

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.003

人肝癌组织中肿瘤干细胞样细胞的分离培养及鉴定

赵璇, 冉宇靓*, 遇琬, 孙力超, 胡海, 李春, 孙立新, 杨治华(中国医学科学院北京协和医学院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

[摘要] 目的: 从人肝癌组织中分离培养肝癌干细胞样细胞, 为进一步研究肝癌干细胞靶向治疗奠定基础。方法: 采用酶消化法和以原代培养结合短暂传代培养的方法从人肝癌组织中分离出含人肝癌干细胞样细胞(human liver cancer stem-like cells, hLCSLCs)的连续传代细胞, 分别加入肝素、白蛋白、氢化可的松以筛选适用于hLCSLCs的无血清悬浮成球培养基。以流式细胞术检测hLCSLCs和由无血清悬浮成球培养所获得的成球细胞中旁群(side population, SP)细胞、CD133及CD90等的表达, 裸鼠成瘤实验检测这两种细胞的致瘤能力。结果: 成功地从人肝癌组织分离获得hLCSLCs, 其SP、CD133⁺和CD90⁺细胞含量分别为0.9%、0.8%和12.7%, 裸鼠皮下接种2000个SP细胞的成瘤率为100%。含有肝素的无血清培养基更适于hLCSLCs的成球培养, 所获成球细胞中SP、CD133⁺和CD90⁺细胞含量分别为4.6%、9.7%和48%, 接种10000个成球细胞即可全部成瘤。结论: 成功建立了从人肝癌组织中分离肿瘤干细胞样细胞的方法, 添加肝素的无血清悬浮成球培养法可有效富集肝癌干细胞样细胞。

[关键词] 肝肿瘤; 肿瘤干细胞; SP细胞; 肝素; CD133; CD90

[中图分类号] Q279; R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0436-06

Isolation, cultivation and identification of cancer stem-like cells from human liver cancer tissues

ZHAO Xuan, RAN Yu-liang*, YU Long, SUN Li-chao, HU Hai, LI Chun, SUN Li-xin YANG Zhi-hua(State Key Laboratory of Molecular Oncology, Institute of Oncology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

[Abstract] Objective: To isolate and cultivate liver cancer stem-like cells (hLCSLCs) from human liver cancer specimens, so as to lay a foundation for stem cell-targeted therapy of liver cancer. **Methods:** The hLCSLCs were obtained from fresh liver cancer tissue using enzymatic digestion and short-term primary culture. Serum-free medium suitable for suspension sphere formation of hLCSLCs was selected by culturing them with serum-free medium supplement with heparin, albumin or hydrocortisone. Numbers of side population (SP) cells, and expressions of CD133 and CD90 in the hLCSLCs and sphere cells were examined by flow cytometry assay. Tumor formation ability of hLCSLCs and sphere cells were assessed by tumor formation assay. **Results:** hLCSLCs were successfully obtained from human liver cancer tissues, with SP cells being 0.9%, CD133 positive cells being 0.8% and CD90 positive cells being 12.7% in the hLCSLCs. The tumor formation rate was 100% when 2000 SP cells were subcutaneously injected into nude mice. Serum-free medium containing heparin was more suitable for sphere formation of hLCSLCs, with SP cells being 4.6%, CD133⁺ cells being 9.7%, and CD90⁺ cells being 48% in these sphere cells. The tumor formation rate was 100% when 10000 sphere cells were injected into nude mice. **Conclusion:** We have successfully established a method for isolating hLCSLCs from human liver cancer tissues. Serum-free suspension medium containing heparin can effectively enrich hLCSLCs.

[Key words] liver neoplasms; tumor stem cell; side population cell (SP cell); heparin; CD133; CD90

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 436-441]

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(No. 2009CB521804)。Supported by the Major Basic Research and Development Program (973) of China(No. 2009CB521804)

[作者简介] 赵璇(1983-),女,汉族,北京市人,硕士,主要从事肿瘤靶向治疗方面的研究。E-mail: xuanzhao117@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: ran_yuliang@126.com

目前在乳腺癌、结肠癌等多种实体瘤中已成功分离出肿瘤干细胞,它们在肿瘤发生、发展、转移、耐受放疗中发挥了关键作用,是未来最佳的生物治疗靶点之一^[1]。但现在分离肝癌干细胞还缺乏广谱的标志物,且绝大多数分离工作均局限于肝癌细胞系^[2,4],直接从人癌组织分离并培养肝癌干细胞尚无报道,严重阻碍了对肝癌干细胞的深入研究。本课题采用一种原代培养结合短暂传代培养的新方法,从人肝癌组织中分离可产生肝癌干细胞样细胞的连续传代细胞系,并尝试建立一种可有效富集肝癌干细胞样细胞的体外无血清悬浮培养技术,以期建立一种从人肝癌组织中分离培养获得肿瘤干细胞样细胞的新方法,为进一步研究肝癌干细胞的靶向治疗策略和治疗剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞和主要试剂

4~6周龄 BALB/c(nu/nu)裸鼠购自中国药品生物制品鉴定所[实验动物合格证号 SCXK(京)2005-0004]。常规细胞培养用液均购自 GibcoBRL 公司,胎牛血清(FBS)和牛血清白蛋白(BSA)购自北京元亨金马生物技术公司。维拉帕米、Hoechst33342、肝素、氢化可的松购自 Sigma 公司,EGF、bFGF、B27 购自 Invitrogen 公司,LIF 购自 Chemicon 公司。抗 CD133、CD90 抗体均购自 Abcam 公司,FITC 标记的二抗购自 Jackson 公司。低黏附 6 孔板购自于 Costar 公司。Cell Counting Kit-8 购自日本同仁化学所。牛脑抽提物为本室按照文献^[5]方法自行制备。人肝癌组织标本由中国医学科学院肿瘤医院腹部外科提供。

1.2 人肝癌组织来源细胞的原代培养及细胞传代

新鲜肝癌组织洗净剪碎,经 0.1% 的胰酶和 0.025% 的 I 型胶原酶 37℃ 消化 30 min,滤网过滤去渣,4℃ 下 500×g 离心 5 min,弃上清;用 5 ml 含有 20% 人血浆的 DMEM-E 培养基孵育 5 min,细胞重悬后经 20% 的 Percoll 在 4℃ 下 1 500×g 离心 15 min,收集含细胞的沉淀,再经 DMEM-E 洗涤 2 次,每次 4℃ 下 500×g 离心 5 min。所获细胞移至培养瓶中,以含有 10% FBS、100 g/ml 牛脑抽提物、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 DMEM-E 培养基培养 48 h,弃上清,洗掉未贴壁细胞继续培养,1 周后挑取多个形成的集落,混匀,移入新瓶培养。第 8 代时挑取非铺路石样形态的细胞集落分开培养,命名为人肝癌干细胞样细胞(human liver cancer stem-like cells, hLCSLCs)细胞。

1.3 CCK-8 法检测细胞的增殖

将指数生长期细胞 1×10^3 个接种到 96 孔板中,连续培养 6 d。每天随机选取其中 2 孔加入 10% 体积的 CCK-8(按试剂说明书操作),1 h 后测定 D_{450} ,绘制细胞生长曲线,并计算细胞的群体倍增时间。

1.4 流式细胞术鉴定肿瘤干细胞相关亚群

收集 hLCSLCs,调整密度至 1×10^6 /ml,分别加入抗 CD133、CD90 抗体孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,加入 FITC 标记的二抗,避光反应 30 min,再 PBS 洗涤 3 次,流式细胞术检测其中阳性细胞含量。

参照 Kondo 等^[6]的方法,将 hLCSLCs 消化为单细胞悬液,加入 Hoechst33342 染料至终质量浓度 5 μ g/ml,对照组加入维拉帕米至终质量浓度 50 μ g/ml,37℃ 孵育 90 min,弃上清,用预冷 PBS 洗 3 次,加入 PI 至终质量浓度 2 μ g/ml,流式细胞术检测其中旁群(side population, SP)细胞的比例。

1.5 SP 细胞裸鼠成瘤实验

收集 hLCSLCs,流式细胞术分选收获其中的 SP 细胞。按照 500、1 000、2 000 细胞/只接种于 BALB/c 裸鼠背部右侧皮下,观察成瘤情况。

1.6 hLCSLCs 无血清悬浮培养基的筛选

无血清悬浮培养基为添加 EGF(20 ng/ml)、bFGF(20 ng/ml)、B27(1:50)、LIF(10 ng/ml)和 LG(2 mmol/L)的 DMEM:F12 培养基,并根据文献^[7-9]方法分别添加 Heparin、白蛋白、氢化可的松,hLCSLCs 接种于低黏附板中培养,观察形成细胞球所用时间、形态,筛选可富集干细胞的适宜的 hLCSLCs 培养基。

1.7 hLCSLCs 细胞系中肿瘤干细胞相关亚群的分离培养和传代

收集 hLCSLCs 单细胞悬液,计数后重悬于无血清培养基中,以 1×10^3 /孔接种于低黏附的 6 孔板中,37℃、5% CO₂ 中培养 7~10 d,待形成细胞球后,将其消化成单细胞悬液,以 1×10^3 /孔再次接种于低黏附的 6 孔板中,连续传代 3 次,记录 hLCSLCs 形成细胞球时间及成球个数。

1.8 成球细胞中肿瘤干细胞相关亚群的鉴定

利用流式细胞仪检测 hLCSLCs 经过无血清悬浮培养所形成的细胞球中 CD133、CD90、SP 阳性细胞所含比例,方法同上所述。

1.9 hLCSLCs 和成球细胞裸鼠成瘤实验

hLCSLCs 细胞按 1×10^4 、 5×10^5 、 1×10^6 /只;成球细胞按 5×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 /只,分别接种于 BALB/c 裸鼠背部右侧皮下,观察成瘤情况。

1.10 统计学处理

应用 SPSS8.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 肝癌组织来源细胞的原代和传代培养

将 1 例肝癌患者(病理诊断为原发性肝细胞癌)的肝癌组织来源细胞原代培养过夜, 可见大量贴壁细胞集落。培养 8 代后, 可见培养瓶中除大量铺路石状内皮细胞样集落外, 还有少量呈多角形、核较大的细胞集落。这些细胞呈单层片状生长, 细胞紧密镶嵌, 细胞生长失去接触抑制, 呈典型的恶性上皮细胞的表型特征(图 1A)。挑取生长良好、增殖速度较快的这种细胞集落进行常规传代培养, 命名为 hLCSLCs。以 CKK-8 法检测该细胞增殖水平, 绘制细胞生长曲线, 结果显示该细胞倍增时间约为 30 h(图 1B)。

2.2 hLCSLCs 中肝癌干细胞样细胞标志物的表达

流式荧光检测连续传代的 hLCSLCs 中 CD133、CD90 和 SP 细胞的阳性表达, 结果显示, hLCSLCs 中 CD133⁺ 细胞含量为 0.8%, CD90⁺ 细胞含量为 12.7%, SP 细胞含量为 0.9%(图 2)。hLCSLCs 中有一定比例的细胞表达肝癌干细胞或干细胞样细胞的标志物, 提示 hLCSLCs 中可能含有肝癌干细胞或干细胞样细胞。另外, Hoechst 33342 染色进行 SP

表达检测时, 添加了拮抗剂维拉帕米, 细胞不能排荧光染料, SP 细胞明显减少(图 2D), 证明了 SP 细胞检测的可靠性。

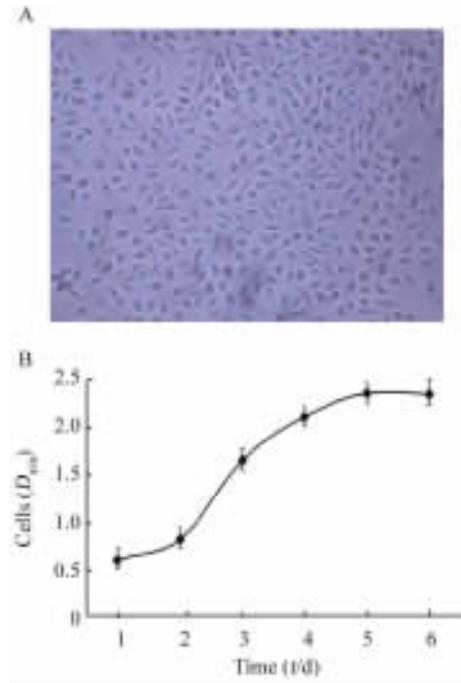


图 1 hLCSLCs 细胞传至第 8 代的形态学特征(A, ×200)及其生长曲线(B)

Fig. 1 Morphological characteristics(A, ×200)and growth curve(B)of hLCSLCs at 8th passage

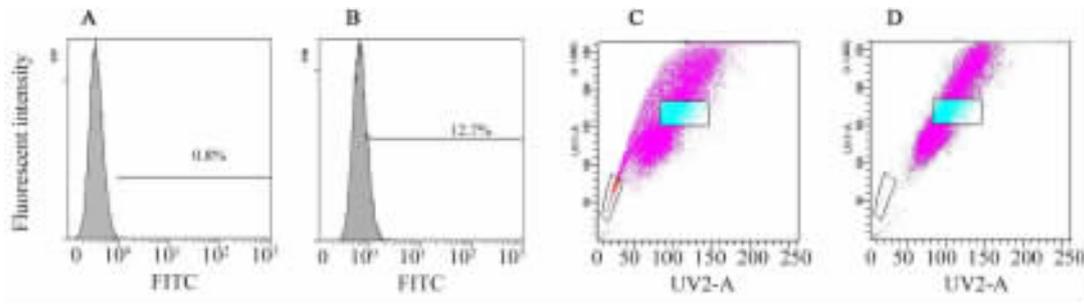


图 2 流式荧光检测 hLCSLCs 相关标志物的表达

Fig. 2 Expressions of cell related markers in hLCSLCs as detected by flow cytometry

A: CD133 antibody; B: CD90 antibody; C: Hoechst 33342; D: Hoechst 33342 and verapamil

2.3 hLCSLCs 中 SP 细胞的裸鼠成瘤效果

采用流式荧光分选 hLCSLCs 中的 SP 细胞, 检测活度达 80% 以上后接种裸小鼠。结果(表 1)显示, 1×10^3 个 SP 细胞接种 2 个月开始有小鼠成瘤, 2×10^3 个 SP 细胞接种 2 个月后的裸鼠成瘤率为 100%。提示 SP 细胞的成瘤能力远远强于亲本细胞 hLCSLCs 的致瘤能力(hLCSLCs 细胞最低需接种 1×10^6 个方

可致瘤)及非 SP 细胞的致瘤能力(非 SP 细胞最低需接种 1×10^6 /只, 3 个月方可致瘤), 与现有其他报道的从人肝癌细胞系中分离的肝癌干细胞或干细胞样细胞的致瘤能力相当甚至略强。说明 SP 细胞可能是分离肝癌干细胞的有价值的标志之一。

2.4 含肝素的无血清悬浮成球培养 hLCSLCs 获取成球细胞

将 hLCSLCs 接种于分别含有肝素、白蛋白、氢化可的松的 3 种无血清培养基(含 EGF、bFGF、LIF、B27 等)中,各自进行成球培养,7 d 后用倒置相差显微镜观察 hLCSLCs 细胞球生长情况。当采用含有肝素的培养基时,细胞可形成状态良好、连接紧密的细胞球,细胞球生长速度较快,每个细胞球由约 30~50 个细胞组成(图 3A)。当用含有白蛋白的培养基培养时,也可以形成细胞球,但细胞球生长速度较慢,每个细胞球由约 5~10 个细胞组成(图 3B)。当用含有氢化可的松的培养基培养时,细胞仅能形成较为松散易吹散的团状黏附,不能形成细胞球结构(图 3C)。通过形态学观察及细胞球生长速度的比较,初步筛选确定含有肝素的无血清培养基适用于肝癌干细胞或干细胞样细胞的细胞球的形成。

表 1 hLCSLCs 中 SP 细胞的裸鼠体内成瘤能力
Tab.1 Tumorigenic capacity of SP cells in hLCSLCs

Cell	Injected cells	No. of forming tumor		
		1 month	2 months	3 months
SP cells	5×10^2	0/6	0/6	0/6
	1×10^3	0/6	1/6	3/6
	2×10^3	0/6	6/6	6/6
hLCSLCs	1×10^4	0/6	0/6	0/6
	5×10^5	0/6	0/6	0/6
	1×10^6	0/6	3/6	6/6

将上一代细胞球消化成单个细胞,连续接种于低黏附 6 孔板进行无血清悬浮成球培养,每代次均采用 1 000 个/孔接种,设置 3 个复孔,7 d 后计数形成细胞球的个数。结果显示,第 2、3、4 代细胞球培

养时形成细胞球的数量较第 1 代显著增加($P < 0.01$),提示了用含肝素的无血清培养基进行无血清悬浮成球培养法可较好地富集肝癌干细胞或干细胞样细胞;且第 2、3、4 代成球细胞之间基本稳定(图 3D),结果表明成球细胞中含有比例较恒定的肝癌干细胞或干细胞样细胞。

2.5 成球细胞中肝癌干细胞样细胞标志物的表达

流式荧光检测 hLCSLCs 无血清悬浮成球培养所获的成球细胞中肝癌干细胞样细胞的标志物 CD133、CD90 和 SP 阳性细胞比例,结果显示,CD133⁺ 细胞含量为 9.7%,CD90⁺ 细胞含量为 48.0%,SP 细胞含量为 4.6%(图 4),均较其亲本 hLCSLCs 中的比例显著提高,表明 hLCSLCs 经无血清悬浮成球培养可以在相当程度上富集肝癌干细胞样细胞。

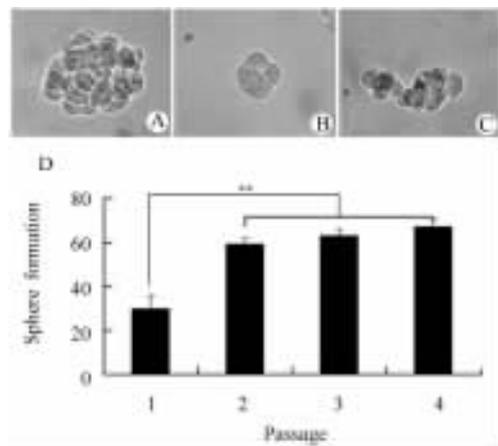


图 3 含肝素无血清培养基促进 hLCSLCs 成球(×200)

Fig.3 Serum-free medium containing heparin increased sphere formation of hLCSLCs(×200)

A: Medium containing heparin; B: Medium containing albumin; C: Medium containing hydrocortisone; D: Sphere formation capacity upon serial passage(** $P < 0.01$)

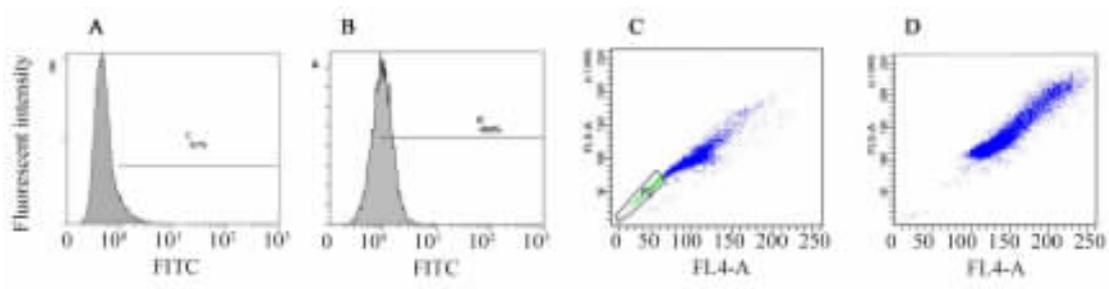


图 4 流式细胞仪检测 hLCSLCs 中成球细胞相关标志物的表达

Fig.4 Expressions of cell related markers in sphere cells of hLCSLCs as detected by flow cytometry

A: CD133 antibody; B: CD90 antibody; C: Hoechst 33342; D: Hoechst 33342 and verapamil

2.6 hLCSLCs 中成球细胞对裸鼠的致瘤能力

检测细胞活度达 80% 以上后, 将 hLCSLCs 及其无血清悬浮培养收获的成球细胞分别接种裸小鼠, 检查其致瘤能力。结果显示, hLCSLCs 需要接种 1×10^6 个细胞才开始有小鼠成瘤, 3 个月成瘤率为 100%; 而 hLCSLCs 无血清悬浮培养收获的成球细胞仅需 1×10^4 个就可致小鼠成瘤, 3 个月成瘤率为 100%。不同数量的细胞接种裸鼠体内成瘤能力如表 2 所示, hLCSLCs 中成球细胞的致瘤能力较其亲本细胞提高了 100 倍, 显示出该无血清悬浮成球培养法可较好地富集肝癌干细胞或干细胞样细胞。

表 2 hLCSLCs 和成球细胞的致瘤能力的比较
Tab. 2 Comparison of tumorigenic capacity of hLCSLCs and sphere cells

Cell	Numbers	Tumorigenic capacity			
		1 month	2 months	3 months	4 months
hLCSLCs	1×10^4	0/5	0/5	0/5	0/5
	5×10^5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1×10^6	0/5	4/5	5/5	5/5
Sphere cells	5×10^3	0/5	0/5	0/5	0/5
	1×10^4	0/5	2/5	5/5	5/5
	1×10^5	0/5	5/5	5/5	5/5

3 讨论

靶向肿瘤干细胞的治疗将极有希望为临床肿瘤治疗带来新的疗法, 为更好地治疗肿瘤带来新的突破。目前, 已经开展了多项靶向肿瘤干细胞的研究, 针对肿瘤干细胞特有的表面靶点或内部重要途径的小分子抑制剂^[10]、抗体靶向的免疫毒素^[11]在实验研究中都已取得了显著的疗效, 进一步深入地研究将有助于我们更好地设计、筛选针对肿瘤干细胞的治疗药物。

肿瘤干细胞研究的前提和基础是能够分离并培养相应肿瘤类型的干细胞或干细胞样细胞。目前血液系统肿瘤^[12]、乳腺癌^[13]、中枢神经胶质瘤^[14]、结肠癌^[15]等肿瘤干细胞均已成功地获得分离。肿瘤干细胞的分离一般是利用其表面标志物, 利用流式细胞术或磁性激活细胞分选法进行分选; 或是应用 SP 细胞分选法分选纯化肿瘤干细胞。近年, 已有 Ma 等^[16]、Yang 等^[2]和 Taniguchi 等^[3]报道了

CD133⁺、CD90⁺、SP 和 EpCAM⁺/AFP⁺^[17]的肝癌细胞似乎都拥有肿瘤干细胞的特性, 但值得注意的是这些报道中没有提及这些标志物有任何交叉重叠表达的现象。因此可以说, 目前尚缺乏针对肝癌干细胞的广谱标志物, 故导致了目前已有的肝癌干细胞研究绝大多数均是局限于肝癌细胞系。直接从人肝癌组织分离并培养肝癌干细胞在现阶段还存在相当的困难, 目前尚未见到报道。从人肝癌组织中分离培养干细胞或干细胞样细胞已成为研究肝癌干细胞的一个瓶颈。本研究利用内皮细胞与肿瘤干细胞之间的相互作用, 在传统分离方法的基础上, 采用血浆沉降法凝集部分肝癌组织的内皮细胞, 获得了包括干细胞在内的肝癌细胞和肝癌内皮细胞的混合物, 并通过添加牛脑抽提物[即内皮细胞生长添加剂 (ECGS), 其中含 bFGF 和 EGF]进行短暂的传代培养, 刺激肿瘤干细胞增殖, 最终获得了在普通有血清培养条件下就含有干细胞样细胞的细胞系 hLCSLCs。在分离后短暂传代培养的过程中, 牛脑抽提物的添加可能对刺激肿瘤干细胞增殖起到了关键的作用。可以推测, 一方面牛脑抽提物中含有有利于干细胞体外扩增的 bFGF 以及 EGF^[18], 它们直接刺激肿瘤干细胞增殖; 另一方面牛脑抽提物通过其固有的对内皮细胞增殖、活化的刺激作用刺激与肿瘤干细胞共培养的内皮细胞的活化, 从而间接促进肿瘤干细胞存活、增殖。

在分离获得含干细胞样细胞的细胞系 hLCSLCs 后, 本研究应用前述的 3 个标志物 CD133⁺、CD90⁺、SP 对其进行了鉴定。结果发现这 3 种标志物在 hLCSLCs 中均阳性, 提示所获得的 hLCSLCs 中可能含有肝癌干细胞。动物体内成瘤实验中, SP 细胞在 1 000 个细胞接种时就可成瘤, 提示 SP 细胞可能是肝癌干细胞的一个广谱且有用的标志物。

目前尚未见到体外培养富集人肝癌组织来源的肿瘤干细胞的报道, 但近年 Singh 和 Hemmati 等^[19-20]研究发现, 利用无血清悬浮培养并且添加生长因子可以分离和培养出多种肿瘤干细胞。无血清培养基能够使胚胎干细胞处于未分化状态^[21]; bFGF 和 EGF 有利于正常干细胞体外扩增^[22]; LIF 有助于保持干细胞未分化状态, 并延长干细胞体外扩增时间^[23]; B27 作为血清替代物, 既保留了细胞赖以生存的必需营养物质, 又去除了血清中的促分化剂。另外, 近年研究证实, 肝素除了公认的抗凝血和抗血栓作用外, 还具有调节免疫、调节多肽生长因子和抑制细胞增殖等多种生物学活性^[7]; 氢化可的松可以使细胞状态变好^[9]; 白蛋白可以通过与维生素、脂类、激素、金属离子和生

长因子的结合而稳定和调节上述物质在无血清培养基中的活性,减轻蛋白酶对细胞的影响^[8]。为此,本研究中进一步在含 bFGF、EGF、LIF 和 B27 的无血清基础培养基中分别加入 Heparin、白蛋白、氯化可的松,通过比较发现,添加肝素的无血清培养基在悬浮成球培养中对于从人肝癌组织分离获得的肿瘤干细胞具有较好的效果。

本研究将有血清培养基培养的 hLCSLCs 转入添加肝素的无血清悬浮成球培养基后发现,该细胞形成细胞球的数量在第 2 代显著升高,然后趋于稳定。该结果不仅提示了其中含具有稳定自我更新能力的干细胞,也表明该培养方法可以富集干细胞的数量。在成球细胞的肝癌干细胞标志物的检测和裸鼠体内成瘤实验中,CD133⁺、CD90⁺、SP 的比例分别上升了 12.4、5 倍,裸鼠体内成瘤能力上升了 100 倍。这些结果证实,经此无血清悬浮成球培养后,肝癌干细胞或干细胞样细胞的比例非常显著地上升,富集效果十分明显。

本研究为从人肝癌组织中分离培养肝癌干细胞样细胞提供了一种新的方法,目前正在采用此方法分离获得的肝癌干细胞样细胞筛选针对肝癌干细胞的单克隆抗体治疗剂。本研究为肝癌干细胞的基础研究和临床治疗提供了有价值的细胞模型和培养方法,有着重要的应用价值。

[参 考 文 献]

- [1] Tu LC, Foltz G, Lin E, *et al.* Targeting stem cells-clinical implications for cancer therapy [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2009, 4 (2): 147-153.
- [2] Yang ZF, Ho DW, Nq MN, *et al.* Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Cancer cell*, 2008, 13 (2): 153-166.
- [3] Chiba T, Kita K, Taniguchi H, *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem-like properties [J]. *Hepatology*, 2006, 44(1): 240-251.
- [4] Xie X, Rivier AS, Zakrzewicz A, *et al.* Inhibition of selectin-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by nonanticoagulant sulfated saccharides. Studies with carboxyl-reduced and sulfated heparin and with trestatin a sulfate [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(44): 34818-34825.
- [5] Maciag T, Cerundolo J, Ilsley S, *et al.* An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979, 76(11): 5674-5678.
- [6] Kondo T, Setoguchi I, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(3): 781-786.
- [7] Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, *et al.* Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver [J]. *Hepatology*, 2000, 32(6): 1230-1239.
- [8] Glassy MC, Tharakan JP, Chau PC. Serum-free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production [J]. *Biotech Bioeng*, 1988, 32(8): 1015-1028.
- [9] 黄斌, 牛红星, 朱明龙, 等. rCHO 细胞无血清适应及悬浮培养 [J]. *华东理工大学学报*, 2004, 30(1): 38-42.
- [10] Phatak P, Cookson J C, Dai F, *et al.* Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth *in vitro* and *in vivo* consistent with a cancer stem cell targeting mechanism [J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(8): 1223-1233.
- [11] Du X, Ho M, Pastan I. New immunotoxins targeting CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells [J]. *J Immunother*, 2007, 30(6): 607-613.
- [12] 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.
- [13] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 3547-3549.
- [14] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
- [15] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. *Nature*, 2007, 445(7123): 111-115.
- [16] Ma S, Chan KW, Hu C, *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2542-2556.
- [17] Yamashita T, Ji J, Budhu A, *et al.* EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012-1024.
- [18] Lou JN, Mili N, Decrind C, *et al.* An improved method for isolation of microvascular endothelial cells from normal and inflamed human lung [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, 34(7): 529-536.
- [19] Hemmati H D, Nakano I, Lazareff J A, *et al.* Cancerous stem cell can arise from pediatric brain tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(25): 15178-15183.
- [20] Singh S K, Clarke I D, Terassaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [21] Hong-mei P, Gui-an C. Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(1): 217-222.
- [22] Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell [J]. *Dev Biol*, 1996, 175(1): 1-13.
- [23] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, *et al.* Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system [J]. *Stem Cell*, 2006, 24(3): 506-513.

[收稿日期] 2009-09-01

[修回日期] 2009-09-25

[本文编辑] 韩丹