

胰腺癌干细胞表面标志物的研究进展

李小平, 郑磊贞

(上海交通大学医学院新华医院, 上海 200092)

摘要:胰腺癌预后极差。近年来,肿瘤干细胞理论引起人们的关注。对胰腺癌干细胞自我更新和耐药机制的深入研究可能会发现对胰腺癌更有效的治疗措施。目前许多实体瘤肿瘤干细胞的分离鉴定还相当困难,主要是因为缺乏特异的肿瘤干细胞分子标志。现对胰腺癌干细胞表面标志物的研究现状作一综述。

关键词:胰腺肿瘤;干细胞;标志物

中图分类号:R735.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2014)12-1040-06

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2014.12.B015

Research Progress in Stem Cell Markers of Pancreatic Cancer

LI Xiao-ping, ZHENG Lei-zhen

(Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract: The survival rates of pancreatic cancer have seen minimal improvement over the past few decades. Biomarkers play a promising role in the development of personalized treatments for patients with pancreatic cancer. Prognostic biomarkers, such as cancer stem cell markers, provide valuable insight into the biological processes of disease. As research progresses, more evidence will provide clinicians with guidelines on the utilization of biomarkers to accurately stage and tailor personalized treatment to the needs of pancreatic cancer patients. This review aims to explore the pancreatic cancer stem cell markers.

Subject words: pancreatic neoplasms; stem cell; marker

胰腺癌是一种恶性程度极高,预后极差的肿瘤。虽然针对胰腺癌的外科治疗技术有了很大的突破和进展,但70%以上患者就诊时已属中晚期,根治性切除率仅30%左右。大部分患者发现时已属晚期无法手术切除,并且对放、化疗不敏感。最近的研究表明,肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)具备无限增殖、多向分化、自我更新和极强的成瘤能力,形成肿瘤并维持肿瘤的生长,且对常规的放化疗更不敏感,还是肿瘤转移、复发的根源。对胰腺癌干细胞(pancreatic cancer stem cells, PCSC)自我更新和耐药机制的深入研究可能会发现对胰腺癌更有效的治疗措施^[1]。

CSC的来源,目前有两种观点:①CSC起源于正常干细胞,由于基因突变等致使这些细胞自我更新和定向分化的调节机制失控,产生CSC。其理论基础是CSC与正常干细胞有很多类似的特性和肿瘤标志物;②CSC来源于正常体细胞或原始细胞突变,转

变成幼稚细胞而获得自我更新以及多向分化的能力。这两种观点都有各自的相关实验作为理论依据,但目前的研究现状更倾向于第一种^[2]。肿瘤干细胞表面的分子标志对于其分离鉴别十分重要,目前许多实体瘤肿瘤干细胞的分离鉴定还相当困难,主要是因为缺乏特异的肿瘤干细胞分子标志。现对胰腺癌干细胞表面标志物的研究现状作一综述。

现有的方法主要应用细胞表面标志物来筛选,主要的干细胞标志物有CD44⁺CD24⁺ESA⁺、CD133⁺和ABCG2⁺等。检测筛选出的细胞是否表现干细胞自我更新和增殖分化的特性来判断是不是胰腺癌干细胞,使用的细胞主要有胰腺癌新鲜标本和胰腺癌^[3]。

1 CD44

CD44是一种多功能性蛋白,在很多生物学过程(如免疫、造血、组织损伤修复、肿瘤的转移)中发挥关键作用。其在多种肿瘤细胞中表达上调,CD44变

通讯作者:李小平,主治医师,硕士;上海交通大学医学院新华医院肿瘤科,上海市控江路1665号(200092);E-mail:lxpmy@sohu.com
收稿日期:2014-02-17; **修回日期:**2014-04-12

异体构型改变在肿瘤侵袭和转移中起重要作用。因此,CD44 及其异构体的检测,有助于肿瘤早期诊断,也是恶性细胞转移潜能和预后的标志。CD44 可提高 C-Met 活性,抑制 Hippo 信号通路(胶质瘤产生过程中很重要的一条通路)。Hippo 信号通路与 PCSC 没有相关研究,在胰腺癌细胞的增殖中是一条重要通路。开展 Hippo 信号通路对 PCSC 调节的研究以及 CD44 对 Hippo 的影响研究将是一项有意义的工作^[4]。

2007 年,两个不同的研究小组分别报道了不同表型的胰腺癌干细胞^[5,6]。Li 等^[5]应用胰腺癌新鲜标本进行裸鼠皮下种植等办法,获得大量胰腺癌细胞,再采用荧光激活细胞分选技术发现胰腺癌中存在 0.2%~0.8% 的 CD44⁺CD24⁺ESA⁺ 细胞,CD44⁺CD24⁺ESA⁺胰腺癌细胞具有干细胞样的高成瘤性、自我更新能力和分化成不同种类细胞的特性,而且其高表达与干细胞自我更新密切相关的 Shh 和多梳基因家族 Bmi-1,因此该亚群细胞被认为是胰腺癌干细胞^[7,8]。

2 CD133

CD133 是一个单拷贝基因产物,该基因位于 4 号染色体(4p15),包含 37 个外显子,是位于人类造血干细胞或祖细胞膜表面具有 5 个跨膜区的糖蛋白,定位于细胞膜及细胞质,由 CD133 mRNA 和蛋白质组成。它是一种细胞膜表面蛋白,相对分子量为 117 000,由 865 个氨基酸组成,具有独特的结构:1 个细胞外区的 N 端,5 个跨膜区域,2 个大的细胞外 loop 环,1 个由 59 个氨基酸组成的细胞内尾,8 个 N 糖基化区,最早是作为造血及某些正常组织干细胞的特异性标志物,随着研究的深入,CD133 已经被广泛地运用于各种肿瘤干细胞的特异性标记,并且也证实了在胰腺癌中存在着 CD133 阳性表达的肿瘤干细胞^[9,10]。

Hermann 等^[11]使用磁珠从胰腺癌标本和胰腺癌细胞株 L3.6pl 中均分选出 CD133⁺的胰腺癌细胞,发现其具备高成瘤、自我更新和多向分化特性。流式分析术发现 CD133⁺细胞约占人胰腺癌组织中癌细胞总数的 1%~3%,在大多数胰腺癌细胞系中其含量低于 1%。研究发现,发现 CD133⁺细胞与 CD44⁺CD24⁺ESA⁺细胞之间存在 14%的重叠。Lee 等^[12]研

究中,CD133 的阳性表达与淋巴结转移及 TNM 分期有关,且阳性表达组生存期明显短于阴性表达组($P < 0.05$),这说明 CD133 的表达与胰腺癌侵袭行为及病程进展有关,并最终影响预后。

CXCR4 可以作为一部分具有高转移倾向的 CD133⁺PCSC 的标志。作为 SDF-1 的受体,CXCR4 在血干细胞归巢骨髓和癌细胞增殖和转移起到很重要的作用^[13]。Hermann 等^[11]显示 CXCR4 在肿瘤侵袭边缘表达,支持 CXCR4 在肿瘤侵袭和转移中的作用。封闭 CD133⁺/CXCR4⁺细胞抑制老鼠移植瘤的转移。CD133⁺/CXCR4⁺细胞对吉西他滨耐药,提示有必要清除这类细胞预防肿瘤复发。

3 C-Met

Li 等^[14]同样还开展了 C-Met 作为 PCSC 标志物的研究,基于 C-Met 可作为正常小鼠胰腺干细胞标志的报道。C-Met 是肝细胞生长因子的酪氨酸激酶受体,显示可增强肿瘤恶性程度和提高肿瘤耐药性。高表达 C-Met 的胰腺癌细胞和 CD44⁺CD24⁺ESA⁺细胞成瘤性相当,比 CD133⁺成瘤性更高。体内实验显示,CD44⁺/C-Methigh 细胞致瘤性最高,而 CD133⁺/C-Methigh 致瘤性不高。

大部分已经表述的 PCSC 表面标志物没有相应的治疗药物靶点,在肿瘤细胞基因分型中作用不大,但 C-Met 可能是一个潜在的作用靶点。使用小分化 hairpin RNA 敲除胰腺癌的 C-Met 基因降低肿瘤微环境形成,抑制肿瘤移植瘤生长。能抑制 C-Met 活性的激酶抑制剂 XC184 (cabozantinib) 可降低肿瘤微环境形成,抑制肿瘤移植瘤生长,降低肿瘤转移。对于皮下接种和原位移植瘤 XC184 可提高吉西他滨的抗肿瘤活性,因此这两点的联系可能对患者有益^[15]。

有研究显示 C-Met 在干细胞功能中的作用。胶质瘤细胞高表达 C-Met 和体外神经生长因子形成高表达,体内肿瘤形成对放射抵抗,以及表达干细胞转录因子如 Nanog 和 Sox-2 相关。降低 C-Met 活性影响不同肿瘤干细胞活性。CD44 通过 C-Met 对于 HGF 信号通路起重要作用,提高 C-Met 在 PCSC 中的活性。需要进一步研究证实是否 CD44 和 C-Met 都是 PCSC 基因分型所必须的还是 C-Met 是最重要的影响因子。

4 ALDH

细胞外蛋白标志物可以用于细胞分类筛选,细胞内标志物也有报道。Jimeno 等^[16]报道,ALDH⁺胰腺癌细胞可能是另一种表型的胰腺癌干细胞。这种表型的胰腺癌细胞在体外克隆形成能力和体内成瘤能力是未分选胰腺癌细胞和 ALDH 细胞的 5~11 倍,其与 CD44⁺CD24⁺细胞之间仅存在极少量的重叠。进一步研究发现,ALDH⁺CD44⁺CD24⁺细胞较 ALDH⁺和 CD44⁺CD24⁺细胞致瘤能力更强,但差别无统计学意义。ALDH1 的活性和干细胞功能有关。ALDH1 阳性和 PDAC 细胞的高致瘤性有关,而与 CD133 状态无关。与 C-Met 和 CD44 一样,ALDH1 可作为 PCSC 的功能标志。高表达 ALDH1 保护胰腺癌细胞免受化疗引起的细胞死亡。移植瘤接受吉西他滨治疗后 ALDH1 阳性细胞富集,显示它们有肿瘤耐药性^[17]。

5 胚胎干细胞基因

Oct4 属于 POU (Pit-Oct-Unc)转录因子家族(又称 POU5f1),通过结合目的基因启动子或增强子区的八聚体基序 ATGCAAAT,激活或抑制靶基因的表达。Oct4 作为鉴定全能胚胎干细胞(ESC)的首选标志物,主要表达于 ES 和生殖细胞,其表达对于维持干细胞的自我更新和多能性是必需的。人们在人成体干细胞和肿瘤以及肿瘤细胞系中,均发现胚胎干细胞标志物 Oct4 的表达。而通过不同的细胞表面标记来进行流式分选,目前已成功地从血液系统恶性肿瘤、乳腺癌、脑部恶性肿瘤等中鉴定并且分离出了这类特殊的细胞群。研究表明,胰腺癌也很可能是干细胞来源的肿瘤。如 Lu 等^[18]发现,成体胰腺干细胞和人源性胰腺癌细胞系 panc-1 和 capan-2 均表达 Oct4。Iki 等^[19]报道了叙利亚金仓鼠胰腺癌表达胚胎干细胞标志物 Oct4。在 ESC 中,细胞外信号分子通过多种信号传导通路向细胞内传递维持多能性或特异性分化的信号,Oct4 参与其中多条信号通路的调节,包括转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 通路、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)通路、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)通路、wnt 通路等。

性别决定区 Y 框蛋白 2(SOX2)是 SOX 基因家

族的一个成员,存在于染色体的 3q26.33,它不仅在胚胎早期的内细胞团、外胚层和生殖细胞有表达,也表达于多能细胞的胚外外胚层。在体外,SOX2 在未分化的胚胎干细胞、胚胎性癌细胞中表达,而随着这些细胞的分化其表达下调。SOX2 的缺乏会导致胚胎由于外胚层发育不良而死于着床期。剔除 SOX2 将会导致胰腺癌干细胞的滋养外胚层分化。发育潜能受限的细胞中 SOX2 不表达^[20]。另外,SOX2 的表达表现出严格的时空限制性,如 SOX2 在小鼠神经干细胞中的过表达可阻碍其分化,但缺失又会导致其过早分化为神经元。在对胰腺癌的研究中也发现,SOX2 的表达和肿瘤细胞的侵袭转移密切相关。SOX2 协同 NANOG、OCT3/4 (Octamer-binding transcription factor-3/4)在维持胚胎干细胞自我更新中发挥重要的作用。同时联合 *KLF4*、*C-myc* 等基因在诱导成纤维细胞向多能干细胞转化过程中也扮演了主要的角色。SOX2 基因的突变和表达异常与肿瘤的发生、发展、衍进以及其他恶性生物学行为息息相关。

Nanog 是 2003 年才被正式鉴定并命名的新基因,是一种维持细胞自我更新和亚全能型的关键转录因子,它能维持外胚层的多能性并且能阻止向原始内胚层的分化,是胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)的标志物之一。*Nanog* 高表达与 ESC 全能型密切相关,而其低表达影响 ESC 分化。随着研究的不断深入,一些存在 CSC 的肿瘤如胃癌、人肉瘤细胞系、乳腺癌等也发现 *Nanog* 高表达,而它们对应的正常组织则不表达,在胚胎发育中内细胞团的细胞命运调控方面扮演着重要角色。

在 ESC 中,Oct4 与 SOX2、*Nanog* 协同作用形成核心转录调控网络,通过自我调节和前馈调节维持多能性和自我更新。Oct4 与 SOX2、*Nanog* 可建立自我调节环路,三者形成调节复合体结合到各自基因的启动子,共同作用维持各自基因的稳定表达。调节复合体的形成使三者紧密联系,缩短对外界信号刺激的反应时间。此外,Oct4 与 SOX2、*Nanog* 还可形成前馈调节环路,共同调控多个转录活性基因和非转录活性基因的表达,其中包括 ESC 特异性转录因子基因 *zic3*、*stat3*、*hesx1*,细胞增殖相关因子基因 *myc*、*eras* 均与维持细胞多能性和自我更新有密切关系;非转录活性基因,包括神经发生相关基因 *neurogl*、*olig2*、外胚层分化基因 *otx1*、*hoxb1*、中胚层分化基因 *hand1*、*myf5*、内胚层分化基因 *atbfl*、*onecut1* 均编码与

细胞分化相关的重要转录因子,提示 Oct4 与 SOX2、Nanog 通过激活多能性基因的表达,同时抑制分化相关基因的表达而维持细胞多能状态。自我调节和前馈调节环路协同维持 ESC 多能性,同时也保持对分化信号的应答能力,一旦胞外信号引起 Oct4 表达水平变化,可干扰整个转录调控网络及下游基因表达,引起细胞分化。

实验证明,选择性敲除(knockdown)上述核心调节环的任何一个基因均导致 ESC 失去自我更新能力而分化。相反,将此类基因导入终末分化的体细胞(如皮肤的成纤维细胞和毛囊角质细胞),可以引起功能基因组重新编程(reprogramming)并使其逆向分化为多潜能干细胞。Oct4 和 Nanog 等在 ESC 自我更新中起重要作用,在肿瘤中可能亦具有相似的功能和作用。分化差和侵袭力强的肿瘤比高分化肿瘤更高表达 ESC 相关基因(如 Oct4、Nanog、SOX2 和 *f-myc*)。

OCT4 和 Nanog 均为核蛋白,不适宜用于活细胞分选,因而有必要筛查受上述基因调控的细胞表面标志物。通过 *hESCs* 基因表达谱的比较分析,发现此类细胞特异性表达 SEMA6A。SEMA6A 属于进化保守的 Semaphorin 家族。该家族由 20 余种成员组成,分为分泌型和膜结合型 2 个亚族,SEMA6A 属于后者。此类膜蛋白的作用机制与 Notch 类似,即 SEMA6A 通过与细胞表面的特异性受体 plexin 结合,引起受体介导的细胞内信号转导,如活化 PI3K-Akt 酪氨酸激酶级联反应。在胚胎发育过程中,SEMA6A 表达局限于原始未分化细胞,如 ESC 等。SEMA6A 基因的启动子区域存在 OCT4 和 Nanog 的特异性结合位点,因而其表达受 ESC 转录因子调控。胰腺癌球体细胞同时表达 ESC 转录因子 OCT4 和 Nanog 及其转录靶基因 SEMA6A。提示此类癌细胞具有原始未分化细胞特性。此类细胞有可能属于迄今未报道的胰腺癌 CSC。因此,以上述标志为基础分析胰腺癌 CSC 的细胞属性,值得进一步探讨^[21]。

近年来,越来越多的研究发现,位于胰腺组织腺泡结构和导管系统交界处并连接两者内腔的泡心细胞(centroacinar cell, CAC)是外分泌胰腺成体干细胞和胰腺癌起始细胞。在成体胰腺中,Notch 信号通路在 CAC 中选择性活化,而 Notch 信号的效应分子 Hes-1 是已知的 CAC 标志^[22]。研究发现,Notch 信号

对胰腺胚胎发育中抑制上皮祖细胞分化和胰腺癌前期病变中促进肿瘤发生起到关键作用。在胰腺发育过程中有 4 种 Notch 基因表达,其中 Notch2 在胰芽分支和导管发生时,局限表达于胰腺胚胎导管细胞,可能是胰腺干细胞的标志物之一。2010 年, Mazur 等^[23]发现,选择性阻断 Notch2 而非 Notch1 可以使胰腺癌演变进程停止,延长生存期。由此可见,以 Notch2 为表面标志的 CAC 有可能属于胰腺癌干细胞。

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)的癌前期病变最常见的为胰腺表皮内瘤(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN),主要遗传改变包括 *p16* 抑癌基因失活和 *K-ras* 癌基因突变。研究表明,Notch2 是调控 PanIN 发展及向 PDAC 演变的关键信号^[24]。有研究证实,胰腺肿瘤形成的过程需要 Notch 和 *K-ras* 的协同作用来完成。胰腺癌 Notch2+Panc-1 和 Bxpc-3 细胞中存在 *K-ras* 基因突变,此类癌细胞以同时表达干细胞特异性标志(如 Oct4、Nanog 和 PDX-1)作为可鉴定的表型标志,并具有高致瘤性,提示属于胰腺癌 CSC^[25]。

PDX1 是胰腺胚胎发育过程中起关键作用的一种转录因子,是具有多向潜能分化的胰腺干细胞标志物,主要表达在胰腺干细胞中。PDX1 阳性细胞可分化为胰腺组织的内分泌细胞、外分泌细胞和导管细胞。在成体中,胰腺外分泌和导管细胞中仅有微量表达 PDX1,但在胰腺炎症和癌变组织中 PDX1 表达上调。Mazur 等^[26]发现,胰腺部分切除术后胰腺导管上皮细胞中出现 PDX1 高表达,说明 PDX1 在残余胰腺再生中起重要作用,推测 PDX1 阳性细胞是导管上皮细胞中存在的干细胞。

6 其他基因

最新的一项发现显示肿瘤干细胞的特征是 26S 蛋白体活性低^[27]。人胶质瘤细胞和乳腺癌细胞稳定表达能够融合鸟氨酸脱羧酶碳基部分的 ZS 绿色荧光,荧光蛋白聚集在细胞内缺乏 26S 蛋白体活性。26S 蛋白体缺乏的亚群已在胰腺癌细胞中找到。Gdeg^h 细胞可以分化为 Gdeg^{high} 细胞和 Gdeg^{low} 细胞,对于吉西他滨高度耐药。Gdeg^h 细胞有高水平核心 β -catenin 的表达,需要进一步研究证实 β -catenin 通路调控 PCSC 活性的作用。

Abcg2/bcrp 是 ABC 转运体家族的成员,首先定位于乳腺癌细胞系,现在发现其广泛存在于各种干细胞上,是多种干细胞的标志物。Olempska 等^[28]检测了 5 个胰腺癌细胞株中肿瘤干细胞标志物的表达,分析认为 CD133 和 (或)ABCG2 阳性可能代表 PCSC。

c-kit(CD117)是造血干细胞的分子标志,其也可能是胰腺干细胞的标志物^[29]。正常情况下 c-kit 受体的活化需要 SCF 参与,SCF 是由多剪切体产生的两条 mRNA 来编码的膜结合蛋白,相对分子质量分别为 248×10^3 、 220×10^3 。

nestin 最初发现于中枢神经系统(CNS),目前被作为鉴定 CNS 干细胞的一个标志物,以区别分化的神经细胞。现在发现包括胰腺前体细胞在内的多种组织细胞都表达,被认为是胰腺干细胞标志物,其可能起着促进胰腺内分泌干细胞分化的作用^[30,31]。

细胞角质素(cytokeratin,CK)是分布于上皮和间皮源细胞中的一类水溶性聚合多肽。目前已知的 CK 多达 20 种,认为存在上皮及上皮源性肿瘤中高表达。正常状态下间质细胞不表达 CK,若表达,则表明间质细胞中可能存在上皮源性肿瘤。目前在胰腺癌干细胞方面研究比较多的 CK 家族成员有 CK17 和 CK19。CK17 被认为最有可能成为胰腺癌干细胞的特异性标志。目前,应用 PCR 技术检测发现 CK19 mRNA 在乳腺癌、胃癌、膀胱癌等源于上皮组织的肿瘤患者中高表达。近年的研究表明,CK19 阳性表达的胰腺干细胞具有转型分化潜能,因此,CK19 可作为胰腺干细胞标志物^[32]。

7 总结与展望

目前明确的属于胰腺干细胞标志物的指标一般都表达于细胞质甚至细胞核,因此,它们对于分选的意义有限,但其对胰腺肿瘤干细胞的鉴定仍有着积极作用。联合多种指标对其分选鉴定将最终可能筛选出胰腺癌干细胞,这将对这一恶性程度极高的肿瘤的治疗产生影响,为难治性胰腺癌的诊断和治疗提供方向。

参考文献:

[1] Habib M, Saif MW. Pancreatic cancer stem cells: their

role in pancreatic cancer patient outcomes and what is future?[J]. JOP, 2013, 14(4):401-404.

[2] Castellanos JA, Merchant NB, Nagathihalli NS. Emerging targets in pancreatic cancer: epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells[J]. Oncol Targets Ther, 2013, 6(2):1261-1267.

[3] Xu L. Cancer stem cell in the progression and therapy of pancreatic cancer[J]. Front Biosci(Landmark Ed), 2013, 18(4):795-802.

[4] Kure S, Matsuda Y, Hagio M, et al. Expression of cancer stem cell markers in pancreatic intraepithelial neoplasias and pancreatic ductal adenocarcinomas[J]. Int J Oncol, 2012, 41(4):1314-1324.

[5] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(3):1030-1037.

[6] 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.

[7] Rasheed Z, Wang Q, Matsui W. Isolation of stem cells from human pancreatic cancer xenografts[J]. J Vis Exp, 2010, 43(1):2169.

[8] Li C, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells [J]. Methods Mol Biol, 2009, 568(12):161-173.

[9] Hori Y. Prominin-1 (CD133) reveals new faces of pancreatic progenitor cells and cancer stem cells: current knowledge and therapeutic perspectives[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 777(3):185-196.

[10] Immervoll H, Hoem D, Sakariassen PØ, et al. Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas[J]. BMC Cancer, 2008, 8:48.

[11] Hermann PC, Huber SL, 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.

[12] Lee HJ, You DD, Choi DW, et al. Significance of CD133 as a cancer stem cell markers focusing on the tumorigenicity of pancreatic cancer cell lines [J]. J Korean Surg Soc, 2011, 81(4):263-270.

[13] Katoh M, Katoh M. Integrative genomic analyses of CXCR4: transcriptional regulation of CXCR4 based on TGF-beta, Nodal, Activin signaling and POU5F1, FOXA2, FOXC2, FOXH1, SOX17, and GFI1 transcription factors [J]. Int J Oncol, 2010, 36(2):415-420.

[14] Li C, Wu JJ, Hynes M, et al. c-Met is a marker of pancreatic

- cancer stem cells and therapeutic target[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(6):2218–2227.
- [15] Hage C, Rausch V, Giese N, et al. The novel c-Met inhibitor cabozantinib overcomes gemcitabine resistance and stem cell signaling in pancreatic cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e627.
- [16] Jimeno A, Feldmann G, Suárez-Gauthier A, et al. A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(2):310–314.
- [17] Kim MP, Fleming JB, Wang H, et al. ALDH activity selectively defines an enhanced tumor-initiating cell population relative to CD133 expression in human pancreatic adenocarcinoma[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6):e20636.
- [18] Lu Y, Zhu H, Shan H, et al. Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2013, 340(1):113–123.
- [19] Iki K, Pour PM. Expression of Oct4, a stem cell marker, in the hamster pancreatic cancer model[J]. *Pancreatol*, 2006, 6(4):406–413.
- [20] Herreros-Villanueva M, Zhang JS, Koenig A, et al. SOX2 promotes differentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells[J]. *Oncogenesis*, 2013, 2:e61.
- [21] 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.
- [22] Katoh M, Katoh M. Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(2):461–466.
- [23] Mazur PK, Einwächter H, Lee M, et al. Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2010, 107(30):13438–13443.
- [24] Zhou ZC, Dong QG, Fu DL, et al. Characteristics of Notch2(+) pancreatic cancer stem-like cells and the relationship with centroacinar cells [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(8):805–811.
- [25] Vizio B, Mauri FA, Prati A, et al. Comparative evaluation of cancer stem cell markers in normal pancreas and pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(1):69–76.
- [26] Mazur PK, Grüner BM, Nakhai H, et al. Identification of epidermal Pdx1 expression discloses different roles of Notch1 and Notch2 in murine Kras (G12D)-induced skin carcinogenesis in vivo[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10):e13578.
- [27] Adikrisna R, Tanaka S, Muramatsu S, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells and selective toxicity of chemotherapeutic agents[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(1):234–245.
- [28] Olempska M, Eisenach PA, 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.
- [29] Amsterdam A, Raanan C, Polin N, et al. Modulation of c-kit expression in pancreatic adenocarcinoma: a novel stem cell marker responsible for the progression of the disease [J]. *Acta Histochem*, 2013, 116(1):197–203.
- [30] Matsuda Y, Kure S, Ishiwata T. Nestin and other putative cancer stem cell markers in pancreatic cancer[J]. *Med Mol Morphol*, 2012, 45(2):59–65.
- [31] Kim HS, Yoo SY, Kim KT, et al. Expression of the stem cell markers CD133 and nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012, 5(8):754–761.
- [32] Liu H, Shi J, Anandan V, et al. Reevaluation and identification of the best immunohistochemical panel (pVHL, Maspin, S100P, IMP-3) for ductal adenocarcinoma of the pancreas[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2012, 136(6):601–609.