

乳腺癌干细胞标志物研究进展*

郑利华 综述, 庞 博, 刘贵建[△] 审校

(中国中医科学院广安门医院检验科, 北京 100053)

摘 要: 乳腺癌的复发和转移使其临床治疗难以取得令人满意的效果, 肿瘤干细胞(CSCs)理论的提出为研究、治疗乳腺癌提供了新的思路。乳腺癌干细胞(BCSCs)具有多向分化、自我更新和耐药性等特征, 在乳腺癌的发生、发展以及耐药、转移、复发等过程中起着重要的作用, 是治疗乳腺癌的新靶点。寻找灵敏度高、特异度强的 CSCs 标志物对鉴别、分离乳腺癌干细胞有重要的意义。该文综述了乳腺癌中比较公认 CSCs 标志物 CD44/CD24、ALDH1 及潜在的肿瘤干细胞标志物 CD133、GD2、CD49f、ANTXR1 的研究进展。

关键词: 乳腺癌; 肿瘤干细胞; 生物标志物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.08.021

文章编号: 1673-4130(2018)08-0970-05

中图法分类号: R737.9

文献标识码: A

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤。临床上主要采用手术、常规放射治疗和化学疗法来治疗乳腺癌, 但是居高不下的复发率和转移率使乳腺癌的治疗往往难以取得令人满意的效果。肿瘤干细胞(CSCs)理论认为 CSCs 是癌症的根源, 肿瘤生长是由隐藏在癌细胞中的少量 CSCs 所驱动, 具有多向分化、自我更新、耐药等基本特征^[1]。这一理论解释了临床上首次放化疗成功后, 肿瘤常常出现复发、肿瘤休眠和转移的现象。深入研究乳腺癌干细胞(BCSCs)相关的生物标志物, 才能正确识别、分离、鉴定 BCSCs, 为深入研究和建立更有效的乳腺癌治疗方法提供新的思路 and 依据。

1 CSCs 生物学特性及分离鉴定技术

1.1 CSCs 及生物学特性 干细胞是具有自我更新能力和多分化潜能的一类细胞。干细胞处于细胞等级的顶端, 通常处于静止状态, 很少分裂。分裂时, 干细胞以不对称分裂的方式进行, 产生一个分裂活跃的子细胞和一个新的静止的干细胞。因此, 干细胞具有自我更新的独特能力, 并且寿命较长。CSCs 具有干细胞的一般特征, 能进行自我更新, 多处于静止状态, 具有类似的分化潜能, 具有相似的表面抗原。

相对于普通肿瘤细胞, CSCs 具有以下几个特征。首先, CSCs 只占肿瘤体积的极少部分, 而它却是促进肿瘤长期生长的源头, 大部分的肿瘤体积是由非肿瘤干细胞构成的, 这些非肿瘤干细胞只能短暂增殖, 不能促进肿瘤体积的长期增长。其次, 极少数量的 CSCs 就能在异体移植实验中形成肿瘤, 而同样数量的普通肿瘤细胞却不能形成肿瘤。最后, CSCs 对常规的化疗和放射治疗具有抗性, 常规放化疗优先杀死

普通肿瘤细胞, 这也是多种肿瘤疾病治疗后复发的原因。

1.2 CSCs 的鉴定与分离 目前, BCSCs 的鉴定只能从功能学的角度进行分析。体外通过观察 CSCs 是否具有自我更新和增殖能力、能否无血清培养成球、是否具有多项分化的潜能来评价其是否属于干细胞; 体内通过在免疫缺陷的小鼠体内接种低数量级的 BCSCs 进行异种移植实验以分析其体外克隆形成潜力和体内致瘤性。后者是评估 BCSCs 活动性, 鉴定 BCSCs 的黄金标准。

现在, 最有效的识别和富集 BCSCs 的技术主要包括侧群(SP)染料排除法、乙醛脱氢酶(ALDH)活性鉴定、无血清培养成球法、PKH 染色法以及细胞表面标志物分选法。

1.2.1 SP 染料排除法 SP 染料排除原理是干细胞内 ATP 结合转运蛋白(如 ABCG2、BCRP1)的表达增加, 使其具有排出亲脂性染料(如 Rhodamine、Hoechst)的能力。利用 CSCs 对荧光亲脂性染料拒染或淡染这一特性, 通过具有紫外或近紫外激光激发装置的流式细胞仪就可以将这部分干细胞检测或分选出来。据报道, 在骨髓、正常的实体组织、肿瘤和各种癌细胞系中已经发现了 SP 细胞^[2]; 而在人和小鼠的乳腺上皮细胞中, SP 细胞被证实含有干细胞样群体^[3]。应用 SP 染料排除法在不同类型的人乳腺癌细胞中均发现了 SP 细胞的存在, 并且这些拒染或淡染的 SP 细胞具有更强的致瘤性^[4-5]。

1.2.2 ALDH 活性鉴定 BCSCs 还能通过 Aldefluor 分析将其从乳腺癌细胞中分离出来。ALDH 是一种醛脱氢酶, 它通过维甲酸代谢在干细胞分化中发挥

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81641192)。

[△] 通信作者, E-mail: liugujian@gamyy.cn。

本文引用格式: 郑利华, 庞博, 刘贵建. 乳腺癌干细胞标志物研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(8): 970-974.

重要作用^[6]。市售 Aldefluor 试剂盒使用含荧光标记的底物,能在 ALDH 存在的条件下发生酶促反应。表达高 ALDH 活性的细胞具有较亮的荧光,可以使用流式细胞荧光分选技术(FACS)将其从混合的细胞群中分离出来。Aldefluor 分析已被用于许多不同癌症的鼠和人类干/祖细胞群。现在已经在包括乳腺癌^[7]在内多种癌症中发现了具有干性的 ALDH 阳性细胞群体。

1.2.3 无血清培养成球法 使用 B27、氢化可的松、胰岛素、成纤维细胞生长因子(FGF)和表皮生长因子(EGF)等营养物质代替血清,在低吸附培养皿中培养 CSCs 形成干细胞球^[8]。由于在此环境下分化的细胞难以存活,因此可以达到提高干细胞比例的目的。当给予血清和细胞外基质如胶原蛋白时,从肿瘤球中分离的细胞会表现出多谱系分化潜能。

1.2.4 PKH 染色法 PKH 染色是一种依据细胞膜标记保留检测对 CSCs 进行体外研究 CSCs 的方法。该方法使用的 PKH 荧光染料能与细胞膜的脂质双层不可逆结合,并且会随细胞分裂而均匀分配到子细胞中^[9]。所以,染料的荧光强度会随着每一次的细胞周期而呈指数级下降^[10]。CSCs 常常通过不对称分裂进行自我更新,形成新的干细胞和子细胞。在不对称细胞分裂后,干细胞进入静止状态,而子细胞经历快速增殖和分化。因此,干细胞保留了 PKH 染料,可以通过流式细胞术鉴定和分离。将乳腺癌细胞用 PKH 染色,进行无血清培养,成球后消化并分选为 PKH 高、低或负细胞群。检测这几个细胞群的致瘤能力,只有 PKH 高的细胞群被发现富集干细胞活性,具有致瘤性^[11]。由于 PKH 染色法是依据干性将 CSCs 与普通肿瘤分离出来;因此,该方法与其他干细胞表征分析相结合以验证干细胞表型时最为有用。

1.2.5 表面标志物分选法 利用流式细胞仪或免疫磁珠法对结合特异抗体的干细胞表面标志物进行分选。经荧光抗体标记的细胞在合适的激发光下发出荧光后,经流式细胞仪分选。免疫磁珠法的原理则是利用细胞表面抗原能与连接有磁珠的特异性单抗相结合的原理。在外加磁场的作用下,与抗体相结合的细胞被吸附而滞留磁场,从而使细胞得以分离。该方法需要寻找合适的表面标志物,在分化的肿瘤细胞上不表达或者低表达的特异性 CSCs 标志物。

2 BCSCs 标志物

2003 年有研究者首次从人乳腺癌细胞中分离出具有 CD44⁺CD24^{-/low}表型的细胞并进行异种移植实验形成乳腺肿瘤,证明 CD44⁺CD24^{-/low}表型的细胞具有 BCSCs 表型^[12]。自此,人们对乳腺癌组织和人乳腺癌细胞系中的 BCSCs 标志物进行了广泛的研究。

2.1 CD44⁺/CD24⁻ CD44 为分布极为广泛的细胞

表面跨膜糖蛋白,在细胞分裂、迁移、黏附和信号传导中具有多种功能。CD44 通过与透明质酸结合介导细胞-细胞和细胞-细胞外基质的相互作用^[13],主要参与异质性黏附;而 CD24 是参与负调节趋化因子受体 CXCR4 活性的小糖蛋白,可以介导乳腺癌转移。

2003 年,ALHAJJ 等^[12]首先分离出人 BCSCs,这为实体肿瘤内存在 CSCs 提供了最直接的证据。研究者使用流式细胞术将来自乳腺癌患者的癌细胞,根据 4 种细胞表面标志物分选为每个标志物表达或不表达的细胞群。4 种细胞标志物是黏附分子 CD44、CD24、乳腺癌或卵巢癌特异性标记 B38.1 和上皮特异性抗原(ESA)。然后将不同的细胞亚群注射到非肥胖性糖尿病/严重联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠的乳腺脂肪垫。结果显示,仅仅 1 000 个 CD44⁺CD24^{-/low}细胞就能形成肿瘤,而其他细胞亚群即使数量达到 2 万也未能形成肿瘤。这说明 CD44⁺CD24^{-/low}细胞的成瘤能力是未分类细胞的 10~50 倍。而且进一步实验发现,在继发性肿瘤中 CD44⁺CD24^{-/low}细胞保持了致瘤性,并产生了其他表型的肿瘤细胞。这表明 CD44⁺CD24^{-/low}致瘤的癌细胞发生了类似于正常干细胞的自我更新和分化过程。目前,CD44⁺/CD24⁻表型已经被广泛应用于 BCSCs 的识别^[14-15]。

2.2 ALDH ALDH 是醛脱氢酶家族成员之一,在哺乳动物的发育过程及体内稳态维持中起着重要作用,被广泛用作各种癌症的标志物。ALDH 可能通过将视黄醇氧化为视黄酸,在干细胞的早期分化中起作用^[16]。ALDH 在干细胞中表达增高,在干细胞的“干性”维持和分化中起着重要作用,同时可以保护干细胞免受内源性毒物和外源性药物的伤害。随着 CSCs 研究的兴起,发现 ALDH 在 CSCs 中高表达,与 CSCs 的放化疗抵抗相关。在多发性骨髓瘤^[17]和急性白血病^[18]的 CSCs 中发现 ALDH 活性增高。ALDH1 作为 BCSCs 标志物在 2007 年被 GINESTIER 等^[7]研究者首次提出,他们使用一种叫做 ALDEFLUOR 的试剂来检测细胞中的 ALDH 活性,ALDH 活性高的细胞会发出荧光并能被检测到,接着用流式细胞术将细胞分选为 ALDEFLUOR 阳性细胞和阴性细胞。研究者发现从正常乳腺上皮组织中分离的 ALDH 活性的细胞具有乳腺干细胞的表型和功能特征。从人乳腺肿瘤分离的 ALDEFLUOR 阳性细胞含有 CSCs 的特征,500 个 ALDEFLUOR 阳性细胞就能形成一个肿瘤;50 000 个 ALDEFLUOR 阴性细胞也不能形成肿瘤。分析 577 例乳腺癌患者组织中 ALDH1 的表达情况,发现这种标志物的表达是临床预后不良的有力预测指标。上述研究结果提示 ALDH1 可以作为 BCSCs 的标志物。当 ALDH1⁺与 CD44⁺/CD24^{-/low}表型共有时,ALDEFLUOR 阳性细胞的成瘤能力增加,仅仅 20 个这样的细胞就足以在动物中产生肿瘤。功

能性研究表明, ALDH1⁺ 细胞比 CD44⁺/CD24⁻/低细胞具有更强的克隆形成能力、体外成瘤和化疗耐药性^[19]。随后,更多的研究也证实了 ALDH1^[20], 包括 ALDH1A1^[21]、ALDH1A3^[22] 等可以作为有效的 BCSCs 标志物。

2.3 CD133(Prominin-1) CD133 是一种跨膜糖蛋白,具有 5 个跨膜区。最初 CD133 是作为造血干细胞的标志,后来在正常的非淋巴造血组织中也检测到 CD133 mRNA,并且发现了其与干细胞迁移和不对称分裂相关^[23]。目前 CD133 已经被检测到在非小细胞肺癌、脑癌、结肠癌及胶质母细胞瘤等多种实体瘤中过表达^[24]。LIU 等^[25]认为 CD133 表达可能有助于更准确地预测乳腺癌的侵袭能力并确定最合适的治疗方案。在 Brca1 相关的乳腺癌细胞系中,使用 CD133⁺ 作为标志物分选出的细胞具有 CSCs 特征,这些细胞能形成更多的克隆,增殖速度更快和体外成瘤更大^[26]。此外,在三阴性乳腺癌中,CD133 也可以用于体外鉴定 CSCs^[27] 和体内研究 CSCs^[28]。XIAO 等^[29]研究者报道了在 25 例炎性乳腺癌中有 22 例检测到 CD133 的表达。

2.4 神经节苷脂 GD2 GD2 是一种鞘糖脂,神经节苷脂是在所有脊椎动物细胞上表达的带有唾液酸的鞘糖脂。它们通过神经酰胺脂质锚定在质膜上,其不同的聚糖延伸到细胞外空间。其中神经节苷脂 GD2 和 GD3 在包括黑色素瘤、神经胶质瘤、神经母细胞瘤等神经外胚层来源的人肿瘤中高度表达,而在正常组织中低表达或表达。GD2 和 GD3 分别由它们的前体 GD3 和 GM3 分别通过 GD2 合成酶(GD2S)和 GD3 合成酶(GD3S)产生。2012 年,BATTULA 等^[30]研究者提出将神经节苷脂 GD2 作为一种新的特异性的细胞表面标志物来研究 BCSCs,并提出将 GD3S 作为 BCSCs 的潜在治疗靶标,可能改善乳腺癌患者的存活率。研究者根据 GD2 将乳腺癌细胞分为 GD2⁺ 和 GD2⁻ 两个亚群,体外成瘤实验发现移植 100、10 个 GD2⁺ 细胞亚群后产生的肿瘤数目分别为移植 GD2⁻ 细胞亚群的 2、10 倍,并且 GD2⁺ 细胞表现出与 CD44⁺CD24⁻ 细胞群体类似的干细胞特性。采用针对 GD3S 的小分子抑制剂抑制 GD2 的产生,导致总 GD2⁺ 细胞数量下降以及 CSCs 相关性显著降低。而 SARKAR 等^[31]使用 shRNA 或雷公藤内酯醇抑制 GD3S,结果显示可以抑制乳腺癌细胞系上皮-间质转化(包括 Snail、Twist 和 TGF- β 1 等)。众所周知,上皮-间质转化可以使癌细胞获得干细胞特性和转移潜能。这些研究说明了 GD2 和 GD3S 可以鉴定乳腺癌中的 CSCs,可能是潜在的 CSCs 标志物。

2.5 炭疽毒素受体 1(ANTXR1) ANTXR1 是一种跨膜蛋白,与脂蛋白受体相关蛋白 6(LRP6)相互作用来调节 Wnt 信号通路,与血管内皮生长因子受体 2

(VEGFR2)相互作用来调节 VEGF 的表达。此外,ANTXR1 选择性地表达在肿瘤血管中,并促进肿瘤血管生成。CHEN 等^[32]研究者发现在乳腺癌中,ANTXR1 通过其配体 C5A(一种胶原蛋白 VI α 3 的片段)调节 LRP6 和 Wnt 靶基因,并促进干细胞样表型,是一种正常干细胞和 BCSCs 富集的标志。ANTXR1 主要在基底样细胞系和少量管腔细胞系中表达,并对 ER α 阴性/基底乳腺癌具有预后影响。

2.6 CD49f(α 6 整联蛋白) 最近的一项研究显示,MEYER 等^[33]从雌激素受体(ER) α 阴性乳腺癌患者的肿瘤中分离出 CD44⁺CD24⁻ 和 CD44⁺CD24⁺ 细胞群在小鼠异种移植模型中具有致瘤性,且 CD44⁺CD49f^{high}CD133/2^{high} 亚型的细胞群能增强体内致瘤性,具有自我更新能力和异质性。CD49f 与 CD29(β 1 整联蛋白)或 CD104(β 4 整联蛋白)和结合层粘连蛋白,促进上皮细胞附着到细胞外基质。除了这种机械作用之外,CD49f 与受体酪氨酸激酶协同作用,在细胞和细胞外基质之间双向沟通。在正常小鼠^[34]和人^[35]乳腺中,只有 CD49f 阳性细胞具有体内再生能力。在乳腺癌中,CD49f 表达升高与生存率下降有关^[36],其配体 CD104 的降低会抑制体内致瘤性^[37]。在小鼠和人乳腺组织中,使用细胞表面标志物 CD49f (α 6 整联蛋白)和 CD29(β 1 整合蛋白)或 CD24(热稳定抗原)或 EpCAM(上皮特异性抗原)能富集乳腺干细胞。因此,CD49f⁺ 与 CD44⁺CD24^{-/low} 联用,可能可以更好地识别并富集不同乳腺癌亚型的 BCSCs。

2.7 其他标志物 除了上述这些标志物外,CD29、CD61、蛋白 C 受体(PROCR)^[38]、干细胞抗原-1(Scal-1)^[39]、上皮细胞黏蛋白 MUC1^[40]、Thy1^[41]、波形蛋白、骨连蛋白、细胞角蛋白 18(CK18)、转录因子 GATA3^[42]、CD24^{high}/CD49f^{high}/DNER^{high}、CD24^{high}/CD49f^{high}/DLL1^{high}、CD49f⁺DLL1^{high}/DNER^{high} 等表面标志物^[43]的细胞群体也在乳腺癌研究中表现出了一定的干性和致瘤能力,可作为潜在的 BCSCs 标志物深入研究。

3 小 结

自 1994 年在白血病中鉴定出 CSCs 后^[44],许多实体肿瘤(如乳腺癌、结直肠癌^[45]、头部肿瘤^[46])中也陆陆续续报道了 CSCs 的存在。近几年,在体内实验中,通过谱系追踪和细胞消融实验也进一步证实了 CSCs 的存在^[47-48]。这一理论和发现为这些癌症的创新治疗提供了一个新的思路:肿瘤治疗不仅要缩小肿瘤体积,更要消灭 CSCs,即这部分维持肿瘤长期生长的细胞群。如何正确识别这部分维持肿瘤长期生长的细胞群,CSCs 的识别和鉴定是其研究的关键之一。通过对细胞表面标志物的研究,可以将 CSCs 与普通肿瘤细胞区别开来,为动物模型的研究打下基础,同时也为乳腺癌的预防、靶向疗法和个体化疗法提供有

效的前进方向。在运用表面标志物对 BCSCs 进行分选时,其异质性也是人们研究的热点。用不同的表面标志物进行分选结果并不一致。研究者采用 CD44⁺/CD24⁻与 CD133 这两个不同的表面标志物对鼠乳腺癌细胞进行分选,发现这两个亚群之间没有重叠,但两者都具有干细胞特性^[27]。而 GINESTIER 等^[7]联合使用 CD44⁺/CD24⁻与 ALDH 两种标志进行共同筛选,发现 CD44⁺/CD24⁻/ALDH⁺的 BCSCs 具有更强的致瘤性,CD44⁺/CD24⁻/ALDH⁻的细胞却失去了致瘤性。这不仅说明了 ALDH 作为 BCSCs 标志物的重要性,也说明了两种标志物分选的异质性。CSCs 标志物中不同的表面标志物、分选方法及在不同类型的乳腺癌细胞中的异质性,提示寻找通用的单一 BCSCs 标志物具有较大的难度;而将不同的 BCSCs 标志物联合应用或者针对不同的乳腺癌的亚型并确定其相应的 CSCs 亚型可能将为乳腺癌靶向治疗提供更为准确的信息。

参考文献

- [1] BATTLE E, CLEVERS H. Cancer stem cells revisited [J]. *Nat Med*, 2017, 23(10): 1124.
- [2] HIRSCHMANNJAX C, FOSTER A E, WULF G G, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(39): 14228-14233.
- [3] ALVI A J, CLAYTON H, JOSHI C, et al. Functional and molecular characterisation of mammary side population cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2002, 5(1): R1.
- [4] NAKANISHI T, CHUMSRI S, KHAKPOUR N, et al. Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(5): 815-826.
- [5] BRITTON K M, EYRE R, HARVEY I J, et al. Breast cancer, side population cells and ABCG2 expression[J]. *Cancer Lett*, 2012, 323(1): 97-105.
- [6] STORMS R W, TRUJILLO A P, SPRINGER J B, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(16): 9118.
- [7] GINESTIER C, HUR M H, CHARAFE-JAUFFRET E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 555-567.
- [8] RDM MARCHIANO. Digestive system cancer stem cells and tests and uses therefor[P]. US: 8357492, 2013.
- [9] DANGELO R C, WICHA M S. Stem cells in normal development and cancer[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2010, 95: 113.
- [10] KUSUMBE A P, BAPAT S A. Cancer stem cells and aneuploid populations within developing tumors are the major determinants of tumor dormancy[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(24): 9245.
- [11] CICALESE A, BONIZZI G, PASI C E, et al. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells[J]. *Cell*, 2009, 138(6): 1083-1095.
- [12] ALHAJJ M, WICHA M S, BENITOHERNANDEZ A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [13] THAPA R, WILSON G D. The importance of CD44 as a stem cell biomarker and therapeutic target in cancer[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016(6): 2087204.
- [14] CHENWEI L I, DAVID G H, PIERO D, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1030-1037.
- [15] MAROTTA L L C, ALMENDRO V, MARUSYK A, et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44⁺CD24⁻ stem cell-like breast cancer cells in human tumors[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(7): 2723-2735.
- [16] CHUTE J P, MURAMOTO G G, WHITESIDES J, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(31): 11707-11712.
- [17] MATSUI W, HUFF CA, WANG Q, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells [J]. *Blood*, 2004, 103(6): 2332-2336.
- [18] PEARCE D J, TAUSSIG D, SIMPSON C, et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(6): 752-760.
- [19] WOODWARD W A, KRISHNAMURTHY S, LODHI A, et al. Aldehyde dehydrogenase immunohistochemical staining in primary breast cancer cells independently predicted overall survival but did not correlate with the presence of circulating or disseminated tumors cells[J]. *J Cancer*, 2014, 5(5): 360-367.
- [20] RODRIGUEZ-TORRES M, ALLAN A L. Aldehyde dehydrogenase as a marker and functional mediator of metastasis in solid tumors[J]. *Clin Exp Met*, 2016, 33(1): 97-113.
- [21] MOREB J S. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2008, 3(4): 237-246.
- [22] QIU Y, PU T, GUO P, et al. ALDH(+)/CD44(+) cells in breast cancer are associated with worse prognosis and poor clinical outcome[J]. *Exp Mol Path*, 2016, 100(1): 145.
- [23] KOSODO Y, ROPER K, HAUBENSAK W, et al. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells

- [J], *Embo J*, 2004, 23(11):2314.
- [24] DA C P A, LOPES C. Implications of different cancer stem cell phenotypes in breast cancer[J]. *Anti Res*, 2017, 37(5):2173.
- [25] LIU Q, LI J G, ZHENG X Y, et al. Expression of CD133, PAX2, ESA, and GPR30 in invasive ductal breast carcinomas[J]. *Chinese Med J*, 2009, 122(22):2763-2769.
- [26] WRIGHT M H, CALCAGNO A M, SALCIDO C D, et al. Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics. [J]. *Breast Cancer Res Bcr*, 2008, 10(1):R10.
- [27] LIU T J, SUN B C, ZHAO X L, et al. CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(5):544.
- [28] ZHAO P, LU Y, JIANG X, et al. Clinicopathological significance and prognostic value of CD133 expression in triple-negative breast carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(5):1107-1111.
- [29] XIAO Y, YE Y, YEARSLEY K, et al. The lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer expresses a stem cell-like phenotype[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(2):561-574.
- [30] BATTULA V L, SHI Y, EVANS K W, et al. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis[J]. *J of Clin Invest*, 2012, 122(6):2066.
- [31] SARKAR T R, BATTULA V L, WERDEN S J, et al. GD3 synthase regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2015, 34(23):2958-2967.
- [32] CHEN D, BHAT-NAKSHATRI P, GOSWAMI C, et al. ANTXR1, a stem cell enriched functional biomarker, connects collagen signaling to cancer stem-like cells and metastasis in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(18):5821-5833.
- [33] MEYER M J, FLEMING J M, LIN A F, et al. CD44^{pos} CD49f^{hi} CD133/2^{hi} defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11):4624-4633.
- [34] STINGL J, EIREW P, RICKETSON I, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells [J]. *Nature*, 2006, 439(7079):993.
- [35] LIM E, VAILLANT F, DI W, et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers[J]. *Nat Med*, 2009, 15(8):907-913.
- [36] FRIEDRICHS K, RUIZ P, FRANKE F, et al. High expression level of $\alpha 6$ integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(4):901.
- [37] LIPSCOMB E A, SIMPSON K J, LYLE S R, et al. The alpha6beta4 integrin maintains the survival of human breast carcinoma cells in vivo[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23):10970-10976.
- [38] WANG D, CAI C, DONG X, et al. Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression[J]. *Nature*, 2015, 517(7532):81.
- [39] GRANGE C, LANZARDO S, CAVALLO F, et al. SCA-1 identifies the tumor-initiating cells in mammary tumors of BALB-neut transgenic mice[J]. *Neoplasia*, 2008, 10(12):1433-1443.
- [40] ENGELMANN K, SHEN H, FINN O J. MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1 [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7):2419.
- [41] CHO R W, WANG X, DIEHN M, et al. Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2):364-371.
- [42] PARK S Y, LEE H E, LI H, et al. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(3):876.
- [43] PECE S, TOSONI D, CONFALONIERI S, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content[J]. *Cell*, 2010, 140(1):62-73.
- [44] LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice [J]. *Nature*, 1994, 367(6464):645-648.
- [45] DICK J E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445(7123):106.
- [46] SINGH S K, HAWKINS C, CLARKE I D, et al. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. *Nature*, 2004, 432(7015):396.
- [47] DRIESENS G, BECK B, CAAUWE A, et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis[J]. *Nature*, 2012, 488(7412):527-530.
- [48] SCHEPERS A G, SNIPPERT H J, STANGE D E, et al. Lineage tracing reveals Lgr5⁺ stem cell activity in mouse intestinal adenomas [J]. *Science*, 2012, 337(6095):730-735.