

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.021

黑素瘤干细胞样细胞及其靶向治疗研究进展

Progress of malignant melanoma stem like cells and its targeted therapy

李崇鑫 综述; 宋鑫 审阅 (昆明医科大学第三附属医院 肿瘤生物治疗中心, 云南 昆明 650118)

[摘要] 近年来,黑素瘤的免疫治疗取得了较大的突破,提高了其临床疗效,成为当前研究热点。大量研究发现,黑素瘤中存在干性细胞,它们具有特殊的分子表型、信号通路和肿瘤微环境,与肿瘤的增殖、侵袭、转移、复发和化疗抵抗等密切相关,参与黑素瘤的发生发展。令人感兴趣的是,黑素瘤干细胞样细胞(melanoma tumor stem-like cells, MTSCs)代表了难治性和耐药性肿瘤细胞的主体,针对 MTSCs 的免疫治疗显示出较好的临床疗效和远期预后,成为黑素瘤免疫治疗的新方向。本文主要综述黑素瘤干细胞样细胞特异性表面标记分子及其分选方法、异常信号通路特征、免疫耐受性肿瘤微环境及其相关靶向免疫治疗的新进展,以期为研发黑素瘤免疫治疗新方法提供理论指导。

[关键词] 黑素瘤; 干细胞样细胞; 靶向免疫治疗

[中图分类号] R730.22; R739.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)01-0124-06

近年来,黑素瘤的临床治疗研究取得可喜进展^[1],美国 FDA 先后批准了多个靶点药物用于治疗晚期黑素瘤,例如 BRAF 抑制剂 vemurafenib 和 dabrafenib、MEK 抑制剂 trametinib、CTLA4 单抗 ipilimumab、免疫检查点抑制剂 PD-1/PD-L1 单抗 pembrolizumab/nivolumab 等均在黑素瘤中显示出较好的疗效,大大提高了患者的生存期^[2-3],奠定了免疫治疗在黑素瘤中的重要地位。新近研究^[4-5,7]发现,肿瘤干细胞样细胞(cancer stem-like cells, CSCs/tumor initiating cells, TICs)在黑素瘤的发生发展中发挥重要作用,靶向黑素瘤干细胞样细胞(melanoma tumor stem-like cells, MTSCs)的药物研究逐渐成为黑素瘤的热点研究方向。本文就 MTSCs 及其靶向治疗策略的新进展作一综述,以期进一步推动 MTSCs 的靶向治疗研究。

1 黑素瘤干细胞样细胞

黑素瘤是一类高度恶性的皮肤肿瘤,虽然其发病率不到皮肤恶性肿瘤的 5%,但死亡率却占所有皮肤肿瘤的 80%^[8],因此,如何有效提高黑素瘤的临床疗效成为研究热点。令人感兴趣的是,MTSCs 是黑素瘤发生发展的主导因素,这一新理念为黑素瘤的靶向治疗提供了新思路^[9]。肿瘤干细胞于 1994 年由 Lapidot 等^[10]在急性髓性白血病中首次报道,随后大量肿瘤干细胞样细胞相继在包括黑素瘤^[11]、乳腺癌^[12]、肺癌^[13]等多种实体瘤中相继被发现和鉴定。肿瘤干细胞是存在于肿瘤组织中的一小群具有干细胞特性的异质性细胞,它具有自我更新、

多向分化的潜能、高致瘤性和多药耐药等特性,同时它可以通过特定的表面标记来分选和鉴定,广泛用于肿瘤发生、侵袭转移、耐药及靶向免疫治疗等相关研究^[4]。

1.1 MTSCs 表面标记及其分选方法

黑素瘤干细胞样细胞最早于 2005 年由 Fang 等分离鉴定,该研究小组运用黑素瘤患者原代细胞和黑素瘤细胞系培养于人胚胎干细胞的培养基中,细胞形成不贴壁的肿瘤球(melanoma spheres)。与所有干细胞一样,这些黑素瘤肿瘤球细胞也具有增殖、分化、自我更新的能力;另一方面,他们具有更高的致瘤性,在 CD20⁺ 的细胞群中高度富集,这充分说明 CD20 可作为黑素瘤干性细胞的分选标记^[14]。恶性黑素瘤干细胞的发现和鉴定,揭开了黑素瘤干细胞研究的序幕。对于黑素瘤干性细胞的分子标记,大量研究进行了深入的探索。越来越多的研究表明 CD133⁺ 细胞在多种肿瘤中具有干细胞特性,CD133/prominin-1 可能是肿瘤干细胞表面特异性表达的分子^[15]。Monzani 等^[16]报道在黑素瘤组织中

[基金项目] 国家卫计委肿瘤科国家临床重点专科资助项目(No. 2013-2014);云南省高层次卫生技术人才-领军人才资助项目(No. L-201213)。Project supported by the National Clinical Key Specialty Construction Projects of Oncology of National Health and Family Planning Commission of China (No. 2013-2014), and the High-level Health Technicians-Leading Talent in Yunnan Province (No. L-201213)

[作者简介] 李崇鑫(1988-),男,云南省师宗县人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗的基础及临床研究, E-mail: lichongxin88@126.com

[通信作者] 宋鑫 (SONG Xin, corresponding author), E-mail: songxin68@126.com

分离出 CD133⁺ 的细胞,这些细胞可在 NOD-SCID 小鼠中形成黑素瘤分化抗原阳性(Mart-1/Melan-A) 的肿瘤。同时,在人黑素瘤细胞系 WM115 中也分离出 CD133 和 ABCG2 双阳性的细胞,体外培养可形成肿瘤球。研究^[17]发现,在黑素瘤细胞系及患者原代细胞或组织中可分离出表达 CD133 的干性细胞,它们通过血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)、特异性的肿瘤微环境和下游相关信号通路的激活等方式来促进肿瘤的生长^[18],并且 CD133⁺ 的细胞与患者的高侵袭特性及耐药等不良预后密切相关^[19-21]。

CD271(P75/NGFR)也是黑素瘤干性细胞的表面标记之一,Boiko 等^[22]从不同部位和分期的恶性黑素瘤患者组织标本中分选出 CD271⁺、CD271⁻ 细胞,他们把这些细胞移植于 T 细胞、B 细胞、NK 细胞缺乏的 Rag2^{-/-}γc^{-/-} 小鼠体内,发现 CD271⁺ 细胞无论是成瘤能力还是侵袭转移能力都明显强于对照组。进一步研究^[23]表明,CD271⁺ 细胞与患者的高侵袭特性及不良预后密切相关。Redmer 等^[24]利用全基因组分析及基因簇富集分析的方法从细胞系及原代细胞中发现在黑素瘤中 CD271⁺ 细胞比 CD133⁺ 细胞具有更强的克隆形成能力及体内成瘤能力。上述研究提示 CD271 也是黑素瘤干性细胞的重要标记物之一。

作为肿瘤干细胞特性之一,耐药性也用作筛选具有干细胞特性肿瘤细胞的手段。耐药蛋白阳性的黑素瘤细胞相较 MDR1⁻ 细胞具有更强的自我更新能力及更高的肿瘤球形成能力,这提示 MDR1⁺ 可用作黑素瘤干性细胞分选标记及治疗的潜在靶点之一^[25]。耐药的细胞高表达 ATP 结合盒转运体(ATP-binding cassette transporters),这是流式分选技术中侧群细胞(side-population, SP)^[26]形成的基础。侧群细胞具有更强的 DNA 损伤修复能力及抗凋亡能力,能够抵抗化疗药物对肿瘤干细胞样细胞的杀伤作用,最终形成化疗抵抗的多潜能异质性细胞^[27]。ATP 结合家族中 ABCB1^[28]、ABCB5^[21,29-31] 和 ABCG2^[16] 研究的较多。流式分选技术、免疫磁珠分选技术^[17] 为当前较为成熟的干性细胞分选方法,为深入研究干细胞的靶向干预治疗提供了条件。

近年来外周血中巢蛋白^[32-33]、醛脱氢酶^[34]、CXC 趋化因子受体 6^[35]、组蛋白去甲基化酶 B^[36] 等也相继证明在黑素瘤干性细胞中高表达,可作为潜在的分选靶标。黑素瘤干性细胞表面标记的确定和分选方法的进步,大大推进了 MTSCs 的靶向免疫治疗研究。

1.2 MTSCs 信号通路

信号通路异常也是肿瘤干细胞主要特性之一,肿瘤干细胞的异常信号传导与肿瘤的发生发展密切相关,特别是在肿瘤放疗、化疗、生物治疗等治疗耐受过程中发挥关键性作用^[7,37]。肿瘤干细胞异常信号通路主要有 Wnt、Notch 和 Hedgehog 等,它们之间相互作用(cross-talk)形成一个复杂的调控网络,对肿瘤干细胞的自我更新、分化等具有重要影响,是导致大多数肿瘤对当前治疗不敏感的主要原因之一。

Perego 等^[38]研究发现,黑素瘤肿瘤球多种干细胞信号通路激活以及 Nanog、Oct3/4 等转录因子的表达水平较贴壁生长的细胞高。性别决定区 Y 框蛋白 2(sex-determining region Y (SRY)-Box2, SOX2) 是 HMG(high mobility group domain) DNA 结合区域转录因子家族的一员,目前大多数研究认为它是保持胚胎干细胞多潜能性和自我更新的重要物质。研究发现 SOX2 在 ALDH 高表达的黑素瘤细胞中表达较非干性细胞高 2 ~ 3 倍,进一步的功能实验发现 SOX2 具有维持 MTSCs 自我更新的能力,并且沉默 SOX2 能减低 ALDH 高表达细胞的成瘤能力。总之,SOX2 通过 Hedgehog 信号通路在 MICs(melanoma-initiating cells) 的自我更新和致瘤性方面发挥至关重要的作用^[39]。

Notch 通路是一条在进化过程中高度保守的信号通路,广泛参与胚胎发育、器官形成以及成体干细胞的自我更新^[40]。新近研究发现,相比良性色素痣,黑素瘤细胞系及恶性黑素瘤患者组织中 Notch 信号异常升高,并且异常活化的 Notch 信号通路明显提高 MTSCs 的存活率及促进黑素瘤的恶性进程,以上研究提示 Notch 通路可作为靶向 MTSCs 的一个有效治疗靶点^[41-42]。

1.3 MTSCs 微环境

肿瘤微环境是肿瘤在其发生发展过程中所处的内环境,由肿瘤细胞、间质组织、微血管、组织液、免疫细胞及其产生的细胞因子等组成的一个有机体,有利于肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。肿瘤干细胞新理论认为肿瘤干细胞的稳态受其所处微环境中一系列细胞因子及信号通路的相互影响^[43-44]。阐明肿瘤干细胞微环境将对肿瘤的发生、发展、侵袭、转移及治疗等的深入研究提供新思路^[9,45]。在黑素瘤中,MTSCs 具有特殊的血管生成拟态、免疫耐受微环境等生物学特性,受到广泛关注,成为当前研究热点。

血管生成拟态作为肿瘤微环境的重要组成部分已经成为肿瘤研究共识。2007 年 Calabrese 等^[46]就已经报道肿瘤血管微环境对脑肿瘤干细胞具有极其

重要的支持作用,干扰这一微环境最终导致脑肿瘤起始细胞数量减少甚至生长停滞。随后 Lai 等^[18]确证在由肿瘤血管及 CD144⁺ 的血管生成拟态等组成的复杂微环境中 CD133⁺/ABC5⁺ 的恶性黑色素瘤细胞大量聚集,他们相互作用形成复杂的肿瘤干细胞微环境并促进黑色素瘤的恶性进程。Natasha 等^[47]发现 VEGF/VEGF-R 信号通路中的 VEGF-R 在 ABC5⁺ 细胞高表达,进一步印证了血管生成拟态对肿瘤干细胞微环境的重要性。

肿瘤干细胞的存在与肿瘤免疫耐受状态密切相关,是肿瘤逃逸免疫监视导致免疫治疗等疗效欠佳的主要内在原因^[48]。相比肿瘤细胞,肿瘤干细胞具有很弱的免疫原性,这主要是由于肿瘤干细胞的主要组织相容性复合体 MHC 和抗原递呈机制等相关分子的下调及其释放的炎性细胞因子如 TGF- β 、IL-10、IL-13 和 PDGF2 等在干细胞微环境中上调所致^[49]。作为免疫负调控重要组成部分的程序性死亡配体 1 (programmed cell death ligand 1, PD-1) 在 CD271⁺ 的黑色素瘤细胞中异常高表达,是免疫治疗失败的主要原因^[50]。Schatton 等^[51]发现与普通黑色素瘤细胞相比,ABC5⁺ 黑色素瘤细胞中 MHC I 类分子相对低表达,同时黑色素瘤相关抗原 MART-1、ML-IAP、NY-ESO-1 和 MAGE-A 表达水平降低,而 MHC-II 类分子异常增高。在细胞系移植瘤及临床组织标本中,ABC5⁺ 细胞高表达共刺激分子 B7.2 和 PD-1。总之,ABC5⁺ 的黑色素瘤细胞通过抑制 IL-2 依赖的 T 细胞活化并诱导产生 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 调节性 T 细胞 (Tregs) 从而引起免疫逃逸及免疫耐受。以上研究表明,干预 MTSCs 微环境的靶向治疗将是黑色素瘤免疫治疗的主要研究方向之一。

2 靶向恶性 MTSCs 的治疗

随着肿瘤分子生物学、免疫学新技术等的快速发展,分子靶向治疗因其肿瘤特异性好、疗效快、毒副作用相对较低等优势在肿瘤综合治疗中的地位日渐突出。令人关注的是,靶向肿瘤干细胞的治疗策略正成为当前新型靶点药物临床转化研究的主要方向之一^[52-53]。Dingli 等^[6]通过数学模型论证了根除肿瘤干细胞对成功治愈肿瘤的重要性。总之,作为一类高度异质性的肿瘤,黑色素瘤的治疗必须消灭具有自我更新及高致瘤能力的 MTSCs,才能进一步提高黑色素瘤的综合疗效^[54-55]。

2.1 靶向 MTSCs 表面标记物

特异性靶向 MTSCs 表面标记物的治疗方法是目前极具前途的药物研发方向之一。ABC5 作为

ATP 结合盒转运体家族成员,是肿瘤多药耐药相关蛋白之一,同时也用作恶性 MTSCs 的分子标记^[21]。Schatton 等^[31]利用 ABC5 单克隆抗体提前 24 h 注射于准备行黑色素瘤异种移植术的小鼠腹膜内,与对照组相比,ABC5 单抗通过抗体依赖的细胞毒效应 (ADCC) 能明显抑制肿瘤的形成。银胶菊内酯对 ABC5⁺ 的干细胞样细胞也有较强的抑制作用,但其确切机制尚不明确,可能与干扰 ABC5⁺ 细胞的 NF- κ B/P53/STAT 通路有关^[56]。以上研究充分展现了靶向黑色素瘤干细胞表面标记治疗的巨大潜力。

综合治疗是肿瘤临床治疗的主要趋势,将肿瘤干细胞靶向治疗与传统治疗相结合,被认为是提高肿瘤治疗有效率的新方向。Schlaak 等^[57]利用抗 CD20 单克隆抗体利妥昔单抗联合低剂量达卡巴嗪治疗一例晚期黑色素瘤患者,结果显示该患者除一处转移灶部分稳定外,其余转移灶均达到完全缓解,并且血清恶黑标记物 S-100 降至正常水平。今后以患者各自不同临床分子特点为基础的个体化靶向治疗将使更多的患者获益。

2.2 靶向 MTSCs 异常信号通路

肿瘤干细胞核心驱动基因介导的信号通路一直是靶向干预治疗药物研究的关键性切入点。目前已有多个针对肿瘤干细胞的靶点药物进入临床前试验研究阶段^[58]。Huynh 等^[59]应用 γ 分泌酶抑制剂 RO4929097 阻断恶性黑色素瘤干细胞样细胞 Notch 通路,发现肿瘤球形成能力及体内成瘤能力均受到明显抑制,这为 γ 分泌酶的后临床研究奠定了良好的基础。来源于传统中药厚朴的小分子药物和厚朴酚 (Honkiol) 可通过影响 Notch 通路的活化明显抑制 MTSC 的特性^[40]。

研究发现,基因表观修饰也可以干预肿瘤干细胞信号通路,在肿瘤新药研发中极具开发潜力。Muthusamy 等^[60]应用去甲基化药物 5-氮-2'-脱氧胞苷增加黑色素瘤细胞系 LXN (latexin 蛋白) 的表达,进而导致 MTSCs 转录因子 OCT4、NANOG、SOX2 等表达下调,MTSC 受到明显抑制,这为靶向干预肿瘤干细胞样细胞信号通路提供了新思路。

Santini 等应用 Hedgehog 抑制剂环杷明 (cyclopamine)、GANT61 作用于黑色素瘤细胞,发现 ALDH 高表达的 MTSCs 数量明显减少;进一步应用慢病毒技术沉默 Hedgehog 通路 SMO 和 *GLI1* 基因,ALDH 高表达的 MTSCs 也显著减少^[61]。上述研究提示靶向 Hedgehog 通路的治疗策略是针对 MTSCs 的有效靶向干预治疗方法。

2.3 靶向 MTSCs 免疫微环境

细胞微环境是一个复杂有序的生态系统, MTSCs 的多种生物学特征均与其赖以生存的微环境密切相关^[62]。SDF-1/CXCR4 信号轴是恶性黑素瘤淋巴转移微环境的重要组成部分,在化疗耐药的 CD133⁺ 黑素瘤细胞中 CXCR4 抑制剂 AMD3100 联合达卡巴嗪可明显抑制其淋巴结及肺的转移^[63]。令人关注的是,降糖药物二甲双胍不仅可以抑制癌细胞的生长,还可以直接影响肿瘤干细胞微环境而抑制其增殖。Hirsch 等研究^[64]发现,二甲双胍可明显抑制肿瘤干细胞的核转录因子 NF- κ B 及磷酸化 STAT3,选择性的抑制乳腺癌肿瘤干细胞的生长。新近研究^[65]发现,二甲双胍还可通过影响转移微环境中黑素瘤干性细胞的动态分布而影响疾病的恶性进程,作为较常见的降糖药物,二甲双胍将被肿瘤研究者重新认识,并成为“老药新用”的典范。

免疫治疗作为新兴的肿瘤治疗模式,被美国权威学术期刊《Science》评为 2013 年年度十大科技进展之首^[66]。黑素瘤作为一类高免疫原性肿瘤,对免疫治疗具有突出的治疗反应,PD-1/PD-L1 单抗、CTLA-4 单抗等在黑素瘤治疗中获得了突破性进展,大大提高了黑素瘤治疗的有效率,为进一步研究针对黑素瘤干性细胞的免疫治疗提供了强有力的支持。Pietra 等^[67]利用 NK 细胞杀伤具有干性特征 (CD133⁺、放射抵抗性、黑素瘤球高形成能力等) 的黑素瘤细胞,结果发现 NK 能有效杀灭包括黑素瘤干性细胞在内的恶性黑素瘤细胞各亚群。Gammaitoni 等^[68]利用 CIK 细胞作用于转移性黑素瘤患者来源的原代黑素瘤细胞,细胞及动物实验均表明 CIK 细胞不仅能杀伤高分化的黑素瘤细胞,对具有干性细胞特性的黑素瘤细胞也达到了 71% 的杀伤活性,为 CIK 靶向肿瘤干细胞治疗后续临床研究提供了实验依据。

3 展 望

随着肿瘤干细胞研究的日渐深入,针对肿瘤干细胞的靶向免疫治疗必将对肿瘤临床疗效的提高产生极大的推动作用。但是目前关于针对肿瘤干细胞的靶向干预治疗的诸多策略中,仍有许多问题亟待解决。比如 MTSCs 特有表面标记的鉴定、MTSCs 特有信号通路的确定以及如何有效处理各条通路之间 cross-talk 现象以及 MTSCs 微环境最佳靶点的确定等。相信随着 MTSCs 的深入研究以及肿瘤综合治疗理念的普及,黑素瘤的临床预后将得到进一步改观。

[参 考 文 献]

- [1] SHAH D J, DRONCA R S. Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma [J]. *Mayo Clin Proc*, 2014, 89(4): 504-519. DOI: 10.1016/j.mayocp.2014.02.002.
- [2] SHIN D S, RIBAS A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? [J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 33c: 23-35. DOI: 10.1016/j.coi.2015.01.006.
- [3] KIM T, AMARIA R N, SPENCER C, et al. Combining targeted therapy and immune checkpoint inhibitors in the treatment of metastatic melanoma [J]. *Cancer Biol Med*, 2014, 11(4): 237-246. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.04.002.
- [4] REYR T, MORRISON S J, CLARKE M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111. DOI: 10.1038/35102167.
- [5] DICK J E. Stem cell concepts renew cancer research [J]. *Blood*, 2008, 112(13): 4793-4807. DOI: 10.1182/blood-2008-08-077941.
- [6] DINGLI D, MICHOR F. Successful therapy must eradicate cancer stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(12): 2603-2610. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0136.
- [7] ADOMO-CRUZ V, KIBRIA G, LIU X, et al. Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(6): 924-929. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3225.
- [8] BERTOLOTTO C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options [J]. *Scientifica*, 2013, 2013:635203. DOI: 10.1155/2013/635203.
- [9] ROESCH A. Melanoma stem cells [J]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2015, 13(2): 118-124. DOI: 10.1111/ddg.12584.
- [10] 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. DOI: 10.1038/367645a0.
- [11] VISVADER J E, LINDEMAN G J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(10): 755-768. DOI: 10.1038/nrc2499.
- [12] GENG S Q, ALEXANDROU A T, LI J J. Breast cancer stem cells: multiple capacities in tumor metastasis [J]. *Cancer Lett*, 2014, 349(1): 1-7. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.03.036.
- [13] LUO J, ZHOU X, YAKISICH J S. Stemness and plasticity of lung cancer cells: paving the road for better therapy [J]. *Oncol Targets Ther*, 2014, 7(1129-1134). DOI: 10.2147/OTT.S62345.
- [14] FANG D, NGUYEN T K, LEISHEAR K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9328-9337. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1343.
- [15] GROSSE-GEHLING P, FARGEAS C A, DITTFELD C, et al. Cd133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges [J]. *J Pathol*, 2013, 229(3): 355-378. DOI: 10.1002/path.4086.

- [16] MOMZANI E, FACCHETTI F, GALMOOI E, et al. Melanoma contains cd133 and abcg2 positive cells with enhanced tumorigenic potential [J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43(5): 935-946. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2007.01.017>.
- [17] WELTE Y, DAVIES C, SCHAFER R, et al. Patient derived cell culture and isolation of cd133(+) putative cancer stem cells from melanoma [J]. *J Vis Exp*, 2013, 13(73): e50200. DOI: 10.3791/50200.
- [18] LAI C Y, SCHWARTZ B E, HSU M Y. Cd133⁺ melanoma subpopulations contribute to perivascular niche morphogenesis and tumorigenicity through vasculogenic mimicry [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(19): 5111-5118. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0624.
- [19] GONZALEZ-HERRERO I, ROMERO-CAMARERO I, CANUETO J, et al. CD133⁺ cell content correlates with tumour growth in melanomas from skin with chronic sun-induced damage [J]. *Br J Dermatol*, 2013, 169(4): 830-837. DOI: 10.1111/bjd.12428.
- [20] EL-KHATTOUTI A, SELIMOVIC D, HAIKEL Y, et al. Identification and analysis of cd133(+) melanoma stem-like cells conferring resistance to taxol: an insight into the mechanisms of their resistance and response [J]. *Cancer Lett*, 2014, 343(1): 123-133. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.09.024.
- [21] EL-KHATTOUTI A, SHEEHAN N T, MONICO J, et al. Cd133⁺ melanoma subpopulation acquired resistance to caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis is attributed to the elevated expression of abcb5: significance for melanoma treatment [J]. *Cancer Lett*, 2015, 357(1): 83-104. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.10.043.
- [22] BOIKO A D, RAZORENOVA O V, VANDE RIJN M, et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor cd271 [J]. *Nature*, 2010, 466(7302): 133-137. DOI: 10.1038/nature09161.
- [23] CIVENNI G, WALTER A, KOBERT N, et al. Human cd271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(8): 3098-3109. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3997.
- [24] REDMER T, WELTE Y, BEHRENS D, et al. The nerve growth factor receptor cd271 is crucial to maintain tumorigenicity and stem-like properties of melanoma cells [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e92596. DOI: 10.1371/journal.pone.0092596. eCollection 2014.
- [25] KESHET G I, GOLDSTEIN I, ITZHAKI O, et al. Mdr1 expression identifies human melanoma stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368(4): 930-936. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.02.022.
- [26] WOUTERS J, STAS M, GREMEAUX L, et al. The human melanoma side population displays molecular and functional characteristics of enriched chemoresistance and tumorigenesis [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e76550. DOI: 10.1371/journal.pone.0076550. eCollection 2013.
- [27] DEAN M, FOJO T, BATES S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4): 275-284. DOI: 10.1038/nrc1590.
- [28] LUO Y, ELLIS L Z, DALLAGLIO K, et al. Side population cells from human melanoma tumors reveal diverse mechanisms for chemoresistance [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(10): 2440-2450. DOI: 10.1038/jid.2012.161.
- [29] GAZZANIGA P, CIGNA E, PANASITI V, et al. Cd133 and abcb5 as stem cell markers on sentinel lymph node from melanoma patients [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2010, 36(12): 1211-1214. DOI: 10.1016/j.ejso.2010.05.001.
- [30] FRANK N Y, MARGARYAN A, HUANG Y, et al. Abcb5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 4320-4333. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3327.
- [31] SCHATTON T, MURPHYGF, FRANK N Y, et al. Identification of cells initiating human melanomas [J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 345-349. DOI: 10.1038/nature06489.
- [32] FUSI A, OCHSENREITHER S, BUSSE A, et al. Expression of the stem cell marker nestin in peripheral blood of patients with melanoma [J]. *Br J Dermatol*, 2010, 163(1): 107-114. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2010.09779.x.
- [33] AKIYAMA M, MATSUDA Y, ISHIWATA T, et al. Inhibition of the stem cell marker nestin reduces tumor growth and invasion of malignant melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(5): 1384-1387. DOI: 10.1038/jid.2012.508.
- [34] LUO Y, DALLAGLIO K, CHEN Y, et al. Aldh1a isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(10): 2100-2113. DOI: 10.1002/stem.1193.
- [35] TAGHIZADEH R, NOH M, HUH Y H, et al. Cxcr6, a newly defined biomarker of tissue-specific stem cell asymmetric self-renewal, identifies more aggressive human melanoma cancer stem cells [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(12): e15183. DOI: 10.1371/journal.pone.0015183.
- [36] HELD M, BOSENBERG M. A role for the jarid1b stem cell marker for continuous melanoma growth [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2010, 23(4): 481-483. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2010.00726.x.
- [37] DAWOOD S, AUSTIN L, CRISTOFANILLI M. Cancer stem cells: Implications for cancer therapy [J]. *Oncology (Williston Park)*, 2014, 28(12): 1101-7, 1110. DOI: 202935[pii].
- [38] PEREGO M, TORTORETO M, TRAGNI G, et al. Heterogeneous phenotype of human melanoma cells with in vitro and in vivo features of tumor-initiating cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2010, 130(7): 1877-1886. DOI: 10.1038/jid.2010.69.
- [39] SANTINI R, PIETROBONO S, PANDOLFI S, et al. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells [J]. *Oncogene*, 2014, 33(38): 4697-708. DOI: 10.1038/onc.2014.71.
- [40] KAUSHIK G, VENUGOPAL A, RAMAMOORTHY P, et al. Honokiol inhibits melanoma stem cells by targeting notch signaling [J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54(12): 1710-21. DOI: 10.1002/mc.22242.
- [41] HOEK K, RIMM D L, WILLIAMS K R, et al. Expression profi-

- ling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5270-5282. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0731.
- [42] PINNIX C C, HERLYN M. The many faces of notch signaling in skin-derived cells [J]. *Pigment Cell Res*, 2007, 20(6): 458-465. DOI: 10.1111/j.1600-0749.2007.00410.x.
- [43] MEDEMA J P, VERMEULEN L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer [J]. *Nature*, 2011, 474(7351): 318-326. DOI: 10.1038/nature10212.
- [44] DI C, ZHAO Y. Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer (review) [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(2): 289-293. DOI: 10.3892/etm.2014.2141.
- [45] LI L, NEAVES W B. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4553-4557. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3986.
- [46] CALABRESE C, POPPLETON H, KOCAK M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells [J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(1): 69-82. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.11.020.
- [47] FRANK N Y, SCHATTON T, KIM S, et al. Vegfr-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1474-1485. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1660.
- [48] SCHATTON T, FRANK M H. Antitumor immunity and cancer stem cells [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2009, 1176: 154-169. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04568.x.
- [49] MACCALLI C, VONONTE A, CIMMINIELLO C, et al. Immunology of cancer stem cells in solid tumours. A review [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(3): 649-655. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.11.014.
- [50] FURUTA J, INOZUME T, HARADA K, et al. Cd271 on melanoma cell is an ifn-gamma-inducible immunosuppressive factor that mediates downregulation of melanoma antigens [J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(5): 1369-1377. DOI: 10.1038/jid.2013.490.
- [51] SCHATTON T, SCHUTTE U, FRANK N Y, et al. Modulation of t-cell activation by malignant melanoma initiating cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 697-708. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1592.
- [52] SAWYERS C. Targeted cancer therapy [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 294-297. DOI: 10.1038/nature03095.
- [53] GENELUX C, SAN DIEGO S C, MOORES U, et al. Biotherapeutic approaches to target cancer stem cells [J]. *J Stem Cells*, 2014, 8(3/4): 135. DOI: jsc.2014.8.3/4.135.
- [54] MURPHY G F, WILSON B J, GIROUARD S D, et al. Stem cells and targeted approaches to melanoma cure [J]. *Mol Aspects Med*, 2014, 39: 33-49. DOI: 10.1016/j.mam.2013.10.003.
- [55] FUKUNAGA-KALABIS M, ROESCH A, HERLYN M. From cancer stem cells to tumor maintenance in melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(8): 1600-1604. DOI: 10.1038/jid.2011.159.
- [56] CZYZ M, KOPROWSKA K, SZTILLER-SIKORSKA M. Parthenolide reduces the frequency of abcb5-positive cells and clonogenic capacity of melanoma cells from anchorage independent melanospheres [J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(2): 135-145. DOI: 10.4161/cbt.22952.
- [57] SCHLAAK M, SCHMIDT P, BANGARD C, et al. Regression of metastatic melanoma in a patient by antibody targeting of cancer stem cells [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(1): 22-30. DOI: 10.18632/oncotarget.437.
- [58] TAKEBE N, HARRIS P J, WARREN R Q, et al. Targeting cancer stem cells by inhibiting wnt, notch, and hedgehog pathways [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(2): 97-106. DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.196.
- [59] HUYNH C, POLISENO L, SEGURA M F, et al. The novel gamma secretase inhibitor RO4929097 reduces the tumor initiating potential of melanoma [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(9): e25264. DOI: 10.1371/journal.pone.0025264.
- [60] MUTHUSAMY V, PREMI S, SOPER C, et al. The hematopoietic stem cell regulatory gene latexin has tumor-suppressive properties in malignant melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(7): 1827-1833. DOI: 10.1038/jid.2013.48.
- [61] SANTINI R, VINCI M C, PANDOLFI S, et al. Hedgehog-gli signaling drives self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(9): 1808-1818. DOI: 10.1002/stem.1160.
- [62] SZTILLER-SIKORSKA M, KOPROWSKA K, JAKUBOWSKA J, et al. Sphere formation and self-renewal capacity of melanoma cells is affected by the microenvironment [J]. *Melanoma Res*, 2012, 22(3): 215-224. DOI: 10.1097/CMR.0b013e3283531317.
- [63] KIM M, KOH Y J, KIM K E, et al. Cxcr4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10411-10421. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2591.
- [64] HIRSCH H A, ILIOPOULOS D, STRUHL K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(3): 972-977. DOI: 10.1073/pnas.1221055110.
- [65] REDDI A, POWERS M A, DELLAVALLE R P. Therapeutic potential of the anti-diabetic agent metformin in targeting the skin cancer stem cell diaspora [J]. *Exp Dermatol*, 2014, 23(5): 345-346. DOI: 10.1111/exd.12349.
- [66] COUZIN-FRANEL J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy [J]. *Science*, 2013, 342(6165): 1432-1433. DOI: 10.1126/science.342.6165.1432.
- [67] PIETRA G, MANZINI C, VITALE M, et al. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(7): 793-801. DOI: 10.1093/intimm/dxp047.
- [68] GAMMAITONI L, GIRAUDO L, LEUCI V, et al. Effective activity of cytokine-induced killer cells against autologous metastatic melanoma including cells with stemness features [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(16): 4347-4358. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0061.

[收稿日期] 2015 - 06 - 10

[修回日期] 2015 - 12 - 22

[本文编辑] 党瑞山