

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.12.002

CD44⁺ 鼻咽癌细胞的干细胞生物学特性

许新华¹, 苏 进¹, 鲁明骞², 李道俊¹, 黄 乔², 薛 峰¹, 易 芳²

Stem Cell Biological Characteristics of CD44⁺ in Human Nasopharyngeal Carcinoma

XU Xin-hua¹, SU Jin¹, LU Ming-qian², LI Dao-jun¹, HUANG Qiao², XUE Feng¹, YI Fang²

1. Oncology Institute, China Three Gorges University, Yichang 443003, China; 2. Department of Oncology, The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University & Yichang Central People's Hospital

Abstract: Objective To separate, expansion, and explore the biological feature of CD44⁺ cells from the human nasopharyngeal carcinoma (NPC) SUNE-1 5-8F cell line. **Methods** Flow cytometry was used to detect the expression of CD44 in SUNE-1 5-8F. Fluorescence-activated Cell Sorting was applied to purify CD44⁺ cells. MTT assay or clone formation assay was used to detect the differences of CD44⁺ and CD44⁻ cells in proliferation and differentiation ability. The expression of stem cell markers Oct4 and Bmi-1 was examined by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** CD44 was positively expressed in about 52.5% of NPC SUNE-1 5-8F cell line. Regardless of serum-free medium and serum medium culture conditions, freshly sorted CD44⁺ cells showed stronger proliferative capacity than CD44⁻ and unsorted CD44⁺ cells. The expression levels of Bmi-1 and Oct4 mRNA in CD44⁺ cells were significantly higher than that in CD44⁻ cells. After 2Gy radiation, the average clone formation efficiency for CD44⁺ and CD44⁻ cells was (23.44 ± 1.90)% and (7.78 ± 1.17)% ($P < 0.001$), respectively. After Cisplatin and Docetaxel treatment, CD44⁺ cells showed a higher survival rate in the same drug concentration compared with CD44⁻ cells. **Conclusion** CD44⁺ cells have the biological characteristics of tumor stem cell and may be assumed as one of markers of NPC tumor stem cells.

Key words: Nasopharyngeal Carcinoma; Tumor stem cell; CD44; Bionomics

摘 要:目的 从人鼻咽癌 SUNE-1 5-8F 细胞株中分离出 CD44⁺ 细胞并探讨其生物学特性。**方法** 常规培养 SUNE-1 5-8F 细胞,采用流式细胞学技术检测 SUNE-1 5-8F 细胞中 CD44⁺ 的表达并用流式细胞仪分选 CD44⁺ 细胞;采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法、克隆形成实验等检测并比较 CD44⁺、CD44⁻ 细胞在体外增殖、分化等方面的差异;并用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测干细胞基因 Oct4、Bmi-1 的表达。**结果** CD44⁺ 细胞在鼻咽癌细胞中 SUNE-1 株所占的比率约为 52.5%;新分选的 CD44⁺ 细胞在无血清培养液和完全培养液中较 CD44⁻ 及未分选细胞均显示出较强增殖能力;RT-PCR 示 Bmi-1 和 Oct4 mRNA 在 CD44⁺ 细胞中的表达水平明显高于 CD44⁻ 细胞。CD44⁺ 和 CD44⁻ 细胞在接受 2Gy 放射处理后,其平均克隆生成效率分别为 (23.44 ± 1.90)% 和 (7.78 ± 1.17)% ($P < 0.001$);CD44⁺ 细胞较 CD44⁻ 细胞在相同顺铂和多西他赛药物浓度下显示出更高的细胞存活率。**结论** CD44⁺ 细胞具有类肿瘤干细胞特性,可能是鼻咽癌的重要肿瘤干细胞标志之一。

关键词: 鼻咽肿瘤;肿瘤干细胞;CD44;生物学特性

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)12-1346-05

0 引言

近年来迅猛发展的肿瘤干细胞(tumor stem cells, TSC)理论为我们重新认识肿瘤的发生和本质,以及临床肿瘤治疗提供了新的方向和视觉角度。

收稿日期: 2011-03-28; **修回日期:** 2011-08-09

基金项目: 湖北省卫生厅科研资助项目(JX4B52); 2011 年宜昌市科技研究与开发项目(A11301-04); 宜昌市中心人民医院 2008 年科研发展基金项目(KFJ2008005)

作者单位: 1. 443003 湖北宜昌, 三峡大学肿瘤研究所; 2. 三峡大学第一临床医学院 & 宜昌市中心人民医院肿瘤科

作者简介: 许新华(1965-), 男, 硕士, 主任医师, 主要从事肿瘤干细胞与恶性肿瘤综合治疗的研究工作

但限于(nasopharyngeal carcinoma, NPC)分布特点,目前国内外 NPC TSC 的研究尚处于起步阶段。我们利用 CD44 作为细胞表面标志物,将 CD44⁺ 细胞从 NPC SUNE-1 5-8F 中分离出来,探索其是否具有肿瘤干细胞的特性,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料

人鼻咽癌细胞株 SUNE-1 5-8F 由华中科技大学同济医学院协和肿瘤中心馈赠。RPMI1640 培养液、新生小牛血清、胰酶(美国 Gibco 公司);碱性成

纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epithelial growth factor, EGF)(美国 Peprotech 公司);anti-CD44⁺ FITC (美国 eBioscience 公司);Hocest33342(碧云天公司);二甲基亚砷(DMSO)(德国 Merck 公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司);顺铂(江苏豪森);多西他赛(齐鲁制药)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 SUNE-1 细胞株培养在含 10% 新生小牛血清 + 双抗(青霉素 100 u/ml、链霉素 100 μg/ml) RPMI1640 完全培养液中。分选后,部分细胞培养在含 10 ng/ml bFGF + 20 ng/ml EGF + 双抗(青霉素 200 u/ml、链霉素 200 μg/ml) RP-MI1640 培养液中。置于 5%CO₂、37℃ 中,每隔 1~2 天传代一次。

1.2.2 流式细胞仪检测并分选 SUNE-1 细胞中的 CD44⁺ 细胞 计数约 6 × 10⁷ 个细胞,用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化,PBS 洗涤。用含 2% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养液重悬,5%CO₂、37℃ 中培养 10 min,离心(1 000 r/min,5 min)去上清液,留取约 100 μl 液体,加入 anti-CD44⁺ FITC 5 μl,4℃ 避光孵育 30 min,离心去上清液,PBS 洗涤至少 3 次,200 目细胞网筛过滤,加 500 μl 含 2% 新生小牛血清 PBS 重悬细胞,上机(FACS Aria,美国 BD 公司)检测 CD44⁺ 表达并分选,用含 20% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养液收集细胞。

1.2.3 细胞增殖速率分析 将新分选后的 CD44⁺、CD44⁻ 以及未分选细胞种植于 96 孔板内,1 × 10³ 细胞/孔,重复至少 3 孔。置于 200 μl 含 10 ng/ml bFGF + 20 ng/ml EGF + 双抗(青霉素 200 u/ml、链霉素 200 μg/ml) 的 RPMI1640 培养液中,5%CO₂、37℃ 培养。在第 1、3、5、7 天分别加入 10 μl MTT 溶液(5 mg/ml),继续培养 4 h 后终止培养,小心吸去孔内培养液,每孔加入 100 μl DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,在酶标仪(Bio-TEK ELX800,美国)上测定各孔的吸光度(A490 nm)值。以培养时间为横轴,吸光度均值为纵轴绘制细胞增殖曲线。

1.2.4 克隆形成实验 将新分选的 CD44⁺、CD44⁻ 以及未分选细胞种植于 6 孔内,300 细胞/孔,重复至少 3 孔。置于完全培养液中,5%CO₂、37℃ 培养 10~14 天,当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃培养液,PBS 洗涤 3 次,2 ml 甲醛固定 10 min,弃上清液,加入 2 ml 结晶紫染色 15 min,弃上清液,流水缓慢洗去染色液,空气干燥后显微镜下计算有效克隆数。

1.2.5 RT-PCR 检测 Oct4、Bmi-1 基因的表达 根

据 Trizol(美国 invitrogen 公司)试剂盒步骤提取新分选的 CD44⁺、CD44⁻ 细胞及未分选细胞总 mRNA。紫外分光光度仪测定纯度(A260/A280:1.8~2.0)及浓度以定量。用 M-MLV 反转录酶(美国 invitrogen 公司)合成 cDNA,置于 -20℃ 冰箱保存备用。PCR 引物设计参照文献^[1-2] 及 Oct4、Bmi-1 cDNA 基因文库。取 1 μl cDNA,分别加入 β-actin、Oct4、Bmi-1 特异性的上下游引物(见表 1)各 1 μl,2 × EasyTaq Supermix(Transgen 公司)10 μl 和去离子水 7 μl,构成 20 μl 反应体系。PCR 扩增条件为 94℃ 10 min,94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,35 个循环。扩增结束后取 8 μl PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离,凝胶成像系统照相记录实验结果。

表 1 Oct4、Bmi-1 和内参 β-actin 基因引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers specific to the Oct-4 and Bmi-1 genes

Genes	Primer sequence	PCR products
β-actin	F:5'-TCACCCACACTGTGCCCAT-3' R:5'-ATGTCACGCACGATTTCCC-3'	160 bp
Oct-4	F:5'-GACAACAATGAGAACCTTCAGGAGA-3' R:5'-CTGGCGCCGGTTACAGAACCA-3'	215 bp
Bmi-1	F:5'-TCATCCTTCTGCTGATGCTG-3' R:5'-GCATCACAGTCATTGCTGCT-3'	221 bp

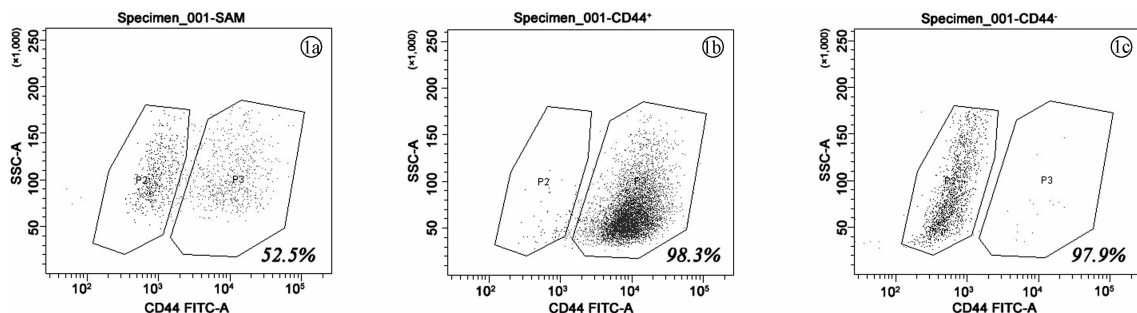
1.2.6 放射及药物敏感实验 将新分选的 CD44⁺、CD44⁻ 细胞种植于 6 孔内,500 细胞/孔,重复至少 3 孔。置于完全培养液中,5%CO₂、37℃ 培养过夜后,接受 2 Gy 的 X 线照射(具体方案如下:SSD=100 cm;Fs=20cm × 20cm;d=1 cm;GA=180°;Mu=182)。继续常规 10~14 天。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养,经无水乙醇固定,结晶紫染色后计数有效克隆形式数目。

药物敏感度分析上,将新分选的 CD44⁺、CD44⁻ 细胞种植于 96 孔板内,800 细胞/孔,重复至少 3 孔。置于完全培养液中,5%CO₂、37℃ 培养过夜,按照不同的浓度梯度加入顺铂、多西他赛,培养 48 h 后,通过 MTT 比色法实验,计算细胞存活率(%)=(实验组 A 值 - 空白组 A 值)/(未加药物组 A 值 - 空白组 A 值) × 100 %。

1.2.7 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理。根据数据特征采用 t 检验,检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 CD44 在 SUNE-1 5-8F 细胞株中的表达情况 流式细胞仪检测到 CD44⁺ 细胞(P3)在 SUNE-



1a: sorting of SUNE-1 5-8F cells using FITC anti-human CD44. The P3 gate represents the CD44⁺ cells (52.5% of total cells) and the P2 gate represents the CD44⁻ cells that were collected for subsequent research; 1b and 1c: the sorting purity of the freshly sorted CD44⁺ and CD44⁻ cells was 98.3% and 97.9%, respectively

图1 流式细胞仪分选 CD44⁺ SUNE-1 5-8F 细胞及分选纯度

Figure 1 Cell sorting results and sorting purity

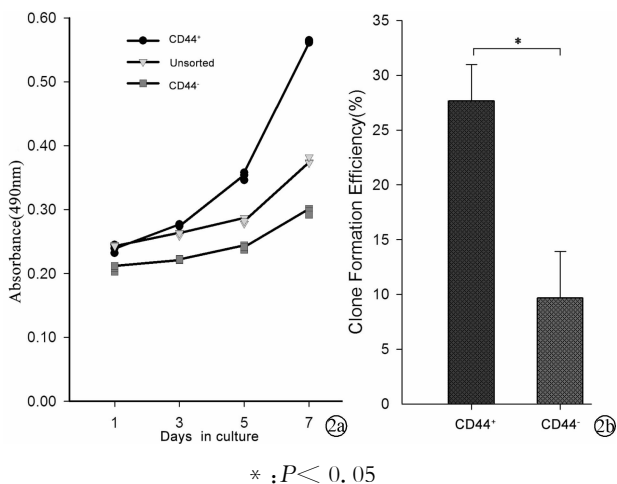
1 5-8F 细胞株中的表达约为 52.5%，见图 1a。

2.2 流式细胞仪分选结果

新分选得到 CD44⁺ 和 CD44⁻ 细胞立即通过流式细胞仪检验分选纯度: CD44⁺ 细胞分选纯度为 98.3%，见图 1b, CD44⁻ 细胞分选纯度为 97.9%，见图 1c。

2.3 细胞增殖速率分析结果

新分选得到的 CD44⁺ 和 CD44⁻ 及未分选细胞经过 MTT 比色法实验, 绘制细胞增殖曲线。CD44⁺ 细胞在第 3、5、7 天紫外吸光度(A)值分别为 0.275 ± 0.002 、 0.352 ± 0.006 、 0.563 ± 0.003 ; 与 CD44⁻ 及未分选细胞相比, CD44⁺ 细胞有较强的增殖能力, 至第 5 天, 细胞增殖明显, 曲线陡直, 未分选细胞次之, 增长曲线平缓, 而 CD44⁻ 细胞曲线较为平坦, 示体外增殖能力较弱, 见图 2a。



* : $P < 0.05$

2a: the growth curves of CD44⁺ and CD44⁻ cells cultured in serum-free RPMI1640 medium for 7 d; 2b: the clone formation of CD44⁺ and CD44⁻ cells cultured in serum RPMI1640 medium for 14 d. CD44⁺ cells grew faster than CD44⁻ cells in both media

图2 细胞增殖曲线及克隆生成效率

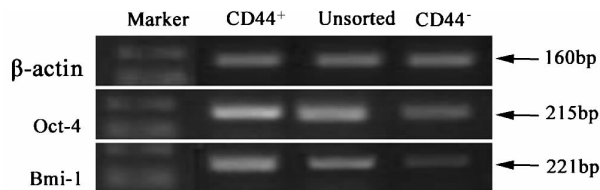
Figure 2 Cell growth curve and Clone formation

2.4 克隆形成实验结果

经过 10~14 天的培养, 绝大多数克隆已大于 50 个细胞。通过计数克隆形成数目后, 计算 CD44⁺ 和 CD44⁻ 细胞平均克隆生成效率(colony-forming efficiency, CFE) 分别为 $(22.17 \pm 6.65)\%$ 和 $(11.50 \pm 5.00)\%$, 统计学分析显示差异有统计学意义($t = 2.596$, $P = 0.041$), 见图 2b。

2.5 Oct4、Bmi-1 基因的表达情况

RT-PCR 结果显示, CD44⁺ 和未分选组细胞中 Bmi-1 和 Oct4 mRNA 的表达量均较高, 而 CD44⁺ 和未分选组细胞中的 Bmi-1 和 Oct4 mRNA 的表达量均显著高于 CD44⁻ 细胞, 见图 3。



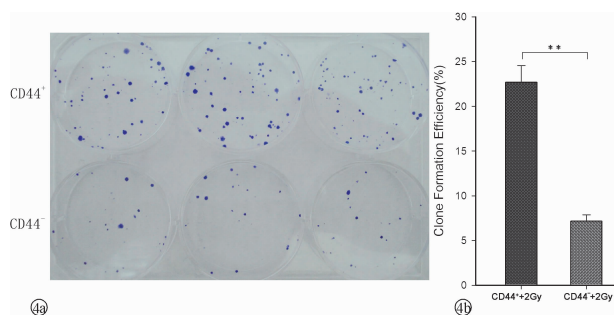
Relative mRNA expression levels of Oct-4 and Bmi-1 in CD44⁺, unsorted and CD44⁻ populations were determined by reverse transcription PCR. Expression levels were normalized to β -actin

图3 Oct4、Bmi-1 基因的表达情况

Figure 3 The expression levels of Oct4 and Bmi-1

2.6 放化疗敏感度在 CD44⁺ 和 CD44⁻ 细胞中的差异
放射处理后的细胞培养约 10~14 天至绝大多数克隆大于 50 个细胞, 通过计数克隆形成数目后, 计算 CD44⁺ 和 CD44⁻ 细胞平均克隆生成效率(colony-forming efficiency, CFE) 分别为 $(23.44 \pm 1.90)\%$ 和 $(7.78 \pm 1.17)\%$ 差异有统计学意义($t = 12.181$, $P < 0.001$), 见图 4。结果提示 CD44⁺ 较 CD44⁻ 细胞对 X 线具有更强的抵抗性。新分选的 CD44⁺ 和 CD44⁻ 细胞被化疗药物处理 48 h 后, 经 MTT 比色法实验测定各孔吸光度(A490 nm)值, 分

别计算 $CD44^+$ 和 $CD44^-$ 细胞在顺铂和多西他赛各浓度的存活率。如图 5 显示, $CD44^+$ 细胞较 $CD44^-$ 细胞在相同顺铂或多西他赛药物浓度下具有更高的细胞存活率, 提示 $CD44^+$ 较 $CD44^-$ 细胞对化疗药物具有更强的抵抗性。

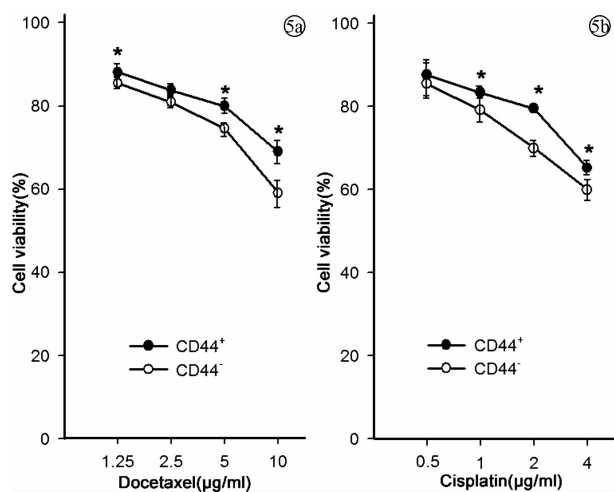


* * : $P < 0.001$

The CFE of freshly sorted $CD44^+$ cells was far stronger than $CD44^-$ cells at an equal cell number

图 4 $CD44^+$ 和 $CD44^-$ 细胞在放射处理后的克隆形成差异

Figure 4 Clone formation differentiation of $CD44^+$ and $CD44^-$ cells after radiation treatment



* : $P < 0.05$

After FACS cell sorting, $CD44^+$ and $CD44^-$ cells were plated at a density of 800 cells/well in 96-well plates and treated with various concentrations of the indicated chemotherapeutic agents for 48 h. $CD44^+$ cells demonstrated more drug resistance to all chemotherapeutic agents tested, compared with $CD44^-$ cells

图 5 $CD44^+$ 和 $CD44^-$ 细胞的药物敏感性

Figure 5 Drug sensitivity of $CD44^+$ and $CD44^-$ cells derived from the SUNE-1 5-8F cell line

3 讨论

TSC 是一种极少数 (0.1%~4%) 的增殖特性失控、可形成肿瘤、具有干细胞特性的肿瘤细胞^[3]。其研究最初始于 1997 年 Bonnet 等^[2]发现的仅占全

部急性粒细胞白血病细胞 0.2% 的 $CD34^+ CD38^-$ 的细胞。近年来, 白血病干细胞的研究发展也带动了多种实体瘤 TSC 的研究, TSC 是形成不同分化程度肿瘤细胞和肿瘤生长、复发及转移根源的观点逐渐被人们接受。但限于鼻咽癌分布特点, 目前国内鼻咽癌干细胞的报道较少, 国内外仅报道姚开泰、曾益新和文忠等^[4-7]学者分别从 NPC 细胞株中分选出 ABCG2⁺、SP 和 $CD133^+$ 细胞, 并认为其具有鼻咽癌干细胞的基本特征。

近年来, 随着研究的发展, 已在数种实体肿瘤中鉴定出各种特异的干细胞表面标志物。其中 $CD44$ 是得到广泛认可的代表标志之一; $CD44$ 是一种跨膜受体蛋白, 属于黏附分子家族, 可与透明质酸等配体结合, 介导细胞与细胞、细胞与基质之间的黏附。近年来发现 $CD44$ 的过表达不仅与肿瘤的浸润、转移、临床分期和耐药有关, 而且其还是乳腺癌^[8]、胰腺癌^[9]、前列腺癌^[10]、直肠癌^[11]、肝癌^[12]等多种 TSC 的表面标志。近来有学者发现, 在舌癌、喉癌、口底癌和上颌窦癌等头颈部鳞癌 (squamous cell carcinoma of the head and neck, SCCHN) 肿瘤组织中, $CD44^+$ 细胞具有起始肿瘤的能力, 并具有自我更新及分化的特性^[13-14]。据此, 研究者认为 $CD44^+$ 的肿瘤细胞群内包含 TSC, $CD44$ 可能是 SCCHN TSC 的特异性表面标志物之一。鉴于 SCCHN 通常具有相同的生物学行为, 本课题组猜想 NPC 中 $CD44^+$ 细胞可能同样具有 TSC 特性。

TSC 的鉴定主要需检测其是否具有干细胞的无限增殖、自我更新和多向分化能力及不同于正常细胞的异型性, 异体移植实验是其鉴定的金标准。我们的早期研究通过细胞免疫荧光技术发现, $CD44$ 在 SUNE-1 5-8F 细胞株中表达, 鉴于科研时间和经费的限制, 本研究未能完成异体移植实验, 仅选择了从鼻咽癌 SUNE-1 5-8F 细胞系中分离 $CD44^+$ 细胞, 并运用 MTT 法、克隆形成实验、流式细胞学技术等观察 SUNE-1 5-8F $CD44^+$ 细胞与 $CD44^-$ 细胞在体外增殖、分化及放化疗敏感度等方面所表现出来的生物学特性差异, 来初步判断 $CD44$ 是否可以作为鼻咽癌干细胞的肿瘤标记物之一。

根据既往研究, $CD44$ 在头颈部肿瘤组织及细胞中含量均较高。Pries 等^[15]曾报道, $CD44^+$ 在头颈部肿瘤组织中的表达量最高可达 87% 以上, 在头颈部各永生化细胞中几乎均高于 95%。本研究中 $CD44^+$ 表达量 (42.4%~52%) 较 Prince 等^[16]报道的肿瘤干细胞标记 ($CD44^+$) 在头颈部肿瘤细胞表达量 (0.1%~42%) 高, 可能与本实验选用的细胞系 SUNE-1 5-8F 有关; SUNE-1 5-8F 细胞系是一种低

分化的鼻咽癌细胞系,具有高成瘤、高转移的特性,其 TSC 细胞含量上可能较其他细胞高。本研究中,不管在无血清培养液还是在 10% 血清完全培养液中,CD44⁺ 细胞均较未分选及 CD44⁻ 细胞显示出更强的增殖能力($P < 0.05$)。CD44⁺ 细胞能够存活,并连续传代,而 CD44⁻ 细胞则会在生长过程中逐渐凋亡。结果显示 CD44⁺ 细胞均较 CD44⁻ 细胞显示出更强的增殖能力($P < 0.05$)。

Bmi-1 基因是一种多梳基因(polycomb group genes, PcG)家族的转录抑制因子,通过多种途径参与细胞调控,包括自我更新/增殖、衰老/永生、起始转录机制和染色质凝集蛋白相互作用等;其适量表达是个体发育所必需,但其高表达则与多种肿瘤的发生、发展、预后密切相关。近年来的研究表明,该基因对于维持干细胞及肿瘤干细胞的自我更新具有重要意义^[17]。Oct4 是全能性或多能性干细胞标志物,目前被认为是维持胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)多能性和自我更新的主要调节因子。迄今为止,Oct4 在成体组织中的表达主要局限于具有干细胞特性的细胞,如皮肤基底细胞层中的个别细胞、乳腺干细胞和胃干细胞等^[18]。既往研究表明,细胞中 Bmi-1 和 Oct4 的表达水平从一定程度上反映了该细胞的自我更新能力。本研究结果显示,而 CD44⁺ 细胞中的 Bmi-1 和 Oct4 mRNA 的表达量均明显高于 CD44⁻ 细胞,与 Prince 等^[16]报道结果相似,提示 CD44⁺ 较 CD44⁻ 细胞具有更强的自我更新能力。

TSC 学说认为,TSC 是肿瘤复发及转移的根源,其具有的较强 DNA 损伤修复功能、高表达多药耐药相关蛋白及 ABC 转运蛋白超家族等特性是导致传统的放、化疗方法不能根治肿瘤的重要原因。Takaishi 等^[19]曾报道 CD44⁺ 与 CD44⁻ 胃癌细胞分别接受 5-Fu 和 VP-16 及放射处理后,可明显观察到 CD44⁺ 细胞具有较高的细胞生存率($P < 0.01$)。本研究中,分别采用顺铂和多西他赛及 X 线照射处理 CD44⁺ 与 CD44⁻ NPC 细胞,得到结果与文献^[19]类似,提示 CD44⁺ 较 CD44⁻ 细胞对化疗药物及 X 线具有更强的抵抗性。

综上所述,CD44⁺ 细胞具有很多 TSC 的特性,如高增殖能力、高表达干细胞标志物及自我更新调控的重要因子,对化疗药物及 X 线具有较强的抵抗性等,CD44 可能是 NPC 干细胞重要的表面标志之一,其体内成瘤能力及是否存在其他特异性的鼻咽癌干细胞标志仍需进一步研究证实。但毫无疑问的是,NPC 干细胞的研究必定会给 NPC 的治疗和预后带来新的突破性进展。

参考文献:

- [1] Tai MH, Chang CC, Kiupel M, et al. Oct4 expression in adult human stem cells evidence in support of the stem cell[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(2): 495-502.
- [2] Qin ZK, Yang JA, Ye YL, et al. Expression of Bmi-1 is a prognostic marker in bladder cancer[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 61.
- [3] Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2008, 18(1): 48-53.
- [4] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia organized as a hierarchy that originates from primitive hematopoietic cell[J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-737.
- [5] 刘求真. 鼻咽癌干细胞的初步研究[D]. 广州: 第一军医大学, 2006.
- [6] Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. *Cancer Research*, 2007, 67(8): 3716-3724.
- [7] 关小芬, 文忠, 申聪香, 等. 人鼻咽癌细胞株中类肿瘤干细胞的分离、培养及鉴定[J]. *解放军医学杂志*, 2008, 33(12): 1461-1464.
- [8] Ai-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [9] Heidt DG, Li C, Mollenberg N, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. *J Surgical Res*, 2006, 130(2): 194-195.
- [10] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10946-10951.
- [11] Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10158-10163.
- [12] Yang ZF, Nga IP, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer[J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-928.
- [13] Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, et al. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(7): 633-639.
- [14] Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(17): 2871-2875.
- [15] Pries R, Witkop N, Trenkle T, et al. Potential stem cell marker CD44 is constitutively expressed in permanent cell lines of head and neck cancer[J]. *In Vivo*, 2008, 22(1): 89-92.
- [16] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(3): 973-978.
- [17] Jiang L, Li J, Song L. Bmi-1, stem cells and cancer[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009, 41(7): 527-534.
- [18] Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, et al. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 23: 201-208.
- [19] Takaishi S, Okumura T, Tu S, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44 [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(2): 1006-1020.

[编辑: 安 凤; 校对: 刘红武]