

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.02.007

· 基础研究 ·

## LoVo 细胞系中结肠癌干细胞样细胞的分离、培养及鉴定

张洪也,程勇,胡祥,吕原,武乃金(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科,重庆400016)

**[摘要]** 目的:从结肠癌 LoVo 细胞系中分离、鉴定具有 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 特异表型的结肠癌干细胞样细胞,观察其生物学行为,证实该细胞系中结肠癌干细胞样细胞的存在。方法:从普通血清培养的 LoVo 细胞系中以流式细胞仪分选具有 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 表型的细胞,接种于添加生长因子的无血清培养基中,观察其增殖过程,继而诱导分化。MTT 法、流式细胞术检测 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup>、EPCAM<sup>low</sup> 和未分选 LoVo 细胞的增殖能力及细胞周期分布。3 种细胞接种裸鼠,比较不同细胞的成瘤率;免疫荧光技术检测小鼠次代 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞中 CD44/EPCAM 的表达。结果:LoVo 细胞中有 17.4% 的 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞,并能在添加生长因子的无血清培养基中呈细胞球样生长,且可连续传代;在血清的诱导下,呈贴壁分化生长,其形态与未分选 LoVo 细胞无差别。CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞增殖能力高于 EPCAM<sup>low</sup> 细胞及未分选 LoVo 细胞,且细胞周期多集中在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。以 500 个 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞接种裸鼠成瘤率为 90% (9/10),而 1 × 10<sup>4</sup> 个 EPCAM<sup>low</sup> 细胞成瘤率为 0 (0/10)。小鼠移植瘤中次代 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞仍能少量表达 CD44 和 EPCAM。结论:LoVo 细胞中存在 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 结肠癌干细胞样细胞,CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 可用于结肠癌肿瘤干细胞的深入研究。

**[关键词]** 结肠癌;LoVo 细胞株;肿瘤干细胞;干细胞样细胞;CD44/EPCAM

**[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2010)02-0149-06

## Isolation, culture and identification of colon cancer stem-like cells from LoVo cell line

ZHANG Hong-ye, CHENG Yong, HU Xiang, LV Yuan, WU Nai-jin (Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated First Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To isolate, culture and identify the colon cancer stem-like cells with CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> phenotype from LoVo cell line, and to observe their biological behaviors and verify the existence of tumor stem cells in LoVo cell line. **Methods:** CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells were sorted from LoVo cells cultured in common-serum medium by flow cytometry, and the resultants were further cultured in serum-free medium (SFM) supplemented with growth factors. The proliferation and differentiation of CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells were observed. The proliferations and cell cycle distributions of CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup>, EPCAM<sup>low</sup>, and un-sorted LoVo cells were estimated by MTT and flow cytometry, respectively. Nude mice were implanted with the above 3 different cells, and tumor formation rates of different groups were analyzed. Expressions of CD44 and EPCAM in the second passage of CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells were determined by immunofluorescence staining. **Results:** We found that 17.4% of LoVo cells were CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells, which could steadily proliferate and assemble into tumor cell spheres in SFM supplemented with growth factors. CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells could differentiate into adherent cells by serum, similar to LoVo cells. The proliferation capacity of CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells was higher than those of EPCAM<sup>low</sup> and LoVo cells, and the cell cycle of CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells was mostly in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. Tumor formation rate of 500 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells was 90% (9/10) in nude mice, with 1 × 10<sup>4</sup> EPCAM<sup>low</sup> cells being 0% (0/10). Moreover, expressions of CD44 and EPCAM in the second passage of CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells could still be detected. **Conclusion:** Colon cancer cell line LoVo contains CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> stem-like cells, and CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells can be used in further research of colon cancer stem cells.

**[Key words]** colon cancer; LoVo cell line; cancer stem cell; stem-like cell; CD44/EPCAM

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(2): 149-154]

**[基金项目]** 重庆市自然科学基金资助项目(No. 2008BB5230)。Project supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (No. 2008BB5230)

**[作者简介]** 张洪也(1982-),男,重庆市人,硕士研究生,主要从事胃肠道肿瘤的基础及临床研究

**[通讯作者]** 程勇(CHENG Yong, corresponding author), E-mail: chengyongcq@yahoo.com.cn

从肿瘤干细胞学说的提出<sup>[1]</sup>,到目前包括血液系统肿瘤<sup>[2]</sup>和实体瘤<sup>[3-4]</sup>中的乳腺癌<sup>[5]</sup>、中枢神经胶质瘤<sup>[6-7]</sup>、前列腺癌<sup>[8]</sup>及结肠癌<sup>[9-10]</sup>等肿瘤干细胞的分离成功,肿瘤干细胞学说得到不断证实及完善,并认为肿瘤干细胞是肿瘤发生、发展、转移和复发的根源。肿瘤干细胞研究要求有充足可靠的肿瘤干细胞来源。目前肿瘤干细胞来源主要通过原代肿瘤组织进行分离获得,操作流程复杂、周期长、易污染等因素限制了其在实验研究中的广泛应用。肿瘤细胞系品种多、易获得、易保存,无疑是肿瘤干细胞来源的最佳途径。因此,本研究在先前结肠癌细胞系研究<sup>[11]</sup>的基础上,以 LoVo 细胞系为研究对象,对其肿瘤干细胞进行分离、培养、鉴定,以期通过较简单易行的途径获得肿瘤干细胞,满足日后更深入的肿瘤干细胞研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂、细胞系和实验动物

LoVo 细胞系由重庆医科大学基研所细胞库提供。RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,特级新生小牛血清(FBS)购自杭州四季青公司,EDTA、胰蛋白酶粉购自北京鼎国公司,PI 购自南京凯基生物公司。无血清培养基(serum-free medium, SFM)为不含牛血清的 RPMI 1640 培养基,并添加重组表皮生长因子(EGF,终质量浓度 20  $\mu\text{g/L}$ , PeproTech)、碱性成纤维生长因子(bFGF,终质量浓度 10  $\mu\text{g/L}$ , PeproTech)。鼠抗人 FITC 标记的 CD44、PerCP-CY5.5 标记的 EPCAM 单克隆抗体及鼠 IgG 同型对照购自 BD Pharmingen 公司。雄性免疫缺陷裸鼠 30 只,鼠龄 3~4 周,体重 20~23 g,由重庆医科大学实验动物中心提供(实验动物合格证号为 SCXK2009-0001)。流式细胞仪购自美国 BD 公司,CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱购自 Thermo 公司,低温高速离心机 2K15 (R=7 cm)购自于 Sigma 公司,倒置显微镜购自于 Olympus 公司。

### 1.2 LoVo 细胞的培养

LoVo 细胞以含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基(serum supplemented medium, SSM)置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,用含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的消化液消化传代。选用对数生长期细胞进行实验。

### 1.3 LoVo 细胞中 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞的分选

用 0.25% 的胰酶消化 LoVo 细胞,再以 0.01% PBS 洗涤,重悬、离心(1 000  $\times g$ , 5 min),加入 FITC 标记的 CD44、PerCP-CY5.5 标记的 EPCAM 抗体各

20  $\mu\text{l}$ ,室温暗处孵育 0.5 h,0.01% PBS 洗涤,上机。分选出的 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 及 EPCAM<sup>low</sup> 细胞重悬于 PBS,计数备用。

### 1.4 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 无血清培养及传代

CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞重悬于 SFM 接种于培养瓶中,继续在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待增殖形成细胞球 3~4 d 后,将其收集于离心管中,自然沉降 20 min,弃去半量陈旧上清,加入等量新鲜 SFM 并机械吹打成单细胞悬液,重悬于 SFM,按 1:2 的比例传代。

### 1.5 MTT 法检测 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞增殖活性

将 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞组(positive group, PG)、EPCAM<sup>low</sup> 细胞组(negative group, NG)及未分选细胞组(control group, CG)分别接种于 96 孔板,4 000 个(200  $\mu\text{l}$ )/孔,分别于接种后 0、3、5、7 d 用 MTT 法检测。每组 6 孔。同时设只加培养液、不加细胞的空白组用于调零。于 490 nm 处在分光光度计上测各组细胞 D 值,取均值并绘制生长曲线。

### 1.6 流式细胞术检测 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞体外分化能力

分选后的 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞种植在 SSM 中,置 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}\text{C}$  饱和湿度的培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次,在培养的 0、4、8、12 d 用流式细胞仪动态检测 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞的百分比,并观察细胞的分化状态。

### 1.7 PI 染色法检测 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞的细胞周期

分别收集 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞组、EPCAM<sup>low</sup> 细胞组及未分选细胞组的细胞悬液,离心(1 000  $\times g$ , 5 min),弃上清,固定染色(4  $^{\circ}\text{C}$  预冷,70% 乙醇固定 18 h, PBS 洗涤 3 次,加 PI 染液至终质量浓度 50  $\mu\text{g/ml}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min),上流式仪检测。

### 1.8 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞裸鼠成瘤实验

3~4 周龄雄性裸鼠 30 只,随机分成 3 组,每组 10 只。各组小鼠分别于皮下注射 500 个 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup>、1  $\times 10^4$  个 EPCAM<sup>low</sup> 细胞和未分选细胞。3 周后观察裸鼠皮下成瘤情况,饲养 3 个月观察其肿瘤生长情况。按照动物伦理学要求,在肿瘤直径超过 1 cm 时处死实验小鼠,剥离肿瘤备检测。

### 1.9 免疫荧光检测 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞移植瘤次代细胞中 CD44 和 EPCAM 的表达

裸鼠移植瘤组织标本以 0.25% 胶原酶消化,制成单细胞悬液,接种于含盖玻片的 24 孔板,待细胞爬片至单细胞层时以 4% 多聚甲醛固定, PBS 冲洗 3 次,加入 FITC 标记的 CD44、PerCP-CY5.5 标记的

EPCAM 单克隆抗体(1:100),37℃ 孵育 1 h 后立即在荧光显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 LoVo 细胞中成功分选出 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞

流式细胞技术分选 LoVo 中 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞前,CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞百分率为 17.4%;分选后再次检测所得 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞的百分率为 80.0%(图 1)。后继实验证明细胞生长良好。

### 2.2 无血清培养液中 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞生长的形态变化

在无血清培养液中培养 24 h 可产生少量体积较小的松散的悬浮肿瘤细胞球,72 h 后肿瘤球体积增大;随着时间的延长,在 1 周左右所形成的肿瘤细胞球数量增多,形态大小各异,较前致密;3 周左

右形成致密的形态一致的肿瘤细胞球,而且经过传代后肿瘤细胞球的数量大量增加(图 2)。

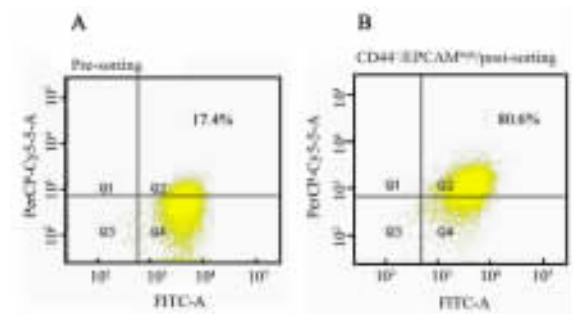


图 1 流式术分选前后 LoVo 中 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞含量  
Fig. 1 Percentage of CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells in LoVo before and after sorting by flow cytometry

A: Before cell sorting; B: After cell-sorting

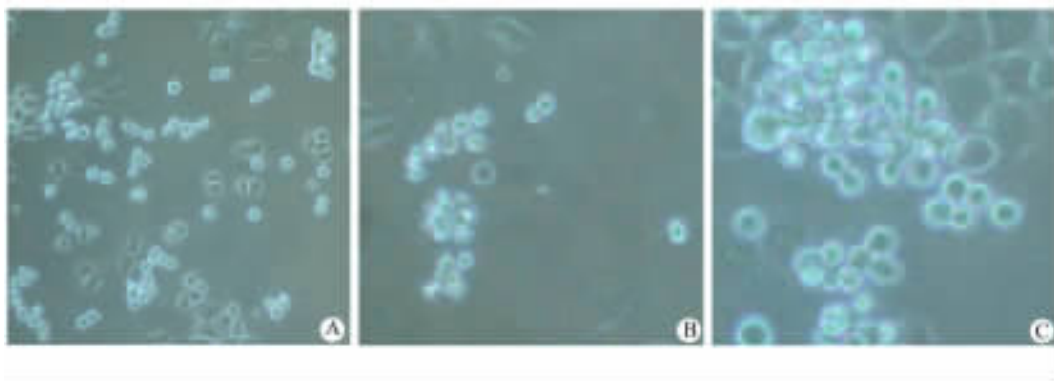


图 2 无血清培养液中 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞形成细胞球(×200)

Fig. 2 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells formed spheres in serum free medium (×200)

A: 24-48 h; B: 1 week; C: 3 weeks

### 2.3 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞的增殖活性

在含血清培养基中,CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞生长曲线明显较 EPCAM<sup>low</sup> 细胞及未分选细胞陡直,以第 3~5 天最为明显(图 3)。由此说明 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 增殖活性最强。

### 2.4 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞的分化能力

在无血清培养液中逐渐滴加 FBS,并隔日补充。随着时间的延长,表达 CD44/EPCAM 的细胞比例逐渐减少,4 d 后趋于平稳,与扩增前水平相当。生长形态上,肿瘤球开始变小,单细胞增多;7 d 左右肿瘤球消失,均为单细胞,多为贴壁生长(图 4)。

### 2.5 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞的细胞周期分布

流式术检测显示,CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞绝大多数处于静止期,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期占 84.68%;EPCAM<sup>low</sup> 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期百分率明显减少至 68.30%,而未分选细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期占 77.89%(图 5)。

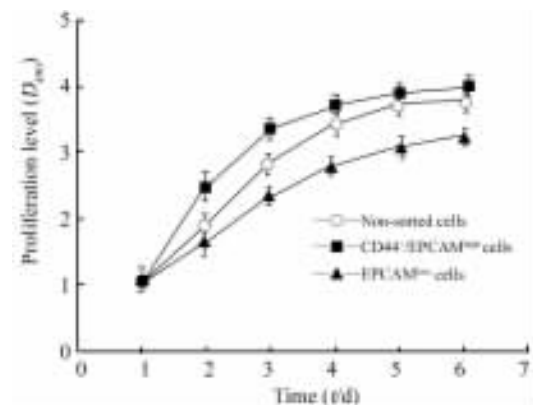


图 3 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞的生长曲线

Fig. 3 Cell Growth curve of CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells

### 2.6 裸鼠接种 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞的成瘤率

CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞即使数量少也有很强的

致瘤性, 500 个 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞接种的成瘤率达 90%。病理切片证实为低分化结肠腺癌(图 6)。EPCAM<sup>low</sup> 细胞几乎没有成瘤能力, 接种 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞无一成瘤(表 1)。

2.7 移植瘤中次代 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞 CD44 和 EPCAM 的表达

移植瘤中次代 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞经原代培养, 细胞爬片后于荧光显微镜下观察, 发现次代 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞绝大多数均表达 CD44, 个别细胞胞膜共表达 CD44/EPCAM, 与原代 LoVo 细胞系检测情况相同(图 7)。

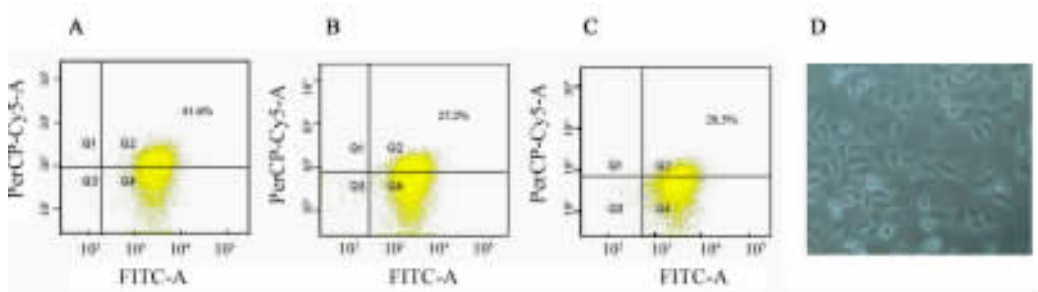


图 4 血清诱导过程中 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞含量和形态的变化

Fig. 4 Changes of cell numbers and shapes of CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells induced by serum

A: CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells induced by serum for 24 h; B: CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells induced by serum for 48 h; C: CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells induced by serum for 72 h; D: Shapes of CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells induced by serum( × 200 )

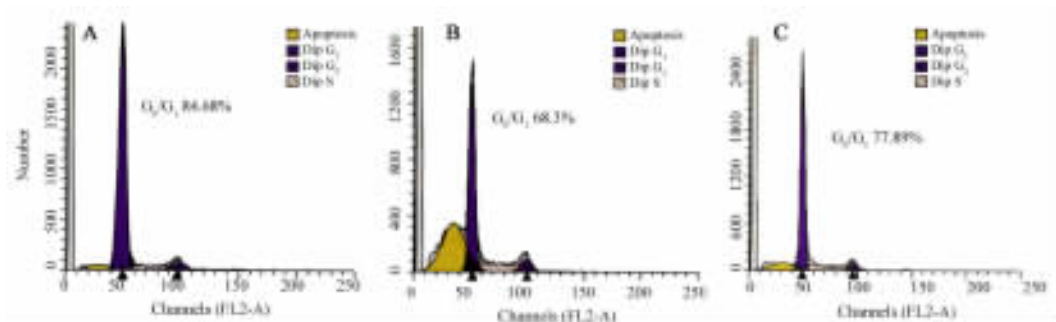


图 5 流式细胞仪检测 3 组细胞的细胞周期分布

Fig. 5 Cell cycle distributions of 3 groups as detected by flow cytometry

A: CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cells; B: EPCAM<sup>low</sup> cells; C: Non-sorted LoVo cells

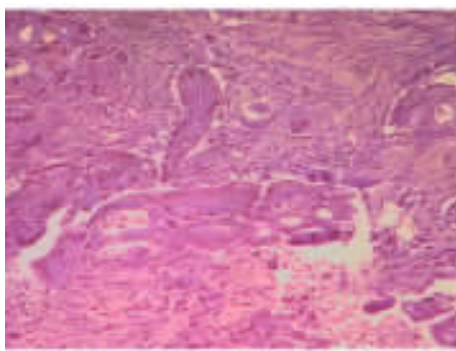


图 6 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞裸鼠

皮下移植瘤呈低分化结肠腺癌( H-E, × 200 )

Fig. 6 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> cell-implanted subcutaneous tumors displayed feature of low differentiated adenocarcinoma ( H-E, × 200 )

表 1 3 组肿瘤细胞接种裸鼠的成瘤率

Tab. 1 Tumor formation rates of tumor cells in three groups in nude mice

Group	Cell number	Tumor formation rate ( % )
CD44 <sup>+</sup> /EPCAM <sup>high</sup>	500	90%( 9/10 )
EPCAM <sup>low</sup>	1 × 10 <sup>4</sup>	0
Non-sorted LoVo	1 × 10 <sup>4</sup>	10%( 1/10 )

3 讨论

肿瘤干细胞学说<sup>[1,12-13]</sup>认为: 肿瘤细胞存在异质性, 其中一小群具有自我更新<sup>[14]</sup>、无限增殖能力

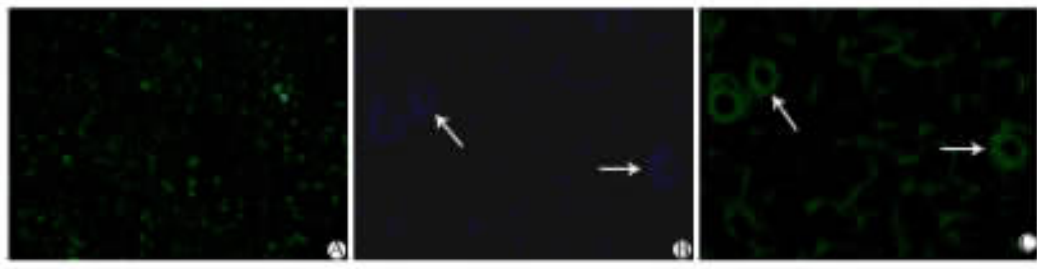


图7 裸鼠移植瘤组织中次代细胞 CD44/EPCAM 的表达

Fig.7 Expressions of CD44 and EPCAM in the second passage cells in implanted tumor tissues in nude mice

A: CD44 ( green fluorescence,  $\times 100$  ); B and C: CD44 ( green fluorescence ) and EPCAM ( red fluorescence ) (  $\times 200$  )

和不定分化潜能的肿瘤细胞即为肿瘤干细胞,是肿瘤形成的起始细胞,并维持肿瘤的生长;肿瘤干细胞对放疗以及化疗药物不敏感<sup>[15-16]</sup>,可能是肿瘤转移、复发的根源<sup>[17]</sup>。目前绝大多数常见恶性肿瘤的肿瘤干细胞分离已取得成功,但是细胞系中肿瘤干细胞的分离仍处于探索阶段,通过诸如 SP 细胞的检测陆续开展。本实验选用恶性程度高的人结肠癌 LoVo 细胞系,联合 CD44、EPCAM 表面抗原,以肿瘤干细胞特有和必需的生物学特性,证实了 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞具有自我更新、增殖分化能力、强致瘤性及遗传稳定性,分离、鉴定了结肠癌肿瘤干细胞样细胞,为下一步结肠癌干细胞分子生物学的研究奠定了基础。

自我更新以及增殖和分化是干细胞最主要的特征,肿瘤干细胞也不例外。本实验证明,所分离的结肠癌肿瘤干细胞样细胞能在无血清、添加重组表皮生长因子和碱性成纤维生长因子的干细胞培养基中呈细胞球样成长,即出现典型的干细胞生长方式,且具有无限增殖的潜能,连续传代并不影响细胞球的生长方式。但同时也发现,肿瘤干细胞球经多次传代增殖,到一定阶段,细胞球数目并不继续持续增加,且单个细胞开始增多,表现出细胞分化的特点,这可能与培养液中白血病抑制因子缺乏而肿瘤干细胞富集过多有关。实验中如控制肿瘤干细胞球的密度,并通过半量换液,即自然沉降 20 min 后弃去半量陈旧上清,加入等量新鲜无血清培养液继续培养,就可避免了活性肿瘤干细胞的丢失,又减少了坏死凋亡细胞的堆积。另外,当以血清诱导培养肿瘤干细胞,可发现 CD44/EPCAM 表达逐渐减少、细胞球亦开始解聚、细胞贴壁生长,证实了肿瘤干细胞的定向分化特性。肿瘤干细胞是否具有逆向分化能力?需要何种诱导因素?将是下一步研究需要解决的问题。

肿瘤干细胞的检测方法主要有活体染料鉴定、

单克隆有限稀释实验和细胞表面特异抗原检测<sup>[18]</sup>。活体染料鉴定利用多数干细胞表面有 ABC 转运蛋白的存在,能够将外源性的染料( Hoechst dye33342 )转运出细胞而自身不被染色,而普通细胞表面没有这种转运蛋白存在而被染色的原理,鉴定出拒染细胞群即为“侧群”( side population, SP )细胞<sup>[19]</sup>。有研究<sup>[20]</sup>表明,SP 细胞群是肿瘤细胞体系内恶性行为的主要原因。单克隆有限稀释实验是通过细胞群在体外经过不同浓度的稀释后,由于干细胞的自我更新能力使其能在体外无限增殖形成细胞克隆,通过鉴定克隆形成能力对不同细胞群进行鉴别。本实验则是利用流式细胞仪检测肿瘤干细胞表达的特异分子抗原,从而达到肿瘤干细胞分选目的。本次实验检测到 LoVo 细胞系中 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 肿瘤干细胞占 17.4%,与此前对该细胞系中 SP 细胞检测及单克隆稀释实验结果不一致,说明肿瘤干细胞表面抗原的多样性,不同方法的检测结果有所出入;另外流式仪的灵敏度及激发光源波长也有所不同也是其原因之一。但通过流式细胞技术针对特异抗原抗体的检测因其灵敏度高、可控性强必将成为肿瘤干细胞分离的主要手段。

本实验通过对 LoVo 细胞株中特定细胞亚群的分离、表型鉴定,检测比较其不同细胞亚群间增殖克隆能力、分化潜力、细胞周期;并通过动物接种实验,比较细胞群的成瘤能力、观察次代肿瘤的原代细胞中特定细胞含量变化情况,证实 CD44<sup>+</sup>/EPCAM<sup>high</sup> 细胞为人大肠癌干细胞样细胞,为肿瘤干细胞的下一步深入研究奠定了基础。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Reya T, Morrison RJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cell, cancer, and cancer stem cells [ J ]. Nature, 2001, 414( 6859 ): 105-111.
- [ 2 ] 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.
- [ 3 ] O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer stem cells in solid tumors: an overview [ J ]. *Semin Radiat Oncol*, 2009, 19( 2 ): 71-77.
- [ 4 ] Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, *et al*. Cancer stem cell markers in common cancers-therapeutic implications [ J ]. *Trends Mol Med*, 2008, 14( 10 ): 450-460.
- [ 5 ] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100( 7 ): 3983-3988.
- [ 6 ] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, *et al*. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [ J ]. *Cancer Res*, 2003, 63( 18 ): 5821-5828.
- [ 7 ] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, *et al*. Identification of human brain tumor initiating cells [ J ]. *Nature*, 2004, 432( 7015 ): 396-401.
- [ 8 ] Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 23 ): 10946-10951.
- [ 9 ] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, *et al*. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [ J ]. *Nature*, 2007, 445( 7123 ): 111-115.
- [ 10 ] Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, *et al*. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104( 24 ): 10158-10163.
- [ 11 ] 胡 祥, 程 勇, 王吉明, 刘 彬. 结直肠癌干细胞肿瘤干细胞相关亚群初步研究 [ J ]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33( 12 ): 1440-1444.
- [ 12 ] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, *et al*. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 19 ): 9339-9344.
- [ 13 ] Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells [ J ]. *Curr Opin Genet Dev*, 2008, 18( 1 ): 48-53.
- [ 14 ] Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells [ J ]. *Oncogene*, 2004, 23( 43 ): 7274-7282.
- [ 15 ] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [ J ]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5( 4 ): 275-284.
- [ 16 ] Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance [ J ]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8( 7 ): 545-554.
- [ 17 ] Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis [ J ]. *Cell Res*, 2007, 17( 1 ): 3-14.
- [ 18 ] Natarajan TG, FitzGerald KT. Markers in normal and cancer stem cells [ J ]. *Cancer Biomark*, 2007, 3( 4-5 ): 211-231.
- [ 19 ] Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis [ J ]. *Nature*, 2004, 432( 7015 ): 324-331.
- [ 20 ] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, *et al*. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer [ J ]. *Cell*, 2005, 121( 6 ): 823-835.
- [ 收稿日期 ] 2009 - 11 - 11 [ 修回日期 ] 2010 - 02 - 28  
[ 本文编辑 ] 王 莹

· 编者 · 作者 · 读者 ·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来部分科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至全国带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明。
2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”,通过大量国内外学术文献的全文比对,对稿件进行学术不端行为的检查。
3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》删除学术不端文献系统”,该系统协助本刊对已发表论文的学术不端行为进行全面复核。
4. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重给作者以下处理:书面警告、通知作者所在单位、在本领域相关期刊间通报、2年内本刊不刊登有其署名的稿件、相关学术责任人(通讯作者)署名的其他稿件延缓审稿等。

(本刊编辑部)