUFFRET E, CLOUTHIER SG, BIRNBAUM D, WONG ST, ZHAN M, CHANG JC, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts[J]. *Stem Cell Reports*, 2013, 2(1): 78-91.
- [118] LIU SQ, SUN Y, HOU YX, YANG LP, WAN XY, QIN YL, LIU YC, WANG R, ZHU PP, TENG Y, LIU MR. A novel lncRNA ROPM-mediated lipid metabolism governs breast cancer stem cell properties[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2021, 14(1): 178.
- [119] GHANBARI MOVAHED Z, MATIN MM, MANSOURI K, SISAKHTNEZHAD S. Amino acid profile changes during enrichment of spheroid cells with cancer stem cell properties in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines[J]. *Cancer Reports (Hoboken)*, 2023, 6(5): e1809.
- [120] LIN YG, DONG JJ, YU W, LI YF, LIU ZX, LIU JQ, WANG CJ, QIN J, ZHU LT, LIANG J. CD14, a novel surface marker of esophageal cancer stem cells[J]. *Oncology Reports*, 2022, 49: 13.
- [121] 白日兰, 崔久嵬. 肿瘤异质性-精准临床诊治的挑战[J]. *中国肿瘤临床*, 2020, 47(21): 1081-1087.
- BAI RL, CUI JW. Tumor heterogeneity-the challenge of precise clinical diagnosis and treatment[J]. *Chinese Clinical Oncology*, 2020, 47 (21): 1081-1087 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)