论著

文章编号:1000-5404(2012)03-0226-05

基于舌鳞癌Tca8113细胞醛脱氢酶活性不同构建差异表达基因cDNA文库

孙守娟,季 平,邓 诚,李 颖,邹 波,漆小娟 (401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医院颌面外科)

[摘要] **目的** 构建舌鳞癌Tca8113细胞系中高、低醛脱氢酶活性(high/low aldehyde dehydrogenase activity, $ALDH^{high}$/$ALDH^{low}$)细胞差异表达基因cDNA文库。**方法** 用流式细胞仪检测ALDEFLUOR®染色的Tca8113细胞中干细胞标志物ALDH的表达,并收集$ALDH^{high}$和$ALDH^{low}$细胞;用Trizol分别提取两亚群细胞的总RNA;用抑制性消减杂交(SSH)对2组RNA进行差异基因筛选和扩增,扩增产物与pMD18-T载体连接并转化大肠杆菌DH5α。文库扩增后,每库随机挑取24克隆进行酶切、测序及同源性分析。**结果** 分选得到$ALDH^{high}$和$ALDH^{low}$两亚群细胞,其中$ALDH^{high}$细胞的比例为2.5%;分光光度计测得$ALDH^{high}$和$ALDH^{low}$的RNA $D(260)/D(280)$的比值分别为1.93和1.92;构建了$ALDH^{high}$和$ALDH^{low}$细胞差异基因cDNA双向文库,每个库约500个克隆菌落,每库随机挑选24个菌落进行PCR分析,克隆片段均匀分布在200~700 bp,无假阳性克隆。测序结果经同源性比对分析和PubMed检索,其中与肿瘤有关的基因有SLC25A13、KLHL2、NPC1、WAPL、BARD1、Notch2、EEF2K。**结论** 成功构建$ALDH^{high}$和$ALDH^{low}$细胞差异基因cDNA文库。

[关键词] 人舌鳞癌Tca8113;抑制性消减杂交技术;cDNA文库;肿瘤干细胞;醛脱氢酶

[中图法分类号] R394-33; R394.2; R739.86 [文献标志码] A

Construction of differentially expressed cDNA libraries of aldehyde dehydrogenase with high and low activity from tongue squamous carcinoma Tca8113 cell line

Sun Shoujuan, Ji Ping, Deng Cheng, Li Ying, Zou Bo, Qi Xiaojuan (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatology Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 401147, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct the differentially expressed cDNA libraries of aldehyde dehydrogenase with high and low activity ($ALDH^{high}$/$ALDH^{low}$) from tongue squamous carcinoma Tca8113 cell line. **Methods** Expression of stem cell marker ALDH was detected, and $ALDH^{high}$ and $ALDH^{low}$ cells were collected by Aldefluor assay combined with flow cytometry. Differentially expressed genes of total RNA that was extracted from the two cell subpopulations by Trizol were screened and amplified by suppressing subtractive hybridization (SSH), and the PCR products were connected with pMD18-T vector and then transfected into *E. coli* DH5α for amplification. Enzyme digestion, gene sequencing and homology analysis were performed in 24 positive clones that were randomly picked from each library. **Results** Two subproportions of $ALDH^{high}$ and $ALDH^{low}$ were screened out, and $ALDH^{high}$ cells in Tca8113 cells accounted for 2.5%. RNA D(260)/D(280) of $ALDH^{high}$ and $ALDH^{low}$ were 1.93 and 1.92, respectively. Two-directional subtractive cDNA libraries of $ALDH^{high}$ and $ALDH^{low}$ were constructed, and each library comprised 500 clones. PCR analysis of 24 clones randomly picked from each library showed that insert-fragments distributed in 200 – 700 bp, and no false positive clones were detected. Gene sequencing result that was analyzed and indexed by PubMed showed that cancer related genes included SLC25A13, KLHL2, NPC1, WAPL, BARD1, Notch2 and EEF2K. **Conclusion** Two-directional subtractive cDNA libraries of $ALDH^{high}$ and $ALDH^{low}$ cells were successfully constructed.

[**Key words**] human tongue squamous carcinoma Tca8113; suppression subtractive hybridization; cDNA library; cancer stem cells; aldehyde dehydrogenase

Supported by the Scientific Research Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (2008-2-231; 2008-2-232). Corresponding author: Ji Ping, Tel: 86-23-88860056, E-mail: jiping_62@hotmail.com

[基金项目] 重庆市卫生局科研基金(2008-2-231;2008-2-232)

[通信作者] 季 平,电话:(023)88860056,E-mail: jiping_62@hotmail.com

肿瘤干细胞理论认为,肿瘤细胞中存在一小群具有自我更新和分化能力的细胞即肿瘤干细胞,这群细胞可能是肿瘤发生、发展的根源[1]。最近几年的研究发现,在骨髓[2]和脐带血[3]干细胞中高表达的醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase,ALDH),同时在很多肿瘤(肝癌[4]、乳腺癌[5]、头颈部鳞癌[6-7]等)干细胞样细胞中的表达高于在非肿瘤干细胞样细胞中的表达。根据上述理论和发现,本实验采用在多种干细胞中高表达的 ALDH 分选舌鳞癌 Tca8113 细胞为 $ALDH^{high}$ 亚群细胞和 $ALDH^{low}$ 亚群细胞,采用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization,SSH)构建两亚群细胞差异基因双向 cDNA 文库,希望为研究肿瘤干细胞基因特点以及肿瘤发生、发展机制提供帮助。

1 材料与方法

1.1 细胞

人舌鳞癌 Tca8113 细胞系由重庆医科大学提供,原由上海交通大学医学院附属第九人民医院口外肿瘤实验室惠赠;培养液为含 10% 小牛血清和双抗的 RPMI1640,在 5% CO_2、37 ℃饱和温度的培养箱中培养,每 2 天换夜、传代。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI1640(GiBco/Brl 公司),10% 小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),2 mmol/L L-glutamine,100 U/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin;ALDEFLUOR® 试剂盒(Stem Cell Tecnologies,加拿大);Trizol 总 RNA 抽提试剂(Invitrogen);PCR-Select™ cDNA Subtraction kit(Clontech 公司);*Taq*™酶、pMD18-T 载体(购自宝生物工程大连有限公司);QIAGEN Ⅱ Gel Extraction Kit(QIAGEN 公司);其他试剂均为进口或国产分析纯。基因扩增仪 ABI9700(ABI 公司),凝胶成像系统 GIS-2008(上海天能科技有限公司),核酸电泳仪及电泳槽(BIORAD 公司),BD FACSAria BD FACSAria Ⅱ 流式细胞分选仪(Becton Dickinson)。

1.3 Tca8113 细胞系中 ALDH 表达的检测

用含 10% 小牛血清 RPMI1640 培养的对数期细胞,用 0.25% 胰酶消化,培养基终止消化,离心去上清,重悬于 ALDEFLUOR Assay Buffer 中,细胞计数,调整细胞浓度为 1×10^6 ~ 2×10^6/ml。从中取出 0.5 ml 作为流式空白对照。其余做如下操作:①准备 2 个 12 mm×75 mm 管子分别标记“test”和“control”,然后在“test”管中置入调整过的细胞悬液 n ml(n 可根据实验需要调整大小)。②加入 5×n μl DEAB(DEAB 为 ALDEFLUOR 基质的抑制剂)试剂至“control”管中,加 5×n μl 活化的 ALDEFLUOR 基质至“test”管,混合并立刻取出 n/2ml 至 DEAB“control”管中。③ 在 37 ℃水浴箱中温育“test”管和“control”管 30 ~ 60 min。④孵育之后,离心所有管子:250×*g*,5 min。去掉上清,0.5×n/2 ml ALDEFLUOR Assay Buffer(buffer 是专门设计用来防止醛脱氢酶荧光产物外排的)重悬细胞,盖上样品的盖子,立即放在冰上;⑤流式细胞仪检测 ALDH 表达情况。

1.4 $ALDH^{high}$ 和 $ALDH^{low}$ 两亚群细胞的 FACS 分选

流式细胞仪检测的 ALDH 在 Tca8113 细胞系中的表达结果显示:在加入醛脱氢酶抑制剂 DEAB 的对照组中,荧光强度较高的 $ALDH^{high}$ 细胞在散点图上消失,而实验组未消失。因此确定 $ALDH^{high}$ 与 $ALDH^{low}$ 细胞在散点图上的分界线。为了分选纯度高的 $ALDH^{high}$ 和 $ALDH^{low}$ 两亚群细胞,我们选取分界线两侧分别距离分界线稍远的细胞,这样可以避免选取了位于分界线上的醛脱氢酶表达高低不明确的细胞。将 $ALDH^{high}$ 与 $ALDH^{low}$ 细胞收集至 EP 管中,将收集到的细胞离心去掉上清后保存于 -70 ℃冰箱备用。最终要求 $ALDH^{high}$ 和 $ALDH^{low}$ 细胞数量达到各约 2×10^5 细胞。

1.5 $ALDH^{high}$ 和 $ALDH^{low}$ 两亚群细胞总 RNA 的提取

将冻存的 $ALDH^{high}$ 和 $ALDH^{low}$ 细胞按照 Invitrogen 公司的 Trizol 说明书进行操作。并用紫外分光光度计和 1% 琼脂糖电泳对总 RNA 进行纯度及完整性的鉴定。

1.6 抑制性消减杂交文库的建立

建立消减杂交文库 1 和消减杂交文库 2(以下简称库 1、库 2),其中库 1 中 $ALDH^{low}$ 为实验方(tester),$ALDH^{high}$ 为驱动方(driver);库 2 中 $ALDH^{high}$ 为实验方(tester),$ALDH^{low}$ 为驱动方(driver)。

1.6.1 抑制性消减杂交 取 $ALDH^{high}$ 细胞的总 RNA 和 $ALDH^{low}$ 细胞的总 RNA 各 2 μg,进行抑制性消减杂交,参照 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA 消减试剂盒说明书并根据实际情况做如下操作:①双链 cDNA 的合成:各取 2 μg 总 RNA,与 cDNA 合成引物(cDNA 合成引物序列为 5′-TTTTGTACAAGCTT30N1N-3′)、5×First-Strand Buffer、dNTP Mix、AMV 逆转录酶混合,于 42 ℃空气温浴 1.5 h,逆转录合成 cDNA 第 1 条链,冰上终止反应。以第 1 条链为模板合成 cDNA 第 2 条链,然后过柱纯化。②Tester 和 Driver 的 cDNA 经 *Rsa* Ⅰ 酶切,用四碱基内切酶 *Rsa* Ⅰ 对合成的双链 cDNA 分别进行酶切产生大小合适的平头末端 cDNA 片段。③接头连接:将 $ALDH^{low}$ 和 $ALDH^{high}$ 各分成 3 份,其中 2 份分别与接头 1(Adaptor 1)和接头 2 连接(Adaptor 2),第 3 份作为 driver,其中 Adaptor 1 序列为:5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3′,3′-GGCCCGTCCA-5′; Adaptor 2: 5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3′, 3′-GCCGGCTCCA-5′。④消减杂交反应:分别将带有接头 1 和 2 的 cDNA 与 Driver cDNA 混合进行第 1 轮杂交,然后将第 1 次杂交产物与过量新的变性 Driver cDNA 混合进行第 2 轮消减杂交。⑤消减杂交产物的 PCR 扩增:以第 2 轮消减杂交产物为模板进行 PCR 扩增。首次 PCR 反应体积为 50 μl,其中包含 35.5 μl H_2O、5 μl $MgCl_2$(TaKaRa)、5 μl 10 buffer(TaKaRa)、1 μl dNTP(10 mmol/L)、1 μl Primer1(上游引物 50 pmol/μl)、1 μl Primer1 (下游引物 50 pmol/μl)、1 μl Template(第 2 轮杂交产物)、0.5 μl(2.5 U) *Taq*(5 U/μl)。反应条件:95 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,62 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,共 25 个循环,其中 PCR primer1 序列为:5′-CTA-

ATACGACTCACTATAGGGC-3′, 5′-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3′。将第1次PCR产物胶回收(QIAGEN胶纯化试剂盒)。将回收后的DNA片段进行第2次PCR扩增,反应体系和条件同第1次。对第1次和第2次PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.6.2 PCR产物的纯化和克隆 将第2次PCR产物用QIAGEN胶纯化试剂盒进行纯化,纯化后的产物与PMD-18T载体连接,以转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。将转化后的大肠杆菌涂在涂有X-gal和IPTG的含氨卞青霉素的LB 90 mm平板上,37 ℃倒置培养过夜,次日观察克隆长势并拍照。用灭菌牙签挑选出的单个克隆菌落,培养后可用甘油长期保存。

1.7 转化子鉴定

重组的转化子通过PCR法进行鉴定:先从库1和库2 2个平板上用灭菌的牙签随机挑转化的单菌落各24个,分别接种于2 ml LB培养基中,37 ℃ 200转/min培养过夜,取20 μl菌液离心后作为模板,以primer1为引物进行PCR扩增。琼脂糖凝胶电泳鉴定大肠杆菌中有无插入片段并拍照。

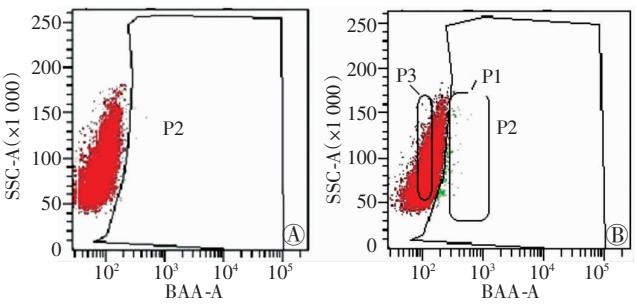
1.8 测序结果的Blast和pupmed分析

上步鉴定的48个阳性克隆,送测序公司测序,测序后在GenBank中用BLAST功能查找每个序列片段对应的人的mRNA序列,对应的基因即是差异基因。并将差异基因在http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed进行文献检索分析其功能。

2 结果

2.1 ALDH在Tca8113细胞系中的表达检测

用Aldefluor assay和流式细胞术(FACS),我们检测到$ALDH^{high}$细胞占Tca8113细胞的2.5%左右(图1中的P2区)。



A:有DEAB;B:无DEAB

P1:分选的$ALDH^{high}$细胞;P2:检测的$ALDH^{high}$细胞;P3:分选的$ALDH^{low}$细胞

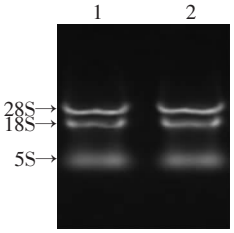
图1 舌鳞癌Tca8113细胞系中$ALDH^{high}$细胞的检测

2.2 $ALDH^{high}$和$ALDH^{low}$两亚群细胞的FACS分选

为了分选高纯度的$ALDH^{high}$细胞,我们选取偏右侧的荧光强度更高的一小亚群细胞,约占1.3%,如图1中的P1区域。分选$ALDH^{low}$细胞时我们选取偏左侧荧光强度较低的一小亚群细胞,如图1中的P3区域细胞。

2.3 总RNA的质量分析

分光光度计测得$ALDH^{high}$和$ALDH^{low}$的总RNA $D(260)/D(280)$的比值分别为1.93和1.92,表明纯度良好。1%琼脂糖凝胶,TBE缓冲液,120 V,20 min电泳图显示质量良好(图2)。

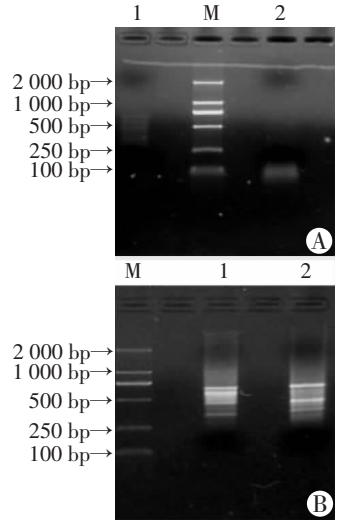


1:$ALDH^{low}$总RNA;2:$ALDH^{high}$总RNA

图2 总RNA甲醛变性琼脂糖凝胶电泳结果

2.4 第1次和第2次PCR后琼脂糖凝胶电泳鉴定

以primer1为引物进行2轮抑制性PCR扩增之后,出现从0.1~2 kb不等的弥散条带,PCR扩增前几乎无任何条带出现,说明抑制性PCR扩增结果较好(图3)。



M:标准;1:库1;2:库2

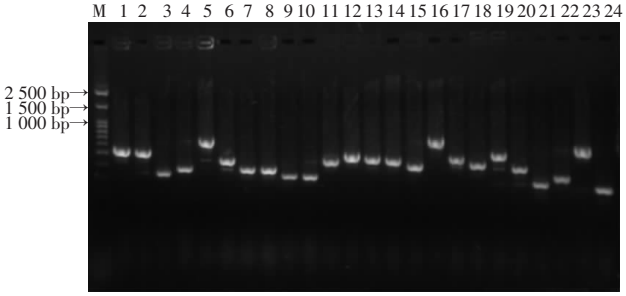
图3 第1次(A)和第2次(B)PCR电泳结果

2.5 平板中菌落生长情况

2个克隆平板中白色单克隆菌落分布较均匀,大小均一,菌落饱满清晰,约500个/板。

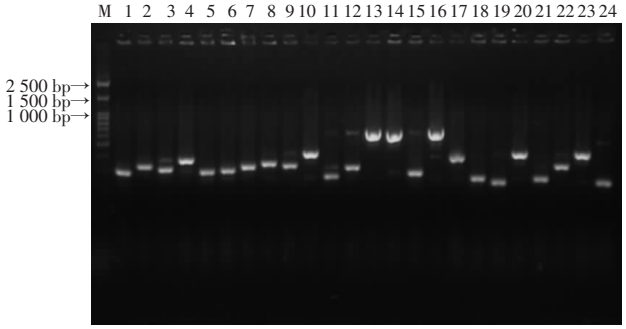
2.6 重组转化子的琼脂糖鉴定电泳结果

PCR产物的电泳结果(图4、5)显示:克隆的片段均匀随机分布在200~700 bp范围,且无假阳性克隆。



M:标准;1~24:库1中重组PMD-18T-cDNA质粒扩增产物

图4 PCR测定差减文库1中重组PMD-18T-cDNA质粒结果



M:标准;1 ~24:库 2 中重组 PMD-18T-cDNA 质粒扩增产物

图 5 PCR 测定差减文库 2 中重组 PMD-18T-cDNA 质粒结果

2.7 测序结果及 Blast 和 Pubmed 分析结果

测序后共得到 45 个序列片段,BLAST 分析后共得到 11 个同源性基因,库 2(ALDH^{high} 相关基因)中包括:SLC25A13、KLHL2、NPC1、EID1、WAPAL、NOTCH2、BARD1、ITPR1、FRG1;库 1(ALDH^{low} 相关基因)中包括:EEF2K 和 MLL。将上述 11 条已知基因进行相关文献检索。与肿瘤发生、发展相关的基因主要有:SLC25A13、KLHL2、NPC1、WAPL、BARD1、Notch2、EEF2K、MLL。

3 讨论

众所周知,最近几年的研究认为肿瘤干细胞可能是肿瘤发生、发展、转移和复发的根源,而细胞之间功能差异的根本原因在于基因的特殊表达,所以通过寻找肿瘤干细胞与非肿瘤干细胞间差异表达基因,我们可以更好地了解肿瘤发展过程的分子机制。循着这一思路,我们首先利用存在于多种干细胞的标志物对舌鳞癌 Tca8113 细胞系进行肿瘤干细胞样细胞和非肿瘤干细胞样细胞分选,然后对两种细胞的 RNA 进行高通量筛选差异基因,建立差异基因文库。

本实验干细胞标志物的选择上,最近几年的研究认为 ALDH 可能为头颈部鳞癌肿瘤干细胞的标志物之一,Clay 等[7] 从 6 例头颈部鳞癌组织中分离出 ALDH^{high} 细胞(占细胞总数的 1% ~7.8%),当注射 50 ~100 个 ALDH^{high} 细胞至 NOD/SCID 小鼠中即可成瘤。然而 prince[8] 等研究结果是最低 5000 个 CD44^{+}CD24^{-} 细胞可成瘤。这说明相对于 CD44[9]、CD133[10-11] 而言,ALDH 有可能是头颈部鳞癌干细胞更为特异有效的标志物。所以本实验采用从舌鳞癌 Tca8113 细胞系中分选出的 ALDH^{high} 和 ALDH^{low} 细胞作为本实验的实验对象,对于接下来的肿瘤干细胞样细胞与非肿瘤干细胞样细胞的差异基因分析可能更具有代表性和意义。

本实验方法学的选择上,利用 SSH 技术从转录组上建立差异基因 cDNA 文库,主要是考虑如下原因:①SSH 技术是根据消减杂交和抑制 PCR 发展起来的一种分离差异表达基因的新方法,具有假阳性率低、筛选效率高、操作简单等优点,特别适用于克隆分析造成某种特殊表型的目的基因及其功能[12]。②目前对常见疾病的基因研究主要从全基因组和转录组上进行,但是除了全基因组研究费用高之外,人们还普遍意识到很难从全基因组如此多的变异体中鉴定出真正起作用的位点。基于这些原因,研究者认为转录组研究是全基因组研究的一种快速廉价的替代方法,尽管这种方法无疑将错过一部分基因,但它的优势是产生了更多的信息,比如基因表达水平和剪接模式。美国杜克大学医学院人类基因组变异中心以及国家癌症研究所的研究人员将全基因组研究和转录组研究所鉴定出的变异体进行了比较,证实了这种替代方法的可行性[13]。③本实验中没有采用全长基因序列而是采用 Rsa1 酶切后的 cDNA 片段进行差异基因筛选。最终获得了差异表达基因的表达序列标签(ESTs),然后通过 BLAST 比对即可找到差异基因,这有助于加速研究差异表达基因的进程。

本实验结果显示:①用干细胞鉴定试剂盒(ALDEFLUOR® reagent kit)结合流式细胞分选技术,成功检测到舌鳞癌 Tca8113 细胞系中 2.5% 的细胞为 ALDH^{high} 细胞,且 ALDH^{high} 亚群细胞的比例与其在头颈部鳞癌[6-7] 中的比例相一致。但为了得到纯度高的 ALDH^{high} 和 ALDH^{low} 细胞,我们按照如图 1 中的 P1 和 P3 区分选。分选纯度高的 ALDH^{high} 细胞和 ALDH^{low} 细胞,是成功筛选差异基因的重要前提和保障。②本实验对 2 组 RNA 合成的 cDNA 先进行 2 次消减杂交,消减掉 ALDH^{high} 和 ALDH^{low} 之间的共同序列,初步富集连接接头 1 和接头 2 的 cDNA 差异表达基因。然后进行抑制性 PCR 扩增,只有两端连接上不同接头的片段才能以指数形式扩增,使得 ALDH^{high} 和 ALDH^{low} 细胞差异基因再次富集。PCR 扩增电泳图出现从 0.1 ~2 kb 不等的弥散条带,说明 ALDH^{high} 和 ALDH^{low} 细胞存在基因差异片段。本实验中我们采用 PCR primer1 进行了 2 次扩增,而没有采用 Nested PCR primer 进行扩增,是因为第 2 次 PCR 不管是采用 Nested PCR primer 还是 PCR primer1 都是扩增包括部分接头在内的目的片段,两者没有本质的区别。③从库 1 和库 2 随机挑选出 24 个克隆菌落,PCR 鉴定都有插入片段且无假阳性克隆,这显示本文库是一个高质量文库。④肿瘤相关基因:SLC25A13 是线粒体转运体成员之一,关于它与肿瘤发生的相关性目前尚无定论。Chang 等[14] 的研究证实:编码线粒体转运体维生素 p 的 SLC25A13 基因的

突变与非病毒性肝癌有关;然而也有报道 SLC25A13 的突变可能不是肝癌发生的主要病因[15]。Bu 等[16]研究证实:过度表达的 Mayven(即 KLHL2)可能促进肿瘤的生长。Dormeyer 等[17]在研究人胚胎干细胞和人胚胎性癌细胞细胞膜蛋白实验中发现 Wnt 信号通路成员 NPC1 在两者的表达量不同,而且这一基因在胚胎干细胞自我更新和癌细胞生长过程中发挥着重要作用,这提示该分子与干细胞的自我更新和分化能力密切相关。Ohbayashi 等[18]研究证实:过表达的 WAPL 可以提高染色体的不稳定性,扰乱有丝分裂和胞质分裂,有助于肿瘤的形成。有报道 BARD1 可能是乳腺癌和卵巢癌生物标志物,那么我们是否可以将 BARD1 作为头颈部鳞癌的标志物,这尚需进行下一步验证。在结直肠癌中 Notch1 和 Notch2 表达存在显著负相关性($P<0.01$)。Notch1 和 Notch2 被证实与肿瘤分化、浸润深度、淋巴结转移、远端转移、TNM 分期和生存率具有相反的相关性,是独立且预测作用相反的预后因素($P<0.01$)。此外,研究还证实 Notch1 阳性伴 Notch2 阴性可协同预测总生存不佳[19]。但在本实验中我们发现在 $ALDH^{high}$ 细胞中 Notch2 高表达,似乎与 Notch2 阴性预测生存不佳相矛盾。在人胶质瘤中 EEF2K 可以帮助瘤细胞迁移和入侵,逃避失巢凋亡。这提示我们:EEF2K 也许是一种有效的抗癌治疗的目标[20]。大量研究报道 MLL 基因异常与白血病的发生有关。

本实验为进一步筛选、克隆舌鳞癌干细胞相关基因提供了平台,也为差异基因表达谱的研究及其作用机制奠定了良好实验基础,从而对于寻找舌鳞癌干细胞标志物和研究肿瘤发生、发展、转移和复发过程的分子机制具有重要意义。

参考文献:

[1] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, *et al*. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. Nature, 2001, 414(6859): 105 - 111.

[2] Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, *et al*. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity[J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1142 - 1151.

[3] Hess D A, Meyerrose T E, Wirthlin L, *et al*. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity[J]. Blood, 2004, 104(6): 1648 - 1655.

[4] 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.

[5] 董华英, 吴诚义, 陈元文. 乳腺癌新辅助化疗后的癌干细胞分离培养[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(20): 2172 - 2176.

[6] Chen Y C, Chen Y W, Hsu H S, *et al*. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(3): 307 - 313.

[7] Clay M R, Tabor M, Owen J H, *et al*. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase[J]. Head Neck, 2010, 32(9): 1195 - 1201.

[8] Prince M E, Sivanandan R, Kaczorowski A, *et al*. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(3): 973 - 978.

[9] Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, *et al*. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Oral Oncol, 2009, 45(7): 633 - 639.

[10] Harper L J, Piper K, Common J, *et al*. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma [J]. J 0ral Pathol Med, 2007, 36(10): 594 - 603.

[11] Zhou L, Wei X, Cheng L, *et al*. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line [J]. Laryngoscope, 2007, 117(3): 455 - 460.

[12] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, *et al*. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6025 - 6030.

[13] Cirulli E T, Singh A, Shianna K V, *et al*. Screening the human exome: a comparison of whole genome and whole transcriptome sequencing[J]. Genome Biol, 2010, 11(5): R57.

[14] Chang K W, Chen H L, Chien Y H, *et al*. SLC25A13 gene mutations in Taiwanese patients with non-viral hepatocellular carcinoma [J]. Mol Genet Metab, 2011, 103(3): 293 - 296.

[15] Tsai C W, Yang C C, Chen H L, *et al*. Homozygous SLC25A13 mutation in a Taiwanese patient with adult-onset citrullinemia complicated with steatosis and hepatocellular carcinoma[J]. J Formos Med Assoc, 2006, 105(10): 852 - 856.

[16] Bu X, Avraham H K, Li X, *et al*. Mayven induces c-Jun expression and cyclin D1 activation in breast cancer cells[J]. Oncogene, 2005, 24(14): 2398 - 2409.

[17] Dormeyer W, van-Hoof D, Braam S R, *et al*. Plasma membrane proteomics of human embryonic stem cells and human embryonal carcinoma cells[J]. J Proteome Res, 2008, 7(7): 2936 - 2951.

[18] Ohbayashi T, Oikawa K, Yamada K, *et al*. Unscheduled overexpression of human WAPL promotes chromosomal instability[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356(3): 699 - 704.

[19] Masuda S. Notch1 and Notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer[J]. Ann Oncol, 2011, 22(11): 2533 - 2534.

[20] Irminger-Finger I. BARD1, a possible biomarker for breast and ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2010, 117(2): 211 - 215.

(**收稿**:2011-09-02;**修回**:2011-10-28)

(编辑 张 维)