

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.02.014

高转移潜能肝癌 HCCLM3 细胞中侧群细胞的分离及其干细胞特性鉴定

郭哲¹, 向邦德^{1△}, 姜经航¹, 张俊², 钟艳平³, 苏节³, 黎乐群¹(1. 广西医科大学附属肿瘤医院 肝胆外科, 广西南宁 530021; 2. 广西医科大学第一附属医院 超声科, 广西南宁 530021; 3. 广西医科大学医学实验中心, 广西南宁 530021)

[摘要] **目的:** 检测高转移潜能肝癌 HCCLM3 细胞株中侧群(side population, SP)细胞比例, 分选 SP 细胞并探讨其生物学特性。**方法:** 4 种肝癌细胞株的转移潜能大小依次为 HCCLM3 > MHCC97H > MHCC97L > Huh7, 分别予以荧光染料 Hoechst33342 染色, 以加入维拉帕米的拮抗组为对照, 流式细胞术检测 SP 细胞比例; 从 HCCLM3 细胞中分选 SP 细胞和主群(main population, MP)细胞, 采用悬浮球培养、Transwell 侵袭实验及裸鼠成瘤实验判断 HCCLM3 SP 细胞是否具有肿瘤干细胞生物学特性; RT-PCR 检测 SP 及 MP 细胞中干细胞相关基因的表达。**结果:** HCCLM3 细胞中 SP 细胞比例为 (16.9 ± 1.8)%, 显著多于 MHCC97H、MHCC97L、Huh7 中 SP 细胞比例 [(8.4 ± 0.7)%、(4.6 ± 0.5)%、(1.0 ± 0.2)%], 均 $P < 0.05$ 。HCCLM3 细胞中, SP 细胞悬浮球形成明显高于 MP 细胞 [(25.3 ± 5.1)% vs (11.2 ± 2.6)%], $P < 0.05$, SP 细胞的侵袭能力显著高于 MP 细胞 ($P < 0.05$), SP 细胞的裸鼠皮下成瘤能力也明显高于 MP 细胞。HCCLM3 细胞的 SP 细胞中干细胞相关基因 *ABC2*、*CD13*、*CD44*、*Nanog*、*Sox2* 及 *Klf4* mRNA 平均表达水平分别是 MP 细胞的 5.64、2.26、2.10、3.78、2.37、2.92 倍 (均 $P < 0.05$)。**结论:** 肝癌 HCCLM3 细胞的 SP 细胞中富集了肝癌干细胞, 这可能与其较高的转移潜能有关。

[关键词] 肝癌; HCCLM3 细胞; 侧群细胞; 肿瘤干细胞; 转移

[中图分类号] R735.3; R730.54; Q2-33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)02-0220-05

Isolation and stem cell property assessment of side population cells in hepatocellular carcinoma cell lines

Guo Zhe¹, Xiang Bangde^{1△}, Jiang Jinghang¹, Zhang Jun², Zhong Yanping³, Su Jie³, Li Lequn¹(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China; 2. Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China; 3. Medical Science Experimental Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and characterize side population (SP) cells in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods:** Four HCC cell lines with a metastatic potential in an order of HCCLM3 > MHCC97-H > MHCC97-L > Huh7 were cultivated in routine culture conditions. Single cell suspensions were made for these lines and incubated with different concentrations of Hoechst33342 either alone or with 50 μmol/l verapamil. The proportion of SP cells in these suspensions was analyzed by flow cytometry. SP cells and main population (MP) cells in the single cell suspension of cell line HCCLM3 were sorted. The HCCLM3-derived SP cells and MP cells were then comparatively assessed for tumorsphere formation, migration and invasion *in vitro*, for tumorigenicity *in vivo* and for the expression of stem cell-related genes at the mRNA level. **Results:** The proportion of SP proportion was significantly different among HCCLM3 (16.9 ± 1.8)%, MHCC97-H (8.4 ± 0.7)%, MHCC97-L (4.6 ± 0.5)% and Huh7 (1.0 ± 0.2) ($P < 0.05$). HCCLM3-derived SP cells but not MP cells displayed many characteristics of cancer stem cells including more sphere formation

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81160262, 81260331); 国家科技重大专项课题资助项目(No. 2012ZX10002010001009)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81160262, 81260331), and the National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China (No. 2012ZX10002010001009)

[作者简介] 郭哲(1986-), 男, 湖北黄冈人, 博士生, 医师, 主要从事肝癌的基础与临床研究, E-mail: zheguophd@163.com

[通信作者] 黎乐群(Li Lequn, corresponding author), E-mail: xiaopushu-213@163.com; 向邦德(Xiang Bangde, co-corresponding author), E-mail: xiangbangde@163.com。△共同通信作者

(25.3 ± 5.1)% vs (11.2 ± 2.6)%, $P < 0.05$), higher invasion ability *in vitro* and stronger tumorigenicity in nude mice. The mRNA levels of ABCG2, CD13, CD44, Nanog, Sox2 and Klf4 in SP cells were 5.64, 2.26, 2.10, 3.78, 2.37, 2.92 times of those respectively in MP cells (all $P < 0.05$). **Conclusion:** In the HCCLM3 cell line there is an enriched population of SP cells with liver cancer stem cell-like properties, which may be related to the highly metastatic potential of HCCLM3 cells.

[**Keywords**] hepatocellular carcinoma; HCCLM3 cell; side population cell; cancer stem cell; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(2): 220-224]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一,手术切除是最主要的治疗手段^[1-2],然而术后肿瘤高复发率已然成为制约其疗效的瓶颈^[3]。近年来肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)已成为肿瘤领域研究的热点,它是存在于肿瘤组织中少数具有无限增殖、自我更新、多向分化潜能的肿瘤细胞。CSC在启动肿瘤的形成和生长中发挥决定性作用,是肿瘤复发和转移的根源^[4]。因此,靶向治疗CSC可能是减少复发及转移的关键。

侧群(side population, SP)细胞具备较强的耐药性及致瘤能力,可能富集了CSC^[5]。在缺乏特异性肝癌干细胞标记物的情况下,SP细胞分选已成为富集肝癌干细胞的一种简便而实用的方法^[6]。本研究借助流式细胞仪检测四种不同转移潜能肝癌细胞株HCCLM3、MHCC97H、MHCC97L、Huh7中SP细胞比例,并选择转移潜能最高、SP细胞比例也最高的HCCLM3细胞中分选SP细胞,鉴定其干细胞特性,初步分析肝癌干细胞与肝癌转移的关系,为肝癌干细胞的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

人肝癌细胞株HCCLM3、MHCC97H、MHCC97L、Huh7(转移潜能依次为HCCLM3 > MHCC97H > MHCC97L > Huh7)购自复旦大学肝病研究所,采用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养液在37℃、5%CO₂饱和湿度的条件下培养。Hoechst33342、维拉帕米(verapamil)、7-AAD均购自Sigma公司,高糖DMEM、DMEM/F12、胎牛血清均购自Gibco公司,Matrigel胶、BD influx流式细胞仪均购自BD公司,CCK-8试剂盒购自同仁公司,实时荧光定量PCR仪购自ABI公司,4~6周龄雄性裸鼠购自广西医科大学动物实验中心(动物合格证号:0001869)。

1.2 不同转移潜能的肝癌细胞中SP细胞的分选

取对数生长期细胞制备单细胞悬液,调整至 1×10^6 个/ml。实验组和对照组均加入Ho-

echst33342至终质量浓度3~10 mg/L;其中对照组在染色前15 min加入维拉帕米至50 μmol/L,以拮抗SP细胞外排Hoechst33342。37℃恒温水浴箱中温育90 min,期间每隔10 min混匀1次。预冷PBS洗涤离心,弃上清。4℃预冷的含5%胎牛血清的高糖DMEM培养液重悬细胞,加入7-AAD至1 mg/L以标记死细胞。各组细胞样品用流式细胞仪检测,设定低Hoechst Red及低Hoechst Blue且对照组缺失的区域为SP细胞的“门”^[7]。分选SP细胞和主群(main population, MP)细胞。

1.3 悬浮球培养检测HCCLM3 SP细胞的成球能力

无血清的DMEM/F12培养基中添加bFGF(20 μg/L)、EGF(20 μg/L)及B27(1:50)等制成无血清悬浮培养基。SP及MP细胞按 2×10^3 个/孔分别接种于低黏附的6孔板,各设3个复孔。37℃孵箱中培养,每2~3 d半量换新鲜无血清悬浮培养基,每日观察细胞悬浮球情况。

1.4 Transwell法检测HCCLM3 SP细胞的侵袭能力

采用8 μm微孔聚碳酸酯膜的Transwell小室,按1:5比例混合matrigel和高糖DMEM培养基,于上室加入100 μl混合液,37℃孵育2 h使其凝固,制成人工基底膜。将分选到的SP及MP细胞分别用高糖DMEM培养基重悬制备成单细胞悬液,调整至 2×10^5 /ml。上室各孔中加入100 μl细胞悬液,下室加入800 μl含10%胎牛血清的高糖DMEM培养液,48 h后自24孔板中取出上室,用棉签擦去上室面细胞,然后将小室置于甲醇中固定15 min,吉姆萨染液染色15 min,于200倍光镜下随机选择5个视野计数穿膜细胞,取平均值。实验重复3次。

1.5 裸鼠成瘤实验检测HCCLM3 SP细胞成瘤能力

将15只4~6周龄的雄性裸鼠随机分为3组。将高糖DMEM培养基与matrigel按体积比1:1混合,用其重悬SP及MP细胞至密度为 2.5×10^6 /ml、 2.5×10^5 /ml、 2.5×10^4 /ml,分别取200 μl细胞悬液(含细胞数为 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 个)接种于裸鼠左、右侧背部皮下。SPF级环境下饲养,观察4周。剥取移植瘤,H-E染色验证裸鼠皮下肿瘤类型。

1.6 Real-time PCR 检测 HCCLM3 SP 细胞内干细胞相关基因的表达

分选 SP 及 MP 细胞,离心后收集,TRIzol 法提取细胞总 RNA。取适量 RNA 进行逆转录,所得 cDNA 于 -20 °C 保存。Real-time PCR 反应体系及条件参照试剂说明书。以 GAPDH 为内参,检测 SP 细胞中肝癌干细胞相关基因 *ABCG2*、*CD13*、*CD44* 和干细胞相关基因 *Nanog*、*Sox2*、*Klf4*、*CD133*、*CD90*、*EpCAM*、*Sall4* 及 *Oct4* mRNA 的表达。各基因的表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法确定, $\Delta\Delta Ct = (\text{SP 细胞目的基因 Ct 值} - \text{SP 细胞 GAPDH Ct 值}) - (\text{MP 细胞目的基因 Ct 值} - \text{MP 细胞 GAPDH Ct 值})$, 相对表达量差异 ≥ 2 倍表示差异有统计学意义。每个样本均设 3 个复管。

1.7 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件处理,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两样本间 *t* 检验,多样本比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCCLM3 细胞中 SP 细胞比例较高

由于不同细胞株的特性不同,其最佳 Hoechst33342 染色浓度亦有差别。以 HCCLM3 细胞为例(表 1),当染料浓度介于 3~5 mg/L 之间时,随着浓度增加,活细胞数逐渐减少,提示 Hoechst33342 对细胞产生毒性作用;同时,SP 细胞比例逐渐减少且对照组中维拉帕米仍未完全阻断染料外排,提示染色不完全。当染料浓度为 7~10 mg/L 时,SP 细胞比例明显减少,对照组染料外排被完全阻断,但是

活细胞也明显减少,提示细胞过染。当染料浓度为 6 mg/L 时,活细胞比例较高,对照组染料外排恰好被完全阻断,实验组低染区即为 SP 细胞,为 $(16.9 \pm 1.8)\%$,提示 6 mg/L 是最适染色浓度。

经 3 次重复测量,肝癌细胞 MHCC97H、MHCC97L、Huh7 的最适染料浓度分别为 10、9、7 mg/L,SP 细胞比例分别为 $(8.7 \pm 0.7)\%$ 、 $(4.6 \pm 0.5)\%$ 、 $(1.0 \pm 0.2)\%$,均显著低于 HCCLM3 细胞 ($P < 0.01$),并且 4 种肝癌细胞株中 SP 细胞比例差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 1)。因为 HCCLM3 细胞中 SP 细胞最多,选择 HCCLM3 细胞进行后续试验。

表 1 HCCLM3 细胞中活细胞和 SP 细胞比例($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Tab. 1 The proportion of living and side population (SP) cells in human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HCCLM3($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Hoechst [$\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$]	Living cell(%)		SP cell(%)	
	Study	Control	Study	Control
3	98.1 ± 0.7	96.5 ± 2.2	40.5 ± 6.3	2.5 ± 1.1
4	96.7 ± 2.4	95.7 ± 1.8	33.3 ± 4.2	0.7 ± 0.3
5	94.8 ± 0.8	94.1 ± 1.1	21.5 ± 5.1	0.4 ± 0.2
6	94.0 ± 1.2	92.5 ± 0.9	16.9 ± 1.8	0
7	88.2 ± 3.1	86.3 ± 2.3	5.6 ± 2.5	0
8	83.5 ± 2.7	79.8 ± 3.6	2.8 ± 1.3	0
9	80.7 ± 4.5	75.3 ± 2.8	2.3 ± 0.7	0
10	76.1 ± 3.3	71.6 ± 3.4	0.9 ± 0.2	0

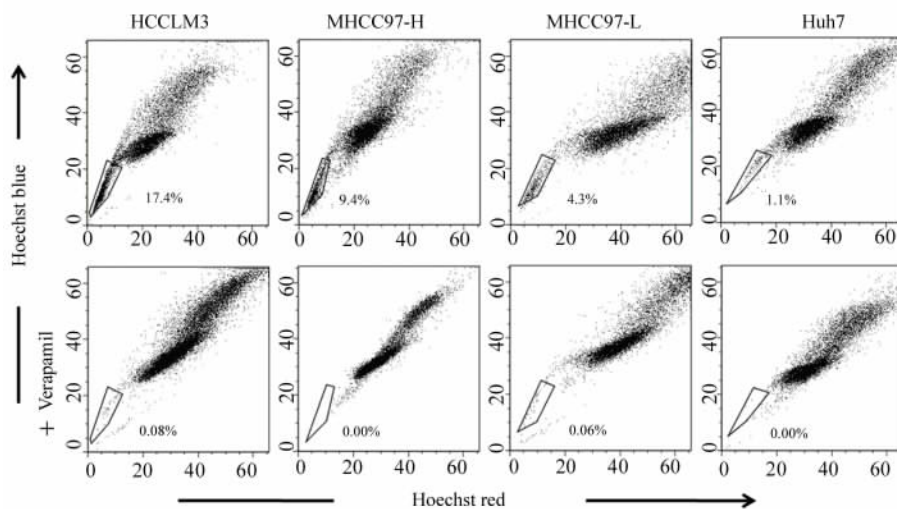


图 1 不同转移潜能肝癌细胞中 SP 细胞比例

Fig. 1 Proportions of SP cells in human HCC cell lines with different metastatic potentials

2.2 HCCLM3 SP 细胞悬浮成球能力高于 MP 细胞

SP 及 MP 细胞连续成球培养 2 周后,与 MP 细胞相比,SP 细胞形成的悬浮球体积大,结构致密(图 2)。SP 细胞的成球率明显高于 MP 细胞,差异有统计学意义[$(25.3 \pm 5.1)\%$ vs $(11.2 \pm 2.6)\%$, $P < 0.05$]。

2.3 HCCLM3 SP 细胞侵袭能力高于 MP 细胞

Transwell 小室侵袭实验结果(图 3)显示,HCCLM3 细胞中的 SP 细胞穿透基底膜细胞数为 (71 ± 7) 个,而 MP 细胞仅为 (22 ± 4) 个,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 HCCLM3 SP 细胞裸鼠皮下成瘤能力高于 MP 细胞

皮下接种后 4 周观察期内, 5×10^3 个 SP 细胞即可形成皮下移植瘤(1/5), 5×10^4 个 SP 细胞在 3 只裸鼠皮下形成移植瘤(3/5), 5×10^5 个 SP 细胞均可成瘤(5/5);而相同条件下 5×10^3 及 5×10^4 个 MP 细胞均未成瘤,只有 5×10^5 个 MP 细胞仅于 2 只裸鼠皮下成瘤(2/5),说明 SP 细胞成瘤能力明显优于 MP 细胞。常规 H-E 染色验证裸鼠皮下肿瘤组织呈移植瘤特点。

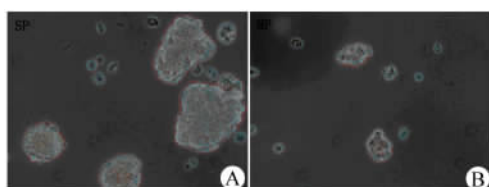


图 2 HCCLM3 细胞中 SP 细胞(A)悬浮成球能力高于 MP(B) ($\times 200$)

Fig.2 Sphere formation was significantly higher in HCCLM3 SP cells(A) as compared with MP cells(B) ($\times 200$)

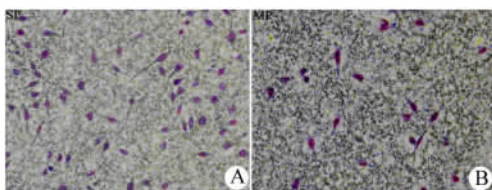


图 3 HCCLM3 细胞中 SP 细胞(A)侵袭能力高于 MP 细胞(B) ($\times 200$)

Fig.3 SP cells(A) in HCCLM3 cells possessed higher invasion ability than that of MP cells(B) ($\times 200$)

2.5 HCCLM3 SP 细胞的干细胞相关基因表达高于 MP 细胞

Real-time PCR 分析各检测基因的表达量

(图 4),SP 细胞中 *ABCG2*、*CD13*、*CD44*、*Nanog*、*Sox2* 及 *Klf4* mRNA 平均表达水平分别是 MP 细胞的 5.64、2.26、2.10、3.78、2.37、2.92 倍,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);另外,SP 细胞中 *CD133*、*CD90*、*EpCAM*、*Sall4* 及 *Oct4* mRNA 表达水平分别是 MP 细胞的 1.79、1.45、1.67、1.83、1.46 倍,差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

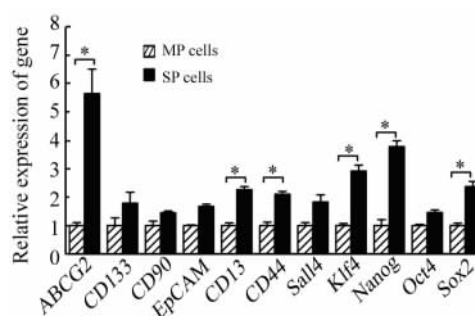


图 4 HCCLM3 细胞分选 SP 及 MP 细胞中干细胞相关基因的表达

Fig.4 Stem cell-related genes expression of SP and MP cells sorted from HCCLM3 cells

3 讨论

自从 Goodell 等^[8]在小鼠骨髓造血干细胞中首次发现 SP 细胞以后,学者们从肝癌等^[6]多种恶性肿瘤组织及相应细胞株中分离出 SP 细胞,并且发现其具备自我更新、无限增殖、多向分化及耐药等干细胞特性,因此,通过 SP 细胞分选方法富集 CSC 被认为是一种简便且有效的途径。SP 细胞因高表达 ABC 转运蛋白能高效外排 DNA 荧光染料 Hoechst33342,表现为细胞核不着色或着色程度很低,主要位于流式双参数图左下角。通过增加 Hoechst33342 浓度并同步设置添加维拉帕米的对照组,根据 SP 细胞及活细胞比例的变化,摸索出最适染料浓度,即维持所有染色细胞较高细胞活性的前提下,对照组 SP 细胞基本消失而实验组尚存在部分真正意义上的 SP 细胞。

本研究选用的四种肝癌细胞转移潜能依次为 HCCLM3 > MHCC97H > MHCC97L > Huh7^[9-10],发现转移潜能越高的肝癌细胞中 SP 细胞越多,提示 SP 细胞含量可能与肝癌细胞的转移潜能有关。分离高转移潜能肝癌细胞 HCCLM3 中的 SP 细胞并对其生物学特性进行鉴定,在体外悬浮球培养以及体内裸鼠成瘤实验中,SP 细胞表现出明显优于 MP 细胞的成球及成瘤能力,提示 SP 细胞具备 CSC 特性,可能

富集了肝癌干细胞^[6]。研究^[11-13]发现, CSC 归巢可能是肿瘤复发转移的根源, 本研究结果显示, SP 细胞穿透基底膜的细胞数明显多于 MP 细胞, 进一步说明 SP 细胞中存在的肝癌干细胞亚群可能参与肿瘤侵袭和转移。

ABCG2 是 ABC 转运蛋白家族中的主要成员之一, 被认为是大多数 SP 细胞表型的决定因素, 目前, ABCG2 已作为肿瘤干细胞标志物用于肝癌干细胞的分离与鉴定^[14]。另外, CD13^[15] 及 CD44^[16] 亦是目前常用的肝癌干细胞标记物。本研究中 SP 细胞较 MP 细胞高表达 ABCG2、CD13 及 CD44, 提示 SP 细胞中富集了肝癌干细胞, 同时也说明 SP 细胞具有异质性, 不同的表型及相应的功能特征可作为深入研究肝癌干细胞的重要方向。

KLF4、Sox2 及 Nanog 作为常见的转录因子在维持胚胎干细胞的多向分化及自我更新能力中发挥重要作用^[17-18], 其在肿瘤干细胞领域的研究也备受关注^[19-20]。本研究发现, HCCLM3 细胞株中 SP 细胞均高表达上述三种转录因子, 提示 SP 细胞可能亦具备胚胎干细胞的多向分化及自我更新潜能, 同时也说明上述转录因子可能在维持 SP 细胞的干细胞特性中发挥了重要作用。

总之, 在不同转移潜能的肝癌细胞株中检测到不同比例的 SP 细胞, 提示 SP 细胞可能与肝癌转移潜能有关; 另外, HCCLM3 中 SP 细胞具备 CSC 生物学特性并且高表达干细胞相关基因, 提示 SP 细胞可能富集了肝癌干细胞。

[参 考 文 献]

[1] Guo Z, Zhong J, Jiang J, et al. Comparison of survival of patients with BCLC stage A hepatocellular carcinoma after hepatic resection or transarterial chemoembolization: A propensity score-based analysis [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(9): 3069-3076.

[2] 郭哲, 向邦德, 张俊, 等. 符合米兰标准肝癌患者肝切除与肝动脉化疗栓塞疗效比较 [J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(20): 1526-1529.

[3] Lee SC. Prognostic biomarkers for prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma: Current status and future prospects [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(12): 3112-3124.

[4] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111.

[5] Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: The SP phenotype [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 3-12.

[6] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like proper-

ties [J]. *Hepatology*, 2006, 44(1): 240-251.

[7] 钟艳平, 孟泳圳, 苏节, 等. 干细胞标志物在卵巢癌 SKOV3 细胞侧群细胞中的表达 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(5): 521-525.

[8] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(4): 1797-1806.

[9] Shi GM, Xu Y, Fan J, et al. Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(11): 1155-1163.

[10] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2): 153-166.

[11] Kucia M, Reza R, Miekus K, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: Pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(7): 879-894.

[12] Guo Z, Li L, Jiang J, et al. Cancer stem cell markers correlate with early recurrence and survival in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(8): 2098-2106.

[13] 黄涛, 马超, 丁月超, 等. 肝癌 SMMC-7721 细胞中侧群细胞侵袭性与上皮-间充质转化的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(1): 84-86.

[14] Zhang G, Wang Z, Luo W, et al. Expression of potential cancer stem cell marker ABCG2 is associated with malignant behaviors of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2013, 2013: 1-12.

[15] Kim HM, Haraguchi N, Ishii H, et al. Increased CD13 expression reduces reactive oxygen species, promoting survival of liver cancer stem cells via an epithelial-mesenchymal transition-like phenomenon [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(3): 539-548.

[16] Hou Y, Zou Q, Ge R, et al. The critical role of CD133(+)CD44(+ /high) tumor cells in hematogenous metastasis of liver cancers [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 259-272.

[17] Wang Z, Oron E, Nelson B, et al. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4): 440-454.

[18] Kim MO, Kim S, Cho Y, et al. ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(3): 283-290.

[19] 贾勇圣, 张文健, 刘虹麟, 等. KLF4 对肿瘤干细胞自我更新和增殖潜能的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(4): 368-372.

[20] 周嘉嘉, 陈汝福, 邓小耿, 等. NANOG 基因在侧群表型干细胞样肝癌细胞中的表达及意义 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2014, 35(1): 12-17.

[收稿日期] 2014 - 11 - 19

[修回日期] 2015 - 02 - 25

[本文编辑] 黄静怡