

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.005

KLF4 对肿瘤干细胞自我更新和增殖潜能的影响

贾勇圣^{1,2}, 张文健², 刘虹麟², 彭亮², 杨治华³, 娄晋宁² (1. 中国医学科学院北京协和医学院研究生院, 北京 100073; 2. 中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029; 3. 中国医学科学院肿瘤研究所, 北京 100021)

[摘要] 目的: 分析 Krüppel 样因子 4 (Krüppel-like factor 4, KLF4) 对肿瘤干细胞 T3A-A3 自我更新和增殖能力的影响。方法: 构建靶向干扰 *KLF4* 的慢病毒载体 pLVTHM-shKLF4, 利用前期实验分离与鉴定的肿瘤干细胞 T3A-A3, 应用 RT-PCR 和 Western blotting 分别检测 pLVTHM-shKLF4 感染后 T3A-A3 细胞中 *KLF4* mRNA 和蛋白的表达。细胞球形成实验检测 pLVTHM-shKLF4 感染对 T3A-A3 细胞自我更新的影响, 平板集落形成实验检测 T3A-A3 细胞的克隆形成能力, 流式细胞术检测 T3A-A3 细胞周期变化。裸鼠皮下移植瘤实验观察 pLVTHM-shKLF4 干扰 *KLF4* 表达后对 T3A-A3 细胞移植瘤生长的影响。结果: 与肝癌细胞 BEL-7402、HepG2 相比, 肿瘤干细胞 T3A-A3 表达更高水平的 *KLF4*; pLVTHM-shKLF4 感染能够在 mRNA 和蛋白水平下调 T3A-A3 细胞中 *KLF4* 的表达。pLVTHM-shKLF4 感染的 T3A-A3 细胞形成细胞球的直径明显小于对照病毒的 pLVTHM-shNC 感染的 T3A-A3 细胞 [(104.33 ± 16.28) vs (186.67 ± 28.15) μm, $P < 0.01$], pLVTHM-shKLF4 感染细胞形成的细胞克隆数目明显少于对照细胞 [(83.5 ± 7.78) vs (125 ± 9.19) 个, $P < 0.01$], pLVTHM-shKLF4 感染的 T3A-A3 细胞 G₁ 期比例明显升高 [(39.65 ± 4.03)% vs (29.35 ± 1.00)% , $P < 0.01$]。pLVTHM-shKLF4 感染的 T3A-A3 细胞的移植瘤生长速度较对照细胞移植瘤明显减慢 [细胞接种 33 d, (46.14 ± 12.94) vs (228.12 ± 94.86) mm³, $P < 0.01$]。结论: 干扰 *KLF4* 的表达可抑制肿瘤干细胞 T3A-A3 的自我更新及其在体内外的增殖潜能。

[关键词] Krüppel 样因子 4 (KLF4); RNA 干扰; 肝癌; 肿瘤干细胞; T3A-A3; 自我更新; 增殖

[中图分类号] R735.7; Q279 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2011)04-0368-05

Effect of *KLF4* on self-renewal and proliferation potential of tumor stem cells

JIA Yong-sheng^{1,2}, ZHANG Wen-jian², LIU Hong-lin², PENG Liang², YANG Zhi-hua³, LOU Jin-ning² (1. Graduate School, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100073, China; 2. Institute of Clinical Medical Sciences, China - Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 3. Institute of Cancer, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Krüppel-like factors 4 (KLF4) on self-renewal and proliferation potential of tumor stem cells (T3A-A3). **Methods:** A lentiviral vector carrying shRNA targeting *KLF4* (pLVTHM-shKLF4) was constructed. Tumor stem cells (T3A-A3 cells) were isolated from a human hepatocarcinoma and were identified in our previous study. The expression of *KLF4* mRNA and protein in T3A-A3 cells was analyzed by RT-PCR and Western blotting analysis after pLVTHM-shKLF4 infection. Self-renewal ability of T3A-A3 cells was evaluated by tumor sphere formation assay after pLVTHM-shKLF4 infection; clonogenic assay was used to determine the clonogenic ability of T3A-A3 cells; and cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry. Influence of *KLF4* knockdown on the growth of T3A-A3-transplanted tumors was examined in xenograft model of nude mice. **Results:** T3A-A3 expressed higher level of *KLF4* than human hepatocarcinoma cell line Bel-7402 and HepG2. pLVTHM-shKLF4 infection significantly decreased the expression of *KLF4* mRNA and protein in T3A-A3 cells. The formed tumor spheres of T3A-A3 cells were significantly smaller in pLVTHM-shKLF4 infection group compared with that in the pLVTHM-shNC control group [(104.33 ± 16.28) μm vs (186.67 ± 28.15) μm, $P < 0.01$]. pLVTHM-shKLF4 infection significantly inhibited the number of T3A-A3 cell-

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2009CB521804)。Project supported by the Major National Basic Research Development Program (973 program) of China(No. 2009CB521804)

[作者简介] 贾勇圣(1979-),男,河北省张家口市人,博士生,主要从事分子肿瘤学研究。E-mail: Jiays@yahoo.com

[通信作者] 娄晋宁(LOU Jin-ning, corresponding author), E-mail: Lou.j@mail.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110714.1100.004.html>

colonies compared with control group (83.5 ± 7.78 vs 125 ± 9.19 , $P < 0.01$). Flow cytometry analysis showed that pLVTHM-shKLF4 infection significantly increased G_1 population when compared with the control vector ($[39.65 \pm 4.03]\%$ vs $[29.35 \pm 1.00]\%$, $P < 0.01$). Furthermore, the growth of T3A-A3-transplanted tumors in pLVTHM-shKLF4 infection group was significantly slower than that in the control group (33 days after cell inoculation, $[46.14 \pm 12.94]$ vs $[228.12 \pm 94.86]$ mm³, $P < 0.01$). **Conclusion:** KLF4 knockdown can inhibit the self-renewal of tumor stem cells (T3A-A3 cells), and inhibit the proliferation potential of T3A-A3 both *in vitro* and *in vivo*.

[**Key words**] Krüppel-like factor 4 (KLF4); RNA interference; hepatocellular carcinoma; tumor stem cell; T3A-A3; self renewal; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(4): 368-372]

Krüppel 样因子 4(Krüppel-like factor 4, KLF4) 属于 KLF 家族,是真核生物中广泛存在的一类转录元件结合蛋白,通过羧基端 3 个连续锌指结构域结合靶基因启动子内 GC 富含序列以调控其转录^[1]。KLF4 功能多样,与正常组织细胞的生长^[2]、分化^[3]以及凋亡^[4]有关;在肿瘤组织中,KLF4 可以通过与不同靶基因的作用,发挥癌基因^[5]或抑癌基因^[6]两种完全相反的作用。最近研究^[7]发现,KLF4 与干细胞自我更新有关,但是尚不清楚在肿瘤干细胞中 KLF4 是否起到相似作用。靶向肿瘤干细胞药物有望成为降低癌症的复发和提高其治愈率的新药物^[8-9]。肿瘤干细胞无限增殖潜能和自我更新的分子机制还不清楚,调控肿瘤干细胞多向分化潜能的机制也未完全阐明^[10-11]。最近研究^[12]发现乳腺癌干细胞高表达 KLF4。本研究探讨肝癌来源的肿瘤干细胞是否表达 KLF4 以及 KLF4 对肿瘤干细胞自我更新和增殖能力的影响,为靶向肿瘤干细胞的治疗研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

分离人肝癌组织肿瘤干细胞,经单细胞克隆纯化后,获得了体外增殖能力最快、裸鼠体内成瘤能力最强且具有干细胞特征的肿瘤干细胞 T3A-A3^[13]。T3A-A3 细胞培养在无血清的 DMEM 培养基中[添加 B27(1:50)、20 ng/ml hEGF、20 ng/ml bFGF、40 U/ml 肝素、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、5 μg/ml 胰岛素和 0.5 μg/ml 氢化可的松]。HEK 293T 细胞和人肝癌 BEL-7402、HepG2(由我室保存)细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。

质粒抽提试剂盒购自 Promega 公司,KLF4 抗体购自 Santa Cruz 公司,B27、hEGF 购自 Invitrogen 公司,β-actin 抗体、LIF、肝素、谷氨酰胺、青霉素、链霉素、胰岛素、氢化可的松购自 Sigma 公司,bFGF 购自

R&D Systems 公司,BamH I 和 EcoR I 内切酶购自 Fermentas 公司,Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。BALB/c 裸鼠 30 只雌性,5~6 周龄,购自北京协和医学院动物研究所(实验动物合格证号:SCXK 京 2009-0004)。

1.2 pLVTHM-KLF4 慢病毒载体的构建

KLF4 干扰序列为 GGACGGCTGTGGATGGAAA^[14],将 BamH I 和 EcoR I 双酶切的慢病毒质粒 pLVTHM 和双链干扰序列连接,制备靶向干扰 KLF4 表达的 shRNA 慢病毒质粒 pLVTHM-shKLF4,经 293T 细胞包装病毒颗粒后感染 T3A-A3 细胞。阴性干扰对照 pLVTHM-shNC 由 Kosik 教授惠赠,其无关干扰序列为 GCTTGTTCGTTGGTAACTACA^[15]。

1.3 RT-PCR 检测 pLVTHM-shKLF4 感染后 T3A-A3 细胞中 KLF4 mRNA 的表达

pLVTHM-shKLF4 和 pLVTHM-shNC 感染 T3A-A3 细胞 72 h,选取各组细胞 1×10^6 个,提取细胞总 RNA。取 1 μg 总 RNA,按照 Promega 反转录试剂盒说明进行反转录合成 cDNA 第一链。PCR 引物由上海英俊公司合成,KLF4 上游引物为 5'-CCCAAT-TACCCATCCTTCCT-3',下游引物为 5'-AGTTTCT-CACCTGTGTGGG -3',扩增片段 240 bp。以 β-actin 基因为内参,β-actin 上游引物为 5'-AACAAGAT-GAGATTGGCATGG-3',下游引物为 5'-AGTGGGGT-GGCTTTTAGGAT-3',扩增片段 251 bp。扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色观察,凝胶成像系统拍照电泳产物。

1.4 Western blotting 检测 pLVTHM-shKLF4 感染后 T3A-A3 细胞中 KLF4 蛋白的表达

pLVTHM-shKLF4 和 pLVTHM-shNC 感染 T3A-A3 细胞 72 h,分别提取细胞总蛋白,煮沸变性后进行 SDS-PAGE。然后将蛋白转印到 PVDF 膜上,使用兔抗 KLF4 抗体(1:500)或小鼠抗 β-actin 抗体(1:2 000)为一抗,辣根过氧化物酶标记抗兔(1:3 000)或辣根过氧化物酶标记抗小鼠 IgG 为二

抗(1:5 000)进行免疫标记,然后化学发光法显色。

1.5 细胞球形成实验检测细胞自我更新能力

将 pLVTHM-shKLF4 和 pLVTHM-shNC 感染的 T3A-A3 细胞以每孔 1 个细胞接种于低黏附 96 孔板,每组 10 复孔。30 d 后在荧光显微镜下观察细胞球(大于 50 μm 的计为 1 个细胞球),测量细胞球直径。

1.6 平板集落形成实验检测 pLVTHM-shKLF4 感染后 T3A-A3 细胞的克隆形成能力

pLVTHM-shKLF4 和 pLVTHM-shNC 感染 T3A-A3 细胞 72 h,将每组细胞以 1 × 10³/孔密度接种于 6 孔板,每组 3 孔。培养 10 d,PBS 清洗后加纯甲醇 1 ml 固定 15 min,结晶紫染色,倒置显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。

1.7 流式细胞术检测 pLVTHM-shKLF4 感染后 T3A-A3 细胞周期的变化

分别收集 pLVTHM-shKLF4 和 pLVTHM-shNC 感染 72 h 后的 T3A-A3 细胞,70% 冰乙醇 -20 °C 固定过夜,PBS 充分洗涤后,细胞重悬于 100 μl 的 RNA 酶(200 μg/ml)中,37 °C 反应 30 min,加入 50 μg/ml 的碘化丙啶(PI)400 μl,室温避光反应 30 min。1 h 内流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.8 裸鼠皮下移植瘤实验

18 只裸鼠随机分成 3 组,分别将 HepG2、BEL-7402、T3A-A3 细胞接种于裸鼠背部皮下,每只接种为 6 × 10⁶ 个细胞,30 d 后用游标卡尺测量肿瘤的长短径,按公式计算肿瘤体积。V(mm³) = 1/2ab², a 为肿瘤长径,b 为肿瘤短径。

12 只裸鼠随机分成 2 组,分别将 pLVTHM-sh-KLF4 和 pLVTHM-shNC 感染的 T3A-A3 细胞接种于裸鼠背部右侧皮下,每只接种 2 × 10⁶ 个细胞,每 3 d 用游标卡尺测量皮下肿瘤的长短径,计算肿瘤体积。33 d 后终止实验,并绘制肿瘤生长曲线。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 软件,组间比较采用 t 检验,P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤干细胞和肝癌细胞中 KLF4 的表达

RT-PCR(图 1A)和 Western blotting(图 1B)结果显示,KLF4 mRNA 和蛋白在肝癌细胞系中表达水平不一,在 BEL-7402 细胞中表达较高,而在 HepG2 细胞中表达较低,但是在 T3A-A3 肿瘤干细胞中的表达明显高于 BEL-7402 和 HepG2 细胞。灰度分析表明,T3A-A3 中 KLF4 mRNA 表达是 BEL-7402 的

1.05 倍;KLF4 蛋白表达是 BEL-7402 的 1.22 倍,是 HepG2 细胞的 25.94 倍。裸鼠皮下接种后,T3A-A3 细胞移植瘤体积最大,BEL-7402 细胞其次,HepG2 细胞未见肿瘤形成(图 1C)。由此可见,KLF4 的表达水平与肝癌细胞的成瘤能力存在一定的相关性。

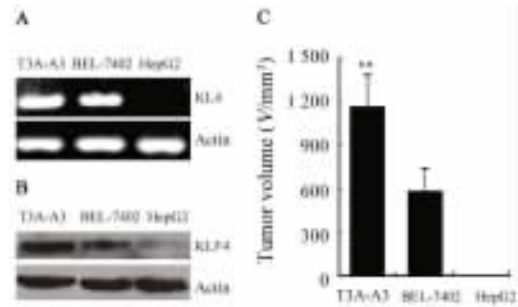


图 1 肿瘤干细胞和肝癌细胞中 KLF4 表达的比较

Fig. 1 Comparison of KLF4 expression in tumor stem cells and hepatocarcinoma cell lines

A: RT-PCR detection the expression of KLF4 mRNA; B: Western blotting detection the expression of KLF4 protein; C: Grafted tumor formed by tumor stem cells and hepatocarcinoma cell lines in nude mice ** P < 0.01 vs BEL-7402

2.2 pLVTHM-shKLF4 感染干扰 T3A-A3 细胞中 KLF4 的表达

pLVTHM-shKLF4 感染 T3A-A3 细胞 72 h 后,KLF4 mRNA(图 2A)和蛋白水平(图 2B)的表达较 pLVTHM-shNC 感染组均降低。灰度分析表明,KLF4 mRNA 表达量减少(81 ± 7.2)%,KLF4 蛋白表达量减少(77 ± 5.6)%。由此可见,慢病毒 pLVTHM-shKLF4 可以有效地在 mRNA 和蛋白水平干扰 T3A-A3 细胞中 KLF4 的表达。

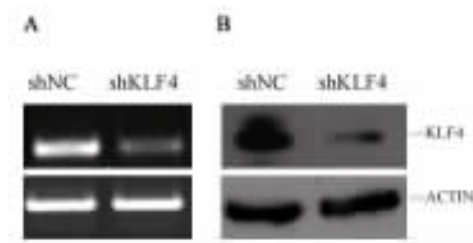


图 2 pLVTHM-shKLF4 感染干扰 T3A-A3 细胞中 KLF4 mRNA(A)和蛋白(B)的表达

Fig. 2 pLVTHM-shKLF4 infection down-regulated expression of KLF4 mRNA and protein in T3A-A3 cells

A: RT-PCR for the expression of KLF4 mRNA; B: Western blotting for the expression of KLF4 protein

2.3 干扰 *KLF4* 的表达抑制 T3A-A3 细胞自我更新
 在无血清的低黏附细胞培养板中培养形成细胞球,保持细胞不分化状态,可反映肿瘤干细胞的自我更新能力^[16]。单细胞成球实验结果(图3)表明,培养30 d后,pLVTHM-shKLF4 感染组 T3A-A3 细胞球的直径明显小于 pLVTHM-shNC 感染组[(104.33 ± 16.28) vs (186.67 ± 28.15) μm, *P* < 0.01]。说明 pLVTHM-sh-KLF4 感染可抑制 T3A-A3 细胞的自我更新能力。

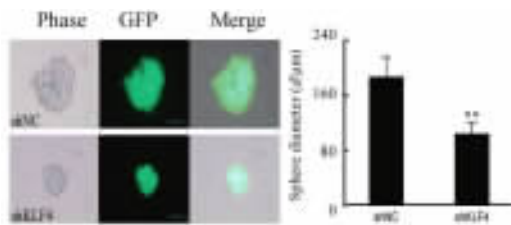


图3 干扰 *KLF4* 表达对 T3A-A3 细胞成球能力的影响 (×200)

Fig.3 Effect of *KLF4* knockdown on tumosphere formation of T3A-A3 cells(×200)

** *P* < 0.01 vs shNC

2.4 干扰 *KLF4* 的表达抑制 T3A-A3 细胞克隆形成

平板集落形成实验结果表明,接种10 d后 pLVTHM-shKLF4 组 T3A-A3 细胞形成的细胞克隆数明显少于 pLVTHM-shNC 组[(83.5 ± 7.78) vs (125 ± 9.19)个, *P* < 0.01],说明 pLVTHM-shKLF4 感染干扰 *KLF4* 的表达可抑制 T3A-A3 细胞的克隆形成能力。

2.5 干扰 *KLF4* 表达致使 T3A-A3 细胞 G₁ 期阻滞

流式术结果(图4)显示,pLVTHM-shKLF4 组 T3A-A3 细胞 G₁ 期比例较 pLVTHM-shNC 组明显增加[(39.65 ± 4.03)% vs (29.35 ± 1.00)% , *P* < 0.01],可见干扰 *KLF4* 表达使 T3A-A3 细胞 G₁ 期细胞阻滞。

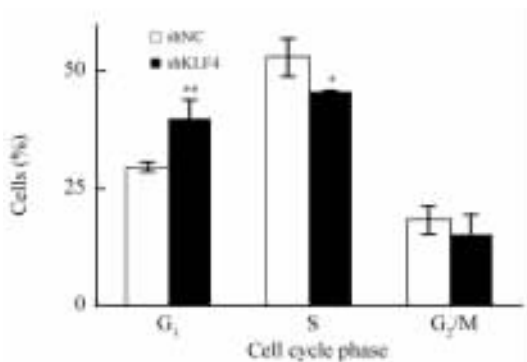


图4 干扰 *KLF4* 的表达对 T3A-A3 细胞周期的影响

Fig.4 Effect of *KLF4* knockdown on cell cycle distribution of T3A-A3 cells

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs shNC

2.6 干扰 *KLF4* 的表达抑制 T3A-A3 细胞裸鼠移植瘤的生长

pLVTHM-shKLF4 感染组 T3A-A3 细胞移植瘤肉眼可见时间为细胞接种后21 d,而 pLVTHM-shNC 组在细胞接种15 d时就发现肿瘤形成。接种33 d后,与对照组相比,pLVTHM-shKLF4 组移植瘤体积明显缩小[(46.14 ± 12.94) vs (228.12 ± 94.86) mm³, *P* < 0.01]。由此可见,干扰 *KLF4* 的表达可以抑制 T3A-A3 细胞移植瘤的形成和生长(图5)。

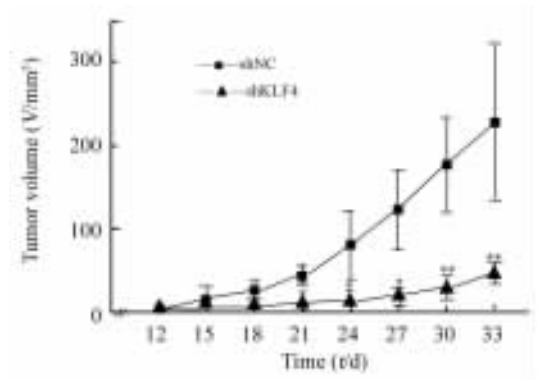


图5 干扰 *KLF4* 表达对 T3A-A3 细胞裸鼠移植瘤生长的影响

Fig.5 Influence of *KLF4* knockdown on growth of T3A-A3 cell-transplanted tumors in nude mice

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs shNC

3 讨论

近年来肿瘤干细胞理论的提出为肿瘤发生学和治疗学提供了重要的线索^[17],对肿瘤干细胞的深入研究将为肿瘤靶向治疗提供理论指导^[9]。本课题组前期研究中从一例人原发性肝癌组织的微血管内皮细胞中获得了一株生长速度最快、成瘤能力最强的单细胞克隆(命名为 T3A-A3 细胞)。该细胞表达经典的干细胞标志性分子和 iPS(induced pluripotent stem cell)相关基因,具有很强的自我更新能力(已传代超过130代);还具有肿瘤细胞的特性:为多倍体染色体核型,在免疫缺陷小鼠接种1 000个细胞即可成瘤,且在成瘤2个月内可发生多处转移;应用人黑素瘤细胞、淋巴瘤细胞制备的条件培养基进行诱导分化,该细胞在诱导后分别表达了这两种肿瘤细胞的特异标志 gp100 和 CD10,提示 T3A-A3 细胞具有多向分化的潜能^[13,18]。

T3A-A3 细胞不仅表达经典的干细胞标志,而且高表达 *KLF4*。为分析 *KLF4* 在肿瘤干细胞中的作用,本研究首先比较了 T3A-A3 细胞与高成瘤肝癌细胞株 BEL-7402 和弱成瘤肝癌细胞株 HepG2 中 *KLF4* 的表达情况,结果发现,T3A-A3 细胞中 *KLF4*

表达水平最高,且 KLF4 的表达水平与细胞的成瘤能力存在一定的相关性。

肿瘤的一个特征是能够无限地增殖^[19]。肿瘤干细胞通过不对称分裂的方式一分为二:一个是肿瘤干细胞,一个是肿瘤细胞,实现肿瘤干细胞的自我更新。本实验发现,干扰 T3A-A3 细胞中 *KLF4* 的表达后,T3A-A3 细胞形成细胞球的直径明显小于对照组细胞,表明 *KLF4* 在肝癌干细胞的自我更新中发挥重要作用。进一步研究干扰 *KLF4* 的表达后 T3A-A3 细胞体外克隆形成能力和体内肿瘤生长速度,结果发现,干扰 *KLF4* 的表达后 T3A-A3 细胞的形成能力和裸鼠皮下移植瘤生长速度较对照组明显降低,并且 *KLF4* 干扰组 T3A-A3 细胞裸鼠成瘤时间明显延长。进一步检测发现,干扰 *KLF4* 的表达可以使 T3A-A3 细胞发生 G₁ 期阻滞,这可能是干扰 *KLF4* 表达抑制 T3A-A3 细胞增殖的机制之一。

有研究^[20]发现,*KLF4* 可以促进胚胎干细胞自我更新。本研究发现,*KLF4* 也是维持肝癌干细胞自我更新能力的重要因子。*KLF4* 调控干细胞自我更新的机制比较复杂,*KLF4* 可直接结合 *Nanog* 启动子近端区,与 *PBX1* 协同调控 *Nanog* 的表达,从而影响细胞的自我更新^[21]。此外,*Lefty1* 是参与胚胎干细胞自我更新的重要基因,*KLF4* 则可结合 *Lefty1* 基因启动子近端元件,与 *SOX2* 协同激活 *Lefty1* 表达^[20]。综上所述,在肝癌来源的肿瘤干细胞 T3A-A3 中高表达的 *KLF4* 与肿瘤干细胞的自我更新、快速增殖和体内成瘤密切相关,靶向 *KLF4* 可能是治疗肝癌的新策略。

[参 考 文 献]

- [1] Mahatan CS, Kaestner KH, Geiman DE, et al. Characterization of the structure and regulation of the murine gene encoding gut-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 4) [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(23): 4562-4569.
- [2] Yet SF, Mca' Nulty MM, Folta SC, et al. Human EZF, a Krüppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(2): 1026-1031.
- [3] Chen X, Whitney EM, Gao SY, et al. Transcriptional profiling of Krüppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation [J]. *J Mol Biol*, 2003, 326(3): 665-677.
- [4] Li Z, Zhao J, Li Q, et al. *KLF4* promotes hydrogen-peroxide-induced apoptosis of chronic myeloid leukemia cells involving the bcl-2/bax pathway [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15(6): 905-912.
- [5] Pandya AY, Talley LI, Frost AR, et al. Nuclear localization of *KLF4* is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(8): 2709-2719.
- [6] Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, et al. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2004, 23(2): 395-402.
- [7] Li Y, McClintick J, Zhong L, et al. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor *KLF4* [J]. *Blood*, 2005, 105(2): 635-637.
- [8] Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: An old idea—a paradigm shift [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4): 1883-1890, 1895-1896.
- [9] Karlic H, Herrmann H, Schulenburg A, et al. Tumor stem cell research-basis and challenge for diagnosis and therapy [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2010, 122(13/14): 423-436.
- [10] Milas L, Hittelman WN. Cancer stem cells and tumor response to therapy: Current problems and future prospects [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2009, 19(2): 96-105.
- [11] Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: Problems for therapy [J]? *J Pathol*, 2011, 223(2): 147-161.
- [12] Yu F, Li J, Chen H, et al. Krüppel-like factor 4 (*KLF4*) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion [J]. *Oncogene*, 2011, 30(18): 2161-2172.
- [13] 刘虹麟. 肿瘤干细胞向不同肿瘤细胞分化的实验研究 [D]. 北京: 北京协和医学院 & 中国医学科学院, 2009: 3-4.
- [14] Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The *KLF4* tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene [J]. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(11): 1074-1082.
- [15] Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, et al. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and *KLF4* and represses pluripotency in human embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2009, 137(4): 647-658.
- [16] Yu F, Yao H, Zhu P, et al. *Let-7* regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1109-1123.
- [17] Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12): 895-902.
- [18] Wu LQ, Zhang WJ, Niu JX, et al. Phenotypic and functional differences between human liver cancer endothelial cells and liver sinusoidal endothelial cells [J]. *J Vasc Res*, 2008, 45(1): 78-86.
- [19] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [20] Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, et al. *KLF4* cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the *Lefty1* core promoter in embryonic stem cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(20): 7772-7782.
- [21] Chan KK, Zhang J, Chia NY, et al. *KLF4* and *PBX1* directly regulate *NANOG* expression in human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(9): 2114-2125.

[收稿日期] 2011-05-20

[修回日期] 2011-06-20

[本文编辑] 王莹