

磁珠细胞分选 CD133⁺/CD44⁺ 前列腺癌干细胞的初步鉴定

盛夏,王德林,李文宾,罗 照

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘要】目的:通过磁珠细胞分选(magnetic bead cell sorting, MACS)方法从人前列腺癌细胞系 PC-3 中分选 CD133⁺/CD44⁺干细胞,为进一步功能性研究奠定基础。**方法:**运用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测 MACS 分选前后 PC-3 细胞膜上 CD133 和 CD44 表达情况;观察无血清培养成球情况,免疫荧光(immunofluorescence, IF)表达情况;比较细胞在分选前后的形态学、增殖能力方面的差异;免疫组化(immunohistochemistry, IHC)和 Western blot 检测诱导分化前后前列腺酸性磷酸酶(prostatic acid phosphatase, PAP)蛋白情况。**结果:**FCM 检测 PC-3 细胞 CD133 和 CD44 的阳性表达分别是(1.33 ± 0.05)%和(0.87 ± 0.06)%,而 MACS 分选后PAP分别为(84.82 ± 0.07)%和(99.91 ± 0.03)%;IF 检测 CD133⁺/CD44⁺细胞培养后继续呈阳性表达;CD133⁺/CD44⁺细胞增殖能力高于 PC-3 细胞($t=11.0, P=0.008$)以及高于诱导后的CD133⁺/CD44⁺细胞($t=40.1, P=0.001$);CD133⁺/CD44⁺细胞经过转化生长因子- β 诱导后 IHC 和 Western blot 检测 PAP 表达呈阳性,而未诱导的 CD133⁺/CD44⁺细胞表达呈阴性。**结论:**MACS 从 PC-3 细胞株中分选的 CD133⁺/CD44⁺细胞经过初步功能性鉴定具有干细胞的某些特性,可为前列腺癌干细胞的进一步探索充当铺垫。

【关键词】前列腺癌;肿瘤干细胞;磁珠细胞分选;PC-3;CD133;CD44

【中国图书分类法分类号】R697.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-08-30

Initial identification of CD133⁺/CD44⁺ prostate cancer stem cell through magnetic bead cell sorting

SHENG Xia, WANG Delin, LI Wenbin, LUO Zhao

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To sort the CD133⁺/CD44⁺ stem cell through magnetic bead cell sorting(MACS) from human prostate cancer cell line PC-3 and to lay the foundation for the further functional research. **Methods:** Expressions of CD133 and CD44 on the membrane of PC-3 cell before and after MACS were detected through flow cytometry(FCM). Formation of spheres cultured by serum-free medium(SFM) was observed and subsequent immunofluorescence(IF) assay was made. Differences in the morphology and proliferation capacity of PC-3 cell before and after MACS were distinguished. Expressions of prostatic acid phosphatase(PAP) before and after the differentiation assay were detected by immunohistochemistry(IHC) and Western blot. **Results:** Positive expressions of CD133 and CD44 of PC-3 cell were (1.33 ± 0.05)% and (0.87 ± 0.06)% through FCM, while those after MACS were (84.82 ± 0.07)% and (99.91 ± 0.03)% respectively. Positive expressions of CD133 and CD44 remained after SFM detected by IF. Proliferation capacity was higher in CD133⁺/CD44⁺ cell than in PC-3 cell($t=11, P=0.008$) and CD133⁺/CD44⁺ cell after inducement($t=40.1, P=0.001$). Expressions of PAP of CD133⁺/CD44⁺ cell were positive after being induced by transforming growth factor- β and were negative in the uninduced CD133⁺/CD44⁺ cell based on IHC and Western blot. **Conclusions:** CD133⁺/CD44⁺ cell had some characteristics of stem cell after MACS from PC-3 cell line through initial functional identification, which could be matting for further explore of the prostate cancer stem cell.

【Key words】prostate cancer; tumor stem cell; magnetic bead cell sorting; PC-3; CD133; CD44

干细胞根据其来源不同,可以分为胚胎干细胞和成体干细胞。肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)

主要是指在成体干细胞中具有自我更新能力、多向分化潜能、高增殖能力及潜在致癌性的那一小部分细胞,维持肿瘤的持续生长。1997年, Bonnet 和 Dick^[1]首次从急性骨髓性白血病(acute myelocytic leukemia, AML)中分选出干细胞,宣告进入了干细胞时代。这种基于表面标记物的方式越来越多的被

作者介绍:盛夏, Email: 361035758@qq.com,

研究方向:泌尿系肿瘤基础和临床研究。

通信作者:王德林, Email: dlwangws@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30972999)。

用于分离出各种 CSC, 如乳腺癌^[2]、肝癌^[3]、结肠癌^[4]等。Collins 等^[5]运用流式方法分选前列腺癌干细胞, 发现约有 0.1% 左右的前列腺细胞含有 CD44⁺/α₂β₁^{hi}/CD133⁺表型, 并且与前列腺癌等级无关, 这让前列腺癌干细胞也进入了人们的视线。本文拟采用免疫磁珠双阳性抗体分选前列腺癌干细胞, 通过研究分选前后其形态学和功能学上的特征差异, 判断磁珠细胞分选(magnetic bead cell sorting, MACS)方法分选干细胞的可靠性和有效性, 并且为进一步探索干细胞的生物学研究奠定基础, 为干细胞靶向治疗研究提供来源。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

人前列腺癌 PC-3 细胞株购自上海细胞库(源自一个白人的前列腺癌骨转移灶); DMEM/F12(美国 Invitrogen 公司); 胎牛血清(Gibco 公司); 0.25% 胰蛋白酶、PBS、缓冲液、免疫组化试剂盒、Western blot 试剂盒(北京鼎国); 噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、β-巯基乙醇(北京康为世纪); 人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、人碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、人白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor, LIF)(美国 PeproTech 公司产品); CD133/CD44 磁珠分选试剂盒和分选架(德国美天旌公司); 人前列腺酸性磷酸酶(prostatic acid phosphatase, PAP)单克隆抗体(Abcam 公司); PE 标记 CD133 流式抗体和 CD44 流式抗体(美国 PeproTech 公司); 兔抗人 CD133 单克隆抗体、大鼠抗人 CD44 单克隆抗体(Santa 公司); TRITC 标记的羊抗兔荧光二抗、FITC 标记的羊抗大鼠荧光二抗(北京康为世纪); 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司); 全自动荧光酶标仪(奥地利 TECAN 公司); IX71 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 凝胶成像仪(美国 Bio-RAD 公司)。

1.2 细胞培养

将复苏的 PC-3 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, PBS 清洗 2 次, 0.25% 胰酶在 37 °C 消化 1~2 min, 传代, 37 °C、5% CO₂ 环境中培养。

1.3 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测 CD133 和 CD44

收集对数期细胞, 计数, 以 5×10^5 个/ml 细胞浓度加入 CD133 抗体、CD44 抗体各 20 μl, 4 °C 孵育 30 min, 800 r/min 离心 5 min, 加入 300 μl PBS 吹打均匀后上机检测。

1.4 双阳性抗体免疫磁珠分选

收集对数期细胞, 确定细胞数, 300 × g 离心 10 min, 重悬于 300 μl 缓冲液中, 加入 FeR 100 μl, 然后添加 CD133 微粒 100 μl, 4 °C 避光孵育 30 min, 300 × g 离心 10 min, 重悬于 500 μl 缓冲液。安置磁架和分离器, 冲洗 3 遍, 将细胞于分离柱中缓慢下流, 冲洗 3 遍, 收集 CD133⁺细胞, 移开分离柱, 快速用缓冲液冲洗得到 CD133⁺细胞。将部分 CD133⁺细胞用含 10% 胎牛血清 + 5×10^{-5} mol/L β-巯基乙醇的 DMEM/F12 培养

16~20 h^[6]。用上述方法继续分选得到 CD133⁺/CD44⁺细胞。

1.5 无血清培养基(serum-free culture, SFM)培养类干细胞球

分别选取 PC-3 细胞和 CD133⁺/CD44⁺细胞各 4×10^5 个, 用添加了 20 μg/L EGF + 20 μg/L bFGF + 20 μg/L LIF 的 DMEM/F12 培养基培养, 每天观察。3~4 d 换液, 将干细胞球悬液倒入离心管中, 静置 1~2 h, 弃上半部分培养基, 添加新培养基继续培养。

1.6 免疫荧光检测

取 SFM 培养 4 d 后 CD133⁺/CD44⁺细胞, 重新悬浮后滴到载玻片上风干, 室温下 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗 3 次, 山羊血清封闭 30 min, 加抗兔 CD133 和抗大鼠 CD44 荧光抗体(1:200 稀释), 4 °C 过夜, 加 2 种二抗(1:50 稀释), 37 °C 孵育 40 min, DAPI 染色 5 min, 甘油封片后荧光显微镜下观察。

1.7 诱导分化后检测 PAP

1.7.1 免疫组化检测 PAP 取 CD133⁺/CD44⁺细胞分 2 组分别接种于底部有载玻片的 6 孔板中, 一组以 DMEM/F12 + 1% 胎牛血清 + 转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)(5 ng/ml)培养, 另一组则以 DMEM/F12 + 1% 胎牛血清培养, 4 d 后取出细胞爬片, 采用免疫组化[链霉素抗生素-过氧化物酶(SP)两步法]检测干细胞分化标记物 PAP 表达, PAP 按照 1:200 稀释。

1.7.2 Western blot 检测 PAP 分别提取诱导前后的 CD133⁺/CD44⁺细胞总蛋白, BCA 法蛋白定量, 10% SDS-聚丙烯酰胺电泳分离, 转移到 PVDF 膜上, 奶粉封闭膜 1 h, 加一抗(1:200 稀释)4 °C 过夜, TBST 清洗 3×10 min, 加二抗(1:5 000 稀释)37 °C 孵育 1 h, 于凝胶成像仪中 ECL 显影, 计算出内参与目的光密度比值。结果以相对光密度值(relative optical density, ROD) × 面积(mm²)表示。蛋白相对含量以(目的条带结果)/(β-actin 条带结果)表示。

1.8 细胞增殖能力检测(MTT)和倍增时间

取 CD133⁺/CD44⁺细胞、PC-3 细胞、诱导后的 CD133⁺/CD44⁺细胞作为第 1、2、3 组以 2×10^3 个/孔(200 μl)细胞接种于 96 孔板, 每组 21 孔, 空白培养基调零, 置于孵箱内培养 7 d, 每天组内随机取 3 孔添加 MTT 20 μl/孔, 继续培养 4 h, 加 DMSO 200 μl/孔震荡后使用酶标仪检测吸光度(absorbance, A)值, 取平均值, 描绘生长曲线, 据 Patterson 公式 $T_d = T \times \lg 2 / \lg(N_t / N_0)$ 计算倍增时间。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行处理。FCM 和 Western blot 数据为计量资料, 用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。CD133⁺/CD44⁺诱导前后组采用配对样本 *t* 检验, CD133⁺/CD44⁺组和 PC-3 组数据采用两独立样本均数 *t* 检验。检验水准 α=0.05(双侧), 以 *P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MACS 分选 CD133⁺/CD44⁺细胞前后 FCM 检测情况

FCM 检测结果如图 1 和表 1 所示, 说明 PC-3 细胞株中 CD133⁺和 CD44⁺细胞占很少的比例; 经过 MACS 分选后可获

得高纯度的 CD133⁺/CD44⁺细胞;通过细胞计数可得到CD133⁺/CD44⁺细胞数的比例为(0.57 ± 0.07)% (表 2)。

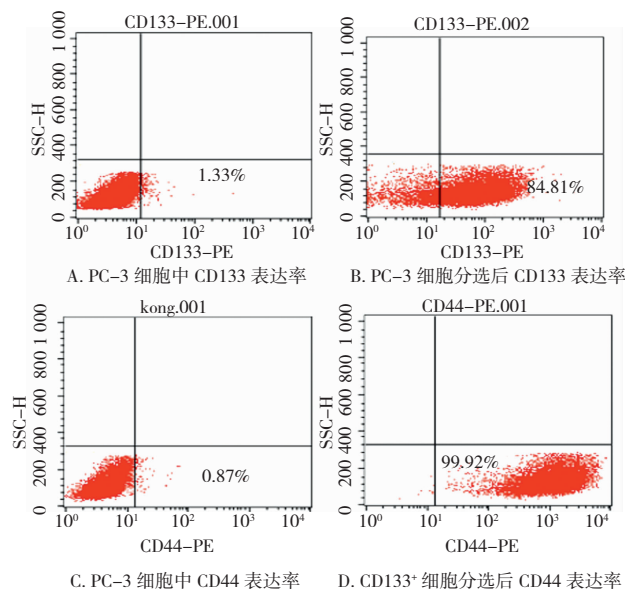


图 1 PC-3 细胞分选前后 CD133 表达率和 CD44 表达率

Fig.1 Expression rates of CD133 and CD44 before and after MACS in PC-3 cells

表 1 FCM 检测 MACS 分选 CD133⁺/CD44⁺ 细胞情况 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Percentage of CD133 ⁺ and CD44 ⁺ after MACS by FCM ($\bar{x} \pm s, \%$)			
组别	分选次数 (n)	CD133 ⁺ 细胞 /PC-3 细胞	CD44 ⁺ 细胞 /PC-3 细胞
MACS分选前	7	1.33 ± 0.05	0.87 ± 0.06
MACS分选后	7	84.82 ± 0.07	99.91 ± 0.03

2.2 SFM 培养类干细胞球

在通过连续 1 周的 SFM 培养类干细胞球后,可见 CD133⁺/CD44⁺细胞球较为紧密,数量多,球大,周围未见明显的细胞碎片或者死细胞(图 2A);可见 PC-3 细胞球结合疏松、量少、体积较小,并且周围有大量的细胞碎片及散在的死细胞(图 2B),说明 PC-3 细胞在 SFM 加生长因子的条件下具有类干细胞球的形成能力,而 CD133⁺/CD44⁺细胞成球效果更好。

2.3 双重免疫荧光检测 CD133 和 CD44

在 SFM 中培养 4 d 后对 CD133⁺/CD44⁺细胞进行双重免疫荧光检测,可见 CD133 抗体细胞均发红色荧光(图 3A),CD44 抗体细胞均发绿色荧光(图 3B),说明 SFM 培养后的 CD133⁺/CD44⁺细胞依旧明显表达 CD133 和 CD44。图 3C 可见细胞核染色相,通过分别将 2 种荧光与核染色相融合后可见荧光均表达在细胞膜上(图 3D、E)。

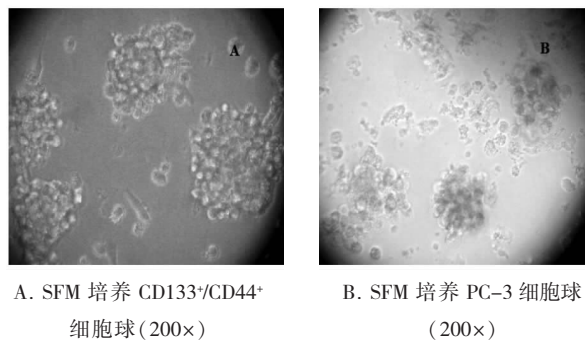


图 2 SFM 培养类干细胞球

Fig.2 Stem cell spheres cultured by SFM

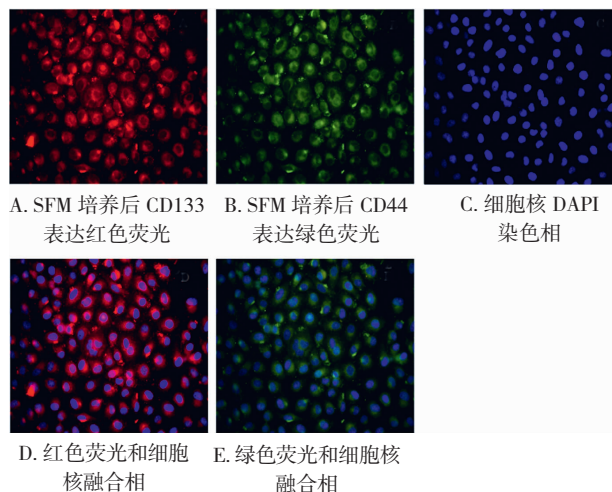


图 3 免疫荧光检测 CD133 和 CD44 情况 (400 ×)

Fig.3 Expressions of CD133 and CD44 detected by immunofluorescence (400 ×)

2.4 CD133⁺/CD44⁺细胞诱导分化后 PAP 表达

CD133⁺/CD44⁺细胞经过 TGF-β 诱导前后运用免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 检测,可见干细胞分化标记物 PAP 在诱导后阳性表达,细胞质呈黄色,胞核呈蓝色,细胞形态不一,可见多个分化成熟的细胞;未经过诱导细胞 PAP 阴性表达,胞核蓝色,细胞呈圆形,形态较小、规则(图 4)。Western blot 检测结果和细胞 IHC 检测结果表达相符,在 CD133⁺/CD44⁺细胞诱导分化前 PAP 呈阴性表达,而 CD133⁺/CD44⁺细胞在 TGF-β 诱导后呈阳性表达, PAP/β-actin 为 0.284 ± 0.014 3(图 5)。

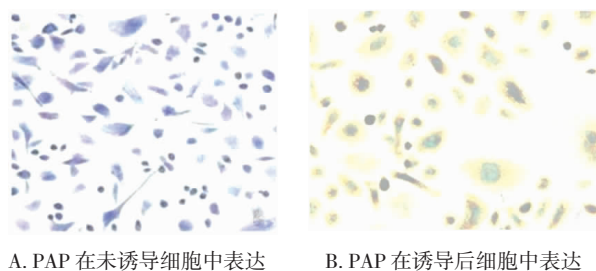
2.5 细胞增殖情况和倍增时间

CD133⁺/CD44⁺细胞在培养初 2~3 h 内呈悬浮状态,呈圆形,体积较小,2 d 后出现少量贴壁;PC-3 细胞呈圆形或梭形,1 d 后少量贴壁;诱导后 CD133⁺/CD44⁺细胞主要是梭形,几乎

表 2 PC-3 细胞中 CD133⁺/CD44⁺ 细胞数

Tab.2 Numbers of CD133 ⁺ /CD44 ⁺ in PC-3 cells							
分选次数	1	2	3	4	5	6	7
PC-3细胞数 (× 10 ⁷ 个)	3.5	4.0	2.1	4.4	4.1	7.0	6.0
CD133 ⁺ /CD44 ⁺ 细胞数 (× 10 ⁵ 个)	2.0	2.3	1.1	1.8	1.8	4.0	3.6
CD133 ⁺ /CD44 ⁺ 细胞阳性百分率 (%)	0.57	0.58	0.52	0.41	0.45	0.57	0.60

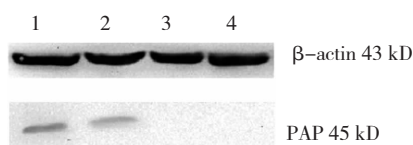
很少贴壁,生长缓慢。96 孔板中细胞增殖情况:组 1、组 2 和组 3 的 A 值分别为 (0.603 ± 0.009) 、 (0.508 ± 0.006) 和 (0.371 ± 0.003) 。组 1 和组 3 采用配对 t 检验,组 1 细胞增殖能力明显强于组 3 细胞,7 d 时 A 值差异具有统计学意义($t=40.1, P=0.001$);组 1 和组 2 间采用两样本均数 t 检验,组 1 细胞和组 2 细胞在到第 7 天时 A 值差异有统计学意义($t=11, P=0.008$) (图 6)。6 孔板中细胞情况:组 1、组 2、组 3 到第 7 天时细胞数分别是 3×10^5 、 4×10^4 、 3.8×10^3 个,倍增时间分别是 23.16、38.74、180.81 h,组 1 和组 2 的细胞数在第 7 天时发生了倍增,细胞数明显增多,而组 3 则在第 7 天内未发生倍增。



A. PAP 在未诱导细胞中表达 B. PAP 在诱导后细胞中表达

图 4 IHC 检测 PAP (400 ×)

Fig.4 PAP detected by IHC (400 ×)

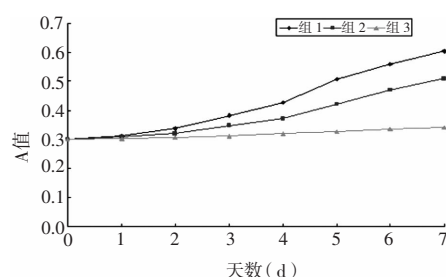


1 和 2:诱导分化后 PAP 表达情况;3 和 4:诱导分化前 PAP 表达情况

图 5 Western blot 检测 PAP 在分化前后细胞中的表达

Fig.5 Expressions of PAP in induced and uninduced cell

detected by Western blot



组 1. CD133⁺/CD44⁺ 细胞;组 2. PC-3 细胞;
组 3. 诱导后 CD133⁺/CD44⁺ 细胞

图 6 细胞增殖曲线图

Fig.6 Curve of cell proliferation

3 讨论

目前治疗前列腺癌的方法能够消除大部分肿瘤细胞,但是一些晚期的癌症如雄激素非依赖性癌依旧没有很好的办法。近年来,干细胞学说逐渐走进人们的视线,干细胞是指那一部分具有多向分化

能力、增殖能力、自我更新、致癌性、永久性的细胞,具有一些特定的表面标记物,通过这些标记物在多种肿瘤细胞中分选出干细胞^[7]。根据干细胞假说,传统治疗方案不能防止肿瘤复发,因为只有分化了的肿瘤细胞才有可能被消除^[8]。干细胞有可能就是肿瘤的“种子”,介导肿瘤的复发、转移及无限增殖。因此,针对干细胞才是有效的治疗。

CD133 和 CD44 被认为是前列腺癌干细胞的表面标记物。Patrawala 等^[9]发现前列腺癌 CD44⁺细胞具有类干细胞特性如致癌性、潜在转移性、克隆形成能力。Vander Griend 等^[10]证实前列腺中 CD133⁺细胞群在培养过程中依旧表现出干细胞的某些特性如自我更新能力和多向分化能力。MACS 是近年来广泛运用锚定干细胞特异性标记物而分选细胞的技术,其方法技术已经日趋成熟,近来已成功分选出睾丸癌^[11]、胃癌^[12]、卵巢癌^[13]、结肠癌^[14]等。因此,本实验拟采用 MACS 从 PC-3 细胞中分离出高纯度的 CD133⁺/CD44⁺细胞,进而比较分选前后前列腺癌细胞功能性差异,为干细胞进一步研究和治疗提供前景。

本研究成功用 MACS 从 PC-3 细胞中分选出前列腺癌干细胞,通过 FCM、免疫荧光、MTT、TGF- β 诱导、IHC 和 Western blot 等一系列功能性鉴定后,初步证实 CD133⁺/CD44⁺细胞具备干细胞的部分特性如无限增殖潜能、多向分化潜能和永久性。

在研究中发现,PC-3 细胞中 CD133⁺/CD44⁺细胞计数比例基本保持在 0.53%左右,而这符合干细胞比例,FCM 结果也足以说明本实验获得了高纯度的 CD133⁺/CD44⁺细胞。但是,仅仅具有此表型的细胞是否就是需要的前列腺癌干细胞呢? 本实验通过 SFM CD133⁺/CD44⁺细胞和 PC-3 细胞及随后的免疫荧光检测发现,CD133⁺/CD44⁺细胞不仅具备高成球能力,而且还能连续性的传代培养后依旧保持有干细胞表型。随后,本实验发现部分研究人员用 TGF- β 和低血清能诱导 CSC 分化,从而抑制其致瘤力^[15],Quintero 等^[16]研究发现 PAP 在干细胞分化中起重要作用,在前列腺癌中低表达,在前列腺癌干细胞中不表达。实验中采用 TGF- β 诱导分化 CD133⁺/CD44⁺细胞后的结果可知 TGF- β 能诱导 CD133⁺/CD44⁺细胞分化,在诱导前后细胞的形态学存在着明显的差异,并且前列腺癌分化标记物 PAP 同样存在着明显的差异,这表示诱导后细胞已经部分或者全部成为了其他成熟亚型的细胞,因此 CD133⁺/CD44⁺细胞具有多向分化潜能。在接下来的增殖实

验中发现 CD133⁺/CD44⁺细胞具有较强的增殖能力,而处于某一分化成熟点的细胞则增殖能力明显减弱。但是 PC-3 细胞作为一个稳定的细胞株,具有较强的增殖能力,推测这由于其大部分细胞处于分化成熟状态,而仅仅存在少量的未分化成熟的细胞,故其增殖能力会低于干细胞,这也进一步说明了干细胞极有可能是癌症的种子,主导肿瘤的无限扩增。因此有理由推断通过 MACS 从 PC-3 细胞分选的 CD133⁺/CD44⁺细胞是前列腺癌干细胞,理由如下:①通过 MACS 分选的 CD133⁺/CD44⁺细胞比例约为 0.53%,代表了那一小群细胞;②CD133⁺/CD44⁺细胞具有较强的成球能力;③CD133⁺/CD44⁺细胞能进行持续性的培养并且能保持干细胞表型;④CD133⁺/CD44⁺细胞具有多向分化潜能;⑤CD133⁺/CD44⁺细胞具有较强的增殖潜能。

本实验成功运用 MACS 从 PC-3 细胞中分选出 CD133⁺/CD44⁺细胞,这种方法可以获得足量的前列腺癌干细胞,可以为前列腺癌干细胞的进一步研究提供源源不断的细胞资源。通过本实验的研究证实 CD133 和 CD44 是前列腺癌干细胞的特异性标记物,那么是否可以针对其基因进行靶向干预,从而达到减少或者消除前列腺癌干细胞的目的呢?前列腺癌干细胞在增殖、自我更新性、致瘤性、多向分化潜能方面拥有很大的优势,本实验为此寻找了一些可靠的证据,并且为后续的生物学方面研究方面奠定了基础。前列腺癌干细胞在肿瘤的形成、发展、复发、转移、耐药等方面起着重要的作用,如何对其有效针对性根疗,溯其根源,也就是如何彻底消除处于静止期的 CSC。总之,目前前列腺癌干细胞的研究处于初级阶段,如果能详尽阐明前列腺癌干细胞的具体作用机制,那么人类治疗肿瘤的路又将向前迈出一大步,对于肿瘤患者而言也会是莫大的福音。

参 考 文 献

- [1] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. Nat Med, 1997, 3(7): 730-737.
- [2] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, 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] 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.
- [4] O'Brien C A, 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.
- [5] Collins A T, Berry P A, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 10946-10951.
- [6] 肖 娟, 武永吉, 张之南, 等. 磁珠双阳性分选法在阵发性睡眠性血红蛋白尿症患者骨髓 CD34⁺CD59⁺细胞体外扩增的应用[J]. 中国实验血液学杂志, 2003, 11(2): 179-183.
- Xiao J, Wu Y J, Zhang Z N, et al. Application of magnetic beads double positive sorting method in the patients CD34⁺CD59⁺ bone marrow cells of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in vitro amplification[J]. Chinese Journal of Experimental Hematology, 2003, 11(2): 179-183.
- [7] 李 曾, 王德林, 蓝建华, 等. 人前列腺癌细胞株 PC-3 中类肿瘤干细胞的培养分离和初步鉴定[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(11): 1348-1352.
- Li Z, Wang D L, Lan J H, Yang Z K. Initial identify and cultured isolation of tumor stem cell in human prostate cancer cell PC-3 line[J]. Med J Chin PLA, 2009, 34(11): 1348-1352.
- [8] Fan X, Liu S, Su F, et al. Effective enrichment of prostate cancer stem cells from spheres in a suspension culture system[J]. Urol Oncol, 2012, 30(3): 314-318.
- [9] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Highly purified CD44 prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells[J]. Oncogene, 2006, 25(12): 1696-1708.
- [10] Vander Griend D J, Karthaus W L, Dalrymple S, et al. The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(23): 9703-9711.
- [11] Geens M, Van de Velde H, De Block G, et al. The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients[J]. Hum Reprod, 2007, 22(3): 733-742.
- [12] Lu R Q, Wu J G, Zhou G C, et al. Sorting of CD133(+) subset cells in human gastric cancer and the identification of their tumor initiating cell-like properties[J]. Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery, 2012, 15(2): 174-179.
- [13] Lin S, Long H X, Xiang T, et al. Isolation and identification of cancer stem cells from primary human ovarian cancer tissues[J]. Chinese Journal of Oncology, 2011, 33(12): 896-899.
- [14] Qing Q, Wang Y Y, Zhang S H, et al. Changes in the biological behaviors of colon cancer cells under simulated hypoxia in vitro[J]. Journal of Southern Medical University, 2011, 31(1): 133-137.
- [15] Tang B, Yoo N, Vu M, et al. TGF- β can suppress tumorigenesis through effects on the putative cancer stem or early progenitor cell and committed progeny in a breast cancer xenograft model[J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8643-8652.
- [16] Quintero I B, Araujo C L, Pulkka A E, et al. Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target[J]. Cancer Res, 2007, 67(14): 6549-6554.

(责任编辑:冉明会)