文章编号:1000-5404(2012)23-2373-05

论著

沉默 CD133 基因对 CD133$^+$肝癌干细胞放射敏感性的影响

王 勇[1],唐 川[2],兰 曦[1],冉雪琪[3],邹冬玲[4],曹 姝[1],李 芳[1],李少林[1] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院放射医学教研室[1];402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院神经内科[2];400030 重庆,重庆市肿瘤研究所:放疗科[3],妇瘤科[4])

[摘要] **目的** 研究沉默 CD133 基因对人肝癌 CD133$^+$-HepG2 干细胞放射敏感性的影响。**方法** 免疫磁珠分选 HepG2 细胞;流式细胞术检测分选前后 CD133 表达率;NOD/SCID 小鼠成瘤实验验证其干性;靶向沉默 CD133 基因并分组(空白组、阴性感染组、阳性感染组);RT-PCR 和 Western blot 检测各组 CD133 基因 mRNA 和蛋白表达;克隆形成实验检测各组细胞经不同剂量照射后的克隆形成率及存活率,绘制存活曲线并计算各组细胞放射生物学参数 D_0、Dq、N 及放射增敏比(SER);流式细胞术检测各组细胞周期及凋亡情况。**结果** 流式细胞术检测结果显示,分选前后 CD133 表达率分别为(1.36 ±0.20)% 和(87.62 ± 1.92)%。CD133$^+$细胞在细胞数为 1×10^3/ml 时即可形成皮下移植瘤。RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,阳性感染组 CD133 mRNA 和蛋白表达均受到明显抑制。流式细胞术检测结果显示:阳性感染组 G_1、S 期减少 G_2 期增加,细胞凋亡率明显增加。克隆形成实验显示阳性感染组 D_0、Dq、N 值与 SF_2 均减小,放射敏感性明显增强,其 SER 为(1.37 ±0.02),差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** CD133 作为肝癌干细胞的表面标志物之一,可能成为肝癌干细胞放射治疗增敏的靶点。

[关键词] CD133;肝癌干细胞;RNA 干扰;放射敏感性
[中图法分类号] R73-362; R730.55; R735.7 [文献标志码] A

RNAi targeting CD133 enhances radiosensitivity in CD133 positive liver cancer stem cells

Wang Yong[1], Tang Chuan[2], Lan Xi[1], Ran Xueqi[3], Zou Donglin[4], Cao Shu[1], Li Fang[1], Li Shaolin[1] ([1]Department of Radiation Medicine, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurology, Yongchuan Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 402160; [3]Department of Radiation Oncology, [4]Department of Gynecological Oncology, Chongqing Tumor Institute, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of CD133-downregulation on the radiosensitivity of CD133$^+$ HepG2 cancer stem cells (CSCs) in hepatocellular carcinoma. **Methods** Magnetic-activated cell sorting (MACS) was used to isolate CD133$^+$ and CD133$^-$ cells from HepG2 cells. Flow cytometry was used to detect the expression of CD133 before and after cells isolation. The NOD/SCID mice transplantation tumor experiments were performed to validate the cancer stem-like properties of sorted CD133$^+$ cells. Targeted silencing towards CD133 gene was performed, and the cells were divided into blank control group, negative-transfection group and positive-transfection group. RT-PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of CD133. Colony formation assay was applied to detect colony formation efficiency and survival rate after irradiation at different doses. Survival curve was drawn and radiobiology parameters D_0, Dq, N and SER (sensitive enhancement ratio) were counted. Flow cytometry was used to test cell cycle and apoptosis. **Results** Flow cytometry indicated that the expression rate of CD133 was (1.36 ± 0.20)% and (87.62 ± 1.92)% respectively before and after MACS isolation. When the obtained CD133$^+$ cells at a dose of 1×10^3/ml, subcutaneous tumor was found in the NOD/SCID mice after implantation. The expression levels of CD133 at mRNA and protein level were significantly decreased in positive-transfection group. After CD133-downregulation, the cells at G1 and S phase were decreased whereas those at G2 phase and apoptotic rate were increased significantly. Colony formation results showed that D_0, Dq, N and SF_2 were decreased while and SER was increased significantly in positive-transfection group ($P<0.05$). **Conclusion** CD133, as a marker of CSCs

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171365)
[通信作者] 李少林,电话:(023)68485060,E-mail:lishaolin@cqmu.edu.cn

in liver cancer, could be a target for radiosensitization in liver CSCs treatment.

[**Key words**] CD133; liver CSCs; RNA interference; radiosensitivity

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171365). Corresponding author: Li Shaolin, Tel: 86-23-68485060, E-mail: lishaolin@cqmu.edu.cn

肝癌生长迅速,恶性程度高,常伴有肝硬化且对放化疗耐受性差,因此预后极差。随着精确放疗的开展和普及,肝细胞的耐受剂量低于肝癌细胞的根治剂量得到很大程度的解决,放射治疗已经成为肝癌的重要治疗手段[1],但是肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)对射线的抵抗导致了放疗效果不满意。肿瘤干细胞是肿瘤细胞中少部分具有自我更新、无限增殖能力和多分化潜能的细胞亚群,是肿瘤的复发和转移的根源并表现出对常规放化疗的抵抗性[2-5]。最近的研究[6]发现在多种实体肿瘤中存在肿瘤干细胞,它们分别有各自不同的肿瘤干细胞表面标志物,其中人CD133是由PROM1基因编码的5次跨膜糖蛋白,其基因定位于人类的4号和2号染色体上。CD133在脑胶质瘤、结肠癌、恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、肝癌、肾癌等多种肿瘤的干细胞中表达[7-13]。结合本课题的前期实验成果,我们选择CD133作为肝癌干细胞的分选标志物。RNA干扰技术主要是利用具有同源性的双链RNA诱导靶基因转录后沉默,具有特异、高效等特点,是基因功能学研究的重要手段[14]。本课题靶向沉默肝癌干细胞CD133基因并进行X线照射,观察细胞生物特性及放射生物学参数的变化,评价其是否具有放射增敏作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

人肝癌细胞株HepG2(购自中科院上海细胞库);RPMI 1640培养基、新生胎牛血清(Gibco-BRL,美国);非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷小鼠(NOD/SCID)由重庆医科大学实验动物中心提供;MACS系统、CD133/2-PE流式抗体、CD133MicroBead Kit分离抗体、CD133/1(W6B3C1)pure Western抗体、FcR Blocking阻断剂、MouselgG2b-PE同型对照、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)及人白血病抑制因子(LIF)均购自德国MiltenyiBiotec公司;总RNA提取及RT-PCR试剂盒购自美国Santa Cruz公司;CD133和GADPH引物、CD133干扰慢病毒构建由长沙赢润生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 HepG2细胞株的培养与传代 HepG2细胞置于含12%胎牛血清的RPMI1640培养液,5% CO_2、37 ℃、饱和湿度的孵箱中培养,选取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.2 $CD133^+$ HepG2肝癌干细胞的分离与纯化培养 取对数生长期细胞10^8数量级,进行免疫磁珠分选,分选步骤严格按照MACS说明书操作:①细胞经PBS洗涤后,适量胰酶消化,buffer洗涤,重悬,300×*g*离心10 min,充分去上清。②300 μl buffer重悬细胞,加入100 μl受体阻断剂(FcR Blocking Reagent),紧接着加入100 μl CD133免疫磁珠(MicroBeads),充分混匀后4 ℃孵育30 min。③加入1~2 ml buffer清洗细胞,300×*g*离心10 min,充分去除上清液。④用buffer重悬细胞至500 μl。⑤放置好分选架、分选器、MS柱及滤器,向滤器中加入500 μl buffer润洗分选柱。⑥将先前准备好的细胞过柱,分别收集$CD133^-$细胞与$CD133^+$细胞并计数。将分选得到的$CD133^+$细胞培养在含有EGF 40 ng/ml、FGF 20 ng/ml、LIF 20 ng/ml的DMEM培养基中。

1.2.3 流式检测分选前后HepG2的CD133表达率 取分选前的HepG2细胞、分选后的$CD133^+$细胞,重悬细胞到1×10^7/80 μl buffer。加入20 μl FCR Blocking Reagent;加10 μl CD133/2抗体,充分混匀,避光冻存20 min(4~8 ℃);加入1~2 ml buffer/10^7个细胞,300×*g*离心10 min,用适量buffer液重悬细胞,用于流式检测。

1.2.4 克隆形成实验对比$CD133^+$细胞与$CD13^-$细胞克隆形成能力 采用梯度倍数稀释法将$CD133^+$细胞与$CD133^-$细胞稀释至1×10^4/ml,以1 000个细胞每孔分别接种于6孔板中,以后每3天换液,10~14 d后终止培养。弃去上清液,用PBS小心浸洗2次。加入快速Giemsa染液试剂一400 μl/孔,固定2 min。然后加入Giemsa染液试剂二800 μl/孔,染色8 min,然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。最后于普通光学显微镜下计数≥50个细胞的集落,并计算克隆形成率(plating efficiency, PE)。PE=集落数目/接种细胞数×100%。

1.2.5 NOD/SCID小鼠成瘤实验 将分选后的$CD133^-$、$CD133^+$细胞调整成1×10^2/200 μl、1×10^3/200 μl、1×10^4/200 μl,3个浓度分别接种到9只NOD/SCID小鼠两侧皮下。每个浓度3只,左侧接种$CD133^-$细胞,右侧种植$CD133^+$细胞。观察5周,每周观察两组小鼠的成瘤和生长情况,测量肿瘤长轴,以直径≥0.5 cm为种植瘤成功。如果小鼠死亡或肿瘤直径<0.5 cm则认为种植失败。

1.2.6 慢病毒感染$CD133^+$细胞 取无血清培养的$CD133^+$-HepG2细胞接种于6孔板中,每孔约1.0×10^5个,此时将其分为空白组、阴性感染组、阳性感染组,其中阴性感染组与阳性感染组按预实验得出的感染复数(MOI值)20分别接种携带无关序列(NC)组和CD133-shRNA序列的慢病毒2×10^6 UT/孔,空白组不做任何处理。24 h后换液,培养4 d后在倒置荧光显微镜下绿色荧光蛋白(GFP)的表达。

1.2.7 RT-PCR检测各组细胞CD133基因的表达 分别收集3组细胞1×10^6个细胞,并提取总RNA,取2 μl总RNA为模板逆转录为cDNA再进行PCR扩增。CD133上游引物:5′-GATTCATACTGGTGGCTGGGTGG-3′,下游引物:5′-GCAGGTGAA-

GAGTGCCGTAAGT-3′,产物长度为 436 bp。内参 GAPDH 上游引物:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游引物:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,产物长度为 452 bp。扩增条件为预变性 94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 共 30 个循环;72 ℃ 5 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果通过凝胶成像系统进行分析。

1.2.8 Western blot 检测各组细胞 CD133 蛋白表达 收集两组细胞 10^6 个,加入细胞裂解液提取细胞总蛋白,取 40 μg 总蛋白进行变性 SDS-PAGE 电泳分离,然后电转至 PVDF 膜,加入 CD133 一抗封闭过夜,将辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠/兔 IgG(1∶1 000)作为第二抗加入封闭剂 37 ℃孵育 1 h,用 TBS 缓冲液洗膜 4 次。取 ECL 试剂盒 A 液、B 液等体积混合,均匀滴于膜上,作用 5 min。在暗室中曝光、显影、定影,β-actin 作为内参。

1.2.9 克隆形成实验检测各组细胞放射敏感性 采用梯度倍数稀释法将 $CD133^+$ 细胞稀释至 1×10^4/ml,根据照射剂量的增加接种不同的细胞数,继续置于孵箱内无菌孵育。过夜后感染,感染后 24 h 各组给予不同放射剂量(0、2、4、6、8、10 Gy)照射。照射条件:采用医用直线加速器(Varian 23EX),6MV-X 射线,源皮距照射 SSD = 100 cm,剂量率 300 cGy/min,机架角 180°,6 孔板下垫 1 cm 厚组织垫(以消减建成效应影响),照射野 20 cm × 20 cm。以后每 3 天换液,10 ~ 14 d 后终止培养。弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 2 次。加入快速 Giemsa 染液试剂一 400 μl/孔,固定 2 min。然后加入 Giemsa 染液试剂二 800 μl/孔,染色 8 min,然后用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。最后于普通光学显微镜下计数≥50 个细胞的集落,并计算 PE(PE = 克隆数目/接种细胞数 × 100%)以及存活分数(survival fraction,SF),SF = 受照射细胞 PE/对照组细胞 PE × 100%。

1.2.10 计算放射生物学参数 以 3 次照射的存活分数均值进行分析,应用 Excel 绘制出各组细胞的剂量存活曲线。根据多靶单击模型 $SF = 1-(1-e^{-D/D0})^N$,运用 SigmaPlot 11.0 软件求出 D_0、Dq、N 和 SF_2(survival fraction at 2 Gy),其中 $Dq = D_0 \times \ln(N)$。计算放射增敏比(sensitizing enhancement ratio,SER),SER = 干扰前组 D_0/干扰后组 D_0。

1.2.11 流式检测感染前后细胞周期及凋亡变化 取无血清培养的各组细胞 0.25% 胰酶消化离心制成单细胞悬液后流式检测细胞凋亡,或经 70% 无水乙醇固定,4 ℃过夜,流式细胞仪检测细胞周期。

1.3 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,组间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 HepG2 细胞分选前后的 CD133 的表达率

流式细胞术检测未分选的 HepG2 细胞中 $CD133^+$ 的表达率为(1.36 ± 0.20)%,通过免疫磁珠分选后 $CD133^+$ 表达率上升到(87.62 ± 1.92)%。

2.2 无血清纯化培养分选得到的 $CD133^+$-HepG2 细胞

$CD133^+$ 细胞在含生长因子的无血清培养基中成球生长,而 $CD133^-$ 细胞在相同条件下出现形态异常最后逐渐死亡,以此纯化分选得到的 $CD133^+$-HepG2 细胞。见图 1。

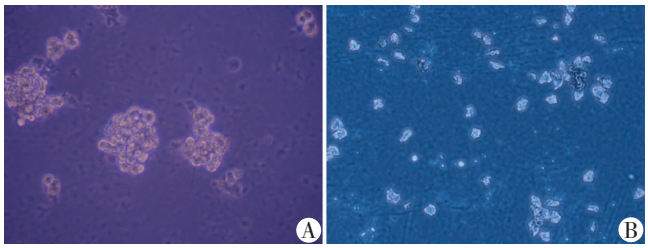


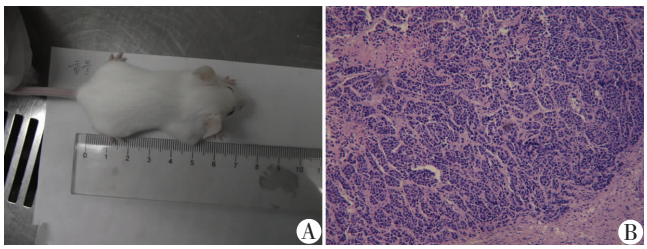
图 1 $CD133^+$- HepG2 细胞(A)和 $CD133^-$- HepG2 细胞(B)在无血清培养液中生长情况 (×100)

2.3 $CD133^+$ 细胞与 $CD13^-$ 细胞克隆形成能力

$CD133^+$ 细胞比 $CD133^-$ 细胞具有更强的克隆形成能力,其克隆形成率为(35.03 ± 2.35)%,而 $CD133^-$ 细胞克隆形成率仅为(6.4 ± 0.72)%。两者差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 $CD133^+$ 细胞与 $CD13^-$ 细胞 NOD/SCID 小鼠体内成瘤能力

为了验证 $CD133^+$ 细胞的干性特点,我们对比了 $CD133^+$ 细胞与 $CD133^-$ 细胞在 6 周龄 NOD / SCID 小鼠皮下成瘤能力,结果显示 $CD133^+$ 细胞在 1×10^3/ml 细胞浓度下即有 1 只小鼠形成皮下移植瘤,1×10^4/ml 细胞浓度下 3 只小鼠均可形成移植瘤,而在相同情况下 $CD133^-$ 细胞均不能形成移植瘤。见图 2。

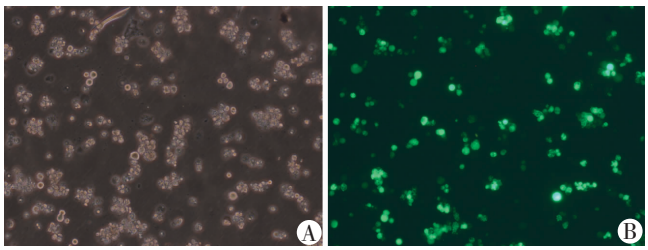


A:成瘤小鼠大体观察;B:移植瘤组织病理学观察 (HE ×200)

图 2 $CD133^+$-HepG2 细胞在 NOD/SCID 小鼠皮下成瘤实验观察

2.5 倒置荧光显微镜观察慢病毒的感染效率

接种慢病毒后 3 d,在倒置荧光显微镜观察到 GFP 的表达,第 5 天达到高峰,其感染阳性效率达 80% 以上。见图 3。



A:普通光学显微镜;B:倒置荧光显微镜

图 3 不同显微镜观察感染慢病毒 5 d 后 $CD133^+$-HepG2 细胞慢病毒感染情况 (×40)

2.6 感染后各组 CD133 mRNA 及 CD133 蛋白的表达

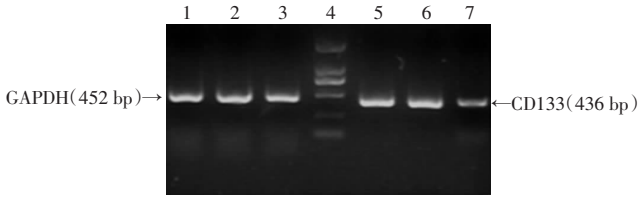
为了验证其沉默效率,我们对感染后各组进行了 RT-PCR 及 Western blot 检测,结果发现阳性感染组 CD133 mRNA 及 CD133

表1 各组细胞克隆形成率及存活分数($n=3$)

照射剂量(Gy)	接种细胞数(孔)	空白组		阴性感染组		阳性感染组	
		PE(%)	SF(%)	PE(%)	SF(%)	PE(%)	SF(%)
0	200	36.00±1.32	100.00±3.67	36.17±4.07	100.00±11.31	17.00±3.12	100.00±18.37
2	300	33.00±0.88	91.67±2.45	32.11±3.01	89.20±8.35	12.67±1.33	74.51±7.84[a]
4	400	26.08±0.14	72.45±0.40	25.83±2.52	71.76±6.99	8.16±1.04	48.04±6.12[b]
6	500	19.33±0.42	53.70±1.16	19.00±0.60	52.78±1.67	4.27±1.36	25.10±8.01[b]
8	600	12.28±0.67	34.10±1.87	11.94±1.50	33.18±4.18	1.56±0.59	9.15±3.44[b]
10	700	5.33±0.68	14.81±1.88	4.90±1.15	13.62±3.21	0.38±0.22	2.24±1.28[b]

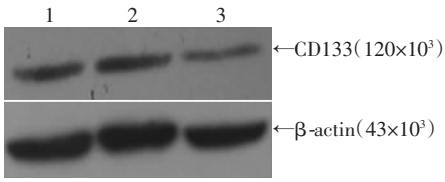
PE:克隆形成率;SF:细胞存活分数;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白组和阴性感染组比较

蛋白表达量均明显下调。阳性感染组 CD133 mRNA/GAPDH(0.531 7±0.152 7)明显低于空白组(1.134 2±0.405 7)与阴性感染组(1.065 5±0.343 4)($P<0.01$)。阳性感染组 CD133 蛋白表达量/β-actin(0.249 7±0.077 5)亦明显低于空白组(0.409 4±0.252 9)与阴性感染组(0.493 2±0.220 1)($P<0.01$)。见图4、5。



1,5:空白组;2,6:阴性感染组;3,7:阳性感染组;4:标准

图4 RT-PCR 检测各组 CD133 mRNA 的表达



1:空白组;2:阴性感染组;3:阳性感染组

图5 Western blot 检测各组 CD133 蛋白的表达

2.7 各组放射生物学参数的变化

各组细胞克隆形成率及存活分数见表1。根据多靶单击模型计算出各组 SF_2、D_0、Dq 及 N 值,结果表明,阳性感染组的 PE、SF、SF_2、D_0、Dq 及 N 值均较空白组和阴性感染组明显减小,其放射增敏比(SER)为(1.37±0.02),差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表2。

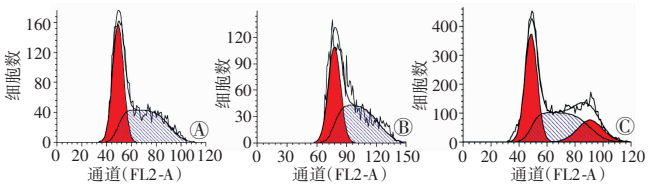
表2 各组细胞放射生物学参数比较($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	SF_2	D_0(Gy)	Dq(Gy)	N
空白组	0.916 7±0.024 5	3.681 7±0.081 1	4.340 4±0.065 6	3.251 3±0.026 8
阴性感染组	0.892 0±0.083 5	3.751 7±0.498 3	4.047 8±0.968 0	3.210 0±1.247 8
阳性感染组	0.745 1±0.078 4[a]	2.710 3±0.102 8[b]	2.249 6±0.595 3[b]	2.313 0±0.433 0[a]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白组和阴性感染组比较

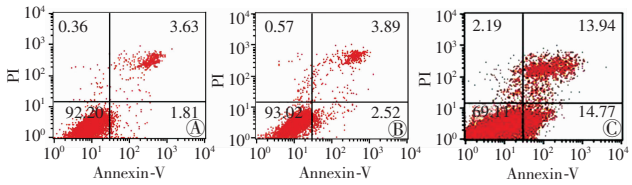
2.8 沉默 CD133 后细胞周期及凋亡的变化

为了探讨其增敏的可能机制,我们使用流式细胞术检测了沉默 CD133 后周期及凋亡的变化,结果发现阳性感染组其 S 期明显减少 G_2 期增多,细胞凋亡也明显增加($P<0.05$)。见图6、7。



A:空白组;B:阴性感染组;C:阳性感染组

图6 流式细胞术检测各组细胞周期的变化



A:空白组;B:阴性感染组;C:阳性感染组

图7 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况

3 讨论

肝癌由于其发病隐匿,对常规放化疗耐受性差等原因导致其预后极差,素有“癌中之王”的称号。而我国正是肝癌的高发国家,全球一半的肝癌患者分布在中国,在肿瘤相关死亡中位居第二[15]。因此寻求积极有效的治疗手段非常重要。放射治疗是恶性肿瘤治疗的重要组成部分,以往由于正常肝脏组织对射线的耐受极差,放射治疗容易导致急性肝坏死等严重并发症的发生,导致选择放疗的肝癌患者相对较少。随着三维适形放射治疗、调强放射治疗、立体定向放射治疗等精确放射治疗的广泛开展和普及,使正常肝脏组织受到射线照射的剂量大大减少,肝癌的放射治疗日益重要。但由于 CSCs 具有对常规放化疗抵抗的特点,常常导致治疗后局部复发和远处转移[16-18],因此如何克服 LCSCs 对射线的抵抗成为肝癌放射治疗的一个重要突破口。那么作为肿瘤干细胞的表面标志物,CD133 能否作为肿瘤干细胞治疗的靶点,是否对肿瘤干细胞放射敏感性产生影响? Rappa 等[19]通过 shRNA 下调 CD133 及针对 CD133 蛋白两个不同表位的单抗,证实 CD133 影响转移性黑色素瘤肿瘤干细胞的重要生物学特性,是其重要的分子治疗靶点。Smith 等[20]利

用 CD133 抗体偶联细胞毒性药物治疗白血病和胃癌;这些都为针对 CD133 靶向治疗的方法提供了有力的支持,也为肝癌干细胞靶向 CD133 的治疗打下了良好的基础。

本实验以肝癌干细胞表面标志物 CD133 为沉默靶点,观察沉默 CD133 后其放射敏感性的变化。首先通过免疫磁珠分选我们得到纯度较高的 $CD133^+$ 细胞,流式细胞术鉴定其阳性表达率为(87.62 ± 1.92)%。随后我们通过 NOD/SCID 小鼠成瘤实验及克隆形成实验验证了 $CD133^+$ 细胞的干性特点。然后分别感染携带干扰序列的阳性慢病毒及无关序列的阴性慢病毒。5 d 后倒置荧光显微镜下观察到绿色荧光蛋白(GFP)的表达,其阳性感染效率达 80% 以上。RT-PCR 和 Western blot 结果显示阳性感染组能显著下调 CD133 的表达。随后我们对各实验组进行不同剂量放射后的平板克隆实验,结果发现阳性感染组的细胞存活曲线明显下移,且放射生物学参数 D_0、Dq 及 N 值也明显减小,其 SER 为(1.37 ± 0.02)。最后我们对其可能的增敏机制进行了初步探讨,通过流式细胞术检测各组细胞周期及凋亡的变化,我们发现阳性感染组 G_1 其及 S 期减少 G_2 期明显增多,细胞凋亡率也明显增加。大量的研究表明细胞周期及凋亡与放射敏感性具有重要关系:S 期尤其是晚 S 期细胞对射线是最耐受的而 G_2/M 期对射线是最敏感的[21-22],而随着细胞凋亡的增加放射敏感性也随之增加[23]。这也对沉默 CD133 增强放射敏感性作出了合理的解释。

综上所述,CD133 作为肝癌干细胞表面标志物之一,对肝癌干细胞干性的维持起着至关重要的作用。沉默 CD133 基因后显著提高了肝癌干细胞对射线的敏感性,提示 CD133 可作为肝癌干细胞放射治疗增敏的有效靶点。

参考文献:

[1] 黎功. 肝癌放疗研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(7): 516 - 519.

[2] Rosen J M, Jordan C T. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm[J]. Science, 2009, 324(5935): 1670 - 1673.

[3] Zhang Q, Shi S, Yen Y, *et al*. A subpopulation of CD133 + cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy[J]. Cancer Lett, 2010, 289(2): 151 - 160.

[4] Winquist R J, Boucher D M, Wood M, *et al*. Targeting cancer stem cells for more effective therapies: Taking out cancer's locomotive engine [J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78 (4): 326 - 334.

[5] Jin Y, Bin Z Q, Qiang H, *et al*. ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(10): 1369 - 1376.

[6] Shmelkov S V, Jun L, St-Clair R, *et al*. Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133 [J]. Blood, 2004, 103(6): 2055 - 2061.

[7] Singh S K, Hawkins C, Clarke I D, *et al*. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. Nature, 2004, 432(7015): 396 - 401.

[8] 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.

[9] Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, *et al*. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(5): 935 - 946.

[10] 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.

[11] Olempska M, Eisenach P A, Ammerpohl O, *et al*. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007, 6(1): 92 - 97.

[12] Yin S, Li J, Hu C, *et al*. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity [J]. Int J Cancer, 2007, 120(7): 1444 - 1450.

[13] Bruno S, Bussolati B, Grange C, *et al*. $CD133^+$ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis[J]. Am J Pathol, 2006, 169 (6): 2223 - 2235.

[14] Aagaard L, Rossi J J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(2/3): 75 - 86.

[15] Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening[J]. Semin Liver Dis, 2005, 25(2) : 143 - 154.

[16] Rich J N. Cancer stem cells in radiation resistance [J]. Cancer Res, 2007, 67(19): 8980 - 8984.

[17] Bao S, Wu Q, McLendon R E, *et al*. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response [J]. Nature, 2006, 444(7120): 756 - 760.

[18] Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(7): 545 - 554.

[19] Rappa G, Fodstad O, Lorico A. The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma[J]. Stem Cells, 2008, 26 (12): 3008 - 3017.

[20] Smith L M, Nesterova A, Ryan M C, *et al*. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers[J]. Br J Cancer, 2008, 99(1): 100 - 109.

[21] Dobrowsky W, Dobrowsky E, Wilson G D. *In vivo* cell kinetic measurements in a randomized trial of continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy with or without mitomycin C in head-and-neck cancer[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 55(3): 576 - 582.

[22] 谷铣之, 殷蔚伯, 余子豪, 等. 肿瘤放射治疗学[M]. 4 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008: 239.

[23] Ranney M K, Ahmed I S, Potts K R, *et al*. Multiple pathways regulating the anti - apoptotic protein clusterin in breast cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772(9): 1103 - 1111.

(**收稿**:2012-07-30;**修回**:2012-09-16)

(编辑 汪勤俭)