论著

文章编号:1000-5404(2013)05-0394-06

Piwil2 重编程人成纤维细胞形成肿瘤干细胞的初步研究

吴 鑫,何大维,张永波,蔡春红,魏光辉 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地)

[摘要] **目的** 初步观察精原干细胞自我更新基因 Piwil2 重编程人成纤维细胞的细胞形态及功能特征变化,建立 Piwil2 调控肿瘤干细胞发生过程的细胞实验模型。**方法** 将携带 Piwil2-GFP 标记和空载目的基因 GFP 标记的慢病毒载体分别感染原代培养的小儿包皮成纤维细胞,筛选建立稳定表达 Piwil2-GFP 和 GFP 成纤维细胞系,观察细胞形态变化及肿瘤球形成过程,分析细胞染色体核型,进行裸鼠体内成瘤实验,RT-PCR、免疫组织化学进一步鉴定重编程后细胞的干细胞特征及三胚层分化的相关标志物。**结果** 转染后第5天,Piwil2-GFP 成纤维细胞开始由长梭形逐渐转变为圆形,第14天出现集落样生长状态,挑选集落重悬后培养形成类似"肿瘤球"样克隆,其细胞染色体核型呈超二倍体的异质性改变。"肿瘤球"样克隆裸鼠体内移植2周时100%形成肿瘤,肿瘤组织学及免疫组化鉴定为表达多种外胚层、中胚层及内胚层肿瘤标志物的恶性肿瘤,RT-PCR 显示细胞及裸鼠肿瘤表达干细胞多能基因 Oct-4、Nanog、Sox2,以及三胚层特征标志物。**结论** Piwil2 重编程人成纤维细胞后的细胞具有干细胞及多潜能分化特性,以及显著的肿瘤细胞异质特性。

[关键词] Piwil2;成纤维细胞;肿瘤干细胞

[中图法分类号] R329.24; R394.2; R730.231 [文献标志码] A

Preliminary study of Piwil2 reprogramming human fibroblasts into cancer stem cells

Wu Xin, He Dawei, Zhang Yongbo, Cai Chunhong, Wei Guanghui (Department of Urology, Key Laboratory of Child Development and Disorder of Ministry of Education; Key Laboratory of Pediatrics of Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the cell morphology and functional characteristics of human fibroblasts after reprogrammed by spermatogonial stem cell self-renewal gene Piwil2, and to construct an experimental cell model for studying cancer stem cells (CSC). **Methods** Lentiviral vectors carrying Piwil2-GFP and GFP were transferred into primary culture of human foreskin fibroblasts to establish the cell lines stably expressing Piwil2-GFP fusion protein and GFP after selected by puromycin. Cells morphological changes and formation of tumor spheroids were observed, chromosomal karyotypes were analyzed and tumor formation assay was operated in nude mice. The tumor characteristics, stem cell characteristics and the markers of three germ layers were identified by RT-PCR and immunohistochemistry. **Results** The morphology of Piwil2-GFP fibroblasts became round and smaller at the 5th day after transfection, and turned to be colony-like growth at the 14th day after transfection. The selected colony was resuspended in culture and appeared to form similar tumor spheroids. The cell karyotype showed hyperdiploid heterogeneity, and all the tumor spheroids-like colonies formed tumor after transplanted into nude mice for 2 weeks. It was identified by histology and immunohistochemistry assays as a malignant tumor that expressed the markers of three germ layers. RT-PCR showed that the cells and tumors in nude mice expressed stem cell pluripotent genes such as Oct-4, Nanog, Sox2 and the markers of three germ layers. **Conclusion** According to the cell morphology, molecular phenotype of stem cells and tumorigenic cell heterogeneity after Piwil2 reprogramming, the Piwil2-GFP fibroblasts seems to have stem cell and pluripotent differentiation characteristics and significant tumor cell heterogeneity. Therefore, fibroblasts after Piwil2

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170556);重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5112)

[通信作者] 何大维,电话:(023)63633394,E-mail:dw.he@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.1740.013.html(2012-12-19)

reprogramming may have CSC functionality, and can be used as a model for studying the process and mechanism of CSC occurrence.

[**Key words**] Piwil2; fibroblasts; cancer stem cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170556), and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5112). Corresponding author: He Dawei, Tel: 86-23-63633394, E-mail: dw.he@163.com

恶性肿瘤对放化疗不敏感或抵抗,导致疗效不满意或复发转移,是恶性肿瘤生存率低的主要原因。理论研究推测,其很可能与肿瘤中存在极少量的"肿瘤干细胞(cancer stem cell,CSC)"有关[1-2]。CSC具有自我更新与分化能力,但是,较正常干细胞存在染色体缺失、增加等核型异常,提示CSC已经从其正常来源的细胞发生遗传转变,具有恶性增生和分化特性[3]。只有建立研究CSC起源、发生、发展的模型,才能阐明其遗传机制、恶性转化路径,发掘针对CSC的治疗新靶点,从而为临床根治肿瘤展示新的希望。2006年,先后有研究小组用Oct-4、Sox2、Nanog、Klf4(C-Myc)4种基因导入人成纤维细胞体外重编程为人诱导多潜能干细胞(iPS),具有多向分化潜能和自我更新特征、致瘤性[4]。2008年,Liu等[5]提出iPS细胞的诱导过程和肿瘤发生过程非常相似。近年研究发现,维持生殖细胞发育起关键作用的微小RNA结合蛋白Piwl2,在人睾丸及多种肿瘤细胞中表达,包括结肠癌、乳腺癌、前列腺癌等,而在正常体细胞、胚胎干细胞中均不表达,提示Piwil2可能是前肿瘤干细胞(pCSC)的分子标志物,在肿瘤发生起源过程中可能具有重要的调控作用[6-9]。因此本实验通过将携带精原干细胞自我更新基因Piwil2的慢病毒载体转染人成纤维细胞,初步观察重编程过程中正常成纤维细胞的生物学行为变化,建立Piwil2调控肿瘤干细胞发生过程的细胞实验模型。

1 材料与方法

1.1 主要材料

SPF级BALB/c裸鼠4只,4周龄,体质量12.5~13.5 g,雌性,购于重庆医科大学实验动物中心,饲养于重庆医科大学附属儿童医院SPF级动物中心。人包皮成纤维细胞来源于6岁儿童包皮环切术的包皮组织(签署知情同意书),并经重庆医科大学附属儿童医院医学伦理委员会批准。Piwil2-GFP和绿色荧光蛋白(GFP)空载基因对照质粒构建,病毒包装均由威斯滕公司完成,培养主要试剂包括DMEM(Gibco公司)、胎牛血清(HyClone公司)、嘌呤霉素(Sigma公司)、LIF(Peprotech公司)。抗体主要有Piwil2、Oct-4、Nestin(Santa公司),CD117、SYD、MyoD1、Des、PLAP、Vimentin、CgA、AFP、EMA、CK、LCA、SMA(迈新生物公司),二抗(浓缩型UltraSensitive S-P试剂盒,中杉金桥公司),RNA快速提取试剂盒、Taq PCR Master Mix(百泰克公司),逆转录试剂盒(TaKaRa公司)。

1.2 正常人成纤维细胞分离培养及实验分组

无菌收取包皮环切术后的包皮外板组织,参照Rozenchan等[10]的方法分离成纤维细胞(FB细胞),将原代FB细胞加10% FBS的DMEM置于37 ℃,5% CO_2孵箱中培养。培养12 d的第5代FB细胞按照如下分组用于重编程实验:实验组为转染Piwil2-GFP基因FB细胞组,空载对照组为转染GFP基因的FB细胞组,正常对照组为未转染任何基因的FB细胞组。

1.3 Piwil2基因重编程人成纤维细胞

培养12 d的第5代FB细胞,按照分组分别以3×10^4/mL接种于24孔板内,37 ℃,5% CO_2培养24 h,40倍光镜下观察细胞密度约70%。弃去培养液,实验组分别加入1 μL Piwil2-GFP病毒原液,空载对照组分别加入1 μL GFP病毒原液,正常对照组分别加入1 μL PBS,各组均加入1%凝聚胺,37 ℃ 5% CO_2培养8 h后换液,10%胎牛血清的DMEM继续培养,48 h后荧光显微镜观察转染效果,并以1 μg/mL嘌呤霉素筛选2周[11],1 000 U/mL LIF抑制其分化[12],观察细胞形态学变化。

1.4 肿瘤球样集落培养

从转染后14 d的Piwil2细胞集落中随机挑选4个Piwil2重编程成纤维细胞集落,分别消化成单细胞传代后培养,挑选"肿瘤球"样集落用于裸鼠体内成瘤实验[13],提取剩余肿瘤球样克隆RNA用于RT-PCR鉴定干细胞分子表型及三胚层表型特征。同时分别提取转染后第20天空载对照组和正常对照组的RNA作为对照(参照总RNA快速提取试剂盒说明书)。

1.5 染色体核型分析

分别取转染后15 d第6代(P6)对数期生长的实验组Piwil2-GFP FB细胞,空载对照组GFP-FB细胞和正常对照组的FB细胞,按细胞核型分析标准步骤进行操作[14],结果由重庆医科大学附属儿童医院分子诊断中心判定。

1.6 体内致瘤实验

将4只4周龄裸鼠左右两侧前肢腋下注射细胞观察成瘤[15-16],共8侧。4只右侧前肢腋下部位分别注射实验组选的4个"肿瘤球"样集落细胞,2只左侧前肢腋下部位注射空载对照组细胞,2只左侧前肢腋下部位注射正常对照组细胞。取转染后18 d对数期生长的GFP-Piwil2 FB细胞、GFP-FB细胞、FB细胞,0.25%胰酶分别消化,重悬后调整计数为1×10^7/mL,抽取单细胞悬液200 μL,参照文献[15-16]方法分别接种于裸鼠的相应部位并做好标记。脱颈处死成瘤后第5周裸鼠,收集肿瘤标本,一部分用于提取总RNA,用于RT-PCR鉴定肿瘤细胞的干细胞分子表型及多胚层分化特征;另一部分10%中性甲醛固定,脱水,石蜡包埋,用于免疫组化检测干细胞标志物及常用多

胚层标志物。

1.7 RT-PCR检测

按照RNA反转录试剂盒说明书,将总RNA逆转录为cDNA,并作为模板进行半定量PCR检测,反应条件为95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,58~65 ℃ 45 s,30个循环,72 ℃ 10 min。

1.8 免疫组织化学染色观察

石蜡包埋标本连续切片,切片厚4 μm。免疫组织化学染色采用S-P两步法,加一抗Nestin(1∶200)、Piwil2(1∶200)、Oct-4(1∶200)、CD117、SYD、MyoD1、Des、PLAP、Vimentin、CgA、AFP、EMA、CK、LCA、SMA(工作液)4 ℃冰箱过夜孵育,滴加二抗工作液(按说明书操作),DAB显色,苏木精复染。PBS代替一抗作为阴性对照。显微镜观察免疫组化结果,棕黄色为阳性表达,定性观察各抗体在肿瘤标本中的表达情况。

2 结果

2.1 Piwil2-GFP重编程FB细胞的形态学

传代后FB细胞呈长梭型,核卵圆形居中(图1)。转染48 h,荧光显微镜观察转染空载对照组和实验组细胞中有部分表达荧光的细胞,两组表达绿色荧光的细胞均超过70%(图2)。转染5 d,Piwil2-GFP FB组部分细胞体积变小,形态由长梭型逐渐变为圆形(图3A、B)。转染10 d,Piwil2-GFP FB细胞形态基本由长梭形完全转变为圆形(图3C、D)。第14天,细胞出现集落样生长(图3E、F),挑取培养的克隆重悬后培养至第3天,形成类似肿瘤球样的圆形克隆(图4),挑选的单个子代克隆(图5),而空载对照组和正常对照组细胞形态依然为长梭型,均无"肿瘤球"样集落形成。

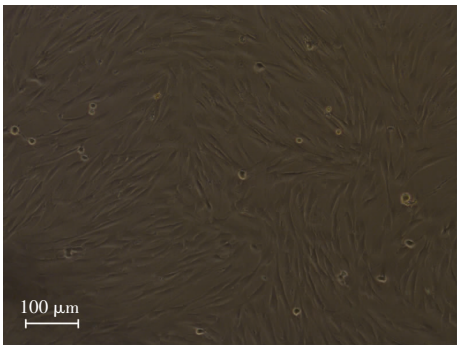
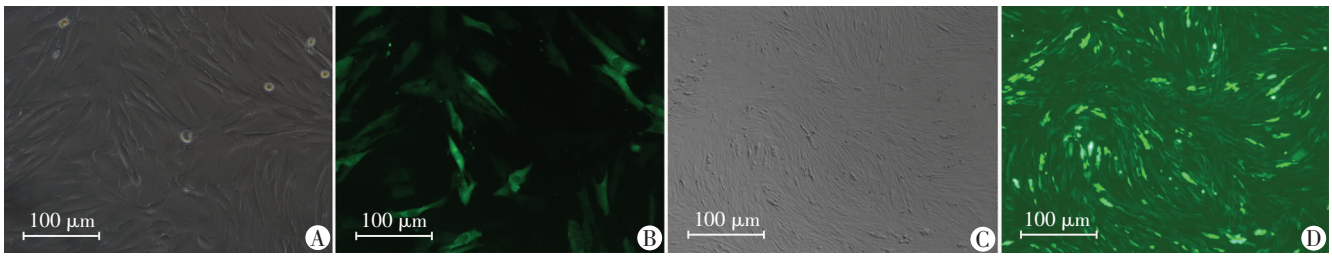
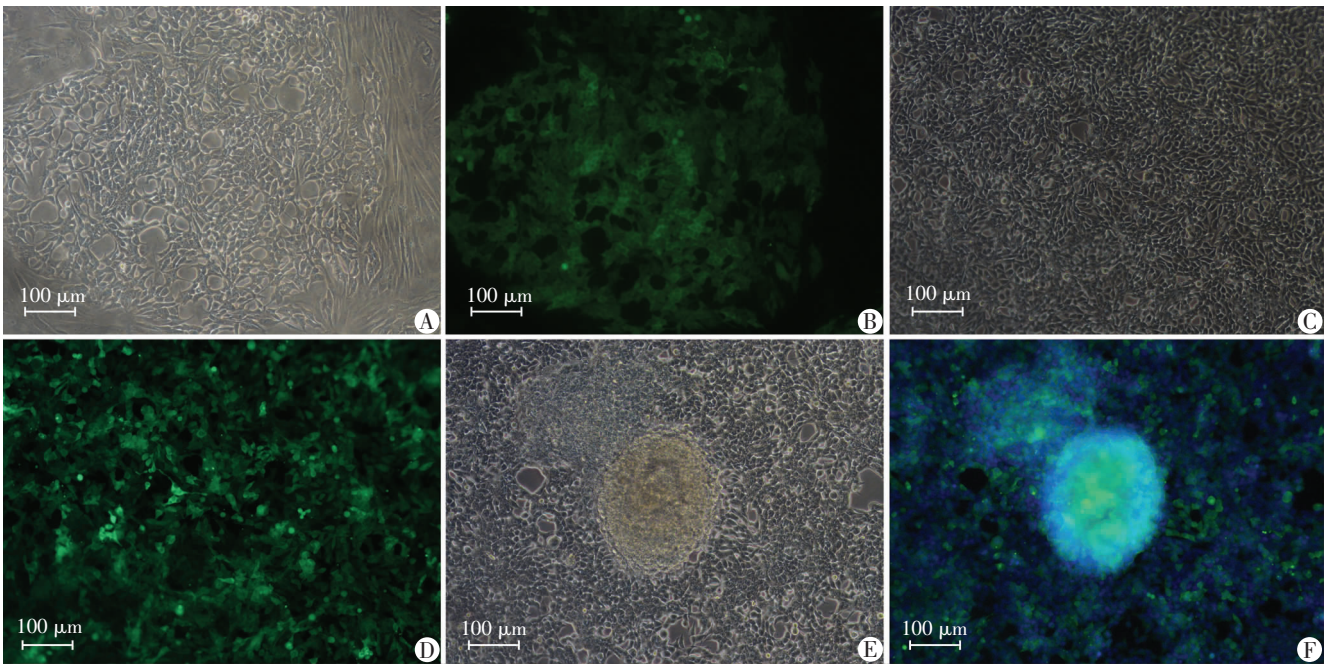


图1 光镜观察第5代原代包皮成纤维细胞



A:GFP-FB细胞光镜下形态;B:GFP-FB细胞荧光下形态;C:Piwil2-GFP FB细胞光镜下形态;D:Piwil2-GFP FB荧光显微镜下形态

图2 转染后48 h空载基因GFP-FB及Piwil2-GFP FB细胞形态变化



A、B:转染后5 d;C、D:转染后10 d;E、F:转染后14 d;A、C、E:光镜;B、D、F:Hoechst染色后荧光显微镜

图3 转染后5、10、14 d Piwil2-GFP FB细胞形态变化

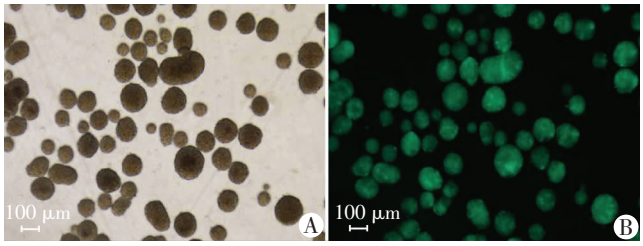


图 4　光镜(A)与荧光显微镜(B)观察克隆重悬后培养至第 3 天 Piwil2-GFP FB 细胞肿瘤球样克隆形态变化

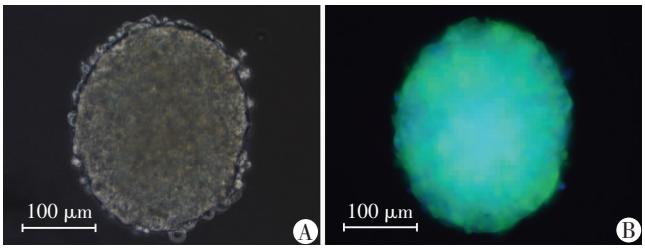
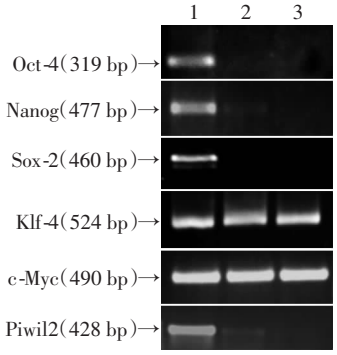


图 5　光镜(A)与荧光显微镜(B)观察培养的单个子代肿瘤球样克隆

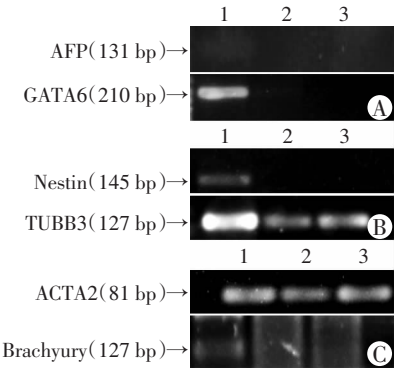
2.2　重编程后 FB 细胞表达干细胞和三胚层分化相关分子特性

RT-PCR 检测 Piwil2-GFP FB 细胞、GFP-FB 细胞、FB 细胞的干细胞分子表型指标，Piwil2-GFP FB 细胞和裸鼠肿瘤过表达 Piwil2，表达 iPS 相关干细胞转录因子 Oct-4、Sox-2、Nanog、Klf-4、c-Myc(图 6)，表达三胚层分化相关基因(图 7)。



1：Piwil2-GFP FB "肿瘤样"集落；2：GFP-FB 细胞组；3：FB 细胞组

图 6　体外培养的 Piwil2-GFP FB "肿瘤球"样集落、GFP-FB 细胞、正常成纤维细胞干细胞标志物 mRNA 扩增结果



1：Piwil2-GFP FB "肿瘤样"集落；2：GFP-FB 细胞组；3：FB 细胞组
A：内胚层；B：外胚层；C：中胚层

图 7　体外培养的 Piwil2-GFP FB "肿瘤球"样集落、GFP-FB 细胞、正常成纤维细胞表达三胚层标记物 mRNA 扩增结果

2.3　重编程后 FB 细胞染色体异质性

染色体核型结果显示 Piwil2-GFP FB 细胞染色体异常，分别为 67～70 条的超二倍体结构，可见多倍体染色体(图 8)。空载对照组和正常对照组细胞染色体均为正常染色核型。

2.4　重编程后 FB 细胞致瘤性

各组裸鼠皮下接种细胞悬液 4～6 h 后，注射部位皮丘消失。7～10 d 后，4 只裸鼠右侧前肢注射 Piwil2-GFP FB 细胞皮下均出现新的结节状物，皮下有滑动感。接种后 2 周，Piwil2-GFP FB 细胞 100% 形成肿块，体积均超过 100 mm^3，成瘤 5 周时，肿瘤有包膜，质地较硬，灰白色，局部暗红色，剖面鱼肉状，内部有坏死。HE 染色大量肿瘤细胞细胞核增大畸形，核质比高。细胞质相对较少，细胞分化程度低(图 9)。而空载对照组和正常对照组皮下均无肿块产生。

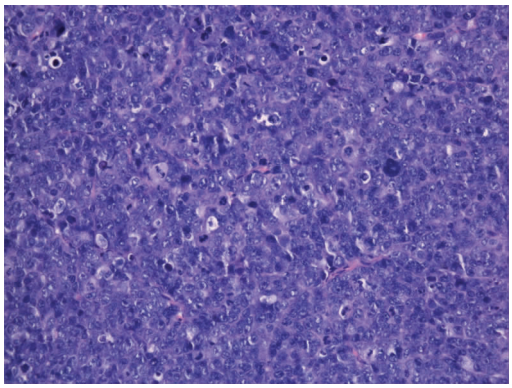


图 9　HE 染色观察裸鼠肿瘤组织病理变化　(×200)

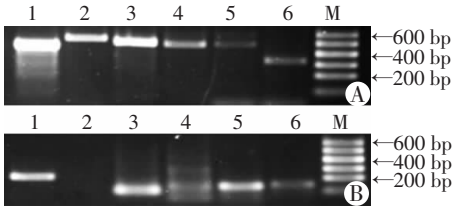


A：70 条；B：67 条；C：67 条；D：68 条；E：67 条

图 8　Piwil2-GFP FB 细胞染色体核型

2.5 重编程后FB形成肿瘤的多胚层分化特性

RT-PCR检测裸鼠肿瘤的干细胞指标及各胚层指标，Piwil2-GFP FB细胞克隆在裸鼠肿瘤中高表达Piwil2(图10)，同时仍表达体外肿瘤球样克隆所表达的干细胞标记物Oct-4、Sox-2、Nanog、Klf-4、c-Myc，并表达内胚层GATA-6，中胚层Brabury、CATA-4，外胚层Nestin、Tubb3组织特征的标志物。但是，不表达内胚层AFP。免疫组化检测裸鼠肿瘤组织常规肿瘤鉴定指标显示，Piwil2-GFP FB细胞在体内成瘤后，除了仍高表达Piwil2蛋白(+++)，还表达外胚层：巢蛋白(Nestin，++)，角蛋白(CK，+)，突触素(SYN，+)，嗜铬素(CgA，-)，上皮膜抗原(EMA，-)。中胚层：中间微丝蛋白(Vimentin，+)，结蛋白(Des，+)，胎盘碱性磷酸酶(PLAP，+)，小儿横纹肌生肌因子(MyoD1，-)，白细胞共同抗原(LCA，-)，平滑肌肌动蛋白(SMA，-)。内胚层：甲胎蛋白(AFP，-)。见图11。



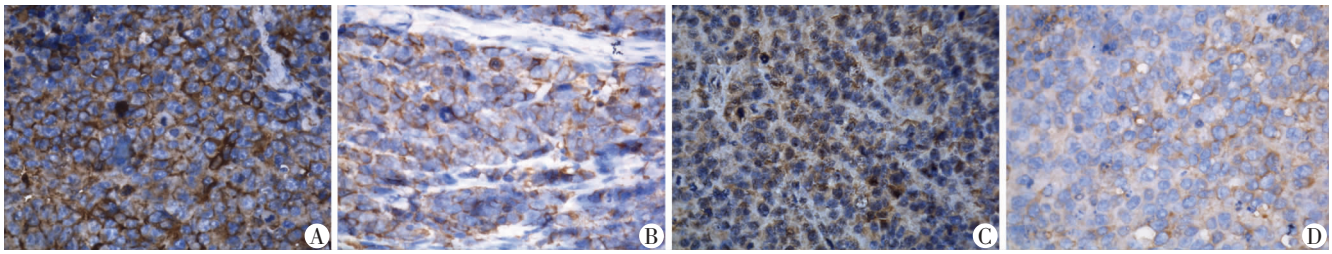
1：Piwil2(428 bp)；2：Klf4(524 bp)；3：C-Myc(490 bp)；4：Nanog(477 bp)；5：Sox2(460 bp)；6：Oct-4(319 bp)；M：标准

1：GATA6(210 bp)；2：AFP(131 bp)；3：ACTA2(81 bp)；4：Brachyury(146 bp)；5：Tubb3(127 bp)；6：Nestin(145 bp)；M：标准

图10 裸鼠体内肿瘤表达干细胞(A)及三胚层(B)相关标记物mRNA扩增结果

3 讨论

研究[7]发现，肿瘤发生过程与iPS细胞重编程过程之间存在着重叠，这更加证实iPS细胞的诱导过程和肿瘤发生过程非常相似的观点。但是iPS重编程效率低，致瘤发生率差别大，且并非所有iPS细胞一定具有致瘤性，需要探索能显著提高重编程细胞致瘤性及异质性的方法。因此，探索对正常细胞重编程建立CSC研究模型，可能有助于阐明CSC起源及发生过程，找到治疗肿瘤的新方法。Piwl2又称癌胚胎/睾丸抗原80(cancer/testis80，CT80)，是Argonaute家族的一员，是一种对维持生殖细胞发育起关键作用的微小RNA结合蛋白，在调节生殖干细胞的自我更新和精子发育方面有重要的作用[6,17]。在人睾丸细胞及多种肿瘤细胞中表达，包括结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、胃肠道肿瘤、卵巢癌、子宫内膜癌，而在正常体细胞、干细胞、胚胎干细胞中均不表达[8,18-21]。根据肿瘤干细胞理论，肿瘤的发生是因为肿瘤细胞中少量CSC(肿瘤干细胞)的存在，而Piwil2是唯一稳定高表达于pCSC即NSC(正常干细胞)和CSC(肿瘤干细胞)中间状态的蛋白，提示Piwil2可能调控肿瘤起源或发生过程[6]。因此，本实验通过将携带绿色荧光蛋白的人Piwil2基因的慢病毒载体导入人包皮成纤维细胞，观察Piwil2在转染细胞中表达情况及对其生物学特性的影响，研究其是否有类似干细胞相关基因重编程的多向分化潜能和自我更新的能力，以及高致瘤性及细胞异质性，建立Piwil2重编程的CSC研究模型。实验中，通过慢病毒载体介导的基因过表达方式建立稳定表达Piwil2重编程成纤维细胞克隆，荧光显微镜观察转染后细胞持续发绿色荧光，且Piwil2 mRNA水平过表达，证实Piwil2-GFP转染成功。Piwil2重编程成纤维细胞，随培养时间延长，细胞逐渐出现集落样生长方式，并呈现肿瘤球样克隆生长，这种细胞形态学的变化，类似iPS的形成过程，且Piwil2重编程成纤维细胞表达胚胎干细胞基因Oct-4、Sox-2、Nanog[22]，提示Piwil2重编程后的成纤维细胞具有干细胞特性，其Piwil2重编程成纤维细胞稳定表达后镜下观察的效率达到约70%，明显高于经典的iPS重编程效率(不足1%)[23]。其次，随机挑选的4个Piwil2重编程成纤维细胞克隆在裸鼠体内100%致瘤成功，而对照组GFP-FB，FB组体内均不产生肿瘤，证明Piwil2重编程的成纤维细胞具有高致瘤性[16]。此外，染色体核型分析证实，Piwil2重编程的成纤维细胞染色体具有明显的异质性，为超二倍体染色体数目且部分染色体缺失。分析肿瘤组织学特点，病理诊断为表达常见外胚层肿瘤标记物巢蛋白Nestin、突触素SYD、角蛋白CK、上皮膜抗原EMA，以及中



A：Piwil2；B：Vimentin；C. Nestin；D：SYN

图11 部分相关蛋白质在裸鼠肿瘤内分布表达 (S-P ×400)

胚层肿瘤标记物:波形蛋白 Vimentin、胎盘碱性磷酸酶 PLAP、细胞表面抗原 CD117,而外胚层嗜铬素 CgA,结蛋白 Des,中胚层白细胞表面抗原 LCA,小儿横纹肌生肌因子 MyoD1,内胚层指标甲胎蛋白 AFP 均阴性的恶性肿瘤[24-25],而 RT-PCR 检测表明肿瘤组织表达外胚层标记物 Nestin,Tubb3,中胚层标记物 Brarachyury,ACTA2,内胚层标志物 GATA6,但是,不表达内胚层标记物 AFP[4,26]。因此,Piwil2 重编程后的成纤维细胞除了具有干细胞及多潜能分化特性,还具有显著的肿瘤细胞异质特性。从重编程后的细胞形态学、干细胞分子表型及致瘤性和细胞异质性分析,Piwil2 重编程后的成纤维细胞具有 CSC 的功能学定义特征,初步判断 Piwil2 重编程成纤维细胞的过程可以用于研究 Piwil2 调控 CSC 发生过程及机制的实验模型之一。然而,本实验重编程的是儿童时期成纤维细胞,是否成年后成纤维细胞具有相似结果需要进一步研究。此外,Piwil2 重编程成纤维细胞形成的 CSC,可能仅代表 Piwil2 基因在肿瘤起源中的调控作用,是否可将其作为研究其他致瘤基因,以及 Piwil2 重编程成纤维细胞的 CSC 的发生机制仍需要大量的后续实验研究。

参考文献:

[1] Dick J E. Breast cancer stem cells revealed[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3547-3549.
[2] Pardal R, Clarke M F, Morrison S J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(12): 895-902.
[3] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, *et al*. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821-5828.
[4] Kim D, Kim C H, Moon J I, *et al*. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins[J]. Cell Stem Cell, 2009, 6(4): 472-476.
[5] Liu S V. iPS cells: a more critical review[J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(3): 391-397.
[6] Gao J X. Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells [J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(1): 67-96.
[7] Lee J H, Schütte D, Wulf G, *et al*. Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(2): 201-211.
[8] Liu J J, Shen R, Chen L, *et al*. Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012, 3(4): 328-337.
[9] He G, Chen L, Ye Y, *et al*. Piwil2 expressed in various stages of cervical neoplasia is a potential complementary marker for p16INK4a[J]. Am J Transl Res, 2010, 2(2): 156-169.
[10] Rozenchan P B, Carraro D M, Brentani H, *et al*. Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts[J]. Int J Cancer, 2009, 125(12): 2767-2777.
[11] Zou C, Chou B K, Dowey S N, *et al*. Efficient derivation and genetic modifications of human pluripotent stem cells on engineered human feeder cell lines[J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(12): 2298-2311.
[12] Zhao X Y, Li W, Lv Z, *et al*. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation[J]. Nature, 2009, 461(7260): 86-90.
[13] Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, *et al*. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again[J]. J Biotechnol, 2010, 148(1): 3-15.
[14] Amit M, Margulets V, Segev H, *et al*. Human feeder layers for human embryonic stem cells[J]. Biol Reprod, 2003, 68(6): 2150-2156.
[15] Zheng L, Liang P, Zhou J, *et al*. BC047440 antisense eukaryotic expression vectors inhibited HepG2 cell proliferation and suppressed xenograft tumorigenicity[J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45(2): 97-103.
[16] 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.
[17] Jordan C T, Guzman M L, Noble M. Cancer stem cells[J]. N Engl J Med, 2006, 355(12): 1253-1261.
[18] Lee J H, Jung C, Javadian-Elyaderani P, *et al*. Pathways of proliferation and antiapoptosis driven in breast cancer stem cells by stem cell protein piwil2[J]. Cancer Res, 2010, 70(11): 4569-4579.
[19] Li L, Yu C, Gao H, *et al*. Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer[J]. BMC Cancer, 2010(10): 38.
[20] Wu Q, Ma Q, Shehadeh L A, *et al*. Expression of the Argonaute protein PiwiL2 and piRNAs in adult mouse mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(4): 915-920.
[21] Dalerba P, Dylla S J, Park I K, *et al*. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(24): 10158-10163.
[22] Kang L, Gao S. Pluripotency of induced pluripotent stem cells [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2012, 3(1): 5.
[23] Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future[J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 678-684.
[24] Shin S K, Kim T W, Youm S Y, *et al*. Basosquamous carcinoma with systemic metastasis in a miniature Pinscher[J]. Jpn J Vet Res, 2011, 59(4): 173-179.
[25] 黄波, 李妍, 李强, 等. 肺硬化性血管瘤临床病理特点及免疫表型分析[J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(7): 524-526.
[26] Zheng Z, Jian J, Zhang X, *et al*. Reprogramming of human fibroblasts into multipotent cells with a single ECM proteoglycan, fibromodulin[J]. Biomaterials, 2012, 33(24): 5821-5831.

(**收稿**:2012-09-28;**修回**:2012-11-23)
(编辑 龙 亮)