

癌症治疗新思路: 靶向肿瘤干细胞

刘佳, 马蕾娜, 王毅刚, 刘新垣, 钱其军*

浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;
中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;
第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438

* 联系人, E-mail: qianqj@sino-gene.cn

2007-09-21 收稿, 2008-03-31 接受

国家自然科学基金(批准号: 30730104)和浙江省科技支撑与引导计划(批准号: 2007C33027)资助项目

摘要 肿瘤干细胞(cancer stem cell/tumor-initiating cell, CSC/TIC)是肿瘤组织中具有很强增殖能力、表现部分干细胞特性的细胞亚群, 在肿瘤对放化疗抗性的产生和癌症的复发中起关键作用。目前用于靶向肿瘤干细胞的药物多为小分子抑制剂和融合蛋白。以溶瘤腺病毒为载体携带外源基因表达的新型治疗策略-病毒基因疗法, 在各种抗癌方案中展现出明显的优势, 对实体瘤表现出很好的疗效, 将其应用于靶向肿瘤干细胞的治疗具有良好的发展前景。根据肿瘤干细胞维持自身功能所依赖的分子机制, 人们制定了一系列行之有效的针对性治疗策略。本文就目前针对肿瘤干细胞的靶向性治疗的研究进展作一评述。

关键词
肿瘤干细胞
靶向
溶瘤腺病毒
策略

肿瘤干细胞(cancer stem cell/tumor-initiating cell, CSC/TIC)是肿瘤细胞群体中具有部分干细胞特性的细胞亚群, 其增殖能力明显强于同一肿瘤组织中的其他癌细胞, 在肿瘤的发生、发展和维持中起十分重要的作用, 而且在动物体内表现出很强的成瘤能力。Lapidot等人^[1]1994年报道急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)病人的血液中存在表型为CD34⁺CD38⁻的肿瘤干细胞亚群, 将其注入非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷型(nonobese diabetic/severe combined immune-deficient, NOD/SCID)小鼠体内可诱发白血病。Al-Hajj等人^[2]在2003年发现乳腺癌中也含有能够在NOD/SCID小鼠中成瘤的干细胞样的癌细胞群体。到目前为止, 人们相继在多种原发性肿瘤和癌细胞系中鉴定到肿瘤干细胞的存在(表1)。

肿瘤干细胞与增殖力较弱的非干细胞样肿瘤细胞相比表现出更强的形成肿瘤的能力。O'Brien等人^[3]从结肠癌中筛选到含有肿瘤干细胞的CD133⁺细胞亚群, 在NOD/SCID小鼠成瘤实验中显示出与CD133⁻细胞亚群在成瘤能力上的明显差异。1×10³个CD133⁺

细胞足以在小鼠体内形成肿瘤, 且成瘤率高达100%, 而CD133⁻细胞的注射量达到2.5×10⁵时, 仅得到11%的成瘤小鼠。此外, 与一般的肿瘤细胞相比, 肿瘤干细胞在放化疗中表现出更强的抗性^[27], 这与肿瘤干细胞能更有效地启动DNA应急反应和高表达耐药相关蛋白有关。肿瘤干细胞的高成瘤率和对放化疗的抵抗能力, 能使其在放化疗过程中得以存活, 导致肿瘤的复发。因此, 有效地清除肿瘤干细胞对于获得理想的抗癌疗效是十分必要的。

目前, 在靶向肿瘤干细胞的研究中应用最多的治疗物是小分子抑制剂和融合蛋白。然而, 靶向性差、副作用明显等缺陷限制了此类药剂在临床治疗中的应用。研究表明, 病毒, 尤其是溶瘤病毒(oncolytic virus)比小分子类和蛋白类药物更适合作为靶向肿瘤干细胞的治疗物。以溶瘤病毒为载体的病毒基因治疗(gene-virotherapy)方案已在实体瘤治疗中取得巨大的成功, 为了实现其对肿瘤干细胞的靶向性, 可采用抗体特异识别, 或以肿瘤干细胞特异性表达调控元件来控制治疗基因表达等策略。肿瘤干细胞的特性

表1 各种肿瘤类型中肿瘤干细胞的分子标记(或分选方法)

肿瘤类别	肿瘤干细胞 marker 或分选方法 ^{a)}	文献
肺癌	SP(side population); CD34 ⁺ /Sca-1 ⁺	[3,4]
前列腺癌及其细胞系	CD133, CXCR4; CD44 ⁺ /α ₂ β ₁ ^{high} /CD133 ⁺ ; Sca; SP	[5-8]
结肠癌	CD133; CD44	[9-11]
脑癌	CD133; nestin; CD133/Sox2/Musashi-1/Bmi-1	[12-14]
胶质母细胞瘤	CD133(*)	[15]
视网膜母细胞瘤	CD133(**)	[16]
肝癌细胞系 HepG2	CD133	[17]
肝癌细胞系 SMMC-7721	CD133	[18]
黑色素瘤	CD133; ABCG2	[19,20]
胰腺癌	CD133; ABCG2; CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /ESA ⁺	[21,22]
鼻咽癌	SP	[23]
乳腺癌	CD44 ⁺ /CD24 ^(-/low) ; SP	[2,8,24]
肝母细胞瘤	CD34 ⁺ /Thy1 ⁺ /c-kit ⁺	[25]
胶质瘤	SP	[8,26]

a) *, 少数样品肿瘤干细胞为 CD133 阴性; **, 待证实

和分子机制与正常干细胞很相似 [28]。据此，人们制定了一系列具有针对性的治疗策略，如抑制增殖、促进分化、诱导凋亡、破坏微环境(niche)和增强化疗敏感性等。初步实验结果表明，这些策略能有效地靶向肿瘤干细胞并抑制其功能，达到理想的治疗效果。下文将对靶向肿瘤干细胞治疗物的选择以及具体的靶向策略等问题作一介绍。

1 靶向肿瘤干细胞的治疗物

目前应用于肿瘤干细胞靶向性治疗的治疗物可分为小分子物质、蛋白和病毒。其中，溶瘤腺病毒同时具有介导外源基因体内表达和直接裂解肿瘤细胞两种治疗功能，在各种治疗物中显现出独有的优势。

1.1 小分子和蛋白类药物

当前，人们非常热衷于对具有肿瘤干细胞靶向性的小分子抑制剂和蛋白的筛选。其中，小分子药物具有易于制备、适合产业化和无免疫原性等优点，因而在靶向肿瘤干细胞尤其是白血病干细胞的研究中很受欢迎。Guzman等人 [29]发现蛋白酶抑制剂MG-132和葱环类抗生素idarubicin可以选择性地引发AML白血病干细胞的凋亡，而对正常造血干细胞没有影响。后来，该研究小组又筛选出一种叫做Parthenolide的倍半萜烯内酯类药物，该药物能够特异性诱导粒细胞性白血病(myelogenous leukemia)的白血病干细胞发生凋亡 [30]。最近有报道证实，小分子抑制剂RHPS4 [31]和砷 [32]均能够抑制白血病干细胞的增殖能力。但是小分子药物副作用明显，靶向性差，这些缺陷大大限制

了该类药剂在实际治疗中的作用。

将抗体和毒素融合制成的融合蛋白-免疫毒素(immunotoxin)，可以将起杀伤作用的多肽或蛋白导入表达相应抗原的靶细胞内，而不影响其他细胞。肿瘤干细胞存在于有特定表面抗原表型的细胞亚群中，这为针对性治疗的实施提供了有效靶点。目前，已有研究小组研制出对肿瘤干细胞具有靶向性的immunotoxin。例如，Du等人 [33]将CD123抗体与假单胞菌外毒素A融合成immunotoxin，体外实验表明该immunotoxin能有效地靶向AML白血病干细胞。Feuring-Buske等人 [34]利用IL-3与白喉毒素的融合蛋白杀灭AML干细胞，效果显著且不会影响正常造血干细胞。虽然immunotoxin与小分子相比，靶向性得到相对增强，但免疫原性强和生产成本高仍是其进入临床时需要解决的问题。

1.2 病毒载体

与使用小分子类和蛋白类药物的治疗方案相比，以病毒为载体的基因疗法(gene therapy)则表现出许多优势：()病毒能够介导外源治疗基因进入细胞进行高效和长期表达；()某些种类的病毒对肿瘤细胞有天然的靶向性，经改造后，靶向性和安全性可显著提高；()病毒不易诱发耐药性。Clement等人 [35]使用慢病毒为载体介导RNA干扰(RNAi)以抑制胶质瘤细胞的SHH通路活性，结果表明富含肿瘤干细胞的CD133⁺细胞在NOD/SCID小鼠体内的成瘤能力被显著削弱。

目前,用于肿瘤基因治疗的病毒类载体类型很多。其中,逆转录病毒最早被用于基因治疗^[36],其特点是仅整合分裂期细胞的基因组。Ho等人^[3]在检测MCM的mRNA表达水平时发现大部分的肿瘤干细胞处于G₀期。所以,逆转录病毒并不是靶向肿瘤干细胞的理想载体。慢病毒能整合静止期的细胞,但是其病毒的产量过低,即便是第1代慢病毒的产量也不过 $10^8\sim 10^9$ pfu/mL^[37,38],而现在应用最广的第3代慢病毒的滴度只有 10^6 pfu/mL^[39],不能满足实际治疗对病毒量的需求。腺相关病毒虽然具有易于操作,安全性较好等优点,但其可插入DNA片段的最大长度只有4.7 kb,一个拷贝中不能携带多个基因,所以其在靶向肿瘤干细胞治疗中的应用受到一定限制。痘病毒和单纯疱疹病毒也分别由于免疫原性强和可转染细胞的种类有限^[40],而不适合作为靶向肿瘤干细胞的载体。

改造后的腺病毒是使用非常广泛的一种肿瘤治疗载体,其复制机理的研究比较清楚,可插入的基因片段容量大(上限至38 kb),可感染的细胞类型多,转染效果好,包装滴度非常高($10^{11}\sim 10^{12}$ pfu/mL),能够同时转染分裂期和非分裂期的细胞,安全性较好,同其他类型的病毒载体相比,更适宜成为靶向肿瘤干细胞的载体。肿瘤治疗用腺病毒载体大多为复制缺陷型,其调控复制的关键基因已被敲除。这种复制缺陷型病毒仅能发挥介导基因在细胞内表达的载体功能,治疗潜能被严重削弱。

1.3 溶瘤腺病毒

除了通过介导治疗基因的表达来抑制肿瘤的发展外,病毒还能够通过自身的复制直接裂解肿瘤细胞。1997年,Heise等人^[41]删除了腺病毒的E1B区的55 kD蛋白,使之选择性地在p53异常的肿瘤细胞中增殖,治疗效果让人振奋,这就是世界上第一个构建成功的溶瘤腺病毒。本实验室的溶瘤腺病毒载体ZD55也是基于上述原理构建的^[42]。溶瘤腺病毒能够在肿瘤细胞内增殖,最终杀死癌细胞而引起瘤体的消退。另外,溶瘤病毒还可以增强机体对肿瘤的免疫反应。为了避免溶瘤腺病毒对正常组织产生毒副作用,使其复制能力局限于肿瘤细胞,人们进行了大量的改造工作,采用删除病毒自身部分基因或使用肿瘤特异性启动子调控病毒复制相关基因表达的策略构建了多种安全性较高的肿瘤特异性溶瘤腺病毒。

最近,Jiang等人^[43]发现溶瘤腺病毒Delta-24-RGD能够有效地清除脑癌干细胞。这证明了将溶瘤腺病毒应用于靶向肿瘤干细胞治疗的可行性和有效性。肿瘤干细胞中人端粒酶(hTERT)的活性明显高于正常干细胞^[44]。溶瘤腺病毒CHNK300^[45]和Ad-TERT^[46]采用hTERT启动子调控病毒的E1A蛋白,能够选择性地在hTERT转录活跃的肿瘤干细胞中复制而不影响正常干细胞,作为靶向肿瘤干细胞的载体非常理想。

病毒基因治疗策略结合了基因疗法和病毒疗法两种治疗方案的优点。增殖型的溶瘤病毒不仅可以直接破坏癌细胞,还能使携带的治疗基因拷贝数随病毒复制而大量扩增,显著提升外源基因的治疗效果。大量的证据表明,以溶瘤腺病毒为载体的病毒基因治疗策略表现出良好的应用前景,其治疗的效果明显好于单独采用溶瘤策略或传统基因治疗策略所达到的疗效,是最有发展前途的肿瘤基因治疗方案之一^[47]。若使溶瘤腺病毒携带针对肿瘤干细胞的治疗基因,应用于靶向肿瘤干细胞的治疗,有望取得令人满意的疗效。

2 针对肿瘤干细胞的治疗策略

为了限制肿瘤干细胞在肿瘤发生和维持中的功能,取得更为理想的治疗效果,研究人员采取了多种行之有效的针对性策略。如抑制增殖、促进分化、诱导凋亡、破坏 niche 和增强放疗敏感性等。

2.1 削弱增殖能力

WNT, SHH和Notch等细胞信号通路以及人端粒酶(hTERT)不仅调控干细胞的自我增殖,而且在生物体的发育,成体后组织的恒态维持(homeostasis)中起关键作用,其异常可导致肿瘤的发生。最近的研究表明,肿瘤干细胞功能的维持同样依赖这些通路^[48]。因此,抑制上述信号通路和hTERT的活性将对肿瘤干细胞自身功能产生影响,从而削弱其增殖能力。

Fan等人^[49]用阻碍Notch通路的 γ 分泌酶抑制剂处理成神经管细胞瘤,明显削弱了富含肿瘤干细胞的CD133⁺细胞群体的增殖力,但对CD133⁻的肿瘤细胞没有影响。Verma等人^[50]利用RNAi技术,下调结肠癌WNT通路中关键蛋白 β -catenin的表达,数据显示,被处理的细胞在软琼脂上形成克隆和在裸鼠体内成瘤的能力均明显下降,表明肿瘤干细胞的增殖能力被有效抑制。Phatak等人^[31]使用小分子药物RHPS4选择性抑制白血病干细胞的端粒酶催化亚基(hTERC)

的活性,结果造成白血病干细胞增殖能力明显下降.

另外,胚胎干细胞特异表达的Oct3/4, Nanog和 Sox2 等因子,对肿瘤干细胞功能的维持也起到重要作用 [16],提示这些因子也可以作为肿瘤干细胞的靶点,用以削弱其增殖能力.

2.2 促进分化

肿瘤可以视为异常发育的器官.与正常器官中的成体干细胞不同,肿瘤组织中的肿瘤干细胞往往分化异常或分化受阻.因此,诱导肿瘤干细胞分化,可以消耗其分裂潜能,同样可以到达抑制肿瘤发展的目的.

全反式维甲酸(all-trans retinoic, ATRA)最早被用于肿瘤的促分化治疗,在对急性早幼粒细胞性白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)的治疗中表现出良好的疗效 [51].Munster等人 [52]使用组蛋白去乙酰化酶的抑制剂SAHA处理乳腺癌细胞MCF-7,可观察到明显的细胞分化特征.另外,化疗药物Cannabinoid也被证实具有诱导胶质瘤干细胞分化及抑制肿瘤发展的作用 [53].骨形态发生蛋白(bone morphogen protein, BMP)是一类在多种组织发育中起作用的细胞因子.其中BMP4 对神经组织的发育和神经干细胞的正常有序分化发挥重要功能.最近, Piccirillo等人 [54]用外源的BMP蛋白诱导胶质母细胞瘤干细胞发生分化,结果导致整个肿瘤群体的成瘤能力被严重削弱.

2.3 破坏微环境

成体组织中的干细胞均处于niche中. Niche为干细胞提供养分和保护,使之免受外来物质的毒害,协助其维持自我增殖能力,调控其分化进程.因此,破坏niche会严重影响干细胞的正常功能,甚至会导致其死亡.已有证据证明肿瘤干细胞也处于niche中 [13].破坏肿瘤干细胞所依赖的niche,会严重影响肿瘤干细胞群体的大小和功能.

Calabrese等人 [13]证实脑癌的肿瘤干细胞位于内皮细胞附近的区域,脱离该区域会影响肿瘤干细胞的增殖能力.此外,在小鼠脑内成瘤实验中,与人内皮细胞共注射的脑癌干细胞的增殖能力明显强于单独注射的脑癌干细胞,表明破坏肿瘤干细胞niche会严重影响其功能的维持. AML干细胞为维持其增殖能力必须进入位于骨髓的niche中,其表面的跨膜蛋白CD44,在其向骨髓迁移的过程中起重要作用. Jin等人 [55]用CD44的单克隆抗体H90 阻断CD44 与其功

能受体的结合,以阻碍AML干细胞向niche转移,结果大大抑制了其增殖和成瘤的能力.

2.4 诱导凋亡

目前,通过诱导凋亡而达到消灭肿瘤细胞的目的策略正被广泛采纳.该策略可以通过两种途径实现,即促进凋亡通路的活性和抑制抗凋亡通路的功能.其中较为常见的促凋亡蛋白包括 P53, TRAIL, caspase3, GranzymeA/B, Bid, Bax 和 Fas 等;重要的抗凋亡蛋白包括 Bcl-2, Bcl-xL, survivin 和 XIAP 等.通过载体介导外源促凋亡蛋白的表达,或使用 RNAi 技术抑制抗凋亡蛋白的翻译,是目前常用的诱导细胞凋亡的手段.

Zhang等人 [56]使用溶瘤腺病毒ONYX-411携带能沉默突变型K-ras的siRNA转染特定癌细胞,能有效促进肿瘤细胞凋亡的发生.如果在表达促凋亡蛋白的同时抑制抗凋亡通路的活性,估计会取得更好的结果. Lebedeva等人 [57]利用复制缺陷型腺病毒将白介素-24(IL-24)和一段能沉默突变型K-ras基因的反义RNA (K-ras AS)同时表达,与只表达IL-24或K-ras AS的策略相比,具有更强的诱导胰腺癌细胞凋亡的能力.我们可以采用同样的策略,选用对肿瘤干细胞有靶向性的病毒载体,同时携带一个促凋亡基因和一个抑制细胞存活基因,协同诱导肿瘤干细胞进入凋亡程序,直接清除该细胞群体.

2.5 增加对放疗和化疗的敏感性

放疗和化疗是当前肿瘤治疗的常规手段.但是肿瘤的抗药性往往致使治疗无效.另外,放化疗后肿瘤也会频繁复发.一般而言,放疗主要影响的是分裂期细胞而对非分裂期细胞作用不明显.然而,肿瘤干细胞多处于非分裂期,因此对放疗的反应不敏感.放疗结束后,肿瘤干细胞重新增殖直接导致肿瘤的复发. Bao等人 [58]经研究发现,胶质瘤干细胞与非干细胞样胶质瘤细胞相比,能更有效地启动DNA损伤反应,减少射线对其造成的伤害.在实验中,他们又通过抑制检验点激酶Chk1 和Chk2 的活性,成功地削弱了胶质瘤干细胞对射线产生伤害的抵抗能力,恢复了其对射线的敏感性.

另一方面,肿瘤干细胞对化学药物的多药抗药性(multidrug resistance, MDR)与BCRP1, MGMT, 抗凋亡蛋白和MDR相关蛋白的高表达有密切关系 [27].通过抑制这些抗性相关蛋白的表达,可以增强肿瘤

干细胞对药物的敏感性,提高其在化疗中的死亡率。可见,通过消除肿瘤干细胞对射线和药物的抗性这一策略,我们仍然能够依靠放化疗这些传统的治疗手段来有效地清除肿瘤干细胞。

3 问题和展望

小分子和蛋白类药物的诸多缺点,限制了其在实际治疗中的应用。而将溶瘤腺病毒应用于靶向肿瘤干细胞的癌症治疗非常适合。但在实际应用中,仍有一些需要解决的问题。首先是如何进一步提高腺病毒对肿瘤干细胞的靶向性。我们可以通过改造病毒外壳蛋白来达到此目的。外壳纤维蛋白(fiber)头部的HI环决定腺病毒靶向细胞的类别,其内部序列的变化会影响fiber与靶细胞表面受体的相互识别,从而改变病毒的靶向性。Reynolds等^[59]将RGD三肽插入HI环区内,改造后的5型腺病毒可以转染不表达柯萨奇-腺病毒受体(coxsackie-adenovirus receptor, CAR)的细胞,改变了其原先的靶向性。若对fiber的HI环的氨基酸残基序列进行改造,使之拥有与肿瘤干细胞表面特异受体的强结合力,可以使腺病毒获得对肿瘤干细胞的靶向性,提高感染率。

另外,病毒的免疫原性也是限制其临床应用的主要问题之一。人们为降低病毒本身对机体免疫系统的刺激做出了许多努力。Roberts等人^[60]对5型腺病毒外壳蛋白hexon进行了改造,使用48型腺病毒hexon蛋白的高度可变区(HVR)的序列替换5型的HVR,成功消除了血清中大量存在的5型腺病毒抗体对改造后载体的免疫反应,提高了腺病毒在实际应

用中的效力。

在选择具体的肿瘤干细胞特异性基因时也有一些问题需要解决。

首先,肿瘤干细胞和正常干细胞共同使用许多通路,如Bmi^[61], Notch, WNT, SHH等。使用针对这些通路的基因用于治疗,可能会引发安全性问题。因此选用仅在肿瘤干细胞中有活性的分子通路作为靶点更为理想。Yilmaz等人^[62]使用Rapamycin抑制白血病干细胞中因PTEN缺失而过度激活的Akt-mTOR通路,结果显示,白血病干细胞被耗尽而正常造血干细胞没有受到影响。

其次,肿瘤干细胞强大分裂能力的维持,是多个分子通路协作的结果。不同通路间还存在着介导通路间相互影响的交谈(crosstalk)现象。例如,WNT通路可以激活Notch通路的活性^[63]。由于其通路间crosstalk的存在,使用RNAi技术同时沉默多个不同通路中关键蛋白的表达^[64],才能有望取得满意的结果。

肿瘤中存在肿瘤干细胞的事实,有助于我们建立更为科学的肿瘤治疗疗效测评标准,制定更为有效的治疗策略。新型的靶向肿瘤干细胞的抗癌治疗策略,为治愈癌症带来了新的希望。

参考文献

- 1 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 1994, 367(6464): 645—648[doi]
- 2 Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983—3988[doi]
- 3 Ho M M, Ng A V, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 4827—4833[doi]
- 4 Kim C F, Jackson E L, Woolfenden A E, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 2005, 121(6): 823—835[doi]
- 5 Miki J, Furusato B, Li H, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res*, 2007, 67(7): 3153—3161[doi]
- 6 Collins A T, Berry P A, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10946—10951[doi]
- 7 Xin L, Lawson D A, Witte O N. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(19): 6942—6947[doi]

- 8 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—6219[[doi](#)]
- 9 O'Brien C A, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 2007, 445(7123): 106—110[[doi](#)]
- 10 Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 2007, 445(7123): 111—115[[doi](#)]
- 11 Dalerba P, Dylla S J, Park I K, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10158—10163[[doi](#)]
- 12 Singh S K, Hawkins C, Clarke I D, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004, 432(7015): 396—401[[doi](#)]
- 13 Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 2007, 11(1): 69—82[[doi](#)]
- 14 Hemmati H D, Nakano I, Lazareff J A, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 15178—15183[[doi](#)]
- 15 Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*, 2007, 67(9): 4010—4015[[doi](#)]
- 16 Seigel G M, Hackam A S, Ganguly A, et al. Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. *Mol Vis*, 2007, 13: 823—832
- 17 Zhou L, Wei X, Cheng L, et al. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope*, 2007, 117(3): 455—460[[doi](#)]
- 18 Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*, 2007, 120(7): 1444—1450[[doi](#)]
- 19 Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur J Cancer*, 2007, 43(5): 935—946[[doi](#)]
- 20 Frank N Y, Margaryan A, Huang Y, et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 4320—4333[[doi](#)]
- 21 Olempska M, Eisenach P A, Ammerpohl O, et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(1): 92—97
- 22 Li C, Heidt D G, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1030—1037[[doi](#)]
- 23 Wang J, Guo L P, Chen L Z, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3716—3724[[doi](#)]
- 24 Phillips T M, McBride W H, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44(+) breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(24): 1777—1785
- 25 Fiegel H C, Gluer S, Roth B, et al. Stem-like cells in human hepatoblastoma. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(11): 1495—1501[[doi](#)]
- 26 Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(3): 781—786[[doi](#)]
- 27 Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 2006, 5: 67[[doi](#)]
- 28 Reya T, Morrison S J, Clarke M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859): 105—111[[doi](#)]
- 29 Guzman M L, Swiderski C F, Howard D S, et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(25): 16220—16225[[doi](#)]
- 30 Guzman M L, Rossi R M, Karnischky L, et al. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*, 2005, 105(11): 4163—4169[[doi](#)]
- 31 Phatak P, Cookson J C, Dai F, et al. Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth in vitro and in vivo consistent with a cancer stem cell targeting mechanism. *Br J Cancer*, 2007, 96(8): 1223—1233[[doi](#)]
- 32 Zheng X, Seshire A, Ruster B, et al. Arsenic but not all-trans retinoic acid overcomes the aberrant stem cell capacity of PML/RARalpha-positive leukemic stem cells. *Haematologica*, 2007, 92(3): 323—331[[doi](#)]
- 33 Du X, Ho M, Pastan I. New immunotoxins targeting CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells. *J Immunother*, 2007, 30(6): 607—613[[doi](#)]
- 34 Feuring-Buske M, Frankel A E, Alexander R L, et al. A diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein is cytotoxic to primitive acute myeloid leukemia progenitors but spares normal progenitors. *Cancer Res*, 2002, 62(6): 1730—1736
- 35 Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, et al. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol*, 2007, 17(2): 165—172[[doi](#)]
- 36 Edelstein M L, Abedi M R, Wixon J, et al. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004—an overview. *J Gene Med*, 2004, 6(6): 597

- 602[[doi](#)]
- 37 Kafri T, Blomer U, Peterson D A, et al. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet*, 1997, 17(3): 314—317[[doi](#)]
- 38 Higashikawa F, Chang L. Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology*, 2001, 280(1): 124—131[[doi](#)]
- 39 Xu K, Ma H, McCown T J, et al. Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther*, 2001, 3(1): 97—104[[doi](#)]
- 40 Seth P. Vector-mediated cancer gene therapy: an overview. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(5): 512—517
- 41 Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, et al. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med*, 1997, 3(6): 639—645[[doi](#)]
- 42 Zhang Z L, Zou W G, Luo C X, et al. An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy. *Cell Res*, 2003, 13(6): 481—489[[doi](#)]
- 43 Jiang H, Gomez-Manzano C, Aoki H, et al. Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: role of autophagic cell death. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(18): 1410—1414[[doi](#)]
- 44 Armanios M, Greider C W. Telomerase and cancer stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005, 70: 205—208[[doi](#)]
- 45 Zhang Q, Nie M, Sham J, et al. Effective gene-viral therapy for telomerase-positive cancers by selective replicative-competent adenovirus combining with endostatin gene. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5390—5397[[doi](#)]
- 46 Zou W, Luo C, Zhang Z, et al. A novel oncolytic adenovirus targeting to telomerase activity in tumor cells with potent. *Oncogene*, 2004, 23(2): 457—464[[doi](#)]
- 47 Ko D, Hawkins L, Yu D C. Development of transcriptionally regulated oncolytic adenoviruses. *Oncogene*, 2005, 24(52): 7763—7774[[doi](#)]
- 48 Massard C, Deutsch E, Soria J C. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol*, 2006, 17(11): 1620—1624[[doi](#)]
- 49 Fan X, Matsui W, Khaki L, et al. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7445—7452[[doi](#)]
- 50 Verma U N, Surabhi R M, Schmalstieg A, et al. Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(4): 1291—1300
- 51 Castaigne S, Chomienne C, Daniel M T, et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood*, 1990, 76(9): 1704—1709
- 52 Munster P N, Trosso-Sandoval T, Rosen N, et al. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res*, 2001, 61(23): 8492—8497
- 53 Aguado T, Carracedo A, Julien B, et al. Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6854—6862[[doi](#)]
- 54 Piccirillo S G, Reynolds B A, Zanetti N, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*, 2006, 444(7120): 761—765[[doi](#)]
- 55 Jin L, Hope K J, Zhai Q, et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*, 2006, 12(10): 1167—1174[[doi](#)]
- 56 Zhang Y A, Nemunaitis J, Samuel S K, et al. Antitumor activity of an oncolytic adenovirus-delivered oncogene small interfering RNA. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9736—9743[[doi](#)]
- 57 Lebedeva I V, Sarkar D, Su Z Z, et al. Molecular target-based therapy of pancreatic cancer. *Cancer Res*, 2006, 66(4): 2403—2413[[doi](#)]
- 58 Bao S, Wu Q, McLendon R E, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006, 444(7120): 756—760[[doi](#)]
- 59 Reynolds P, Dmitriev I, Curiel D. Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther*, 1999, 6(7): 1336—1339[[doi](#)]
- 60 Roberts D M, Nanda A, Havenga M J, et al. Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature*, 2006, 441(7090): 239—243[[doi](#)]
- 61 Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, 2003, 423(6937): 255—260[[doi](#)]
- 62 Yilmaz O H, Valdez R, Theisen B K, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*, 2006, 441(7092): 475—482[[doi](#)]
- 63 Ayyanan A, Civenni G, Ciarloni L, et al. Increased Wnt signaling triggers oncogenic conversion of human breast epithelial cells by a Notch-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(10): 3799—3804[[doi](#)]
- 64 潘秋卫, 蔡荣, 刘新垣, 等. 肿瘤基因治疗新策略——RNA 干扰. *科学通报*, 2006, 51(9): 993—997