论著

文章编号:1000-5404(2010)20-2172-05

乳腺癌新辅助化疗后的癌干细胞分离培养

董华英,吴诚义,陈元文 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌外科)

【摘要】 **目的** 从不同周期新辅助化疗后的乳腺癌组织中分离培养乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSCs),观察其体外增殖和分化特性,研究新辅助化疗对BCSCs分离培养的影响。**方法** 在添加生长因子的无血清培养基(serum free media, SFM)中悬浮培养细胞获得富含BCSCs的微球体(mammospheres, MSs),通过克隆形成实验研究微球体细胞(mammospheres-derived cells, MSDCs)的自我更新能力;在添加5%胎牛血清的培养基中培养MSDCs诱导其分化,研究其分化能力;免疫细胞化学检测ESA和Nestin在MSDCs中的表达;流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测MSDCs中的ALDH1$^+$细胞含量。**结果** 化疗1个周期的5例乳腺癌标本经培养均无MSs形成,化疗2个周期的6例标本经培养其中3例有MSs形成,化疗3个周期以上的9例标本中的5例可以直接分离出MSs,其余4例仅得到少量坏死的细胞和组织碎片;MSDCs在含血清的培养基中贴壁分化;MSDCs均含有ALDH1$^+$细胞。**结论** 从新辅助化疗后的乳腺癌组织中分离BCSCs宜选取化疗2个周期后的标本;新辅助化疗可以富集BCSCs;ALDH1$^+$表型的BCSCs比CD44$^+$CD24$^-$表型的BCSCs在乳腺癌中分布更加广泛。

【关键词】 乳腺肿瘤;化疗;肿瘤干细胞;细胞分离;细胞培养
【中图法分类号】 R73-351;R730.53;R737.9 【文献标志码】 A

Isolation and culture of breast cancer stem cells derived from breast cancer after neoadjuvant chemotherapy

Dong Huaying, Wu Chengyi, Chen Yuanwen (Department of Endocrine Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To isolate and culture breast cancer stem cells (BCSCs) from breast cancer tissues after different cycles of neoadjuvant chemotherapy, and investigate their proliferation and differentiation biological characteristics *in vitro* in order to obtain the impact of neoadjuvant chemotherapy on the isolation and culture of BCSCs. **Methods** Breast tissue samples from 20 patients receiving TAC neoadjuvant chemotherapy in our department from October 2009 to April 2010 were collected. There were 5 cases with 1 cycle of chemotherapy, 6 cases with 2 cycles, 7 cases with 3 cycles, and 2 cases with 4 cycles. The tissue samples (1 cm × 1 cm × 1 cm) were obtained through operation and cut into pieces for culture. The suspended cells were cultured in serum-free media (SFM) supplemented with growth factors. Cells grown in these conditions as nonadherent spherical clusters of cells (usually named "mammospheres", MSs) were enriched in BCSCs. The self-renewal capacity of mammospheres-derived cells (MSDCs) was evaluated by colony formation assay. Conversely, the differentiation of MSDCs was induced by culturing them in media supplemented with 5% fetal bovine serum without growth factors. Expressions of epithelial (ESA) and Nestin in MSDCs was detected by immunocytochemistry. ALDH1$^+$ cells of CMSDCs were detected by flow cytometry (FCM). **Results** The 5 specimens with 1 cycle of chemotherapy cultured in SFM had no MS formation, but the 3 of 6 specimens with 2 cycles formed MSs in the media described above. Interestingly, MSs were directly isolated from the 5 of 9 specimens with more than 3 cycles of chemotherapy, but the remaining 4 cases obtained only a small amount of necrotic cells and tissue fragments. MSDCs adhered and differentiated in media under differentiating conditions, and which contains ALDH1$^+$ cells. **Conclusion** Isolation of BCSCs from breast cancer tissues after adjuvant chemotherapy should select samples after 2 cycles of chemotherapy. BCSCs are enriched by new adjuvant chemother-

【基金项目】 重庆市卫生局医学科研项目(06-2-028)
【通信作者】 吴诚义,电话:(023)89011192, E-mail:chengyiw@126.com

apy. ALDH1$^+$ BCSCs distribute more widely in breast cancer tissues than those of the CD44$^+$CD24$^-$ ones.

[Key words] breast neoplasms; chemotherapy; tumor stem cells; cell isolation; cell culture

Supported by the Program of Medical Science of Chongqing Municipal Health Bureau (06-2-028). Corresponding author: Wu Chengyi, E-mail: chengyiw@126.com

乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSCs)是乳腺癌细胞中的异质性亚群,具有干细胞自我更新和多向分化的特性,并且有很强的成瘤能力。BCSCs能够逃避常规治疗而得以存活,是乳腺癌复发和转移的根源[1-3]。研究证实新辅助化疗后的乳腺癌组织中含有更高比例的BCSCs,悬浮联合化疗药物培养乳腺癌细胞,可以提高BCSCs的分选效率[4,5],但是不同周期的新辅助化疗对BCSCs分离培养的影响尚少见报道。本研究从接受不同周期新辅助化疗的乳腺癌患者的乳腺癌组织中分离BCSCs,应用SFM悬浮培养法获取微球体(mammospheres, MSs),进行体外培养和传代,探讨新辅助化疗对BCSCs分离培养的影响。

1 资料与方法

1.1 病例选择与标本

选择2009年10月至2010年4月重庆医科大学附属第一医院内分泌外科确诊为乳腺癌的患者20例,均为女性。所有患者术前使用TAC方案化疗(多西他赛75 mg/m^2,表柔比星40 mg/m^2,环磷酰胺500 mg/m^2),其中1个周期化疗5例,2个周期化疗6例,3个周期化疗7例,4个周期化疗2例。为了保证获取足够多的细胞,选择的病例化疗后包块均大于1 cm×1 cm×1 cm。所有标本为术中获取,于30 min内送至实验室立即进行细胞培养。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM-F12、胎牛血清(HyClone)、B27添加剂(Gibco)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)(PeproTech)、上皮特异性抗原ESA、巢蛋白(Nestin)(北京中杉金桥生物技术有限公司)、红细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司)、ALDEFLUOR®试剂盒(StemCell Technologies)、激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5)、BD FACSAria流式细胞分选仪(Becton Dickinson)。本实验在眼科学重庆市重点实验室完成。

1.3 MSs的培养及传代

将乳腺癌标本放在培养皿内的细胞筛上,剪成小于1 mm×1 mm×1 mm的小块,呈糊状,反复用D-Hanks液冲洗,使细胞充分滤过筛网,250×g离心5 min,收集细胞,分离中避免使用胰酶或胶原酶消化。细胞内加入红细胞裂解液,吹打混匀,1 min后D-Hanks液漂洗,离心沉淀后用培养基重悬,接种于含有生长因子的DMEM-F12培养基(1∶50 B27,20 ng/ml EGF,20 ng/ml bFGF)中,于37 ℃,5% CO_2恒温培养箱中孵育。每3天换液1次,250×g离心5 min,收集细胞,同时去掉部分单细胞、死细胞及杂质,半量换液和全量换液交替进行。MSs每5~7天传代1次,传代时250×g离心5 min,收集MSs,用胰酶消化5 min,轻轻吹打至大部分MSs消失,终止消化,获取微球体细胞(mammospheres-derived cells, MSDCs),离心收集细胞,继续在上述SFM中培养。

1.4 MSs的诱导分化

MSs用胰酶消化成单细胞(MSDCs),含有5%胎牛血清的DMEM-F12培养基重悬,以1×10^5/ml的浓度接种于25 mm^{2}的培养瓶中,置于37 ℃,5% CO_2恒温培养箱中孵育,每3天左右换液1次,细胞贴壁生长达到90%融合时用胰酶消化成单细胞,进行传代。

1.5 免疫荧光细胞化学检测ESA和Nestin的表达

参考Dey等[6]的方法,主要步骤如下:①收集MSs,制备成适当浓度的细胞悬液,吸取50 μl涂布在多聚赖氨酸的处理的载玻片上,使细胞均匀分布在6 mm的圆圈内;②电风扇吹至略干,用-20 ℃预冷的1∶1的甲醇和丙酮混合液于室温下固定10 min,PBS漂洗5 min;③用含有0.5% Triton X-100的非免疫动物血清封闭1 h,PBS漂洗2次,每次5 min;④加入一抗,于37 ℃孵育2 h,PBS漂洗2次,每次5 min;⑤加入FITC或TRITC标记的二抗,于37 ℃避光孵育45 min,PBS漂洗2次,每次5 min;⑥甘油封片。以PBS代替一抗作为阴性对照。将制备好的样品在激光共聚焦显微镜下扫描成像,无荧光或可见微弱自发荧光为阴性,可见明亮的荧光为阳性。

1.6 流式细胞术(FACS)检测ALDH1$^+$细胞

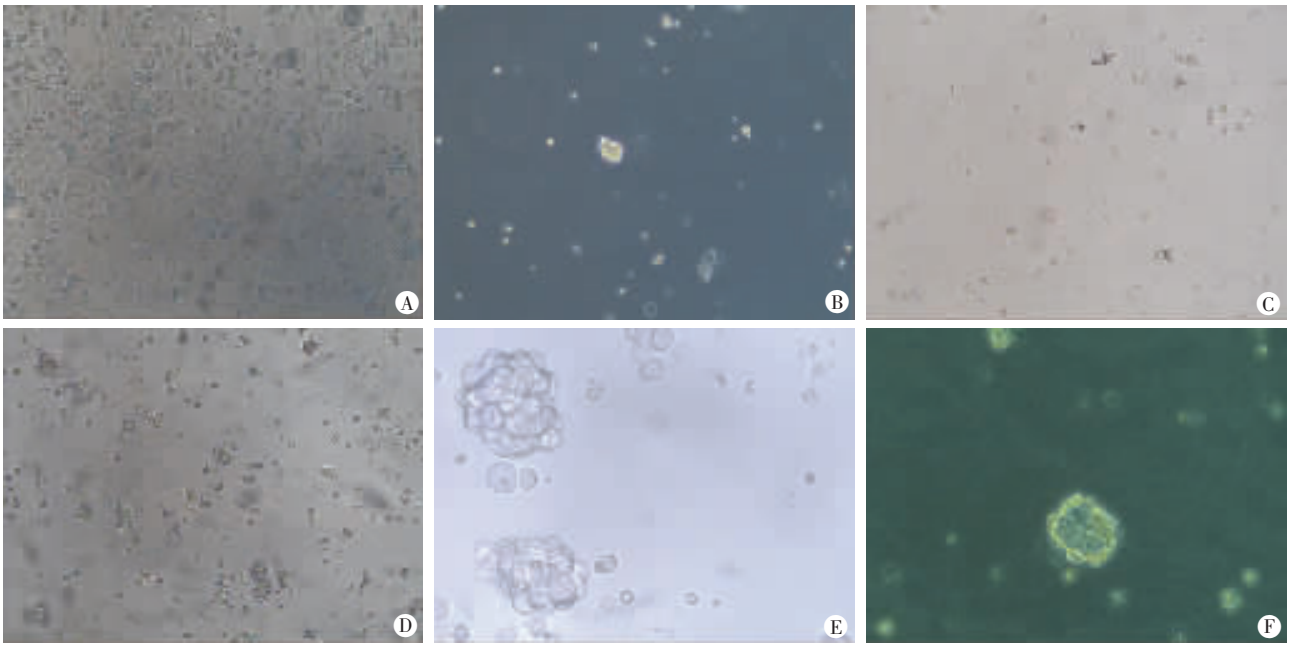
参照ALDEFLUOR®试剂盒说明书进行,主要步骤如下:制备单细胞悬液,离心去上清液,用反应缓冲液重悬细胞,并调整细胞浓度至1×10^5~1×10^6/ml;取1 ml细胞悬液加入测试管,5 μl抑制剂DEAB加入对照管,然后在测试管内加入5 μl活化的ALDEFLUOR底物,混匀后立即吸取0.5 ml细胞悬液转移至对照管,吹打混匀,将对照管和测试管于37 ℃孵育30 min;将测试管和对照管于250×g离心5 min,吸去上清液,分别用0.5 ml缓冲液重悬细胞,立即上机检测或4 ℃保存于24 h之内上机检测。

2 结果

2.1 化疗后乳腺癌标本的MSs培养

2.1.1 化疗1个周期乳腺癌标本的MSs培养 5例标本经机械分离后获得大量的坏死组织和细胞碎片(图1A),培养10 d后均未见MSs形成。

2.1.2 化疗2个周期乳腺癌标本的MSs培养 其中3个标本分离出大量的坏死组织和细胞碎片,另外3个标本分离出的细胞培养3 d后的有MSs开始形成,并且培养基中坏死的单细胞较多,7 d后球体不再增大,折光性强,细胞连接紧密,球体表面未见坏死的细胞层(图1B),消化成单细胞后在SFM中连续传代形成新的MSs。



A：化疗1个周期的标本经机械分离获得大量的坏死细胞和组织碎片（×100）；B：化疗2个周期的部分标本在无血清培养基中形成微球体（×100）；C：化疗3个周期的部分标本机械分离后获得少量的坏死细胞和组织碎片（×100）；D：化疗3个周期的部分标本机械分离后直接获得微球体样细胞团（×100）；E：分离获得的微球体无血清培养24 h后的形态（×200）；F：分离获得的微球体无血清培养3 d后表面可见坏死的细胞层（×200）

图1 相差显微镜观察乳腺癌不同周期新辅助化疗后的癌干细胞分离与培养

2.1.3 化疗3个周期和4个周期的乳腺癌标本的MSs培养

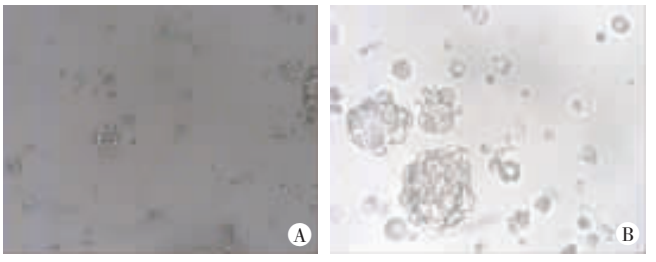
其中4个标本仅分离到少量的坏死细胞和组织碎片（图1C），SFM中培养10 d未见MSs形成；另外5例标本直接分离获得MSs样的细胞，体积较小，折光性弱，培养基中坏死的细胞及组织碎片很少（图1D），24 h后单细胞从球体表面脱落，球体折光性增强（图1E），MSs培养3 d后球体表面可见坏死的细胞层（图1F），MSDCs在SFM中培养5 d即可形成新的MSs，其折光性强，细胞连接紧密，有极少数的单细胞脱落，表面无坏死的细胞层。MSDCs可以连续传代形成新的MSs。

2.2 MSs传代过程中的生长变化

MSs消化成单细胞后，在SFM中培养24 h后即可见到细胞分裂，48 h后形成几个细胞到十几个细胞组成的新生MSs（图2A），5～7 d后形成几十个至上百个细胞组成的成熟MSs（图2B），细胞连接紧密，密度大，细胞与细胞之间的分界线不清。随着传代次数的增加，球体逐渐变小，变少，化疗2个周期标本的MSs传至第11代时已基本无新的MSs形成，而化疗3个周期以上标本的MSs传至第16代时才不能形成新的MSs。

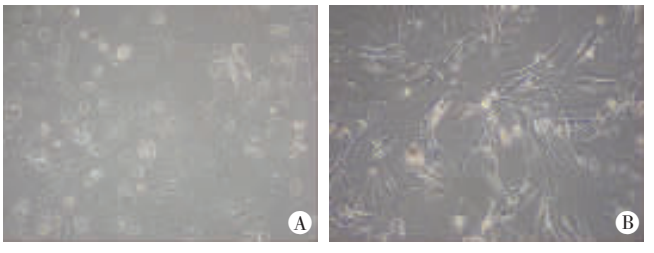
2.3 MSDCs在添加血清的培养基中的变化

MSDCs接种于添加5%胎牛血清的DMEM-F12的培养基中，6～12 h后细胞开始贴壁，或细胞由圆形变成梭形（图3A），3～5 d后大部分细胞贴壁生长，与周围细胞相互融合，仅有极少数细胞悬浮生长（图3B）。化疗3个周期以上标本的MSDCs贴壁时间早，生长速度快。



A：包含大约10个细胞的新生微球体；B：包含几十个至上百个细胞的成熟微球体

图2 在无血清培养基中微球体的形成过程 （相差显微镜 ×200）

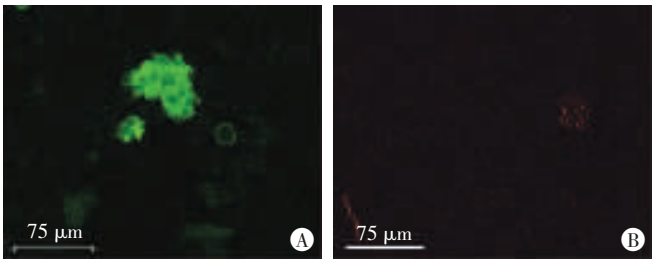


A：MSDCs血清诱导分化6 h后；B：MSDCs血清诱导分化3 d后

图3 血清诱导MSDCs分化的过程 （相差显微镜 ×200）

2.4 ESA和Nestin在MSDCs中的表达

免疫荧光细胞化学显示：ESA标记的MSDCs的包膜和胞浆内可见弥漫的绿色荧光（图4A），Nestin标记的MSDCs仅见微弱的荧光（图4B）。

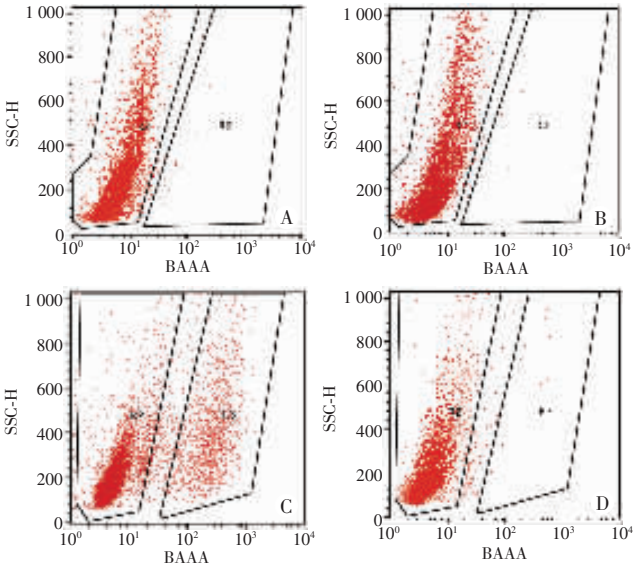


A：ESA 在 MSDCs 中呈阳性表达；B：MSDCs 不表达 Nestin

图 4 激光共聚焦显微镜观察 ESA 和 Nestin 在 MSDCs 中的表达

2.5 MSDCs 中含有 ALDH1$^+$细胞

FACS 检测结果显示：化疗两个周期标本的 MSDCs 中 ALDH1$^+$细胞比例均小于 10%（图 5A、B），而化疗 3 个周期以上标本的 MSDCs 中 ALDH1$^+$细胞比例全部大于 15%（图 5C、D）。



A、B：化疗 2 个周期标本的 MSDCs，含有较低比例的 ALDH1$^+$细胞群；C、D：化疗 3 个周期以上标本的 MSDCs，含有较高比例的 ALDH1$^+$细胞群；A、C：无 DEAB；B、D：有 DEAB

图 5 MSDCs 的 ALDH 活性分析典型流式细胞检测结果

3 讨论

乳腺癌干细胞在乳腺癌细胞中的比例很低，因此获得充足数量的细胞是 BCSCs 各项研究的前提。Ponti 等[7]借鉴神经干细胞的培养方法，在添加生长因子而不含血清的培养基中悬浮培养乳腺癌原代细胞及乳腺癌细胞株，乳腺癌细胞在此条件下发生 anoikis 凋亡，而 BCSCs 可以自我更新形成一种叫做“乳腺球”（mammospheres，MSs）的细胞团，MSs 中富含 CD44$^+$CD24$^-$表型的 BCSCs。随后无血清悬浮培养方法被广泛用于 BCSCs 的富集，是目前体外获取 BCSCs 的重要方法[8-10]。接受新辅助化疗的乳腺癌患者在临床上占有很大比例，不同周期的化疗是否对 BCSCs 分离培养有着不同的影响，如何从化疗后的乳腺癌组织中获取 BCSCs 是一个值得研究的问题。

已有研究证实 8-喹啉醇和沙利霉素可以杀伤 BCSCs[11,12]。乳腺癌是一种异质性很强的疾病，不同类型的乳腺癌可能起源于不同的 BCSCs，其对化疗药物的敏感性存在差异[13]。本研究未能在化疗 1 个周期的乳腺癌标本中培养出 MSs，分析其原因可能为：化疗药物在杀伤乳腺癌细胞的同时，对 BCSCs 造成一定程度上的损伤，而在此时分离的 BCSCs 在体外培养相当于对其进行了第二次打击，BCSCs 由于不能及时适应新的环境而死亡，因此只能分离得到坏死组织和细胞碎片，SFM 中培养不能形成 MSs。而化疗 2 个周期的部分标本中的 BCSCs 对化疗药物比较敏感，在杀灭乳腺癌细胞的同时清除了癌干细胞，另一部分标本的 BCSCs 对化疗药物不敏感，在化疗的过程中幸存下来，由于时间较短，其尚未大量扩增，因此需要在体外培养一段时间才能形成 MSs。化疗超过 3 个周期的乳腺癌标本杀灭了大部分乳腺癌细胞，如果 BCSCs 对化疗药物敏感而被清除，则无法分离出 MSs，而化疗药物不敏感的 BCSCs 有充足的时间在体内自我更新，大量增殖，形成类似于 MSs 的细胞团。分离出的 MSs 折光性较弱，球体外周细胞与球体连接松散，可能是由于 MSs 表面存在分化的乳腺癌细胞，24 h 后球体表面部分乳腺癌脱落，BCSCs 被暴露出来，其折光性增强，细胞间连接紧密，难以区分细胞间的界限，球体外周可见少量坏死的乳腺癌细胞。3 d 后与球体连接紧密的乳腺癌细胞在无血清环境中发生 anoikis 凋亡，所以在球体的表面可以见到坏死的细胞层，该区域的折光性也较弱。另外，本研究发现基底亚型乳腺癌更容易分离获得 MSs。

本研究培养和分离的 MSs 消化成单细胞后，可以在 SFM 中重建产生新的 MSs，并能够连续传代，证实其具有自我更新能力。分离的 MSs 传代次数的比培养 MSs 增多，反映化疗药物促进了其自我更新能力。在传代的过程中球体越来越小，随着传代次数的增多，最终不能再形成新的微球体，说明 SFM 悬浮培养方法并不能长期维持 BCSCs 的体外扩增，该培养方法有待改进。MSDCs 在含有血清的培养基中贴壁生长，细胞形态由圆形变成梭形。化疗 3 个周期以上标本的 MSDCs 贴壁速度快于化疗 2 个周期标本的 MSDCs，反映其具有更强的分化能力。免疫荧光细胞化学显示，MSs 细胞表达上皮细胞标记物 ESA，而不表达神经干细胞标记物 Nestin，证实本研究培养和分离的 MSs 来源于上皮细胞，而非神经干细胞。以上实验证实我们培养和分离的 MSs 具有自我更新和多向分化的潜能，符合癌干细胞的特征。

2003 年 Al-Hajj 等[14] 发现了表型为 $CD44^+CD24^-$ 的 BCSCs，首次证实了乳腺癌是一种干细胞疾病。研究发现 $CD44^+CD24^-$ 表型细胞主要存在于基底亚型的乳腺癌中，其他亚型乳腺癌细胞的 BCSCs 标记物有待进一步鉴定[15]。乙醛脱氢酶 1（ALDH1）是 2007 年 Ginestier 等[16] 鉴定的 BCSCs 的功能性标记物，他们通过流式细胞仪检测发现 $ALDH1^+$ 细胞亚群与 $CD44^+CD24^-$ 细胞亚群仅有极少的一部分重合，$ALDH1^+CD44^+CD24^-$ 细胞亚群表现出极强的成瘤能力，20 个该表型细胞即能在小鼠体内形成移植瘤，而 $ALDH1^-CD44^+CD24^-$ 表型的细胞不能在小鼠乳腺脂肪垫内成瘤。研究发现多种肿瘤细胞中均存在 $ALDH1^+$ 表型的癌干细胞，ALDH1 已经成为目前公认的癌干细胞的标记物之一[17-21]。本研究通过 FCAS 检测发现 MSDCs 中均含有 $ALDH1^+$ 细胞，且化疗 2 个周期标本的 MSDCs 中 $ALDH1^+$ 细胞比例（<10%）小于化疗 3 个周期标本的 MSDCs 中 $ALDH1^+$ 细胞比例（>15%），说明 ALDH1 表型细胞普遍存在于 MSDCs 中，且随着化疗周期的增加，$ALDH1^+$ 表型的 BCSCs 比例增高。这一结果与文献报道的新辅助化疗可以引起乳腺癌组织中 BCSCs 比例增高相一致[4]。

总之，本研究证实从新辅助化疗后的乳腺癌标本中分离 BCSCs 宜选取化疗 2 个周期以上的标本，通过培养可以获取 MSs。化疗 3 个周期以上的标本可以直接分离获得富含 BCSCs 的 MSs，更适合 BCSCs 的获取。而化疗 1 个周期的乳腺癌标本不适合 BCSCs 的分离和培养。直接分离获得的 MSs 含有更高比例的 $ALDH1^+$ 表型癌干细胞，且该表型 BCSCs 比 $CD44^+CD24^-$ 表型的 BCSCs 在乳腺癌中分布更加广泛。本研究为从新辅助化疗后的乳腺癌组织分离 BCSCs 提供了科学依据，并且为 MSs 的获取提供了新的便利方法。

参考文献：

[1] Phillips T M, McBride W H, Pajonk F. The response of CD24 (-/low)/$CD44^+$ breast cancer-initiating cells to radiation[J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(24): 1777-1785.

[2] Li X, Lewis M T, Huang J, *et al*. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(9): 672-679.

[3] 肖福英，刘婧，黄涛生. 乳腺干细胞研究进展[J]. 第三军医大学学报，2008，30(18)：1681-1685.

[4] Yu F, Yao H, Zhu P, *et al*. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells[J]. Cell, 2007, 131(6): 1109-1123.

[5] Li H Z, Yi T B, Wu Z Y. Suspension culture combined with chemotherapeutic agents for sorting of breast cancer stem cells[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 135.

[6] Dey D, Saxena M, Paranjape A N, *et al*. Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture[J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5329.

[7] 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.

[8] Grimshaw M J, Cooper L, Papazisis K, *et al*. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(3): R52.

[9] Zhang M, Behbod F, Atkinson R L, *et al*. Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(12): 4674-4682.

[10] Kok M, Koornstra R H, Margarido T C, *et al*. Mammosphere-derived gene set predicts outcome in patients with ER-positive breast cancer[J]. J Pathol, 2009, 218(3): 316-326.

[11] Zhou J, Zhang H, Gu P, *et al*. Cancer stem/progenitor cell active compound 8-quinolinol in combination with paclitaxel achieves an improved cure of breast cancer in the mouse model[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 115(2): 269-277.

[12] Gupta P B, Onder T T, Jiang G, *et al*. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening[J]. Cell, 2009, 138(4): 645-659.

[13] Hwang-Verslues W W, Chang K J, Lee E Y, *et al*. Breast cancer stem cells and tumor suppressor genes[J]. J Formos Med Assoc, 2008, 107(10): 751-766.

[14] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, *et al*. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983-3988.

[15] Honeth G, Bendahl P O, Ringner M, *et al*. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(3): R53.

[16] Ginestier C, Hur M H, Charafe-Jauffret E, *et al*. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(5): 555-567.

[17] Ran D, Schubert M, Pietsch L, *et al*. Aldehyde dehydrogenase activity among primary leukemia cells is associated with stem cell features and correlates with adverse clinical outcomes[J]. Exp Hematol, 2009, 37(12): 1423-1434.

[18] Carpentino J E, Hynes M J, Appelman H D, *et al*. Aldehyde dehydrogenase-expressing colon stem cells contribute to tumorigenesis in the transition from colitis to cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(20): 8208-8215.

[19] Li T, Su Y, Mei Y, *et al*. ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome[J]. Lab Invest, 2010, 90(2): 234-244.

[20] Ma S, Chan K W, Lee T K, *et al*. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(7): 1146-1153.

[21] Burger P E, Gupta R, Xiong X, *et al*. High aldehyde dehydrogenase activity: a novel functional marker of murine prostate stem/progenitor cells[J]. Stem Cells, 2009, 27(9): 2220-2228.

（收稿 2010-06-07 修回 2010-06-25）

（编辑 邓强庭）