

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.004

· 基础研究 ·

小鼠乳腺癌 4T1 细胞中肿瘤干细胞样细胞的富集和鉴定

王欣荣¹, 单保恩¹, 艾 军¹, 刘丽华¹, 刘月彩¹, 张 超¹, 张海谱¹, 刘登湘² (1. 河北医科大学 第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011; 2. 邢台市人民医院 医务科, 河北 邢台 054000)

[摘要] 目的: 无血清培养基(serum-free medium, SFM)悬浮培养小鼠乳腺癌细胞株 4T1, 富集并鉴定 4T1 细胞株中肿瘤干细胞样细胞。方法: 通过含 EGF、bFGF 和 B27 等细胞因子的 SFM 培养富集 4T1 细胞中肿瘤干细胞样细胞, 将其接种于含血清培养基(serum-supplemented medium, SSM), 观察 4T1 肿瘤干细胞样细胞分化情况。应用细胞表面标志 CD44⁺CD24^{-/low} 和 Hoechst 33342 染色法检测 4T1 细胞中肿瘤干细胞样细胞的比例, 小鼠致瘤实验验证不同培养条件下 4T1 肿瘤干细胞样细胞的致瘤能力。结果: 4T1 细胞在 SFM 中能够存活、增殖, 并形成细胞球, 细胞球可连续传代, 若重新接种于 SSM 中可贴壁分化。4T1 细胞球中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例为 6.4%~68.9%, 侧群(side population, SP) 细胞比例为 7.3%~61.2%, 均显著高于 SSM 中培养的 4T1 细胞($P < 0.05$); 随着 SFM 中细胞球传代次数增加, CD44⁺CD24^{-/low} 细胞和 SP 细胞的比例逐渐升高。小鼠致瘤实验结果显示, 富集了肿瘤干细胞的细胞球比常规培养 4T1 细胞的致瘤性更强。结论: 乳腺癌 4T1 细胞可在含多种生长因子的 SFM 中悬浮生长并形成细胞球, 4T1 细胞中含有的乳腺癌干细胞样细胞可通过 SFM 培养法富集。

[关键词] 无血清悬浮培养; 乳腺癌 4T1 细胞; 肿瘤干细胞; CD44⁺CD24^{-/low}; 侧群细胞

[中图分类号] R446.63; R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0381-05

Enrichment and identification of cancer stem cell-like cells in mouse breast cancer cell line 4T1

WANG Xin-rong¹, SHAN Bao-en¹, AI Jun¹, LIU Li-hua¹, LIU Yue-cai¹, ZHANG Chao¹, ZHANG Hai-pu², LIU Deng-xiang (1. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Medical Affairs Department, People's Hospital of Xingtai, Xingtai 054000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To culture mouse breast cancer 4T1 cells in serum-free medium(SFM), and to screen for and identify the cancer stem-like cells in 4T1 cells. **Methods:** Breast cancer stem-like cells were enriched from 4T1 cells cultured in SFM containing EGF, bFEGF, and B27, etc. The suspension spheres were seeded in serum-supplement medium(SSM) and cell differentiation was observed. The proportion of cancer stem-like cells in 4T1 cells was determined through cell surface markers CD44⁺CD24^{-/low} and Hoechst 33342 staining. Tumorigenic abilities of 4T1 cells in different culture conditions were detected by mouse tumorigenesis experiment. **Results:** 4T1 cells could survive, proliferate and form breast cancer suspension spheres in SFM for prolonged time period. 4T1 spheres seeded into SSM could differentiate and adhere to the culture plates. There were 6.4% - 68.9% CD44⁺CD24^{-/low} cells and 7.3% - 61.2% side population(SP) cells in 4T1 spheres, which were significantly higher than those in 4T1 cells cultured in SSM ($P < 0.05$). The ratios of CD44⁺CD24^{-/low} and SP cells were gradually increased with the passage of 4T1 spheres in SFM. 4T1 spheres with enriched cancer stem cell were more tumorigenic than 4T1 cells cultured in the SSM. **Conclusion:** 4T1 cells can grow and form spheres in serum-free suspension medium containing growth factor, and they contain breast cancer stem-like cells, which can be enriched when cultured in SFM.

[Key words] serum-free suspension culture; breast cancer 4T1 cell; cancer stem cell; CD44⁺CD24^{-/low}; side population cell

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 381-385]

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(No. C2009001195)。Project supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. C2009001195)

[作者简介] 王欣荣(1971-),女,河北省邢台市人,硕士,主要从事肿瘤干细胞方面的研究。E-mail: xinrongwang2009@yahoo.cn

[通信作者] 单保恩(SHAN Bao-en, corresponding author),E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn

肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)理论^[1]的提出,使通过靶向性杀死肿瘤干细胞从而根治肿瘤成为可能。但是,肿瘤干细胞的培养和分离一直是肿瘤干细胞研究的瓶颈,制约其研究的进一步深入。因为缺乏特异性的表面标记物,肿瘤干细胞的分离方法主要是富集 CSC,分选出的只是富含 CSC 的细胞^[2]。在乳腺癌肿瘤干细胞的研究中同样如此。乳腺癌干细胞是最早被鉴定出来的实体瘤干细胞,目前分离乳腺癌干细胞的方法主要有以下 3 种:流式细胞仪检测细胞表面标记物 CD44⁺ CD24^{-/low}, Hoechst 33342 染色分选侧群(side population, SP)细胞和无血清微球体培养法。无血清微球体培养法是目前富集干细胞的常用方法^[3-6],被广泛应用于富集包括乳腺癌干细胞在内的各种肿瘤干细胞。本实验将无血清微球体培养法应用于小鼠乳腺癌细胞株 4T1 的培养,以期从中分离出乳腺癌干细胞样细胞,观察其增殖和分化的特性,为乳腺癌干细胞的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

小鼠乳腺癌细胞株 4T1 由河北医科大学第四医院科研中心提供。优级胎牛血清购自杭州四季青公司,DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司。4T1 细胞用含血清培养基(serum-supplemented medium, SSM)即含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,于 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养,以 0.25% 胰蛋白酶 - 0.02% EDTA 消化细胞传代。EGF 和 bFGF 购自 Peprotech 公司,B27 购自 Invitrogen 公司,胰岛素购自万邦医药公司,抗 CD44-PE 和 CD24-FITC 抗体购自 BD 公司。染料 Hoechst 33342 购自 Sigma 公司,鼠尾胶原购自杭州生友生物公司。BALB/c 小鼠购自河北医科大学实验动物中心(动物合格证号 905016)。

1.2 4T1 细胞的无血清悬浮微球培养与传代

取对数生长期的 4T1 细胞,用胰酶-EDTA 消化后机械吹打成单细胞悬液。经锥虫蓝染色并计数后以 2 × 10⁴/ml 接种于无血清培养基(serum-free medium, SFM)^[5,7],即不含胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,并添加 20 ng/ml EGF、10 ng/ml bFGF、2% B27 和 5 μg/ml 胰岛素,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中静止培养,3 d 后离心换液。当培养瓶中形成细胞球后,将其用胰酶-EDTA 消化并机械吹打成单细胞悬液,并以 2 × 10⁴/ml 接种于 SFM 中,约 6 ~ 7 d 传代一次。

1.3 4T1 细胞微球体的诱导分化

用鼠尾胶原包被 6 孔板过夜。将培养出的第 4 代 4T1 细胞球用 PBS 液洗涤后,用胰酶-EDTA 消化成单细胞悬液,然后重悬于 SSM 中,按照 1 × 10⁵/孔接种于 6 孔板。每天用倒置相差显微镜观察其分化和生长情况。当细胞贴壁、分化并处于对数生长期时,在 SSM 中连续传代。

1.4 流式细胞术和 Hoechst 33342 染色法检测 4T1 细胞中 CD44⁺ CD24^{-/low} 细胞和 SP 细胞

细胞球形成 6 d 后,用胰酶-EDTA 消化成单细胞悬液,取 1 × 10⁶ 个细胞,加入抗 CD44-PE 和抗 CD24-FITC 进行标记,避光 50 min 后用 PBS 液洗 2 遍,以 40 μm 的细胞筛网进行过滤,上流式细胞仪检测 CD44⁺ CD24^{-/low} 细胞。

取 1 × 10⁶ 个细胞加入 Hoechst 33342 染液至终质量浓度为 5 μg/ml,置 37 °C 的水浴箱水浴 90 min,每 15 min 震荡混匀一次,1 000 × g 离心 5 min,弃上清,PBS 液洗 2 次,弃上清,涂片置荧光显微镜下观察,并利用 Image capture 软件拍照。随机计数 10 个视野中 SP 细胞比例。

取常规培养的 4T1 细胞和细胞球贴壁分化后的 4T1 细胞,用上述方法检测 CD44⁺ CD24^{-/low} 和 SP 细胞。

1.5 4T1 细胞和细胞球成瘤能力的检测

雌性 BALB/c 小鼠共 25 只,抽签法随机分为 5 组(表 1)。第 10 代 4T1 细胞球形成 1 d 后,将其消化成单细胞悬液,锥虫蓝染色检测细胞的活力。以表 1 中所描述的分组及数量将单细胞悬液分别接种于小鼠左、右背部皮下,每部位接种 0.2 ml。观察 12 周的肿瘤生长情况。

表 1 动物致瘤实验的分组

Tab. 1 Grouping of animal tumorigenesis experiment

Group	n	Inoculated cell number	
		4T1 cell on left back	4T1 sphere cell on right back
A	5	2 × 10 ²	2 × 10 ²
B	5	2 × 10 ³	2 × 10 ³
C	5	2 × 10 ⁴	2 × 10 ⁴
D	5	2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵
E	5	2 × 10 ⁶	2 × 10 ⁶

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件进

行统计学分析,两个独立样本组间均数比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4T1 细胞在无血清培养基中可形成能够连续传代的细胞球

将 4T1 细胞接种于 SSM 中培养,24 h 后基本贴壁,48 h 后形成单层贴壁细胞层,仅少量悬浮细胞,但没有悬浮细胞团。把 4T1 细胞接种于 SFM 中,24 h 时大部分 4T1 细胞贴壁;48 h 后部分 4T1 细胞悬浮并出现增殖,开始有部分细胞因不适应无血清环境呈凋亡态;4 d 后约 75% 细胞凋亡和坏死,同时可见细胞球形成(约由 8~20 个细胞组成),贴壁细胞进一步减少;随后,悬浮细胞球形态更加规则,体积更大,至 6 d 时可长至上百个细胞,基本无贴壁细胞(图 1)。将细胞球消化后传代,在 SFM 中又可形成细胞球,如此重复,细胞数量可扩增。



图 1 4T1 细胞在无血清悬浮培养时的形态
Fig.1 Morphology of 4T1 cells maintained in serum-free medium

A: 4 d (×100); B: 6 d (×200)

2.2 4T1 细胞球可在有血清的培养基中贴壁分化

将 4T1 细胞球细胞接种于 SSM 24 h 后,多数细胞球仍悬浮,少量开始贴壁;48 h 后,更多细胞球贴壁,部分细胞球仍悬浮;72 h 后,大量细胞贴壁,并开始与周围细胞融合,悬浮细胞球已不见,显微镜下观察,与 SSM 中常规培养的 4T1 细胞形态无明显差异,并可在 SSM 中连续传代(图 2)。以上实验结果显示,4T1 细胞在 SSM 中贴壁生长,而在 SFM 中形成细胞球悬浮生长。

2.3 4T1 细胞中 CD44⁺CD24^{-/low} 和 SP 细胞的比例

有血清常规培养的 4T1 细胞中,CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例约为 5.2%,SP 细胞比例约为 5.53%,两者之间无明显差异($P > 0.05$)。4T1 细胞球于 SSM 中贴壁分化后的细胞中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例为 5.81%,SP 细胞比例为 5.97%,两者之间无明显差异($P > 0.05$)。这两种培养条件下 CD44⁺CD24^{-/low} 和 SP 细胞比例之间也

无明显差异($P > 0.05$)。4T1 细胞球中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例约为 6.4%~68.9%(图 3),SP 细胞比例约为 7.3%~61.2%(图 4),均高于有血清培养的 4T1 细胞($P < 0.05$)。随着传代次数的增加,CD44⁺CD24^{-/low} 和 SP 细胞比例均逐渐升高(图 5),表明 4T1 细胞株在无血清培养条件下形成的细胞球富集了肿瘤干细胞,具有肿瘤干细胞的特性。

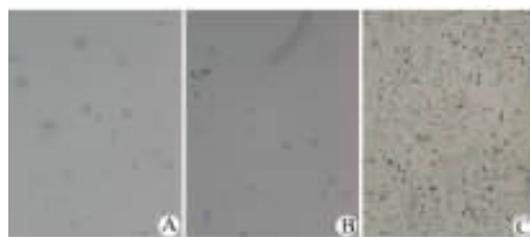


图 2 4T1 微球体细胞在有血清培养时的形态(×100)
Fig.2 Morphology of 4T1 mammosphere cells maintained in serum-supplemented medium(×100)

A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h

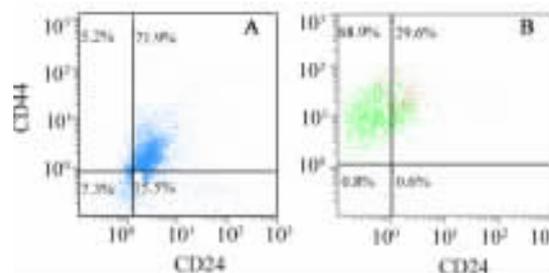


图 3 流式细胞术分析 4T1 微球体细胞及有血清培养 4T1 细胞中 CD44、CD24 的表达

Fig.3 Flow cytometry analysis of expressions of CD44 and CD24 on 4T1 cells derived from mammosphere cells and serum-supplemented culture cells

A: Expression of CD44 and CD24 on cells derived from serum-supplemented culture cells; B: Expression of CD44 and CD24 on cells derived from mammosphere cells

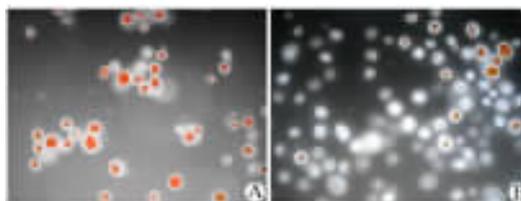


图 4 不同培养条件下 4T1 细胞中 SP 细胞的比例(×100)
Fig.4 Proportion of SP cells in 4T1 cells at different culture conditions(×100)

A: Serum-supplemented medium; B: Serum-free medium

2.4 4T1 微球体细胞的致瘤能力显著强于4T1 细胞

BALB/c 小鼠接种不同数量(2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 个)4T1 细胞球细胞 2.5 个月后,在接种细胞处均可见肿瘤生成,接种 2×10^2 个 4T1 细胞球细胞组小鼠未见肿瘤生成。接种 2×10^5 和 2×10^6 个常规培养的 4T1 细胞组小鼠可见肿瘤形成,而接种 2×10^2 、 2×10^3 、 2×10^4 个常规培养的 4T1 细胞组小鼠未见肿瘤形成(表 2)。结果提示,4T1 细胞球中细胞的致瘤能力显著强于常规培养的 4T1 细胞($P < 0.05$)。

3 讨论

肿瘤干细胞学说认为,肿瘤组织中存在极少量充当着干细胞角色的肿瘤细胞,它们具有自我更新和多向分化潜能,在肿瘤形成和生长中起着重要作用,是肿瘤生长、转移和复发的根源,此类细胞被命名为肿瘤干细胞^[8-10]。如何分离肿瘤干细胞并进一步研究其生物学特性,一直困扰着广大科研工作者。

由于缺乏特异性的肿瘤干细胞表面标记物,所以,肿瘤干细胞的分离方法只是富集了 CSC。

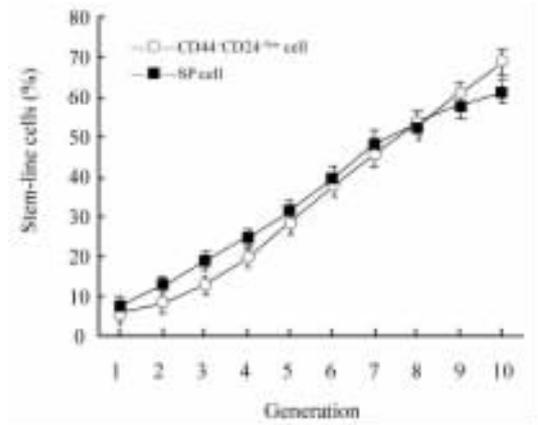


图5 SFM 培养 4T1 细胞连续传代时肿瘤干细胞样细胞的比例
Fig.5 Proportion of cancer stem-like cells in 4T1 cells under serum-free culture condition during serial generations

表 2 不同 4T1 细胞的小鼠成瘤情况(n)

Tab.2 Tumor formation of different 4T1 cells in mouse (n)

Cell	Inoculated cell number				
	2×10^2	2×10^3	2×10^4	2×10^5	2×10^6
4T1 cell	0/5	0/5	0/5	3/5	5/5
4T1 sphere cell	0/5	2/5	4/5	5/5	5/5

无血清培养应用于干细胞的体外培养,主要是由于其维持了干细胞的未分化状态,该法具有简便、快速、实用性强的优点,可以获得足够数量的细胞用于实验研究。Hemmati 和 Singh 等^[11-12]利用添加生长因子的无血清培养基从胶质瘤和成髓细胞瘤中分离和培养肿瘤干细胞,在肿瘤干细胞的分离培养方面取得了突破性进展,使得微球体培养法成为富集肿瘤干细胞的常规方法之一。

本研究将无血清微球体培养法应用到乳腺癌肿瘤干细胞的研究中,从小鼠乳腺癌 4T1 细胞中成功富集出具有增殖和分化能力的肿瘤干细胞样细胞,并能够连续传代。在缺少血清的环境中,相对分化成熟的下游细胞由于无法耐受长期的悬浮生长而凋亡,而相对未分化的干细胞则存活下来并继续增殖^[13]。大部分 4T1 细胞不能耐受无血清培养,相继凋亡,而少数细胞在第 4 天左右可形成细胞球。随着培养时间的延长,细胞球不断扩大,且传代后可继续生成肿瘤细胞球,表明了肿瘤干细胞具有不断自

我更新、增殖的特性。将 4T1 微球体细胞接种到包被了鼠尾胶原的 SSM 中,细胞可贴壁分化。因此,4T1 细胞可以在添加了生长因子的无血清培养基中长期生长和传代,并且随着有、无血清培养基的变换,4T1 细胞的生长方式也在悬浮细胞球和贴壁细胞之间转换。

CD44⁺CD24^{-/low} 是乳腺癌干细胞公认的标记物。Hajj 等^[14]从乳腺癌组织中分离出 CD44⁺CD24^{-/low}ESA⁺Lin⁻ 细胞,这群细胞只需 100 个就可以在非肥胖糖尿病/重度联合免疫缺陷小鼠中形成 1 cm 大小的肿瘤;与分选前乳腺癌细胞相比,CD44⁺CD24^{-/low}ESA⁺Lin⁻ 细胞致瘤性提高了 50 倍。这说明 ESA⁺CD44⁺CD24^{-/low}Lin⁻ 细胞在乳腺癌中起着干细胞的作用。本研究利用流式细胞仪检测了 4T1 细胞球中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例,结果显示,随着传代次数的增加,细胞球中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞含量逐渐升高,说明无血清微球体培养富集了乳腺癌干细胞。

肿瘤干细胞高表达 ABC 转运蛋白,使得荧光染料 Hoechst 33342 排出细胞外而使胞核淡染或不染色,能够将 Hoechst 33342 排出的细胞就是所谓的“侧群”(SP)细胞^[15]。Hoechst 染料排出实验被用来鉴定不同实体瘤包括乳腺癌中肿瘤干细胞的存在^[16]。Kondo 等^[17]证实,MCF-7 乳腺癌细胞株中 SP 细胞比例为 2.0%,C6 胶质瘤细胞中只含 0.4% 的 SP 细胞。Engelmann 等^[18]发现 MCF-7 乳腺癌细胞中大多数 SP 细胞表型为 CD44⁺/CD24^{-/low},单个 SP 细胞在悬液中培养能很快形成乳腺癌细胞球体。Patrawala 等^[19]的研究进一步发现,SP 细胞较相应的非 SP 细胞具有更强的致瘤性,同时 SP 细胞可传代并生成其他非 SP 细胞,显示其具有自我更新和多向分化能力。本实验结果显示,4T1 细胞球中 SP 细胞含量约为 7.3%~61.2%,显著高于常规培养的 4T1 细胞,这表明微球体培养富集了 SP 细胞。

肿瘤细胞动物移植实验是检验肿瘤干细胞的“金标准”。Singh 等^[12]利用流式细胞仪分选了脑肿瘤 CSC,这些细胞表达 CD133,100 个 CD133 细胞就能在 NOD/SCID 小鼠连续传代致瘤,并与原发肿瘤组织具有相同的组织类型。为了验证 4T1 细胞微球体中富集的肿瘤干细胞的致瘤能力,本研究进一步进行了小鼠致瘤实验。结果表明,4T1 细胞球细胞更具致瘤性,提示微球体培养富集了肿瘤干细胞。

总之,部分 4T1 细胞能在 SFM 中存活、增殖,形成细胞球,高表达乳腺癌干细胞标志 CD44⁺CD24^{-/low},具较强的小鼠致瘤性。

[参 考 文 献]

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111.
- [2] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem /progenitor cell properties [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13): 5506-5511.
- [3] Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24^{-/low}/CD44⁺ breast cancer initiating cells to radiation [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(24): 1777-1785.
- [4] Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme [J]. *Oncogene*, 2004, 23(58): 9392-9400.
- [5] Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(10): 1253-1270.
- [6] Sansone P, Slorci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Tafurelli M, et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12): 3988-4402.
- [7] 黄明主,张凤春,张雁云. 乳腺癌干细胞微球体形成的影响因素 [J]. *北京大学学报*, 2008, 40(5): 500-504.
- [8] Bansal N, Banarjee D. Tumor initiating cells [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 10(2): 192-196.
- [9] Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(5): 460-466.
- [10] Gangemi R, Paleari L, Orengo AM, Cesario A, Chessa L, Ferrini S, et al. Cancer stem cells: A new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(14): 1688-1703.
- [11] Hemmati HD, Nakano I, Lazaman-Sreff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cell can arise from pediatric brain tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(25): 15178-15183.
- [12] Singh SK, Clarke ID, Terassaki 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.
- [13] Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: Implications for stem cell biology and neoplasia [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005, 10(1): 75-86.
- [14] 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.
- [15] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side population phenotype [J]. *Nat Med*, 2001, 7(9): 1028-1034.
- [16] Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: The SP phenotype [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 3-12.
- [17] 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.
- [18] Engelmann K, Shen HM, Finn OJ. MCF-7 side population cells with characteristics of cancer stem /progenitor cells express the tumor antigen MUC1 [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2419-2426.
- [19] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cancer cells are similarly tumorigenic [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6207-6219.

[收稿日期] 2010-04-26

[修回日期] 2010-06-14

[本文编辑] 徐红梅