

胰腺肿瘤干细胞研究新进展

周竹超¹ 龚轶一¹ 倪泉兴²

1. 复旦大学附属华山医院普外科, 上海 200040;
2. 复旦大学附属肿瘤医院胰腺外科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] 胰腺肿瘤尤其是胰腺导管腺癌的恶性程度高, 转移性强, 预后差。以往研究表明肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)在胰腺肿瘤的发生、发展过程中起重要作用, 深入了解胰腺肿瘤的发病机制将有助于针对性治疗。在胰腺发育过程中, 复杂的信号通路和转录因子决定了其前体细胞分化方向, 在胰腺发生恶变过程中, 这些因素又参与其中, 因而往往可以作为追溯CSC的标志。一些研究也应用特定蛋白来筛选胰腺CSC。现就胰腺CSC的来源、鉴定和靶向治疗进行综述。

[关键词] 胰腺癌; 干细胞; 肿瘤干细胞; 信号通路; 靶向治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.05.011

中图分类号: R735.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)05-0382-07

Recent progress on pancreatic cancer stem cells ZHOU Zhu-chao¹, GONG Yi-yi¹, NI Quan-xing²
(1. Department of General Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 2. Department of Pancreatic Surgery, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: NI Quan-xing E-mail: ni_quanxing@hotmail.com

[Abstract] Pancreatic neoplasm, especially pancreatic ductal adenocarcinoma tends to be with bad prognosis due to higher grade malignancy and metastasis. Formerly researches suggested that cancer stem cells play an important part in the initiation and process of pancreatic cancer, so that, well understanding on the mechanism of pathogenesis will contribute to a direct treatment on it. Complex signal pathways and transcription factors determined the differentiation of precursor cells during the development of pancreas, whereas, also involved in pancreatic malignant changes, which could be used as markers tracking cancer stem cells. Moreover, several special proteins were also employed as tools for pancreatic cancer stem cells screening. In this text, we reviewed origination and identification of pancreatic cancer stem cells, as well as targeted therapy.

[Key words] Pancreatic carcinoma; Stem cells; Cancer stem cells; Signal pathways; Targeted therapy

临床上胰腺恶性肿瘤主要为胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC), 其恶性程度高, 早期诊断困难, 易局部浸润和全身转移, 在美国和日本分别位居癌症死亡的第4位^[1]和第5位^[2]。迄今, PDAC的手术切除率仅20%, 由于对常规化疗和放疗不敏感, 易复发和转移, 术后的5年生存率仅20%~25%^[3-4]。所以研究胰腺肿瘤细胞起源、癌变机制和转化过程具有很重要的临床意义。近年来, 对于胰腺肿瘤来源于肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)的假说日益受到关注, 其理论核心是胰腺肿瘤中存在很

小一部分具有自我更新和多向分化能力的CSC, 异常增殖分化形成肿瘤。由于CSC具有干细胞特性, 在肿瘤发生、发展、侵袭、转移和治疗后复发中起决定性作用, 所以对胰腺CSC的分离和鉴定、微环境和信号通路的调控作用以及耐药性和转移机制的研究, 可为胰腺肿瘤特异性靶向治疗提供突破性的结果。

1 胰腺发育的信号调控和胰腺干细胞

胰腺具有外分泌和内分泌两种功能: 前者指由腺泡细胞与连接腺泡和导管间的泡心细胞(centroacinar cells, CAC)分泌消化酶和水电解质, 经过导管细胞组成的导管进入肠道帮助消化; 后

者主要是由分泌胰高血糖素、胰岛素、生长抑素、胰多肽的胰岛 α 、 β 、 δ 、PP细胞组成。

胰腺起源于内胚层,研究发现,与胰腺相关最早的胚胎学变化为间充质聚集在内胚层原肠腔十二指肠原基处背侧。小鼠胚胎第9.5天(人类妊娠第26天)时,内胚层外翻进入叠加的间充质内并逐渐外突形成背侧胰芽。大约12 h(人类为第6天)后,肝胆原基的尾侧外翻形成腹侧胰芽。在小鼠胚胎第12~13天(人类妊娠第37~42天)时,随着原肠腔的旋转和背侧胰芽的延伸,背腹侧胰芽慢慢融合,在十二指肠原基处形成一个环状(C-loop)结构,即是胰腺器官雏形。在小鼠胚胎第13~14天时,胰腺内分泌细胞数迅速扩增,尤其是 β 细胞开始大量分化,并取代 α 细胞占胰岛细胞中的大部分,相应地导致胚胎中胰岛素和胰高血糖素的分泌水平发生逆转。与此同时,胰腺导管不断形成侧支,伴随着腺泡酶基因表达呈指数型增加,导管和腺泡在形态和功能上分化成熟^[5]。

在胰腺发育成熟过程中,胰腺前体细胞受到多种信号通路的调控,确切机制复杂,尚未明了。已知的相关信号通路包括TGF- β 、Notch、Sonic hedgehog(Shh)、FGF、EGF、Retinoids、Wnt、Bmi1、Pten、Hippo等。多种转录因子如胰十二指肠同源盒1(pancreas duodenum homeobox-1, PDX1)、Nkx2.2、Nkx6.1 and Nkx6.2、HlxB9、Ptf1a(p48)、MIST1、NeuroD(BETA2)、Neurogenin 3(Ngn3)、Isl1、Pax4、Pax6、MafA、HNF cascade、Sox9、Sox4、Myt1、GATA6和GATA4等也在胰腺的发育中起作用^[6-9]。起决定作用的3个主要调节因素包括Shh信号通路的关闭、PDX1的表达增加和Notch信号通路的调控^[10]。此外,Shh、Notch和PDX1还与胰腺内、外分泌干细胞的“干细胞”特性保持密切相关并参与肿瘤的生成。Shh编码Hedgehog蛋白,其下游作用因子Gli直接作用于靶基因。Hedgehog信号通路调节胚胎发育和成体许多组织器官干细胞的自我更新与增殖。内胚层原肠腔上皮细胞Shh信号的关闭决定了十二指肠原基处内胚层分化成胰腺而不是相

邻的肠道。在胰芽形成和生长的过程中起主要作用的是PDX1。PDX1是由Hox-like同源结构基因所编码的转录因子,敲除PDX1的小鼠胚胎无法发育形成一个完整的胰腺,证明它在胰腺发育中至关重要^[11]。由于其功能较多,也被称为胰岛素启动因子1(insulin promoter factor-1, IPF1)、生长抑素转录激活因子1(somatostatin transactivating factor-1, STF1)、胰岛素下游因子(insulin upstream factor-1, IFU1)、葡萄糖敏感因子(glucose-sensitive factor)等。在成体胰腺中它主要在内分泌细胞中表达,对胰岛素、生长抑素、胰淀粉酶、葡萄糖转运子-2和葡萄糖激酶的表达起重要作用^[12]。随着胰腺发育,Notch信号处于正常水平时,胰腺祖细胞表达Hes-1(hairy and enhancer of split 1)和p48向外分泌方向分化;与之相反,抑制Notch信号通路导致Ngn3表达增强,使胰腺祖细胞向内分泌方向分化^[13](图1)^[14]。

De Back等^[15]研究认为,在早期胰腺发育过程中细胞间侧向稳定(lateral stabilization)耦合侧向抑制(lateral inhibition)作用决定了其内分泌和外分泌细胞的发育方向,这对Notch信号通路单纯通过侧向抑制来控制胰腺多能细胞发展方向的理论作了补充。Notch信号通路中的Notch受体分为4个亚型,分别为Notch1、Notch2、Notch3、Notch4。Lammert等^[16]在小鼠胚胎发育过程中进行原位杂交实验发现,在胰腺胚胎发育过程中Notch1最先开始表达,当Hes-1同时表达时提示Notch1通路被激活,随后Notch2表达在导管,Notch3、Notch4则表达在胰腺间充质和内皮细胞中。Murtaugh等^[17]在转基因小鼠模型中发现,在PDX1阳性的胰腺前体细胞中异位活化表达Notch可使其向内分泌和外分泌的分化同时停止,并停留在祖细胞阶段,这说明Notch信号通路在胰腺早期发育中起着维持胰腺上皮祖细胞处于未分化状态,直至分化条件成熟的作用。

胰腺正常干细胞(normal stem cell, NSC)的研究是胰腺疾病替代治疗的重点,和胰腺CSC的研究相辅相成,尽管近年来已经取得了一定

的进展, 但仍缺乏可靠的标志物及可信的评价系统。目前胰腺NSC较公认的特异性标志物有PDX1、Ngn3、巢素蛋白(nestin)、Notch信号、

细胞角蛋白(cytokeratin, CK)、MSH2、 β -半乳糖苷酶、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)等^[18]。

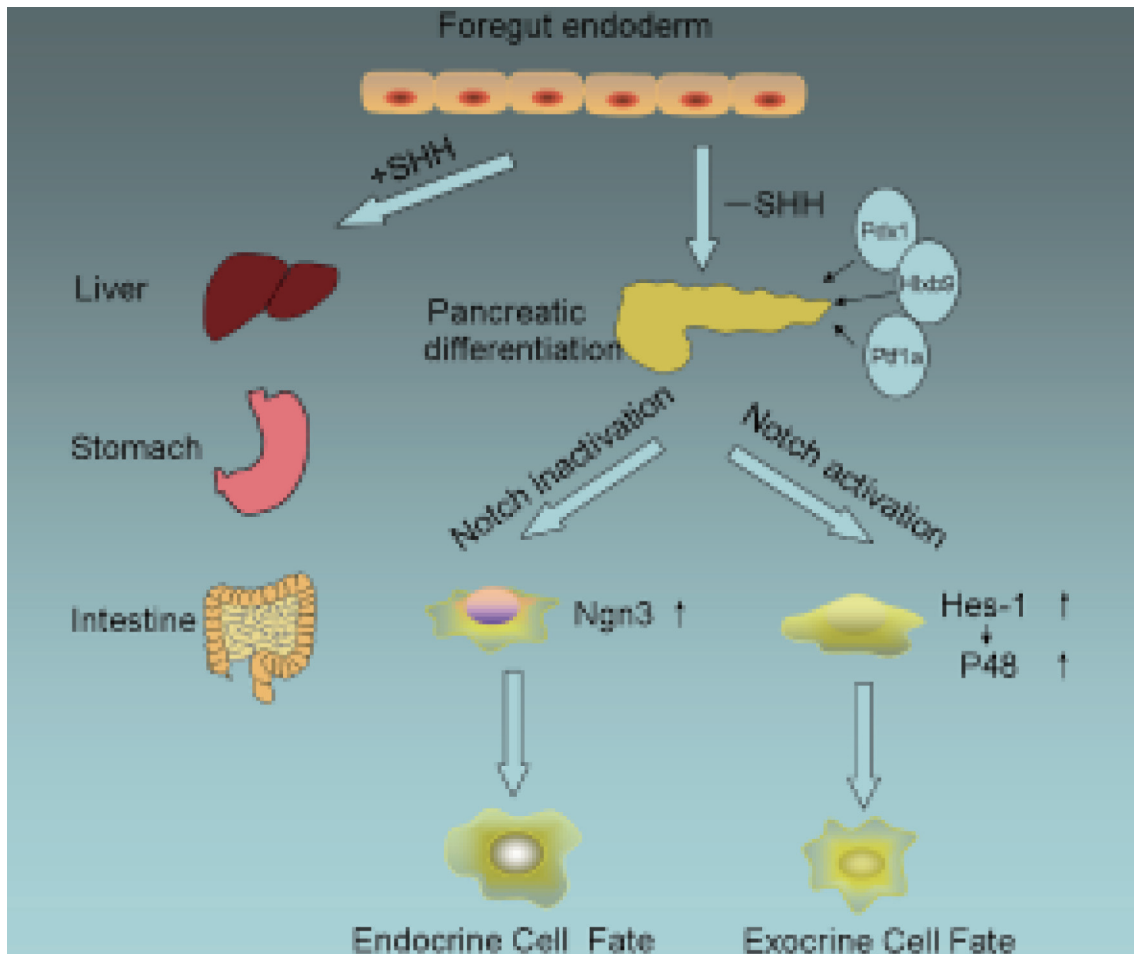


图1 胰腺发育中的主要影响因子^[14]

Fig. 1 Key factors involved in pancreas development: Shh, Pdx1 and Notch signal pathway^[14]

2 胰腺CSC的来源

胰腺肿瘤起始于胰腺CSC^[19]。PDAC的癌前期病变可以分为胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)、导管内乳头状黏液瘤(intraductal papillary mucinous neoplasia, IPMN)和黏液囊性瘤(mucinous cystic neoplasia, MCN), 其中PanIN最为常见。Hruban等^[20]和Stanger等^[21]认为, PanIN起源于连接胰腺腺泡和导管的CAC, 并且在CAC增生与PanIN之间存在一个腺泡-导管化生(acinar-ductal metaplasia, ADM)过程。De La等^[22]研究证实ADM是胰腺肿瘤形成的第一步, 且ADM过程需要Notch

和K-ras的协同作用来完成。Lee等^[23]报道, nestin是外分泌胰腺干细胞的标志之一, 而nestin阳性细胞表达Notch2, 此类胰腺干细胞可以转型分化为导管细胞。Mazur等^[24]发现, 选择性阻断Notch2能使PanIN进程停止, 而阻断Notch1则无效, 这说明Notch2是调控PanIN发展及向PDAC演变的关键信号。Miyamoto等^[25]发现CAC中Notch信号持续活化, Notch信号的靶基因Hes-1是已知的CAC标志, 结合其在胰腺中的特殊位置, 推断CAC可能为胰腺干细胞或胰腺癌起始细胞。

Rovira等^[26]用醛脱氢酶(aldehyde

dehydrogenase, ALDH)为标志分离了一部分泡心细胞和终末导管细胞,发现这群细胞能高表达胰腺发育过程中一些基因,能形成自我更新的细胞球体,并可分化成内分泌和外分泌胚胎细胞。不仅如此,当胰腺上皮受到慢性损伤时,此群细胞骤然增殖,显示其对胰腺上皮的修复再生能力。此外,选择性敲除PTEN,一种磷脂酸肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K)信号的负调控因子,会引起泡心细胞数量的激增,在ADM过程中直接取代腺泡细胞并分化成导管,并可导致胰腺导管的恶变^[27]。上述发现均提示泡心细胞可能是胰腺腺泡和导管的干细胞,很可能为PDAC的细胞来源。近来也有研究认为表达LGR5和Nanog的胰腺β细胞可能是胰腺癌干细胞的来源^[28],但具体需要更多实验去证明。

3 胰腺CSC的分离和鉴定

胰腺和乳腺同为腺体器官,有着相似的组织结构,因此筛选胰腺癌干细胞的表面标志时借鉴了已被公认的乳腺癌干细胞标志物CD44⁺CD24^{low}ESA⁺^[29]。Li等^[30]就以这三种标志不同组合对人胰腺癌小鼠移植瘤细胞用流式方法进行筛选,再将筛选出的细胞接种到NOD/SCID小鼠。结果显示,在胰腺癌细胞中仅占0.2%~0.8%的CD44⁺CD24⁺ESA⁺细胞具有明显的肿瘤形成能力,由此类细胞分化增殖形成的异质性肿瘤与直接从患者体内取得的肿瘤组织在病理形态、胰腺癌分化标志物S100P和分层蛋白(stratifin)的表达类型上均非常相近。不仅如此,此类细胞还高表达与胰腺癌早期发生相关的信号Shh,并可在悬浮培养中聚集成细胞球体(sphere),显示其自我更新能力。但也有学者对此项研究提出质疑:①ESA是上皮细胞的标志,因此把ESA⁻细胞(主要是非上皮的炎性、间质和血管细胞)作为对照显然有局限性^[31]。②细胞周期分析显示CD44⁺CD24⁺ESA⁺和CD44⁻CD24⁻ESA⁻两群细胞没有明显区别,这不符合干细胞应该处于静止期的常规,提示前者研究中的子代细胞可能并非来自推定的CSC,而仅是发生了表型标志的改变。③CD44⁺CD24⁺ESA⁺细胞

高表达Shh可能由于分选导致的富集,要证实干细胞通路Shh活化的直接靶标应该是定量PCR检测其作用因子Gli。④研究中未给出有力的CSC按等级体系(hierarchy)分化的依据,子代肿瘤表达了分化标志S100P和stratifin如同原代肿瘤一样仅显示了肿瘤分化的状态,无法区分肿瘤的异质性来源于克隆演变还是CSC。单个CSC能按等级体系分化成肿瘤的不同组分才是最根本的证明^[32]。

Hermann等^[33]发现,占胰腺癌组织细胞总数1%~3%的CD133⁺细胞具有显著的肿瘤起始能力。此外,胰腺癌L3.6pl细胞系中CD133⁺细胞同样有很强的致瘤性,能在无血清悬浮培养下形成可扩增的球体细胞。值得注意的是,综合检测结果显示标志为CD44⁺CD24⁺ESA⁺和CD133⁺的两组胰腺癌细胞重叠率仅14%,究竟是这两群细胞代表了不同的胰腺癌干细胞抑或具有以上4种标志的胰腺癌细胞具有更强的CSC特性有待进一步研究。然而更多的报道对CD133⁺作为胰腺癌CSC的标志提出异议:①CD133抗原可被糖基化修饰,在胰腺癌研究中不同小组采用不同的CD133抗体可引出相反的实验结论^[34-35]。还有研究发现不论干样细胞还是分化细胞,CD133在结肠上皮普遍表达,提出CD133不适宜作为消化道CSC的标志物^[36-37]。②在神经细胞CSC的鉴定中,CD133⁺球体细胞展示了分化成多种谱系细胞的能力,CD133⁺胰腺癌球体细胞在分化条件下可扩增,但未给出明确的多向分化的依据^[32,38]。③直接以NSC标志物CD133或CD44、CD24作为假定的CSC标志物进行鉴定使得研究对象从一开始就受到了限制。这种局限性存在于多种肿瘤的CSC研究中。理想的表面标志物本身应该和CSC自我更新的功能相关,受到自我更新相关基因的调控。

最近,有研究认为ALDH能作为胰腺CSC的内源性标志。ALDH是一种内生性的酶,在乙醇和视黄醛的代谢中起关键作用,为正常胰腺发育所必需且和胰腺癌的发生有关。研究显示肿瘤组织标本中阳性表达ALDH的胰腺癌患者预后较差。ALDH⁺胰腺癌细胞较ALDH⁻细胞具有更

强的致瘤性、克隆形成能力和转移侵袭能力。ALDH⁺和CD44⁺CD24⁺两群细胞几乎没有重叠(CD44⁺CD24⁺ALDH⁺细胞比例<0.1%), 而体外实验中前者似乎比后者更具侵袭力^[39]。但在更全面的检测中发现ALDH在胰腺肿瘤组织和正常胰腺组织中均有广泛表达, 因此也不适宜作为胰腺CSC的标志物^[40]。

经过长期体外传代培养的胰腺癌细胞系遗传物质可能存在未知的改变, 作为CSC的研究材料可信度固然不如原代肿瘤组织, 但稳定性和一致性却是其优点。Olempska等^[41]以干细胞标志物ABCG2和CD133为标志测定了5种胰腺癌细胞株(Panc1、Panc89、Colo357、PancTul和A818-6)中的胰腺癌干细胞。推测标志物ABCG2和CD133阳性细胞可能为胰腺癌干细胞。Gou等^[42]将胰腺癌Panc1细胞培养在无血清条件下并添加生长因子等诱导球体形成, 此类球体细胞能排斥荧光染料Hoechst, 且在体外和体内实验中均较常规培养下的Panc1细胞有更强的增殖能力, 提出Panc1球体细胞有干细胞特性。但无血清培养下的细胞更具致瘤性是否与培养液中添加了促进有丝分裂的生长因子bFGF和EGF有关, 还有待说明。Zhou等^[43]检测到Panc1细胞中侧群细胞(side-population cell, SP)的比例为3.3%, 经吉西他滨(Gemcitabine)培养后比例上升至9.8%, 此群细胞较非SP细胞高表达ABCB1和ABCG2, 可能是其排斥Hoechst和耐药性的原因。以往的研究证明SP细胞为卵巢CSC^[44], 但是胰腺肿瘤SP是否就是CSC还需要更多的实验数据证明。由于胰腺肿瘤发生机制较复杂和CSC含量较低, 现阶段的一些鉴定方法均无法给出权威的证据, 所以对于胰腺CSC标志物的鉴定仍是研究胰腺肿瘤的重要课题。

4 针对胰腺CSC的生物学治疗

开发选择性靶向胰腺CSC的治疗方法必须首先解决一个长期困扰研究者的问题, 如何避免对NSC产生不良反应, 因为这两者有太多共性, 甚至有研究者认为它们的差异只是所处的微环境造成的^[45]。尽管如此, 近几年在针对胰腺CSC的治疗上仍取得了一定的突破。Muller

等^[46]在体外和体内实验中均证明将干细胞相关信号通路Shh的抑制剂环杷明(cyclopamine)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的阻断剂雷帕霉素(rapamycin)和吉西他滨联合应用可有效杀灭胰腺CSC, 进而缩小肿瘤, 抑制转移, 延长无瘤生存期, 而单一应用其中一种药物则无此效果, 称为CRG方案。mTOR是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 属于PI3K家族, mTOR信号通路在某些肿瘤发生过程中被不适当的激活, 因此, mTOR信号通路的抑制剂可作为这些肿瘤患者的靶向性治疗剂^[47]。有研究发现在血液系统中敲除mTOR通路上游的负调控因子PTEN可使NSC衰竭, 但却同时使白血病起始细胞增多, 而采用mTOR抑制剂则起到相反的作用^[48]。这个结果的意义在于研究者终于可以通过抑制mTOR通路而在打击CSC时避免损伤NSC和正常组织细胞。此外, CRG方案的3种药物, 均已分别在临床使用, 缩短了研发周期, 药代动力学和不良反应也已被掌握, 期待其联合应用能早日进入临床。

莱菔硫烷(sulforaphane, SFN, SF, 又名萝卜硫素), 是一种主要存在于西兰花和其他十字花科蔬菜中的异硫氰酸盐类物质, 可预防许多化学致癌物诱导的DNA损伤和多种肿瘤的发生, 是潜在的肿瘤治疗药物。Kallifatidis等^[49]发现, 将SF与化疗药物联合应用可抑制胰腺CSC的集落生成、球体形成和ALDH活性, 小鼠体内实验更证实了SF能增强细胞毒类药物对胰腺CSC的效力, 却未增加化疗毒性。进一步研究发现在SF基础上再联合同样对胰腺CSC有效的多靶点抗肿瘤药物索拉非尼(sorafenib, SO)可显著诱发胰腺肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤血管增殖和上皮间变(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 缩小肿瘤体积, 有望成为另一种对抗胰腺CSC的药物组合^[50]。除此以外, 干细胞相关信号通路(如Shh^[51]、mTOR、Pten、Notch、Bmi1、Wnt)阻断剂、MicroRNAs(如miR-34^[52]、miR-200家族^[53])、端粒酶模板拮抗剂(如GRN163L^[54])等也是胰腺CSC生物学治疗的

研究方向。

5 结论

迄今,虽然有多个研究组致力于胰腺CSC的分离和鉴定,并以特异性标志物如CD44、CD24、ESA、CD133、CXCR4和ALDH等分离得到了多种胰腺癌干样细胞群,但其间少有交集,也仍缺乏作为胰腺CSC的充分证据。此外,胰腺CSC的细胞来源、组织定位、信号通路调控机制、微环境的作用、耐药和转移的分子生物学机制等众多问题尚未明确。胰腺CSC的研究仍处于早期阶段。提高胰腺肿瘤的5年生存率是国际上的难题,其中靶向胰腺CSC的治疗可以从源头上杀灭肿瘤细胞,根治肿瘤,是非常有前景的研究领域,但高选择性地只针对CSC而不损伤NSC是个巨大的挑战。令人振奋的是,随着对CSC抗药性和调控机制的不断深入剖析,针对胰腺CSC的多种生物治疗已略见疗效,可能在不久的将来,随着机制的明确和多种疗法的联合应用,对胰腺肿瘤的治疗将取得突破性的进展。

[参 考 文 献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, et al. Cancer statistics, 2010 [J] . CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
- [2] QIU D, KUROSAWA M, LIN Y, et al. Overview of the epidemiology of pancreatic cancer focusing on the JACC Study [J] . J Epidemiol, 2005, 15(Suppl 2): 157-167.
- [3] PHILIP P A, MOONEY M, JAFFE D, et al. Consensus report of the national cancer institute clinical trials planning meeting on pancreas cancer treatment [J] . J Clin Oncol, 2009, 27(33): 5660-5669.
- [4] LI D, XIE K, WOLFF R, ABBRUZZESE J L. Pancreatic cancer [J] . Lancet, 2004, 363(9414): 1049-1057.
- [5] GITTES G K. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review [J] . Dev Biol 2009, 326(1): 4-35.
- [6] RHIM A D, STANGER B Z. Molecular biology of pancreatic ductal adenocarcinoma progression: aberrant activation of developmental pathways [J] . Prog Mol Biol Transl Sci, 2010, 97: 41-78.
- [7] JENSEN J. Gene regulatory factors in pancreatic development [J] . Dev Dyn, 2004, 229(1): 176-200.
- [8] GEORGE N M, DAY C E, BOERNER B P, et al. Hippo signaling regulates pancreas development through inactivation of Yap [J] . Mol Cell Biol, 2012, 32(24): 5116-5128.
- [9] PAN F C, BANKAITIS E D, BOYER D, et al. Spatiotemporal patterns of multipotentiality in Ptf1a-expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration [J] . Development, 2013, 140(4): 751-764.
- [10] EDLUND H. Developmental biology of the pancreas [J] . Diabetes, 2001, 50(Suppl 1): 5-9.
- [11] JONSSON J, CARLSSON L, EDLUND T, et al. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice [J] . Nature, 1994, 371(6498): 606-609.
- [12] HUI H, PERFETTI R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood [J] . Eur J Endocrinol, 2002, 146(2): 129-141.
- [13] APELQVIST A, LI H, SOMMER L, et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation [J] . Nature, 1999, 400(6747): 877-881.
- [14] HEZEL A F, KIMMELMAN A C, STANGER B Z, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma [J] . Genes Dev, 2006, 20(10): 1218-1249.
- [15] DE BACK W, ZHOU J X, BRUSCH L. On the role of lateral stabilization during early patterning in the pancreas [J] . J R Soc Interface, 2013, 10(79): 20120766.
- [16] LAMMERT E, BROWN J, MELTON D A. Notch gene expression during pancreatic organogenesis [J] . Mech Dev, 2000, 94(1-2): 199-203.
- [17] MURTAUGH L C, STANGER B Z, KWAN K M, et al. Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation [J] . Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(25): 14920-14925.
- [18] BONNER-WEIR S, SHARMA A. Pancreatic stem cells [J] . J Pathol, 2002, 197(4): 519-26.
- [19] REYA T, MORRISON S J, CLARKE M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J] . Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
- [20] HRUBAN R H, MAITRA A, GOGGINS M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia [J] . Int J Clin Exp Pathol, 2008, 1(4): 306-316.
- [21] STANGER B Z, DOR Y. Dissecting the cellular origins of pancreatic cancer [J] . Cell Cycle, 2006, 5(1): 43-46.
- [22] DE LA O J, EMERSON L L, GOODMAN J L, et al. Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia [J] . Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(48): 18907-18912.
- [23] LEE K M, YASUDA H, HOLLINGSWORTH M A, et al. Notch 2-positive progenitors with the intrinsic ability to give rise to pancreatic ductal cells [J] . Lab Invest, 2005, 85(8): 1003-1012.
- [24] MAZUR P K, EINWACHTER H, LEE M, et al. Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma [J] . Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(30): 13438-13443.
- [25] MIYAMOTO Y, MAITRA A, GHOSH B, et al. Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis [J] . Cancer Cell, 2003, 3(6): 565-576.
- [26] ROVIRA M, SCOTT S G, LISS A S, et al. Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas [J] . Proc Natl Acad Sci U S A,

- 2010, 107(1): 75–80.
- [27] STANGER B Z, STILES B, LAUWERS G Y, et al. Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas [J] . *Cancer Cell*, 2005, 8(3): 185–195.
- [28] AMSTERDAM A, RAANAN C, SCHREIBER L, et al. LGR5 and Nanog identify stem cell signature of pancreas beta cells which initiate pancreatic cancer [J] . *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 433(2): 157–162.
- [29] AL-HAJJ M, WICHA M S, BENITO-HERNANDEZ A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J] . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 3983–3988.
- [30] LI C, HEIDT D G, DALERBA P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J] . *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1030–1037.
- [31] LONARDO E, HERMANN P C, HEESCHEN C. Pancreatic cancer stem cells – update and future perspectives [J] . *Mol Oncol*, 2010, 4(5): 431–442.
- [32] BHAGWANDIN V J, SHAY J W. Pancreatic cancer stem cells: fact or fiction? [J] . *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(4): 248–259.
- [33] HERMANN P C, HUBER S L, HERRLER T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer [J] . *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3): 313–323.
- [34] IMMERSVOLL H, HOEM D, SAKARIASSEN P O, et al. Expression of the “stem cell marker” CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas [J] . *BMC Cancer*, 2008, 8: 48.
- [35] MAEDA S, SHINCHI H, KURAHARA H, et al. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer [J] . *Br J Cancer*, 2008, 98(8): 1389–1397.
- [36] KEMPER K, SPRICK M R, DE BREE M, et al. The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation [J] . *Cancer Res*, 2010, 70(2): 719–729.
- [37] SHMELKOV S V, BUTLER J M, HOOPER A T, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133– metastatic colon cancer cells initiate tumors [J] . *J Clin Invest*, 2008, 118(6): 2111–2120.
- [38] SINGH S K, CLARKE I D, TERASAKI M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J] . *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821–5828.
- [39] RASHEED Z A, YANG J, WANG Q, et al. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma [J] . *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(5): 340–351.
- [40] DENG S, YANG X, LASSUS H, et al. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers [J] . *PLoS One*, 2010, 5(4): 10277.
- [41] OLEMPKA M, EISENACH P A, AMMERPOHL O, et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines [J] . *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(1): 92–97.
- [42] GOU S, LIU T, WANG C, et al. Establishment of clonal colony-forming assay for propagation of pancreatic cancer cells with stem cell properties [J] . *Pancreas*, 2007, 34(4): 429–435.
- [43] ZHOU J, WANG C Y, LIU T, et al. Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer [J] . *World J Gastroenterol*, 2008, 14(6): 925–930.
- [44] SZOTEK P P, PIERETTI-VANMARCKE R, MASIAKOS P T, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and mullerian inhibiting substance responsiveness [J] . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(30): 11154–11159.
- [45] LI L, NEAVES W B. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters [J] . *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4553–4557.
- [46] MUELLER M T, HERMANN P C, WITTHAUER J, et al. Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer [J] . *Gastroenterology*, 2009, 137(3): 1102–1113.
- [47] INOKI K, CORRADETTI M N, GUAN K L. Dysregulation of the TSC–mTOR pathway in human disease [J] . *Nat Genet*, 2005, 37(1): 19–24.
- [48] YILMAZ OH, VALDEZ R, THEISEN B K, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukemia-initiating cells [J] . *Nature*, 2006, 441(7092): 475–482.
- [49] KALLIFATIDIS G, LABSCH S, RAUSCH V, et al. Sulforaphane increases drug-mediated cytotoxicity toward cancer stem-like cells of pancreas and prostate [J] . *Mol Ther*, 2011, 19(1): 188–195.
- [50] RAUSCH V, LIU L, KALLIFATIDIS G, et al. Synergistic activity of sorafenib and sulforaphane abolishes pancreatic cancer stem cell characteristics [J] . *Cancer Res*, 2010, 70(12): 5004–5013.
- [51] FU J, RODOVA M, ROY S K, et al. GANT-61 inhibits pancreatic cancer stem cell growth in vitro and in NOD/SCID/IL2R gamma null mice xenograft [J] . *Cancer Lett*, 2013, 330(1): 22–32.
- [52] JI Q, HAO X, ZHANG M, et al. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells [J] . *PLoS One*, 2009, 4(8): 6816.
- [53] BURK U, SCHUBERT J, WELLNER U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells [J] . *EMBO Rep*, 2008, 9(6): 582–589.
- [54] HERBERT B S, GELLERT G C, HOCHREITER A, et al. Lipid modification of GRN163, an N3’ →P5’ thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition [J] . *Oncogene*, 2005, 24(33): 5262–5268.

(收稿日期: 2013-03-10 修回日期: 2013-04-15)