

·论著·

胃癌细胞系中 CD44⁺ 胃癌干细胞的表达和意义

任 芳,陈毅德,冯丽华,郑志高,范 鑫,林雨标,冯水土

(厦门市海沧医院肿瘤血液内科,福建 厦门 361026)

摘要:目的 探讨胃癌细胞系中 CD44⁺胃癌干细胞的基因表达及其意义。方法 采用无血清培养基获得漂浮球,在胃腺癌细胞系 MKN-45 中用 FACS 检测肿瘤干细胞(CSC)表面标志物 CD44 的表达,采用 FACS 分离 CD44⁺亚群,通过体外培养鉴定两种不同细胞群 CD44⁺和 CD44⁻中的致瘤、自我更新、分化特性,采用实时 RT-PCR 评估 CD44⁺和 CD44⁻中干细胞特异性基因的表达。结果 MKN-45 和 NCI-N87 在无血清培养基中形成胃癌微球体,而 KATO III 和 AGS 不能形成胃癌微球体,MKN-45 细胞系经 FACS 分选 CD44⁺和 CD44⁻中细胞,80% MKN-45 细胞高表达 CD44;CD44⁺细胞在无血清培养基中显示出更高的微球体形成、分化特性;参与 Wnt2、Bmi1、Oct3/4、Notch1、Sox2、Nanog 和其他基因的“干细胞”基因的表达水平在 CD44⁺亚群中高于 CD44⁻亚群。结论 人胃癌细胞中的 CD44⁺亚群可能含有胃癌干细胞样细胞,可为胃癌的诊断、治疗提供参考。

关键词:胃癌;CD44;胃癌干细胞;基因表达

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.20.013

文章编号:1006-1959(2020)20-0045-06

Expression and Significance of CD44⁺ Gastric Cancer Stem Cells in Gastric Cancer Cell Lines

REN Fang, CHEN Yi-de, FENG Li-hua, ZHENG Zhi-gao, FAN Xin, LIN Yu-biao, FENG Shui-tu

(Department of Oncology and Hematology, Xiamen Haicang Hospital, Xiamen 361026, Fujian, China)

Abstract: Objective To investigate the gene expression and significance of CD44⁺ gastric cancer stem cells in gastric cancer cell lines. Methods Floating spheres were obtained with serum-free medium. FACS was used to detect the expression of tumor stem cell (CSC) surface marker CD44 in gastric adenocarcinoma cell line MKN-45, CD44⁺ subgroups were separated by FACS, and two different cell populations were identified by in vitro culture. The tumorigenicity, self-renewal, and differentiation characteristics of CD44⁺ and CD44⁻. Real-time RT-PCR was used to evaluate the expression of stem cell-specific genes in CD44⁺ and CD44⁻. Results MKN-45 and NCI-N87 formed gastric cancer microspheres in serum-free medium, while KATO III and AGS could not form gastric cancer microspheres. The MKN-45 cell line was sorted by FACS for CD44⁺ and CD44⁻ cells, 80% MKN-45 cells highly express CD44; CD44⁺ cells show higher microsphere formation and differentiation characteristics in serum-free medium; the expression level of "stem cell" genes involved in Wnt2, Bmi1, Oct3/4, Notch1, Sox2, Nanog and other genes CD44⁺ subgroup was higher than CD44⁻ subgroup. Conclusion The CD44⁺ subset of human gastric cancer cells might contain gastric cancer stem cell-like cells, which could provide references for the diagnosis and treatment of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; CD44; Gastric cancer stem cells; Gene expression

尽管胃癌(gastric cancer, GC)的发病率和死亡率一直下降,但它仍然是世界上第 5 大最常见的恶性肿瘤,2012 年大约有 100 万新增病例,尤其在东亚(主要在中国)。同时,胃癌是全球癌症死亡的第 3 大原因^[1]。大多数患者早期无症状或存在非特异性症状,确诊时常为晚期,日本和韩国使用钡光荧光检查或内窥镜检查,更有利于早诊断、早治疗^[2]。GC 被认为是一种预后不良的恶性疾病,5 年生存率<30%^[3]。目前 GC 研究的主要焦点是通过寻找新工具和技术来实现早发现、早诊断、早治疗^[4]。因此,如何识别且清除早期胃癌细胞是胃癌患者早诊断、早治疗的关键。癌症干细胞(CSC)可以为胃癌诊断和治疗提供新方法。研究表明,CSCs 是肿瘤起始、侵袭、远处转移和抗癌药物耐药的原因^[5],胃 CSC 可能在胃癌早期发挥重要作用并促进肿瘤发生进展。目前有学者推测可通过特定表面标志物的鉴定

基金项目:1. 厦门市科技计划(医疗卫生项目)(编号:3502Z20184049、3502Z20199106);2. 厦门市海沧区科技计划项目(编号:350205Z20174005)

作者简介:任芳(1980.6-),女,福建厦门人,博士,主治医师,主要从事肿瘤内科及肿瘤分子机制研究

通讯作者:冯水土(1979.6-),男,福建厦门人,硕士,主任医师,主要从事肿瘤内科及肿瘤分子机制研究

CSC^[6],其中 CD44 首先被确定是乳腺癌的特异性 CSC 标志物^[7],也已被证明是其他许多实体瘤的 CSC 标志物^[8],也有学者认为 CD44 可能也是胃 CSC 标志物^[9]。本研究从人 MKN-45 胃腺癌细胞系中分离、鉴定、并培养胃 CSC 细胞,观察 CD44⁺细胞的特性,评估其作为胃癌细胞表面标志物的价值。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人胃癌细胞系 MKN-45、NCI-N87、KATO III、AGS 购自 ATCC 公司,置于含 10%胎牛血清的 1640 培养基(HyClone)中培养;加入 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素(Gibco);在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中,培养基每 2 d 更换 1 次。将细胞以 80%汇合传代,并以 20%汇合接种,保持最佳培养条件。

1.2 胃癌微球体细胞培养 从贴壁细胞(1.0×10⁴/ml)中提取胃癌微球体细胞,置于无血清的 PRMI-1640 培养基(HyClone)中,培养基含 2%B27、20 ng/ml EGF(R&D)、10 ng/ml 人 FGF-2(R&D)和 10 mM HEPES(Invitrogen)。7~10 d 后观察 6 孔板中的胃癌微球体细胞,并使用倒置显微镜(Olympus)以 40 和 200 放大倍数进行定量。胃癌微球体通过胰蛋白酶-EDTA 溶液(GIBCO)消化,40-μm 筛(BD Bio-

sciences)过滤后获得单细胞悬液,并再次将单细胞接种。最后去除生长因子,添加 10%FBS 后,从胃癌微球体中获得分化细胞。

1.3 流式细胞术分析和分选 CD44 可作为原发性肿瘤和胃癌 CSC 鉴别标记^[9,11-13]。本实验通过使用 FACS 分析人 MKN-45 胃腺癌细胞系的 CD44 表达模式。通过 FACS 分选培养 CD44⁺胃癌细胞,诱导肿瘤微球体形成。培养基中加入 10%FBS 代替 EGF 和 FGF-2,观测 CD44 的表达及其形态。步骤如下:蛋白酶消化 MKN-45 细胞,用 PBS 洗涤两次并离心,将 1×10^6 个细胞沉淀重悬于含 2%FBS 的 PBS 中,使用 100 倍稀释的抗人 CD44-FITC 小鼠单克隆抗体(克隆 G44-26,BD Pharmingen)于室温下,孵育 30 min 后,在 FACS Calibur (Becton-Dickinson)上分析样品。收集 $(5 \sim 10) \times 10^6$ 个细胞并染色,并使用 FACS Aria (Becton-Dickinson)分选。选染色最显著的前 10%细胞和最模糊的 10%细胞作为阳性和阴性对照组。FACS 分选后,使用台盼蓝染色鉴别细胞活性,分选细胞含量预计高于 96%。使用 CD44 小鼠单克隆抗体分析胃癌微球体细胞和分化细胞的 CD44 表达。

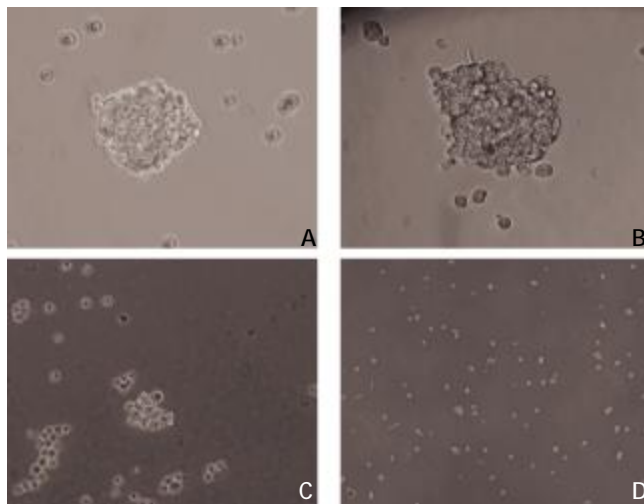
1.4 RT-PCR 分析 CD44⁺和 CD44⁻胃癌细胞参与干细胞相关途径的基因表达情况 按照试剂盒说明书,使用 Trizol 试剂(Invitrogen)从 CD44⁺和 CD44⁻细胞中提取总细胞 RNA。取 1 μ g 总 RNA,通过 oligo(dT)18 引物,反转合成 cDNA,按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)试剂盒说明书进行。反应体系包含:0.1 μ M 正向和反向引物以及 SYBR Green PCR 混合物(Applied Biosystems)进行 RT-qPCR。具体引物序列如下:CD44 正向引物:TCCAGGCAACTCCTAGTAGTA,反向引物:CTGTCCCTGTTGTCTGAAT;Wnt2 正向引物:ACTCTCAGGACATGCTGGCT,反向引物:AC-

GAGGTCATTTTCGTTGG;Bmi1 正向引物:TGGA-GAAGGAATGGTCCACTTC,反向引物:GTGAG-GAAACTGTGGATGAGGA;Notch1 正向引物:CCT-GAGGGCTTCAAAGTGTC,反向引物:CG-GAACTTCTTGGTCTCCAG;Oct4 正向引物:CTGGA-GAAGGAGAAGCTGGA,反向引物:CAAATTGCTC-GAGTTCTTTCTG;Sox2 正向引物:TGCGAGCGCTG-CACAT,反向引物:CGGGCAGCGTGTACTTATCC;Nanog 正向引物:CAACCAGACCCAGAACATCC,反向引物:TTCCAAAGCAGCCTCCAAG;C-myc 正向引物:TCAAGAGGCGAACACACAAC,反向引物:GGC-CTTTTCATTGTTTCCA;ABCG2 正向引物:TGGCT-TAGACTCAAGCACAGC,反向引物:TCGTCCCTGCT-TAGACATCC;CXCR4 正向引物:GAGTGGCCGAC-CTCCTCTT,反向引物:ACATGGACTGCCTTG-CATAGG;GAPDH 正向引物:ACCCACTCCTCCAC-CTTTGA,反向引物:CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT。具体操作如下:在 95 $^{\circ}$ C 变性,5 min 后,反应在 95 $^{\circ}$ C 下进行 40 个延伸、扩增循环。通过 7900HT 快速实时 PCR 系统(Applied Biosystems)进行信号检测。以 GAPDH 基因作为内参,根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量。每组重复实验 3 次,使用 Microsoft Excel 计算平均值和标准差。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 23.0 软件对所有的实验数据进行统计学分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃泌素形成不同的人胃癌细胞系 MKN-45 和 NCI-N87 细胞显示直径约 100 μ m 的经典球状集落,KATO III 细胞形成少量集落,而 AGS 细胞系不能形成球状集落并死亡,见图 1。



注:A.MKN-45;B.NCI-N87;C.KATO III;D.AGS

图 1 不同人胃癌细胞系产生胃癌微球体图像

2.2 CD44⁺干细胞相关基因的表达 MKN-45 细胞显示出高水平的 CD44 表达, 高达 82% 细胞表达 CD44; 随后通过 FACS 从 MKN-45 细胞系中分选出 CD44⁺ 和 CD44⁻ 细胞, 分选的细胞的纯度大于 96%, 见图 2。“肿瘤干性”基因包括 CD44、Wnt2、Bmi1、Notch1、Oct4、Sox2、Nanog、C-myc、转运蛋白和运动基因(ABCG2、CXCR4), 在 CD44⁺ 中表达高于 CD44⁻ 细胞亚群, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 3。相对于 CD44⁻ 细胞, CD44⁺ 细胞形成更多、更大的微球体, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4、图 5。

CD44⁺ MKN-45 细胞在无血清细胞培养基中培养, 以维持未分化状态, 培养 10-14 d 后, 通过倒置相差显微镜观察形成漂浮的微球体, 见图 6。此外, 胃癌球体在第 3 次细胞培养传代后生长为更大、更紧凑的微球体, 见图 7。培养 1 d 后, 漂浮的胃微球体迁移为贴壁细胞, 贴壁细胞获得与其亲本 MKN-45 非常相似的多边形形态, 见图 8。流式细胞术分析胃癌微球体和分化的贴壁细胞表明, 在分化过程中 CD44 表达从 98% 降低至 85%, 见图 9。

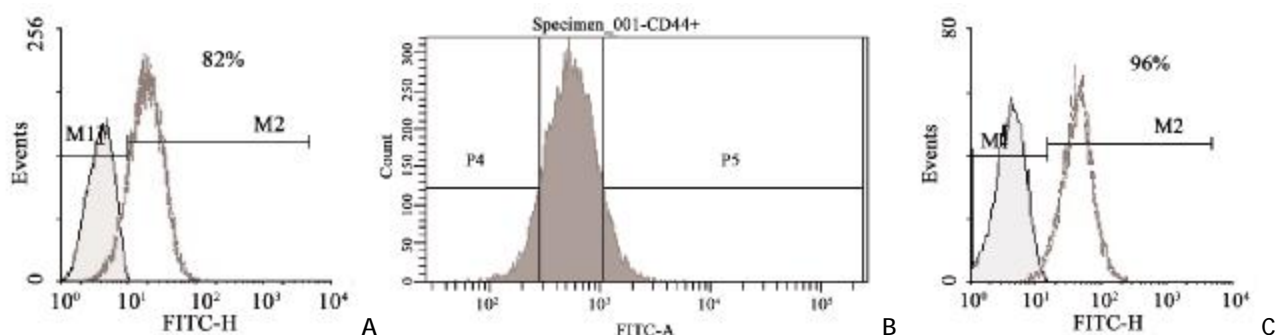


图 2 MKN-45 细胞系中 CD44⁺ 细胞的表达

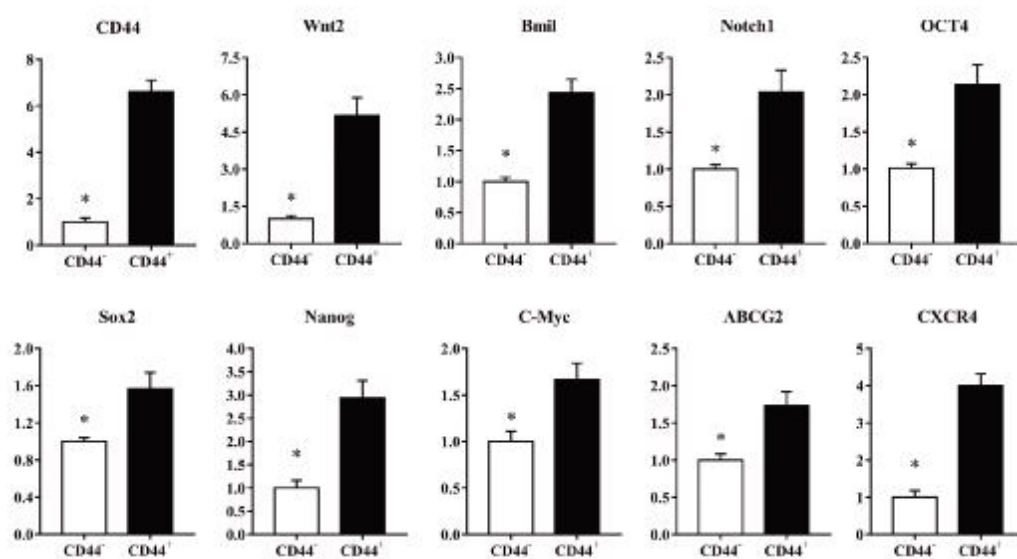


图 3 RT-qPCR 检测 CD44⁺ 和 CD44⁻ 细胞的干细胞基因表达

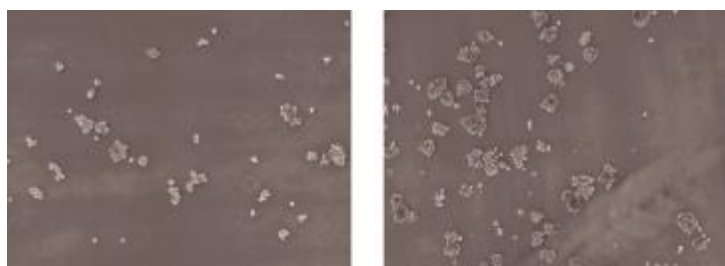


图 4 不同亚群的胃癌微球体形成能力

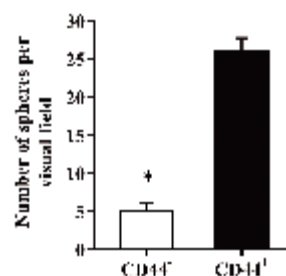


图 5 CD44⁺ 与 CD44⁻ 细胞形成的微球体比较

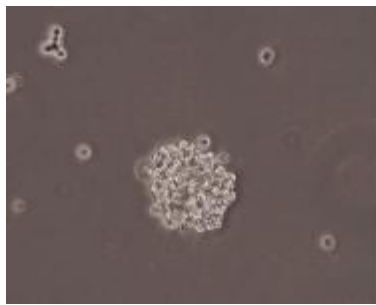
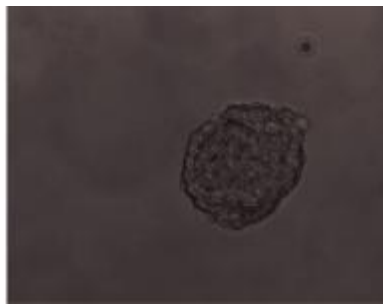
图 6 CD44⁺MKN-45 细胞在无血清培养基中形成的漂浮微球体

图 7 胃癌球体第 3 次培养形成微球体

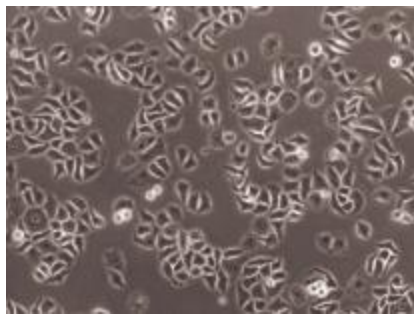


图 8 培养 1 d 后胃微球体迁移为贴壁细胞

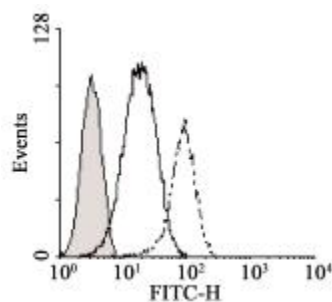


图 9 分化过程中 CD44 的表达下降

3 讨论

癌症干细胞为具有无限增殖、分裂、多向分化潜能的细胞亚群^[14]。最早在急性髓性白血病中发现了 CSC,其中 CD34⁺CD38⁻亚群具有干细胞增殖分化能力^[15],越来越多的证据表明 CSCs 存在于各种实体肿瘤中,包括乳腺^[7]、结肠直肠^[16]、肺^[17]、头颈部^[18]、胰腺^[19]、肝^[20]、胃癌^[9]、胶质瘤^[21]、前列腺^[22]等。因此,癌症干细胞的检测对癌症患者的准确诊断和有效治疗具有重要意义。寻找细胞表面标志物是鉴定和分离 CSC 最重要方法,流式细胞术或磁性细胞分选已在许多实体恶性肿瘤中成功分离 CSC。然而,实体瘤 CSC 表面识别标志物的确定无疑是 CSC 领域最困难的挑战^[6]。大多数用于分选的标记物是经验性,且源自正常干细胞。最近已有报道分离、鉴定胃 CSC 的各种技术和细胞表面标志物^[13,23-26],其中 CD44 是用于胃 CSC 最具有潜力标记物之一。CD44 是 I 类跨膜糖蛋白,可以作为细胞外基质如透明质酸的受体。CD44 因其在介导细胞-基质相互作用以及与恶性过程相关的重要功能,尤其是癌症转移中的重要作用而备受关注^[27]。HA-CD44 在细胞外结构域中的相互作用激活了多种信号通路,涉及 CSC 自我更新、克隆形成、抗凋亡/存活,放化疗抗性^[28]。CD44 单独与其他标记物组合鉴定 CSC 已应用于许多肿瘤中,如乳腺癌^[7]、胰腺^[29]、结肠直肠^[30]、肺^[31]、肝细胞^[32]、卵巢^[33]、头颈部^[34]等。Takaishi 等通过分析一组人类 GC 细胞系,在 CD44⁺细胞亚群中鉴定出 CSC^[9]。与 CSC 的定义标准一样,从 5 个 GC 细胞系中的 3 个细胞系中分选出 CD44⁺细胞,在悬浮状态下形成球状集落,以及在 SCID 小鼠的胃和皮肤中

形成异种移植肿瘤。因此,本研究试图通过 CD44 富集 MKN45 细胞中收集可能存在的 CSC。许多研究人员使用荧光激活细胞分选来鉴定和分离 CSCs,确定其在特定的无血清培养基中形成球体。本课题组通过 FACS 从 MKN-45 细胞系中分选出 CD44⁺和 CD44⁻细胞,发现 CD44⁺细胞在体外显示出更高胃癌微球体形成效率,与相关报道结果一致^[9]。此外,CD44⁺细胞能够在无血清培养基中作为胃癌微球体增殖,并在 10%FBS 存在下分化,表明它们保留了自我更新能力和分化潜能。

目前研究已在多个癌症中检测到干细胞相关基因(也称为“肿瘤干性基因”),其可解释 CSCs 的自我增殖、分化特性^[35]。因此,开发有效的诊断、治疗方法首先需确定 CSC 中有活性、特异的分子标志物。据报道,这些基因的失调及其信号通路的变化参与了胃癌的发生发展。通过 RT-PCR(qRT-PCR)技术可分析 CD44⁺和 CD44⁻胃癌细胞之间“干性基因”的 mRNA 表达差异。本研究发现,与 CD44⁻亚群相比,CD44⁺胃癌细胞群高表达的“干性基因”包括 CD44、Wnt2、Bmi1、Notch1、Oct4、Sox2、Nanog、C-myc、转运蛋白和运动基因,如 ABCG2 和 CXCR4^[36-39]。研发能够特异阻断这些与 CSC 增殖、分化和转移相关基因的药物将增强肿瘤的治疗效果并改善预后。同时对这些基因进行深入研究,进一步阐明它们对 CSCs 的确切作用以及其与胃癌的关系具有重要意义。然而,一些胃癌细胞系本身含有高比例的 CD44⁺癌细胞,这与当前的 CSC 模型不一致,可能与 CSC 尚未完全纯化,且标志物特异性不足有关^[40]。本研究中,MKN-45 细胞显示出高水平的 CD44 表达,高达

80%。此外,肿瘤块内可能存在多个 CSC 亚群,可能需要多个标记物的组合来识别完整的 CSC 群体^[41]。最近已报道 LGR5+(GPR49+) 干细胞位于胃窦区域,持续分化为所有胃窦细胞^[42]。本研究还分析了干细胞相关基因 LGR5 在胃癌细胞系中的表达,但并未发现 LGR5 在 CD44⁺和 CD44⁻肿瘤细胞中表达的差异。因此,LGR5 可能不是胃癌 CSC 标记。

总之,MKN-45 细胞中存在 CSC,FACS 是分离和鉴定胃癌 CSC 的有效手段。然而,由于胃 CSC 的特异性表面标志物未知,异种移植肿瘤模型是鉴定 CSCs 的金标准,因此需要进一步的 DNA 高通量测序和体内实验来鉴定潜在的胃癌干细胞标志物,这可能有助于早期诊断和更有效的胃癌靶向治疗。

参考文献:

- [1] Jacques F, Isabelle S, Rajesh D, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. International Journal of Cancer, 2015, 136 (5): E359-E386.
- [2] Yun SS, Han KY. Screening and Early Detection of Gastric Cancer: East Versus West [J]. Surgical Clinics of North America, 2015, 95(5): 1053-1066.
- [3] Siegel RL, Fedewa SA, Miller KD, et al. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2015 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015.
- [4] Beeharry MK, Liu WT, Yan M, et al. New blood markers detection technology: A leap in the diagnosis of gastric cancer [J]. World Journal of Gastroenterology, 2016, 22(3): 12.
- [5] Eaves CJ. Cancer stem cells: Here, there, everywhere [J]. Nature, 2008, 456(7222): 581-582.
- [6] Woodward WA, Sulman EP. Cancer stem cells: markers or biomarkers [J]. Cancer & Metastasis Reviews, 2008, 27(3): 459-470.
- [7] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [8] Thapa R, Wilson GD. The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer [J]. Stem Cells International, 2016(2016): 2087204.
- [9] Shigeo T, Tomoyuki O, Shuiping T, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44 [J]. Stem Cells, 2010, 27(5): 1006-1020.
- [10] Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology [J]. Neoplasia, 2015, 17(1): 1-15.
- [11] Zhang C, Li C, He F, et al. Identification of CD44+CD24+ gastric cancer stem cells [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137 (11): 1679-1686.
- [12] Yoon C, Park DJ, Schmidt B, et al. CD44 expression denotes a subpopulation of gastric cancer cells in which Hedgehog signaling promotes chemotherapy resistance [J]. Clinical Cancer Research, 2014, 20(15): 3974-3988.
- [13] Yu D, Shin HS, Choi G, et al. Proteomic analysis of CD44(+) and CD44- gastric cancer cells [J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2014, 396(1-2): 213-220.
- [14] O'Connor, Michael L, Xiang D, et al. Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward [J]. Cancer Letters, 2014, 344(2): 180-187.
- [15] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. Nat Med, 1997, 3(7): 730-737.
- [16] Daisuke I, Takatsugu I, Keisuke M, et al. Colorectal Cancer Stem Cells Acquire Chemoresistance Through the Upregulation of F-Box/WD Repeat-Containing Protein 7 and the Consequent Degradation of c-Myc [J]. Stem Cells, 2017, 35 (9): 2027-2036.
- [17] Alamgeer M, Peacock CD, Matsui W, et al. Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies [J]. Respiriology, 2013, 18(5): 757-764.
- [18] Jing H, Toshio F, Syed RH, et al. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma [J]. BMC Cancer, 2014(14): 173.
- [19] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 1030-1037.
- [20] Taro Y, Xin WW. Cancer stem cells in the development of liver cancer [J]. Journal of Clinical Investigation, 2013, 123 (5): 1911-1918.
- [21] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [22] Li T, Su Y, Mei Y, et al. ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome [J]. Laboratory investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology, 2010, 90(2): 234-244.
- [23] Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, et al. CD44+ slow-cycling tumor cell expansion is triggered by cooperative actions of Wnt and prostaglandin E2 in gastric tumorigenesis [J]. Cancer Science, 2010, 101(3): 673-678.
- [24] Lau WM, Teng E, Chong HS, et al. CD44v8-10 Is a Cancer-Specific Marker for Gastric Cancer Stem Cells [J]. Cancer Research, 2014, 74(9): 2630-2641.
- [25] Fukamachi H, Shimada S, Ito K, et al. CD133 is a marker of gland-forming cells in gastric tumors and Sox17 is involved in its regulation [J]. Cancer, 2011, 102(7): 1313-1321.
- [26] Nishikawa S, Konno M, Hamabe A, et al. Aldehyde dehydrogenase high gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy [J]. International Journal of Oncology, 2013, 42(4): 1437-1442.
- [27] Negi LM, Talegaonkar S, Jaggi M, et al. Role of CD44 in tumour progression and strategies for targeting [J]. Journal of Drug Targeting, 2012, 20(7): 561.
- [28] Bourguignon LY, Shiina M, Li JJ. Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression [J]. Advances in Cancer Research, 2014, 123(22): 255-275.
- [29] Ling L, Xinbao H, Jun Q, et al. Antibody Against CD44s Inhibits Pancreatic Tumor Initiation and Postradiation Recurrence in Mice [J]. Gastroenterology, 2014, 6(10): 165.

(下转第 53 页)

(上接第 49 页)

- [30]Dotse E,Bian Y.Isolation of colorectal cancer stem-like cells [J].Cytotechnology,2016,68(4):609-619.
- [31]Leung EL,Fiscus RR,Tung JW,et al.Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties[J].PLoS One,2010,5(11):e14062.
- [32]Michishita M,Ezaki S,Ogihara K,et al.Identification of tumor-initiating cells in a canine hepatocellular carcinoma cell line[J].Research in Veterinary ence,2014,96(2):315-322.
- [33]Meng E,Long B,Sullivan P,et al.CD44+/CD24 ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival[J].Clinical & Experimental Metastasis,2012,29(8):939-948.
- [34]Luciana A,Douglas G,Cristiane S,et al.Profiling the Behavior of Distinct Populations of Head and Neck Cancer Stem Cells[J].Cancers,2016,8(1):7.
- [35]Bhardwaj A,Arora S,Prajapati VK,et al.Cancer"stemness" - regulating microRNAs:role,mechanisms and therapeutic potential[J].Current Drug Targets,2013,14(10):1175.
- [36]Borah A,Raveendran S,Rochani A,et al.Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells:clinical implications for cancer therapy[J].Oncogenesis,2015,4(11):e177.
- [37]Es-Haghi M,Soltanian S,Dehghani H.Perspective:Cooperation of Nanog,NF- κ B, and CXCR4 in a regulatory network for directed migration of cancer stem cells [J].Tumor Biology, 2015,37(2):1559-1565.
- [38]Matsuoka J,Yashiro M,Sakurai K,et al.Role of the Stemness Factors Sox2,Oct3/4,and Nanog in Gastric Carcinoma[J].Journal of Surgical Research,2012,174(1):130-135.
- [39]Siddique HR,Saleem M.Role of BMI1,a stem cell factor,in cancer recurrence and chemoresistance:preclinical and clinical evidences[J].Stem Cells,2012,30(3):372-378.
- [40]Rocco A,Compare D,Nardone G.Cancer stem cell hypothesis and gastric carcinogenesis:Experimental evidence and unsolved questions [J].World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2012,4(3):54-59.
- [41]Brungs D,Aghmesheh M,Vine KL,et al.Gastric cancer stem cells:evidence,potential markers,and clinical implications[J].Journal of Gastroenterology,2016,51(4):313-326.
- [42]Wu C,Xie Y,Gao F,et al.Lgr5 expression as stem cell marker in human gastric gland and its relatedness with other putative cancer stem cell markers[J].Gene,2013,525(1):18-25.

收稿日期:2020-09-02;修回日期:2020-09-12

编辑/成森