

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.010

过表达 *CD133* 对脑胶质瘤 U251 细胞生物学行为的影响

马晓花^{1,2}, 葛彦^{1,2}, 陆婷^{1,2}, 邓云³, 居颂光^{1,2}, 张学光^{1,2} (1. 苏州大学 医学生物技术研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 江苏省干细胞研究重点实验室, 江苏 苏州 215007; 3. 中国人民解放军第 100 医院 妇产科, 江苏 苏州 215007)

[摘要] **目的:**构建稳定表达人 *CD133* 基因的脑胶质瘤 U251 细胞株,并探讨 *CD133* 对 U251 细胞生物学行为的影响。**方法:**将人 *CD133* 全长 cDNA 构建入逆转录病毒表达载体 pEGZ-Term,包装成逆转录病毒 pEGZ-Term-*CD133*,进而感染脑胶质瘤 U251 细胞株。流式细胞术及 Real-time PCR 检测感染后 U251 细胞 *CD133* 分子的表达。细胞计数法、神经球形成实验观察 *CD133* 过表达对 U251 细胞体外的增殖和神经球形成的影响。裸鼠皮下成瘤法检测感染后 U251 细胞的体内致瘤性。**结果:**成功构建 pEGZ-Term-*CD133* 逆转录病毒表达载体,并获得稳定表达 *CD133* 的 U251 细胞。相比 U251-mock、U251 细胞,U251-*CD133* 细胞高表达 *CD133* mRNA [$(7\ 400.2 \pm 5\ 003.4)$ vs (2.0 ± 1.1) 、 (1.0 ± 2.2)],均 $P=0.0007$)和蛋白。感染 pEGZ-Term-*CD133* 对 U251 细胞的体外增殖并无影响 ($P>0.05$);但在无血清神经干细胞培养条件下,U251-*CD133* 细胞所形成的神经球数量显著高于 U251-mock 和 U251 细胞 [(34.0 ± 7.5) vs (14.6 ± 2.3) 、 (11.5 ± 1.3)],均 $P<0.01$]。接种量为 1×10^5 个细胞时,U251-*CD133* 细胞在裸鼠体内的成瘤时间(32 d)少于 U251-mock 细胞(38 d)、成瘤率更高(100% vs 30%),在第 41 天时,肿瘤体积显著增大 [(180.3 ± 146.8) vs (4.0 ± 0.0) mm³, $P=0.003$]。**结论:***CD133* 分子不影响脑胶质瘤 U251 细胞的体外增殖,但可促进 U251 细胞神经球的形成和致瘤性。

[关键词] *CD133*;脑胶质瘤;U251 细胞;逆转录病毒;致瘤性

[中图分类号] R739.41; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2013)04-0438-06

Impact of *CD133* gene overexpression on biological characteristics of human glioma U251 cells

Ma Xiaohua^{1,2}, Ge Yan^{1,2}, Lu Ting^{1,2}, Deng Yun³, Ju Songguang^{1,2}, Zhang Xueguang^{1,2} (1. Medical Bio-Tech Institute, SooChow University, Suzhou 215007, Jiangsu, China; 2. Key Lab for Stem Cell Research of Jiangsu Province, Suzhou 215007, Jiangsu, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, No. 100 Hospital of Chinese People's Liberation Army, Suzhou 215007, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:**To study the impact of *CD133* on biological characteristics of human glioma U251 cells by construction a U251 cell line stably overexpression human *CD133* gene. **Methods:** The full length human *CD133* cDNA was sub-cloned into retroviral expressing vector pEGZ-Term to obtain recombinant pEGZ-Term-*CD133* retrovirus. Then, U251 cells were infected by pEGZ-Term-*CD133* retrovirus. The expression of *CD133* on infected U251 cells was detected by flow cytometry and real-time PCR. By cell counting and neurosphere formation analysis, the impact of *CD133* overexpression on the proliferation and neurosphere formation of U251 cells *in vitro* was determined. Tumorigenicity was evaluated by subcutaneous injection of *CD133* infected U251 cells into the nude mice. **Results:** The pEGZ-Term-*CD133* retrovirus expression vector was constructed successfully and a *CD133* stably infected U251 cell line was obtained. Compared with U251-mock and U251 cells, the expressions of *CD133* mRNA ($[7\ 400.2 \pm 5\ 003.4]$ vs $[2.0 \pm 1.1, 1.0 \pm 2.2]$; all $P=0.0007$) and *CD133* protein were significantly increased in U251-*CD133* cells. pEGZ-Term-*CD133* retrovirus infection showed no effect on the proliferation of U251 cells ($P>0.05$). However, the neurosphere formation of U251-*CD133* cells was obviously higher than U251-mock and U251 cells in the presence of serum free neurosphere medium ($[34.0 \pm 7.5]$ vs

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 31200661);苏州市自然科学基金资助项目(No. SYS201106)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 3120061), and the Natural Science Foundation of Suzhou (No. SYS201106)

[作者简介] 马晓花(1988-),女,甘肃省定西市人,硕士生,主要从事肿瘤免疫学研究。E-mail: 276354091@qq.com

[通信作者] 张学光(Zhang Xueguang, corresponding author), E-mail: xueguangzh@126.com

[14.6 ± 2.3], [11.5 ± 1.3]; all $P < 0.01$). Compared with the U251-mock cells, the tumor formation time of U251-CD133 cells was shorter (32 d vs 38 d), the tumorigenesis ratio was higher (100% vs 30%) and the tumor volume was significantly larger ([180.3 ± 146.8] vs [4.0 ± 0.0] mm³, $P = 0.003$) at 41 d when subcutaneous inoculated 1×10^5 cells. **Conclusion:** CD133 has no influence on proliferation of glioma U251 cells, but could enhance neurosphere formation and tumorigenicity of U251 cells.

[**Key words**] CD133; glioma; U251 cell; retrovirus; tumorigenicity

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(4): 438-443]

CD133 是 Miraglia 等^[1]在 1997 年发现的造血干/祖细胞表面标志分子,2000 年国际白细胞分化抗原工作组会议将其正式命名为 CD133^[2]。CD133 属 Prominin 家族成员,为 5 次穿膜糖蛋白,有 CD133-1 和 CD133-2 两种异构体。除造血干/祖细胞外,CD133 分子也表达于内皮祖细胞^[3]、表皮干细胞^[4]、神经干细胞及多种肿瘤组织表面^[5-9]。研究^[10]发现,CD133 分子可作为脑胶质瘤干细胞的表面标志分子,与脑胶质瘤的发生、发展及预后密切相关,但其在脑胶质瘤干细胞中的生物学作用还有待阐明。本研究构建稳定表达 *CD133* 基因的脑胶质瘤 U251 细胞株,并初步探讨过表达 *CD133* 对 U251 细胞生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 材料及主要仪器

CD133 全长基因由本实验室居颂光博士提供,逆转录病毒表达载体 pEGZ-Term 及辅助病毒载体 pHIT456 和 pHIT60 由德国 Wuerzburg 大学 Seffling 教授惠赠。脑胶质瘤 U251 细胞购自美国 ATCC 公司,由本实验保存。KOD neo-plus DNA 聚合酶购自日本 Toyobo 公司, Taq DNA 聚合酶、*Bam*H I、*Smi* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、逆转录酶 M-MLV (RNase H⁻)、核糖核酸酶抑制剂、焦碳酸二乙酯、oligo (dT)18、无 RNase 水、5 × M-MLV 缓冲液、TRIzol 均购自日本 TaKaRa 公司。胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自美国 Axyen 公司。脂质体 lipofectamineTM 2000、博来霉素 (Zeocin)、B27、bFGF、EGF 均购自美国 Invitrogen 公司。Polybrene 购自美国 Sigma 公司。CD133 mAb-PE (Phycoerythrin, 克隆号:AC141) 购自德国 Miltenyi Biotec 公司,小鼠 IgG-PE 同型对照购自美国 eBioscience 公司。FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 购自德国 Roche 公司。荧光定量 PCR 仪购自美国 BIO-RAD,流式细胞仪购自美国 Beckman Counter 公司。免疫缺陷 BABL/c 裸鼠购自中国科学院上海动物实验中心 [动物合格证号: SCXK(沪)2007-0005]。

1.2 pEGZ-Term-CD133 逆转录病毒载体的构建

根据 *CD133* (GenBank AF0272081) 基因序列设计引物,将 CD133 全长 cDNA,克隆入逆转录病毒载体 pEGZ-Term 中,转化感受态大肠杆菌 Top10,挑选抗性菌落,经菌液 PCR 验证、*Bam*H I 和 *Smi* I 双酶切、基因测序验证,命名为 pEGZ-Term-CD133 质粒。分别采用脂质体将空载体 pEGZ-Term 或重组质粒 pEGZ-Term-CD133 及辅助载体 pHIT456 和 pHIT60 导入 293T 细胞,包装成对照 pEGZ-Term 和 pEGZ-Term-CD133 逆转录病毒。

1.3 pEGZ-Term-CD133 逆转录病毒稳定感染 U251 细胞的筛选和鉴定

对照 pEGZ-Term 和 pEGZ-Term-CD133 逆转录病毒上清感染 U251 细胞,培养 48 h 后用 500 μg/ml 博来霉素加压筛选,获得抗性克隆 U251-mock 和 U251-CD133 细胞。取 U251-mock 和 U251-CD133 细胞,加入抗人 CD133 mAb-PE 染色,流式细胞仪检测 GFP 及细胞表面 CD133 分子的表达。抽提 U251、U251-mock 和 U251-CD133 细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,荧光定量 PCR 验证 *CD133* mRNA 的表达,以 β -actin 基因为对照。*CD133* 基因引物序列:上游为 5'-GAACTCTCTTGAATGAACTCC-3'、下游为 5'-AACTTAATCCAACCTCCACC-3'。 β -actin 基因引物序列:上游为 5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACA-3'、下游为 5'-GATAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'。扩增条件:变性 95 °C、10 min,退火加延伸 60 °C、30 s,溶解曲线 65 °C ~ 95 °C、0.5 °C/s。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 进行数据分析。

1.4 细胞计数法检测 pEGZ-Term-CD133 感染对 U251 细胞增殖的影响

将处于对数生长期的 U251、U251-mock 和 U251-CD133 细胞经胰酶消化,重悬于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,调整细胞密度为 5 × 10⁴ 个/ml,以 100 μl/孔接种于 96 孔板中。此后在培养 24、48 和 72 h 3 个时间点计数各组细胞,绘制细胞生长曲线,比较各细胞的增殖情况。

1.5 神经球形成实验检测 pEGZ-Term-CD133 感染

对 U251 细胞神经球形成的影响

将处于对数生长期的 U251、U251-mock、U251-CD133 细胞经胰酶消化, PBS 洗涤 3 次后重悬于含 B27 1:50、5 ng/ml bFGF 和 2.5 ng/ml EGF 的 DMEM/F12 无血清培养基中, 调整细胞密度为 3×10^4 个/ml, 以 100 μ l/孔接种于 96 孔板中, 每天观察细胞形态, 并拍照记录神经球的形成情况。随机选取 5 个视野, 计数各组细胞所形成的神经球数。

1.6 裸鼠体内成瘤实验检测 pEGZ-Term-CD133 感染对 U251 细胞成瘤性的影响

收集对数生长期的 U251-mock、U251-CD133 细胞, 无菌 PBS 洗涤 2 次, 调整细胞密度为 2×10^7 、 6×10^6 、 2×10^6 个/ml。将 10 只裸鼠按接种细胞量随机分为 3 组: 1×10^6 组 3 只、 3×10^5 组 4 只、 1×10^5 组 3 只。分别将两种细胞接种到裸鼠左右两侧肋腹的皮下, 每个注射点接种 50 μ l。定期观察裸鼠状态及成瘤情况, 记录成瘤时间。游标卡尺测量瘤体长径(a)、短径(b), 待瘤块长至直径约 15 mm 时, 处死裸鼠。依据公式 $V = a \times b^2 / 2$ 计算瘤体积。

1.7 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 软件绘制成瘤曲线及肿瘤生长曲线并对数据进行分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 pEGZ-Term-CD133 逆转录病毒感染 U251 细胞株

经 *Bam*H I 和 *Smi* I 双酶切鉴定, 成功构建了含人 CD133 cDNA 的逆转录病毒表达载体 pEGZ-Term-CD133(图 1)。相比 U251-mock、U251 组, U251-CD133 组细胞高表达 *CD133* mRNA [$(7\ 400.2 \pm 5\ 003.4)$ vs (2.0 ± 1.1) 、 (1.0 ± 2.2) , 均 $P = 0.0007$]。U251-CD133 组细胞高表达 GFP 和 CD133 分子, 对照组 U251-mock 细胞仅表达 GFP 但不表达 CD133 分子(图 2)。结果表明, pEGZ-Term-CD133 逆转录病毒感染的脑胶质瘤细胞株 U251-CD133 构建成功。

2.2 CD133 过表达对 U251 细胞增殖的影响

在含胎牛血清的常规培养条件下, U251、U251-mock、U251-CD133 3 种细胞均贴壁生长, 呈纺锤形、星形或纤维细胞形, 培养 24 h 后细胞贴壁良好, 细胞轮廓清晰, 胞质均一透明; 48 h 后细胞更加伸展, 呈纤维形生长, 增殖明显(图 3A)。在 24、48、72 h 3 个时间点, U251、U251-mock、U251-CD133 三种细胞的细胞数量并无明显差异[48 h 时($13.54 \pm$

4.59) $\times 10^4$ vs (15.41 ± 3.02) $\times 10^4$ 、(11.5 ± 3.86) $\times 10^4$ 个, 均 $P > 0.05$], 提示 pEGZ-Term-CD133 逆转录病毒感染不影响 U251 细胞的增殖(图 3B)。

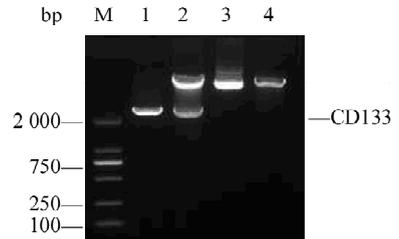


图 1 双酶切法鉴定 pEGZ-Term-CD133 逆转录病毒

Fig. 1 Identification of pEGZ-Term-CD133 retrovirus by double enzyme digestion

M: DL 2000 DNA marker; 1: *CD133* cDNA;
2: pEGZ-Term-CD133 digested by *Bam*H I and *Smi* I; 3: pEGZ-Term-CD133;
4: pEGZ-Term digested by *Bam*H I and *Smi* I

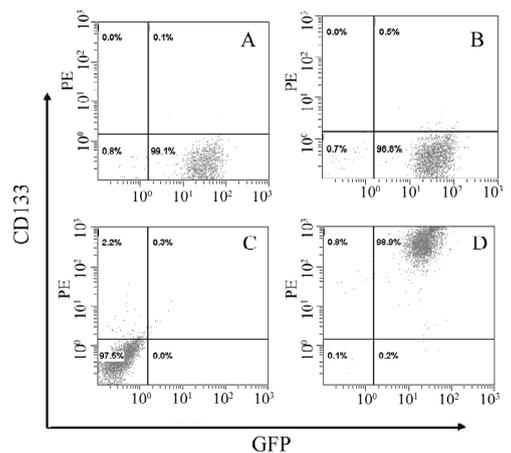


图 2 pEGZ-Term-CD133 逆转录病毒感染后 U251 细胞中 CD133 的表达

Fig. 2 Expression of CD133 in U251 cells after pEGZ-Term-CD133 retrovirus infection

A: U251-mock + mouse IgG control;
B: U251-mock + CD133-mAb-PE;
C: U251-CD133 + mouse IgG control;
D: U251-CD133 + CD133-mAb-PE

2.3 CD133 过表达促进 U251 细胞的神经球形成

将 U251、U251-mock、U251-CD133 细胞培养在神经干细胞培养基中, 结果发现对照组 U251、U251-mock 细胞始终有部分贴壁生长, 形成的神经球数较少, 结构较松散; U251-CD133 细胞始终呈半贴壁或

悬浮状态生长,并形成更大、更致密的神经球样结构,球体周围细胞透亮,细胞形态清晰,中间细胞密度高,透光性差,细胞轮廓模糊(图4)。随机观察5个视野,计数神经球数目,U251-CD133 细胞所形成的神经球数显著高于 U251-mock 和 U251 细胞 [(34.0 ± 7.5) vs (14.6 ± 2.3)、(11.5 ± 1.3)个,均 $P < 0.01$]。

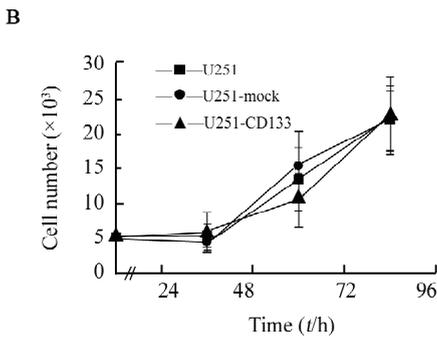
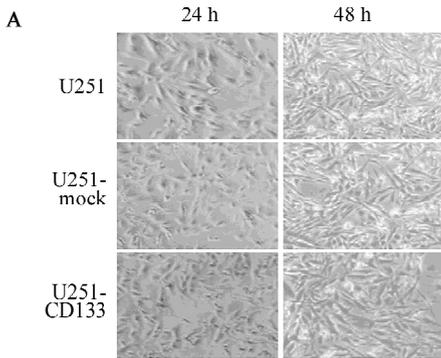


图3 CD133 对有血清培养条件下 U251 细胞增殖的影响(× 100)

Fig. 3 Effect of CD133 on proliferation of glioma U251 cell in serum medium(× 100)

A: Cell proliferation assay; B: Growth curve of U251 cell

2.4 CD133 过表达增强脑胶质瘤 U251 细胞的致瘤性

将 U251-CD133、U251-mock 两种细胞分别接种裸鼠 5 d 后,1 × 10⁶ 组裸鼠均形成肉眼可见的肿块,此后每隔 3 d 观察肿瘤生长情况,U251-CD133 细胞成瘤时间明显早于 U251-mock 细胞(图 5A):U251-CD133 细胞 1 × 10⁶、3 × 10⁵、1 × 10⁵ 各组成瘤时间分别为 5、23、32 d,U251-mock 细胞为 5、26、38 d;U251-CD133 细胞各组成瘤率均为 100%,U251-mock 细胞 1 × 10⁵ 组成瘤率仅为 30%。此外,接种 41 d 后 1 × 10⁵ 组 [(180.3 ± 146.8) vs (4.0 ± 0.0) mm³, $P = 0.003$] 和 3 × 10⁵ 组 [(284.4 ± 254.8) vs (94.8 ± 92.9) mm³, $P = 0.039$] U251-CD133 细胞所

成肿瘤体积显著大于 U251-mock 细胞(图 5B),说明 CD133 分子明显增强了 U251 细胞的致瘤性。

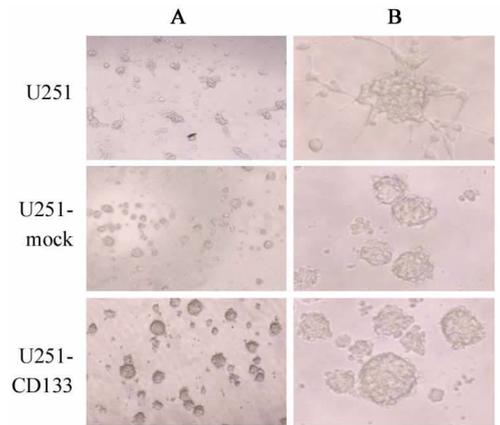


图4 CD133 对 U251 细胞神经球形成的影响
Fig. 4 Effect of CD133 on neurosphere formation of U251 cells

A: Magnification × 10; B: Magnification × 40

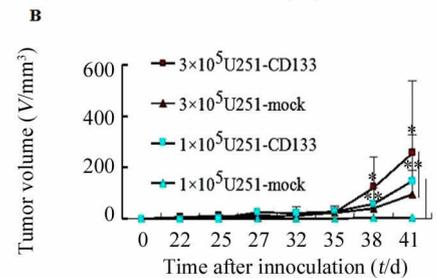
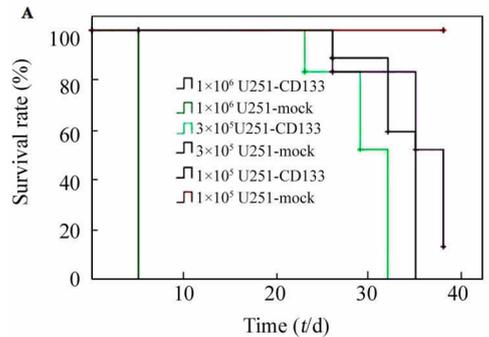


图5 CD133 过表达增强 U251 细胞的致瘤性
Fig. 5 CD133 overexpression enhanced the tumorigenesis of U251 cells

A: Survival curve; B: Tumor growth curve
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs U251-mock

3 讨论

脑胶质瘤是常见的恶性肿瘤,呈侵袭性生长,易复发,患者预后差^[11]。Singh 等^[12]首次报道了

CD133 可作为脑瘤干细胞(brain tumor stem cell, BTSC) 表面的特征标志分子。在成髓细胞瘤、少突胶质细胞瘤、成胶质细胞瘤中也分离得到 CD133⁺/nestin⁺ CSC 肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)^[13]。Pallini 等^[14]发现, 在复发的胶质细胞瘤中 CD133⁺ 细胞是初始胶质细胞瘤的 4.6 倍, 并且 CD133 的表达与脑胶质瘤预后密切相关。Rong 等^[15-16]发现, CD133⁺ 胶质瘤干细胞样组分可分化为内皮祖细胞, 进而成熟为血管内皮细胞, 形成肿瘤新生血管。Bao 等^[17]发现, CD133⁺ 细胞能够优先激活 DNA 辐射损伤反应, 引起细胞周期的停滞以修复受损的 DNA, 这可能是脑胶质瘤放疗后复发的主要原因。研究^[18]表明, 成胶质细胞瘤来源的 CD133⁺ CSC 可能通过同时上调 *BCRPI* (*ABCG2*) 及 DNA 错配修复基因 *MGMT* 来赋予细胞化疗抗性。总之, CD133 分子在脑胶质瘤干细胞研究中起到十分重要的作用。有研究推测, CD133 可能通过羧基端酪氨酸残基磷酸化来介导细胞内信号, 充当生长因子受体。

当前对 CD133 分子生物功能的研究主要采取以下两种方法:(1) 通过磁珠或流式细胞分选将肿瘤细胞分为 CD133⁺、CD133⁻ 两群, 研究其体外分化、侵袭、耐药性以及致瘤性等生物学性质;(2) 通过基因工程技术, 对已有的肿瘤细胞系进行 *CD133* 基因转染或沉默, 从而研究肿瘤细胞的上述性质, 进一步探索可能的信号通路^[19-21]。本研究结果表明, CD133 分子不影响脑胶质瘤细胞的增殖, 与 Lin 等^[22]、Tarek 等^[23]报道的结果一致。Beier 等^[24]将脑胶质瘤新鲜组织细胞分选为 CD133⁺ 和 CD133⁻ 两类细胞, 发现在神经球干细胞培养基培养条件下, CD133⁻ 细胞多呈贴壁生长而无神经球形成, CD133⁺ 细胞呈神经球样生长, 且能长期传代, 提示 CD133⁺ 细胞可能是肿瘤无限增殖的根源。本研究发现了相似的结果, 在无血清神经干细胞培养基中, U251-CD133 细胞较 U251-mock 细胞形成更典型的神经球, 球体更大、密度更高、增殖能力更强, 提示 CD133 分子能够促进脑胶质瘤 U251 细胞在神经干细胞培养基中的增殖, 推测其参与了赋予 U251 细胞肿瘤干细胞特性的过程。

肿瘤组织是高度异质性群体, 并非所有肿瘤细胞都能够克服环境中生长抑制因子而继续生长形成新的肿瘤。Galli 等^[25]将脑胶质瘤细胞分为 CD133⁺ 细胞和 CD133⁻ 细胞, 分别接种至裸鼠颅内、腹腔和皮下, 结果发现 CD133⁻ 细胞无致瘤力, 而 CD133⁺ 细胞致瘤率为 50% ~ 100%。为进一步研究体内环境下 CD133 分子对脑胶质瘤细胞增殖的

影响, 本研究将 U251-CD133 和 U251-mock 两种细胞分别接种到裸鼠皮下, 观察体内肿瘤的生长情况。结果表明, U251-CD133 细胞在裸鼠皮下成瘤时间更早、成瘤率更高、形成的瘤体更大。结果显示, 3×10^5 、 1×10^5 两组 U251-CD133 细胞所成肿瘤体积明显大于 U251-mock 细胞, 说明 CD133 分子在体内环境下促进了肿瘤细胞的自我更新及增殖, 但其分子机制和可能的信号途径还待进一步探索。

本研究分析了 CD133 分子对 U251 细胞的体外生长及体内致瘤性的影响, 证实其能够在无血清神经干细胞培养基中促进 U251 细胞的增殖, 并显著增强裸鼠体内致瘤率。结果提示, CD133 有可能成为针对脑胶质瘤干细胞治疗的潜在靶点, 本研究为 CD133 分子的功能研究及临床应用提供了新线索。

[参 考 文 献]

- [1] Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-tansmembrane hematopoietic stem cell antigen: Isolation, characterization, and molecular cloning [J]. *Blood*, 1997, 90(12): 5013-5021.
- [2] Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: Molecule of the moment [J]. *J Pathol*, 2008, 214(1): 3-9.
- [3] Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, et al. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells [J]. *Blood*, 2000, 95(10): 3106-3112.
- [4] Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, et al. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted toplasmalemmal protrusions of non-epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(23): 12425-12430.
- [5] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445(7123): 106-110.
- [6] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, et al. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(4): 820-824.
- [7] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer [J]. *Cancer Stem Cell*, 2007, 3(1): 313-323.
- [8] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10946-10951.
- [9] Zabierowski SE, Herlyn M. Melanoma Stem cells: The dark seed of melanoma [J]. *Clin Oncol*, 2008, 26(17): 2890-2894.
- [10] 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.
- [11] 郑克彬, 焦保华. 胶质瘤干细胞及相关的信号转导通路 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(1): 107-109.

- [12] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumor initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
- [13] Yi L, Zhou ZH, Ping YF, et al. Isolation and characterization of stem cell-like precursor cells from primary human anaplastic oligoastrocytoma [J]. *Mod Pathol*, 2007, 20(10): 1061-1068.
- [14] Pallini R, Ricci-Vitiani L, Montano N, et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis [J]. *Cancer*, 2011, 117(1): 162-174.
- [15] EI Hallani S, Boisselier B, Peglion F, et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: Tubular vasculogenic mimicry [J]. *Brain*, 2010, 133(4): 973-982.
- [16] Wang R, Chadavada K, Wilshire J, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium [J]. *Nature*, 2010, 468(9624): 829-833.
- [17] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radio-resistance by preferential activation of the DNA damage response [J]. *Nature*, 2006, 444(5236): 756-760.
- [18] Jamal M, Rath BH, Tsang PS, et al. The brain microenvironment preferentially enhances the radioresistance of CD133(+) glioblastoma stem-like cells [J]. *Neoplasia*, 2012, 14(2): 150-158.
- [19] Ma S, Lee TK, Zheng BJ, et al. CD133⁺ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway [J]. *Oncogene*, 2008, 27(12): 1749-1758.
- [20] Wang YK, Zhu YL, Qiu FM, et al. Activation of Akt and MAPK pathways enhances the tumorigenicity of CD133⁺ primary colon cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(8): 1376-1380.
- [21] Borrego-Diaz E, Terai K, Lialyte K, et al. Over-activation of Ras signaling pathway in CD133⁺ MPNST cells [J]. *J Neurooncol*, 2012, 108(3): 423-434.
- [22] Dong L, Qi N, Ge RM, et al. Overexpression of CD133 promotes the phosphorylation of Erk in U87MG human glioblastoma cells [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 484(3): 210-214.
- [23] Elsaba TM, Martinez-Pomares L, Robins AR, et al. The stem cell marker CD133 associates with enhanced colony formation and cell motility in colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): 42-52.
- [24] Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al. CD133⁺ and CD133⁻ glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristic and molecular profiles [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9): 4010-4015.
- [25] Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic stem like neural precursors from human glioblastoma [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 7011-7021.
- [收稿日期] 2013 -02 -01 [修回日期] 2013 -05 -05
- [本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

常见参考文献著录格式示例

1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(1 版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

[1] Abrams WB, Beers MH, Berkow R. 默克老年病手册 [M]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[文献类型标志]// 专著主要责任者. 专著题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

[1] Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms [M]// Soderman WA Jr, Soderman WA. Pathologic physiology: Mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页.

[1] Nobles KN, Guan Z, Xiao K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: Direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and -2 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(29): 21370-21381.

4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志]. 公告日期或公开日期.

[1] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PIK)、其制备方法及应用: 中国, 2010101496839 [P]. 2010-10-14.

5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[文献类型标志]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

[1] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系 [D]. 郑州, 郑州大学, 2007.

6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页(更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径.

[1] Christine M. Plant physiology: Plant biology in the genome era [J/OL]. *Science*, 1998, 281: 331-332 [1998-09-23]. <http://www.sciencemag.org/cgi/collection/anatmorp>.

[2] Hopkinson A. UNIMARC and metadata: Dublin core [EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.