

骨肉瘤肿瘤干细胞最新研究进展*

魏 红 彭圣智 综述 王 旭 审校

(济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067)

摘 要 骨肉瘤肿瘤干细胞是骨肉瘤复发和转移的根源。目前,骨肉瘤肿瘤干细胞的研究正处于探索阶段,其分离鉴定、生物学特性、肿瘤干细胞起源等问题是研究的热点。骨肉瘤肿瘤干细胞的研究将为明确骨肉瘤的发病机制及研发新的针对肿瘤干细胞的药物提供重要的理论和现实意义。

关键词 骨肉瘤;肿瘤干细胞;间充质干细胞;分离鉴定

中图分类号:R730.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9760(2014)06-204-05

骨肉瘤是一种常见的骨原发性恶性肿瘤,青少年多见,早期诊断困难,病死率和转移率极高,传统的手术治疗往往给患者带来无法弥补的创伤。随着新辅助化疗的广泛应用和手术技术的进展,骨肉瘤患者的5a生存率得到了很大提高,但受肿瘤细胞耐药机制和免疫逃逸的影响,目前骨肉瘤的疗效处于瓶颈状态。根据肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)理论,现有的治疗手段并没有将CSC完全杀灭,而只要有CSC的存在,就可以继续自我更新和不断增殖分化重新形成肿瘤,导致复发和转移。因此本文就骨肉瘤CSC的分离鉴定、多潜能等生物学特性、起源等问题加以讨论,为进一步研究骨肉瘤CSC及研发新的针对CSC的药物提供一定的理论依据。

1 骨肉瘤及肿瘤干细胞学说

“肿瘤干细胞”学说认为,正是CSC的增殖才形成了肿瘤。这些CSC具有共同的特点:耐药性、形成肿瘤能力及不对称分裂。这些特点已经被应用来鉴别CSC,但要考虑到不同的组织起源。已有证据显示从上皮、神经外胚层及间叶组织肿瘤中分离出的CSC有不同的生长环境的需求,表达不同的细胞表面蛋白以及存在不同的信号传导通路的激活。

目前,骨肉瘤的起源仍不很清楚,近来很多研究提出骨肉瘤中可能存在CSC。最早提出骨肉瘤中存在CSC的是Parker-Gibbs等^[1],他们利用去血清悬浮培养法从骨肿瘤(骨肉瘤、横纹肌肉瘤和软骨肉瘤)中观察到了类似于乳腺癌和脑肿瘤的肉

瘤细胞球,这些细胞球有很强的自我更新能力和多向分化能力,能再次形成悬浮细胞球并且可以向骨和脂肪组织分化。这些悬浮细胞球有形成肿瘤的能力,对化疗药物耐受。这种具有干细胞样特性的细胞球高表达间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)特有的表面标志物如CD133、CD117和Stro-1^[2-3]。人骨肉瘤细胞系中分离出的悬浮细胞球中CD133⁺细胞可以在裸鼠移植瘤模型中形成肿瘤^[3]。

在骨肉瘤小鼠模型中一些干细胞相关的标记物已被证实。从这些小鼠肿瘤中分离出来的细胞具有多向分化能力,能形成悬浮细胞球,表达鼠干细胞表面抗原Sca-1。除了形成悬浮细胞球的能力外,骨肉瘤中的CSC具有外排染料的能力,且高表达醛脱氢酶(ALDH1)活性^[4-6]。另外,细胞球中INK4、P16INK4 α 和P19ARF基因表达下降,提示这种细胞可以逃避p53、Rb基因调节的老化和凋亡^[7]。这些研究和探索为骨肉瘤中含有CSC提供了强有力的证据。

2 骨肉瘤干细胞的分离鉴定

骨肉瘤干细胞的分离是一个关键问题。目前分离鉴定CSC的方法主要是先通过细胞表面分子标志分离肿瘤细胞亚群,然后找出具有自我更新、分化增殖能力、成瘤能力的亚群,从而鉴定出CSC或者是应用无血清培养基、悬浮培养法来分离CSC。这些技术方法大多都是依赖于CSC与普通肿瘤细胞的区别点。如果我们分离鉴定的依据是不可逆的,分选的结果只能是获得一类CSC亚群,而其他的CSC亚群很可能会被遗漏,同时也不能完全排除非干细胞性肿瘤细胞的干扰,因此目前的

* [基金项目] 济宁医学院青年基金资助项目(编号:JYQ2011KM 014)

分离鉴定方法仍需要不断完善。应用不同的方法分选 CSC 的报道总结较多,在此对这些方法及存在的问题加以综述。

2.1 基于表面标记物的分选

作为间叶组织起源的肿瘤, MSC 的特异性表面标记物常被用来分离骨肉瘤干细胞。由于目前没有公认的 MSC 的标记物,一些表面标记物被单独或联合用来从细胞系或者人肿瘤标本中分离和鉴定骨肉瘤干细胞。然而,目前的研究结果常需进一步验证,因为标记物的表达很多情况下依赖于使用的是哪一种细胞系(新鲜分离的肿瘤组织,原代细胞,传代的细胞),以及传代的范围(体内还是体外);另外,不同的物种,不同的分离方法(酶裂解或机械性裂解)标记物表达也是不同的。例如,不同的培养环境可以使 CSC 中 CD133 阳性细胞所占比例有所不同^[8]。因此由于缺乏明确的间充质源性 CSC 的标记物,而且多因素影响这些标记物的表达,所以单纯依赖表面标记物分选 CSC 是不够的,还要结合 CSC 功能方面的特点才能做到有效分选。不同的细胞亚群可用不同的表面标记物分选出来,这也提示在肿瘤中可能存在不同类型的干细胞,或者说 CSC 也分等级,既存在静止期的干细胞,又有活动期的干细胞,而且在不同的环境中 CSC 可以相互转化^[9]。

2.2 基于细胞本质特性的分离鉴定

2.2.1 保留染料能力

CSC 因为其较慢的增殖速度以及不对称细胞分裂方式被认为是相对静止的细胞。PKH26 和 PKH67 是一类脂类染料,能均匀地标记细胞膜,并在细胞分裂时对等的分离到两个子代细胞内。因此,染料随着细胞的分裂成比例的被稀释。分裂慢的细胞可有效保留染料,分裂快的细胞染料浓度迅速被稀释。由于 CSC 不对称分裂,静止期的 CSC 可长期保留标记,而其子代细胞随着其快速分裂形成肿瘤,细胞中的标记物被迅速稀释,这一技术被称为标记滞留细胞技术,已被用来在骨肉瘤细胞系中分离 PKH26 阳性细胞^[4]。基因表达显示 PKH26 阳性细胞与其他能够贴壁生长的细胞相比是一类幼稚的细胞。然而, PKH26 阳性细胞群比 CD133 阳性细胞群的范围大,这也进一步说明不同的分离方法所获得的 CSC 是不同的。

2.2.2 外排染料能力及侧群细胞

研究显示 CSC 具有抗药能力,它高表达药物转运体如 ABC 抗药外排转运体。基于 CSC 具有外排 DNA 标记

荧光染料 Hoechst33342 的能力,有学者应用这一特性从已建立细胞系及人骨肉瘤活检标本^[5]中分离鉴定骨肉瘤 CSC。这部分能够外排染料的细胞群被称为侧群(side population, SP)细胞, SP 细胞可形成细胞球并可以高效快速的形成肿瘤。SP 细胞也表现为不对称分裂,可以产生 SP 子代细胞以及非 SP 子代细胞。

2.2.3 醛脱氢酶活性

醛脱氢酶 1 可能成为正常及 CSC 的候选标记物。醛脱氢酶 1 可以将非荧光物转化为荧光物,因此可以通过分选荧光反应阳性的细胞来筛选醛脱氢酶阳性细胞。醛脱氢酶 1 阳性的骨肉瘤细胞富集于肉瘤样细胞球中,并有很强的呈瘤及侵袭能力^[6]。

2.3 骨肉瘤干细胞功能特性

应用 CSC 2 个方面的功能特性来鉴定骨肉瘤干细胞:1)在免疫抑制宿主动物体内可形成与原发瘤一样的肿瘤;2)能分化产生构成起源组织的各种细胞成分。这两方面的特性常被用作分离技术的后续验证,而且它是建立纯化的 CSC 系所必需的。有实验显示肿瘤细胞形成肉瘤样细胞球的能力与其形成移植瘤的能力有关^[4]。

2.3.1 无限稀释分选法

是分离纯化 CSC 的金标准。该项技术依赖于 CSC 即使在浓度很低时也能高效的形成肿瘤。其可靠性依赖于 CSC 数与呈瘤能力之间的线性关系、使用的实验动物的品系、体内肿瘤生长的重要调节免疫反应的缺乏状态、物种特异性信号的存在等因素的影响,因此使用这种方法时应谨慎。考虑到肿瘤和其生长微环境的密切关系,成瘤率与接种部位也有关。目前认为,直接将肿瘤细胞局部注射到骨组织而建立的移植瘤模型是公认的鉴定 CSC 的模型。无限稀释分选法可被用来在体外评价肿瘤细胞形成群落的能力。尽管 CSC 具有优先形成细胞群落能力的具体机制还不明确,但利用这种方法可以对无血清培养基中悬浮生长的细胞进行自我更新能力的评价。体外形成群落法可被用来分离干细胞,国内有学者^[10]报道运用简化的无血清培养法成功从骨肉瘤细胞中分离出具有增殖和分化能力肿瘤细胞球,并在体外连续传代。这种方法简化了 CSC 的培养,有较高的应用价值,但这种方法有 2 个方面的局限性:一方面不能从高浓度成群的细胞群中分离干细胞,另一方面不能分离静止的干细胞。在实体瘤标本的高浓度细胞群中培养建立干细胞群落是非常困难的,但联合应用无限稀释法就可有效避免这一

问题。有学者就联合应用体外形成群落法及无限稀释法证实 Sca-1 表达阳性率与小鼠骨肉瘤干细胞形成群落的能力有关,还证实 CSC 表达干细胞转录因子 Sox2^[11]。

2.3.2 多向分化能力 与大部分肿瘤细胞不同, CSC 可以通过对称或不对称的方式分裂,分化形成各种类型的细胞,称为多向分化能力。同 MSC 一样,骨肉瘤干细胞在适宜的培养条件下可以向骨母细胞、脂肪细胞、软骨方向分化。由于诱导骨肉瘤干细胞分化的实验及各种类型细胞的鉴定相对简单,我们就可以利用这种多向分化能力进一步对 CSC 进行鉴定。这种分选法常是在标记物分离法之后用来对干细胞及非干细胞进行鉴定。因此,检测多向分化能力及无限稀释法的联合应用是非常有效的对 CSC 的鉴定方法。

3 肿瘤干细胞具有多潜能的原因

CSC 是一种未分化的、干细胞样的细胞群,它能呈球样生长,表达多能干细胞相关的胚胎干细胞因子 Oct4、Sox2 和 Nanog^[11-12]。胚胎干细胞转录因子在 CSC 中的表达最早是在 p53 和 Rb 基因缺失的小鼠骨肉瘤模型中发现的。阳性表达鼠 MSC 标记物 Sca-1 的肿瘤细胞具有形成肉瘤样细胞球的能力,并且表达胚胎干细胞因子 Sox2。这些肉瘤样细胞球高表达 Sca-1 及 Sox2,而骨分化标记物 Runx2 及 osterix 表达量降低。Sox2 基因敲除可使肿瘤细胞失去呈肉瘤样细胞球的能力及呈瘤能力,同时 Sox2 基因敲除可使 Sca-1 表达降低及细胞周期抑制因子 p21 及 p27 表达增多,继而肿瘤细胞重新向骨方向分化。另外,在人骨肉瘤活检组织、骨肉瘤细胞系中也检测到 Sox2 的表达,并且这些细胞呈肉瘤样细胞球的能力与 Sox2 的表达有关^[11]。这些发现证实 Sox2 很可能是 CSC 保持其多潜能的非常重要的因素。

因此,我们推测小鼠及人的骨肉瘤组织中至少包含这样 2 类细胞群,一类高表达 Sox2,具有干细胞的特性,但缺乏向骨方向分化的能力;另一类低表达 Sox2,能分化为成熟的骨组织并存在有 Wnt 通路的激活。这些发现进一步证实 Sox2 可作为 CSC 的标记物,并提示我们可以通过抑制 Sox2 的表达达到骨肉瘤靶向治疗的目的。

4 骨肉瘤干细胞的起源

随着干细胞生物学的日益深入和完善,有

新的理论认为遗传或者后天的一些因素干扰了 MSC 成骨分化的过程,从而导致骨肉瘤的发生,即骨肉瘤起源于 MSC。MSC 是骨髓中非造血干细胞,具有分化为多种基质细胞的潜能,能分化为骨、软骨、肌肉、韧带、跟腱、脂肪细胞和基质等。体外培养鼠 MSC 可以发生恶性转化,转化为骨肉瘤或者是纤维肉瘤细胞^[13]。体外转染了人端粒酶逆转录酶(hTERT)的人 MSC^[14]也可以发生恶性转化。另外,Ewing 肉瘤可能也起源于 MSC^[15]。这些研究均提示 MSC 很可能是骨肉瘤的起源细胞。

在骨的形成过程中,不成熟的骨细胞向成熟的骨细胞分化要经历骨基质的合成、沉积、骨化几个阶段。原始的骨原细胞由间充质细胞分化而来,继而分化为前成骨细胞、骨母细胞,最终成熟为骨细胞,这是一个非常复杂的过程。目前尚缺乏明确的各阶段的分化标记物。已知的骨分化过程中关键的调节因子是 RUNX2/CBFA1 以及其下游的 osterix。前成骨细胞表达 RUNX2 及 osterix,而后向骨母细胞分化,细胞停止增殖,同时合成基质蛋白主要是 I 型胶原并沉积下来。随后分化为成熟的骨母细胞,表达 osteocalcin (OCN),最后基质钙化形成成熟的骨组织。虽然骨肉瘤肿瘤组织具有异质性,其构成成分混杂有一些分化成熟的骨样基质及骨组织,但骨肉瘤的发生却被认为是细胞的异常增生及分化障碍所致。2 类抑癌基因 Rb 及 p53,在骨的分化过程中具有重要的调控作用,在骨肉瘤中常存在表达缺失。Rb 蛋白可以与 RUNX2 相互作用并可增加 RUNX2 的转录活性,因此,可促进细胞向骨母细胞分化。在特异性 Rb 基因缺陷小鼠表现出骨发育障碍,在这类小鼠骨发育中有较多分化障碍的骨原细胞,不能顺利通过细胞周期发育为成熟的骨细胞^[16]。无独有偶,在特异性 p53 基因缺陷小鼠中也表现出骨分化障碍,并有进一步发展成骨肉瘤的倾向^[17]。因此,Rb 及 p53 的突变干扰了骨的分化过程,DNA 损伤修复关键点出现功能障碍,这为骨肉瘤的发生进一步积累突变奠定了基础。因此,尽管骨肉瘤干细胞可能具有不对称分裂的能力,能够产生一定数量的分化成熟的细胞,但实际上骨肉瘤还是一种分化障碍性疾病。

骨髓微环境也是影响骨母细胞分化的一个重要因素。骨髓富含造血干细胞及 MSC,而且这 2 类细胞可根据不同的表型和功能向不同的方向分化。MSC 可以通过产生 IL-6 等细胞因子使骨肉瘤细胞长期处于一种未分化状态^[18]。从人骨肉瘤

组织中分离出的 MSC 与正常骨髓中的 MSC 在遗传学上有着明显的区别,这也说明 MSC 所提供的微环境在维持骨肉瘤细胞的未分化状态方面的重要性^[19]。

尽管大多数研究认为骨肉瘤起源于 MSC,但却很难准确定位肿瘤起源细胞所处的发育阶段。通过研究小鼠自发骨肉瘤模型发现,骨肉瘤细胞系中 Rb 和 p53 的突变可追溯到骨原细胞。在这个模型中 *osx-Cre* 转基因(介导 Rb 及 p53 敲除的 *floxed* 等位基因)的表达需要 *osterix* 启动子的激活,而 *osterix* 启动子在骨原细胞才有表达^[20]。这一发现提示骨肉瘤很可能起源于限制单向或者双向潜能的前成骨细胞。但是,也不能排除转基因被其它因素诱导表达,也可能在骨发育过程中更早的阶段就有所表达。换句话说,Rb 及 p53 的缺失赋予了 CSC 去分化的能力,可使其向更原始的阶段分化。因此有人提出骨肉瘤干细胞之所以具有多潜能性,一种可能是起源于去分化的骨原细胞,这类细胞可重新获得 MSC 样的特性,第二种可能就是直接起源于 MSC。

5 结论与展望

如果说癌基因与抑癌基因的提出揭示了肿瘤基因学的本质,那么 CSC 理论的提出可以说是肿瘤学上的一个新的里程碑,它激励了不少学者在过去几十年里在不停地探索肿瘤的起源。CSC 理论同样在高度恶性的骨肉瘤中也得到了证实,很多研究者已经从小人或鼠骨肉瘤细胞中分离出了这样一类细胞亚群,它们表达干细胞标记物,能够形成肿瘤,在无血清培养基中能形成悬浮生长的细胞球。与成体干细胞不同的是,这种细胞可无限增殖,并且附带有多种基因突变(最常影响的是 p53 及 Rb 基因通路)可使细胞具有持续的自我更新能力。

目前研究较多的是一些上皮组织起源 CSC 的特性,它们往往表现为慢周期性,处于相对静止状态。而这一点在骨肉瘤干细胞却有所不同,骨肉瘤干细胞的增殖速度比普通干细胞都快,这可能是 MSC 起源的 CSC 与上皮源性的 CSC 的不同之处。有一种假设能够解释这种现象,干细胞在漫长的生活周期内,可以是活化的,也可以是静止的,总体上维持一种相对平衡状态。而静止期干细胞的主要功能可能是取代那些“损伤”的细胞。在不同数量和性质的致癌基因的作用下,最原始的干细胞可演变为相对静止的或者活化的一些 CSC。而实际

上,悬浮成球培养法很可能只能筛选出自我更新相对快一些的干细胞群,而筛选不出静止期的细胞群。因此,这也是我们在应用无血清悬浮培养法筛选 CSC 时应考虑到的一个问题。

骨肉瘤干细胞研究中另外一个亟待解决的问题是 CSC 的分裂方式是否为单向不对称性的,即一些低分化的祖细胞是否可去分化演变为 CSC。虽然目前研究并没有发现细胞培养过程中存在自发性的去分化现象,但有研究显示低水平转录因子就可以诱导成纤维细胞转化为原始的多能干细胞,这一发现也提示我们 CSC 当中也可能存在类似的现象。例如:成纤维细胞生长因子(FGF)信号通路可以维持 CSC 生长微环境,与骨肉瘤干细胞的生长有一定关系,其机制可能就是通过诱导 Sox2 表达使骨肉瘤祖细胞去分化。

骨肉瘤干细胞研究的另一个潜在的意义就是针对 CSC 的靶向治疗。目前这方面的报道寥寥无几。有学者提出 CSC 抑制剂盐霉素(Salinomycin)是一个新的 Wnt 信号通路抑制剂,可以抑制 CSC 的生长^[21],另外,也有学者应用修饰的 T 淋巴细胞免疫治疗法清除 CSC^[22]。需要注意的是,目前所认识的 CSC 的一些标记物可能并不是维持 CSC 生存或再生所必需的,而只是它们分化程度的一种标志。而在多种器官干细胞中均有表达的转录因子 Sox2 在骨肉瘤中存在过表达,而且是维持其生存和肿瘤形成所必需的,这就为研究 CSC 的其他关键因子及靶向治疗提供了新的思路。只有更准确地分离 CSC,阐明其相关的分子生物学特性,才能使骨肉瘤的药物靶向治疗得以早日实现。

参考文献:

- [1] Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis[J]. *Neoplasia*, 2005, 7 (11): 967-976.
- [2] Tang QL, Liang Y, Xie XB, et al. Enrichment of osteosarcoma stem cells by chemotherapy[J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30 (6): 426-432.
- [3] Tirino V, Desiderio V, Paino F, et al. Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo[J]. *FASEB J*, 2011, 25(6): 2022-2030.
- [4] Rainusso N, Man TK, Lau CC, et al. Identification and gene expression profiling of tumor-initiating cells isolated from human osteosarcoma cell lines in an orthotopic mouse model[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(4): 278-287.

(下转第 211 页)

- ent treatment strategies[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5): 1293-1298.
 - [24] Bos WH, Bartelds GM, Wolbink GJ, et al. Differential response of the rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies during adalimumab treatment in patients with rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(10): 1972-1977.
 - [25] Mucke HA. Iguratimod: a new disease-modifying antirheumatic drug[J]. *Drugs Today (Barc)*, 2012, 48(9): 577-586.
 - [26] Tanaka K, Yamaguchi T. Pharmacological properties and clinical efficacy of the synthetic anti-rheumatic drug, iguratimod (Kolbet®/Careram®)[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2012, 140(6): 285-292.
 - [27] Ishiguro N1, Yamamoto K, Katayama K, et al. Concomitant iguratimod therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. [J]. *Mod Rheumatol*, 2013, 23(3): 430, 439.
 - [28] 陈瑞林, 陶怡, 林泽英, 等, 阿达木单抗治疗类风湿关节炎的疗效和安全性[J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(2): 152-155, 166.
 - [29] Loulergue P, Tubach F, Salmon D, et al. Bacteremia in patients receiving TNF-alpha antagonists—a prospective multicenter study[J]. *J Infect*, 2013, 67(6): 524-528.
 - [30] Sarsour K, Greenberg J, Johnston JA, et al. The role of the FcγRIIIa polymorphism in modifying the association between treatment and outcome in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab versus TNF-α antagonist therapies [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2013, 31(2): 189-194.
- (收稿日期 2014-05-15)
- +++++
- (上接第 207 页)
- [5] Yang M, Yan M, Zhang R, et al. Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(10): 1774-1781.
 - [6] Lohberger B, Rinner B, Stüendl N, et al. Aldehyde dehydrogenase 1, a potential marker for cancer stem cells in human sarcoma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43664.
 - [7] Fujii H, Kanya H, Toshifumi T, et al. Reduced expression of INK4a /ARF genes in stem-like sphere cells from rat sarcomas[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(3): 773-778.
 - [8] Kelly SE, Di Benedetto A, Greco A, et al. Rapid selection and proliferation of CD133⁺ cells from cancer cell lines: chemotherapeutic implications[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10035.
 - [9] Takeda N, Jain R, LeBoeuf MR, et al. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches[J]. *Science*, 2011, 334(6061): 1420-1424.
 - [10] 曲绍政, 李书忠, 高甲科, 等. 骨肉瘤干细胞的分离与鉴定[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(14): 2641-2648.
 - [11] Basu-Roy U, Seo E, Ramanathapuram L, et al. Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas [J]. *Oncogene*, 2012, 31(18): 2270-2282.
 - [12] Liu PY, Zhang WB, Wang J, et al. Inhibitory effect and significance of rapamycin on the mammalian target of rapamycin signaling pathway in osteosarcoma stem cells and osteosarcoma cells[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2013, 35(3): 175-180.
 - [13] Yamaoka E, Hiyama E, Sotomaru Y, et al. Neoplastic transformation by TERT in FGF-2-expanded human mesenchymal stem cells[J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(1): 5-11.
 - [14] Burns JS, Kristiansen M, Kristensen LP, et al. Decellularized matrix from tumorigenic human mesenchymal stem cells promotes neovascularization with galectin-1 dependent endothelial interaction[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21888.
 - [15] Amaral AT, Manara MC, Berghuis D, et al. Characterization of human mesenchymal stem cells from ewing sarcoma patients. Pathogenetic implications[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e85814.
 - [16] Berman SD, Yuan TL, Miller ES, et al. The retinoblastoma protein tumor suppressor is important for appropriate osteoblast differentiation and bone development[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(9): 1440-1451.
 - [17] Wang X, Kua HY, Hu Y, et al. P53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling[J]. *J Cell Biol*, 2006, 172(1): 115-125.
 - [18] Tu B, Du L, Fan QM, et al. STAT3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis osteosarcoma[J]. *Cancer Lett*, 2012, 325(1): 80-88.
 - [19] Yang X, Wang YP, Liu FX, et al. Increased invasiveness of osteosarcoma mesenchymal stem cells induced by bone morphogenetic protein-2[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2013, 49(4): 270-278.
 - [20] Baglio SR, Devescovi V, Granchi D, et al. MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31[J]. *Gene*, 2013, 527(1): 321-331.
 - [21] Naujokat C, Steinhart R. Salinomycin as a Drug for Targeting Human Cancer Stem Cells [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 950658.
 - [22] Rainusso N, Brawley VS, Ghazi A, et al. Immunotherapy targeting HER2 with genetically modified T cells eliminates tumor-initiating cells in osteosarcoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(3): 212-217.
- (收稿日期 2014-02-13)