文章编号:1000-5404(2013)12-1247-05

论著

5-氟尿嘧啶及长春新碱对胃癌细胞SGC-7901干细胞相关特性的影响

陈 军[1],崔有宏[2],郝迎学[1],唐 波[1],植懿丹[3],余佩武[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院全军普通外科中心,微创胃肠外科中心[1],西南医院病理学研究所[2],基础医学部全军免疫学研究所[3])

[摘要] **目的** 探讨化疗药物5-FU、长春新碱对胃癌细胞SGC-7901干细胞相关表型及功能影响。**方法** 5-FU、长春新碱分别作用于SGC-7901细胞后,通过流式细胞术及荧光实时定量PCR的方法观察胃癌干细胞候选标志CD44、CD133的表达,检测干性相关基因及上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition,EMT)相关基因的表达变化,并检测药物作用对其集落形成能力、无血清培养基中成球能力及NOD/SCID小鼠体内成瘤能力的影响。**结果** 不同浓度5-FU、长春新碱作用3 d后均可显著增加剩余SGC-7901细胞CD44 mRNA的总体表达水平,分别为未用药组的(2.36±0.03)、(1.74±0.05)、(6.03±0.75)、(4.06±0.77)倍,均有显著差异($P<0.05$)。CD133及CD44阳性细胞比例亦明显升高,但干性基因表达、克隆形成能力、成瘤能力未见明显增加。而与5-FU不同的是,长春新碱作用后细胞发生了EMT相关基因的表达改变,在无血清培养基中形态与其他组细胞差异显著,且可形成典型的细胞球。**结论** 5-FU及长春新碱作用后细胞CD44和CD133的表达增加,此外长春新碱还促进细胞EMT改变,并增加细胞在无血清培养基中的成球能力。

[关键词] 胃癌干细胞;5-FU;长春新碱;上皮-间质转化
[中图法分类号] R73-361;R735.2;R979.1 [文献标志码] A

Effects of 5-FU and vincristine on stem cell-associated phenotypes and properties of gastric cancer cell line SGC-7901

Chen Jun[1], Cui Youhong[2], Hao Yingxue[1], Tang Bo[1], Zhi Yidan[3], Yu Peiwu[1]([1]Center of General Surgery, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, [3]Institute of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To identify the effects of 5-fluorouracil (5-FU) and vincristine (VCR) on stem cell-associated phenotypes and properties of gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** SGC-7901 cells were treated with 5-FU and VCR, respectively. Candidate stem cell markers of CD44 and CD133 as well as other stemness genes and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-associated genes were assayed. Colony formation assay, sphere formation assay and tumorigenic formation assay were used to test the properties of SGC-7901 cells associated with cancer stem cells. **Results** After 5-FU and VCR treatment, the mRNA expression levels of CD44 and CD133 significantly increased in all the doses as compared with the control group (up to 2.36±0.03, 1.74±0.05, 6.03±0.75 and 4.06±0.77 folds respectively, $P<0.05$), but the capabilities of colony formation and tumorigenic formation had no change. VCR treatment manifested the EMT gene profile and showed different morphologic features in serum-free SGC-7901 cell culture, which was different from 5-FU treatment. **Conclusion** Transient treatment of 5-FU and VCR up-regulates the expression of CD44 and CD133. VCR induces EMT changes in SGC-7901 cells and enhances sphere formation in serum-free culture medium.

[**Key words**] gastric cancer stem cells; 5-FU; vincristine; epithelial-to-mesenchymal transition

Corresponding author: Yu Peiwu, E-mail: yupeiwu01@vip.sina.com

肿瘤干细胞被认为是肿瘤组织中一小部分具有自我更新和多向分化潜能的肿瘤细胞,是肿瘤发生、发展、转移及复发的元凶[1]。虽然胃癌干细胞在多项研究中得以证实,但相对于其他类型的肿瘤干细胞而言,目前对其认识仍比较局限[2-4]。近年来有不少研究关注化疗药物对肿瘤干细胞的影响,认为肿瘤干细胞对化疗药物具有耐受性,据此在一定程度上可富集肿瘤干细胞。而临床上常用的化疗药物如5-氟尿嘧啶(5-FU)和长春新碱(VCR)在常规3~5 d化疗后能否直接影响胃癌细胞干细胞相关表型及功能尚不清楚。因此,本研究拟研究短期作用后胃癌干细胞相关表型、功能特性包括上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchy-

[通信作者] 余佩武,E-mail:yupeiwu01@vip.sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130425.1858.019.html(2013-04-25)

mal transition,EMT)相关特征的改变,为认识化疗药物对胃癌干细胞的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

胃癌细胞系SGC-7901由第三军医大学西南医院病理学研究所惠赠。胎牛血清、RPMI1640培养基、DMEM/F12培养基购自Gibco公司,EGF、bFGF购自Stemcell公司,FITC标记的CD44抗体及同型抗体购自BD公司,PE标记的CD133抗体及同型抗体购自Milteny公司,Tripure购自Roche公司,反转录试剂盒购自TOYOBO公司,SYBR qPCR Mix购自TaKaRa公司。引物设计参考相关文献[5],交由英骏公司合成。

1.2 方法

1.2.1 SGC-7901细胞培养及药物处理 胃癌细胞系SGC-7901复苏后将其培养于含有10%胎牛血清的1640培养基中,置于孵箱内,37 ℃ 5% CO_2 饱和湿度下培养。细胞状态稳定后在对数生长期按以下方案在4组细胞中分别添加化疗药物:5-FU 5 μg/mL(5-FU-5组),5-FU 7.5 μg/mL(5-FU-7.5组),长春新碱(VCR)1 μg/mL(VCR-1组),VCR 1.5 μg/mL(VCR-1.5组),另1瓶加PBS作为空白对照。加药72 h后胰酶消化收集细胞进行后续操作。

1.2.2 SGC-7901细胞流式细胞学检测 细胞经PBS洗去培养基成分后,加入FITC标记的CD44抗体(1∶50稀释)及PE标记的CD133抗体(1∶10稀释),充分混匀,4 ℃下避光孵育30 min。以相应荧光标记的IgG为同型对照平行操作。抗体作用完毕用PBS洗1次后加入1%多聚甲醛固定后送检进行流式细胞学检测。

1.2.3 克隆形成实验 各组细胞胰酶消化后进行细胞计数,按100个细胞/孔加入预先添加培养基的24孔板中,十字形移动平板使细胞分布均匀,观察细胞生长状况,并于第14天染色观察克隆形成情况。

1.2.4 细胞成球实验 在DMEM/F12基础培养基中添加EGF(50 ng/mL)、bFGF(20 ng/mL)等细胞因子配制无血清培养基。将各组细胞加入预先添加了无血清培养基的24孔板中,观察细胞的生长状况及成球情况。

1.2.5 成瘤实验 各组细胞经胰酶消化收集后计数,按1×10^5注射NOD/SCID小鼠侧腹部,以未处理组为对照,观察各组细胞在小鼠体内的成瘤情况。

1.2.6 RNA提取及反转录 各组细胞收集1×10^5进行RNA提取。细胞经离心后弃尽上清,加入1 mL Tripure,充分混匀,室温下静置10 min使细胞充分裂解。加入200 μL氯仿后静置10 min,4 ℃下12 000 r/min离心10 min。小心吸取上清,加入等体积异丙醇后冰浴10 min。4 ℃ 12 000 r/min离心10 min得到RNA沉淀。用75%乙醇及无水乙醇各洗1次后得到纯RNA。25 μL纯水溶解后测定RNA浓度及纯度,$(D)260/(D)280=1.8\sim2.1$之间纯度良好的样品用于后续实验。

按反转录试剂盒说明书配制相应反应体系,各组RNA样品按500 ng上样。反转录程序为:25 ℃ 10 min→50 ℃ 30 min→95 ℃ 5 min。

1.2.7 荧光实时定量PCR(Real-time PCR) 用相应的cDNA进行Real-time PCR。按说明书操作配制反应体系(TaKaRa公司)。检测基因包括胃癌干细胞候选表面标志CD44、CD133,干性相关基因Sox-2、Oct-4,EMT相关基因钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin),对照为GAPDH。相应引物如表1所示。PCR程序如下:95 ℃ 2 min→(95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s)×40循环。用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各组基因相对表达量。

表1 Real-time PCR扩增引物

基因	上游引物(5′→3′)	下游引物(5′→3′)	引物长度(bp)
CD44	CAAGCAATAGGAATGATGTC	GGTCACTGGGATGAAGGT	130
CD133	TACGGCACTCTTCACCTG	TCACTGCTTATGCTTCCAG	82
Sox-2	CCAGCTCGCAGACCTACAT	ACTTGACCACCGAACCCA	104
Oct-4	CCTGAAGCAGAAGAGGATC	CGTTTGGCTGAATACCTT	90
E-cadherin	CAGCACGTACACAGCCCTAA	ACCTGAGGCTTTGGATTCCT	158
Vimentin	GACAATGCGTCTCTGGCACGTCTT	TCCTCCGCCTCCTGCAGGTTCTT	229
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA	137

1.3 统计方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件两样本均数间比较用t检验。

2 结果

2.1 5-FU及VCR处理后增加SGC-7901细胞CD44及CD133的总体表达

从流式细胞学检测结果上看,在SGC7901细胞中,细胞普遍表达CD44分子,其阳性率达90%以上。而CD133的表达比例很低,仅为2%左右。经5-FU处理后,可观察到CD44阳性比例进一步增加至95%以上,且流式结果中可见其荧光强度均值从718升高至2 242和1 875),但CD133变化不显著。经过VCR处理的各组细胞,表达CD44或CD133阳性的细胞比例均明显升高。不同浓度的VCR处理后,$CD44^+$细胞比例上升至99%以上,荧光强度均值显著升高至6 300和6 293。此外,$CD44^+CD133^+$双阳性细胞从未用药的2.14%升高到3.69%及5.72%。

2.2 药物处理后胃癌干细胞候选标志及干性相关基因的mRNA变化情况

与流式细胞学检测结果一致,在药物处理后的各组细胞中,CD44 mRNA表达水平与未用药组相比有明显提高(表2)。5-FU处理后,在5 μg/mL及7.5 μg/mL的条件下,CD44 mRNA相对表达量均明显增加($P<0.05$)。VCR处理后,在1 μg/mL及1.5 μg/mL的条件下,CD44 mRNA增加倍数更大($P<0.01$),该结果也与流式细胞学检测结果一致,即VCR处理后CD44荧光强度高于其他各组。CD133 mRNA的表达水平略有增加,但除5-FU-7.5组外与未处理组相比无统计学差异($P>0.05$),提示差异主要在蛋白水平。但在药物处理后的细胞中,干性相关基因如Sox-2表达量是下降的($P<0.05$),Oct-4仅在5-FU 5 μg/mL处理后略有上升($P<0.05$)。该结果提示了处理后的细胞中CD44与CD133的变化与干性基因变化存在不完全同步的情况。

2.3 药物处理后各组细胞生长状况及克隆形成结果

用药后等量细胞细胞在24孔板内增殖情况并不优于未用药组。图1显示了各组细胞显微镜下观察到的生长状况及克隆

形成结果。结果显示,用药后各组克隆形成能力显著降低,镜下观察只见少量克隆生长,且细胞数显著低于未用药组($P<0.05$)。

表 2 药物处理后各组胃癌干细胞相关基因的 mRNA 相对表达量
(相对于 SGC-7901 相应基因)

组别	CD44	CD133	Oct-4	Sox-2
5-FU-5 组	2.36 ±0.03[a]	1.41 ±0.07	1.68 ±0.12[a]	0.28 ±0.05[a]
5-FU-7.5 组	1.74 ±0.05[a]	1.54 ±0.08[a]	1.60 ±0.12	0.36 ±0.04[a]
VCR-1 组	6.03 ±0.75[a]	1.14 ±0.10	0.65 ±0.05	0.07 ±0.02[a]
VCR-1.5 组	4.06 ±0.77[a]	1.26 ±0.04	0.83 ±0.07	0.12 ±0.04[a]
SGC-7901 组	1.00 ±0.04	1.00 ±0.11	1.00 ±0.08	1.00 ±0.09

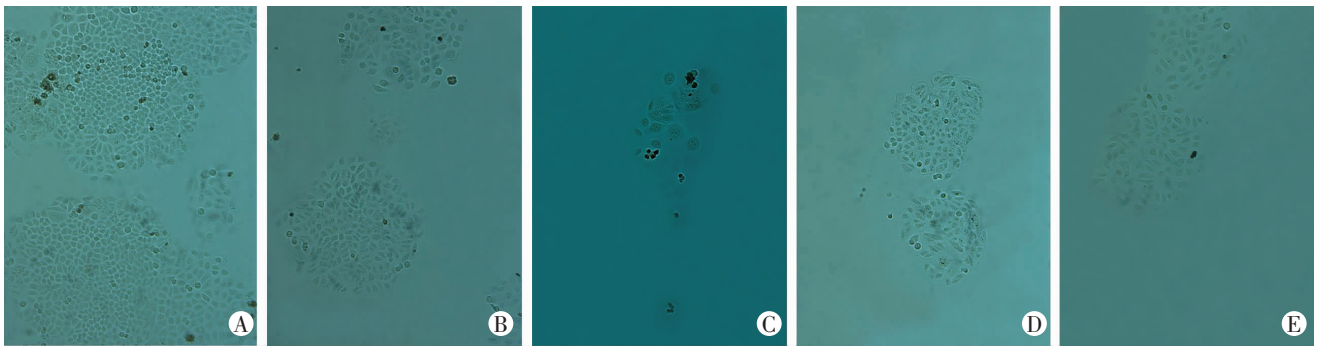
a: $P<0.05$,与 SGC-7901 组比较

2.4 NOD/SCID 小鼠体内成瘤能力比较

使用 5-FU 及 VCR 短期处理后,与克隆形成能力类似,细胞在 NOD/SCID 小鼠体内成瘤能力与未用药组相比并无显著增加,相反瘤体体积要小于未用药组。

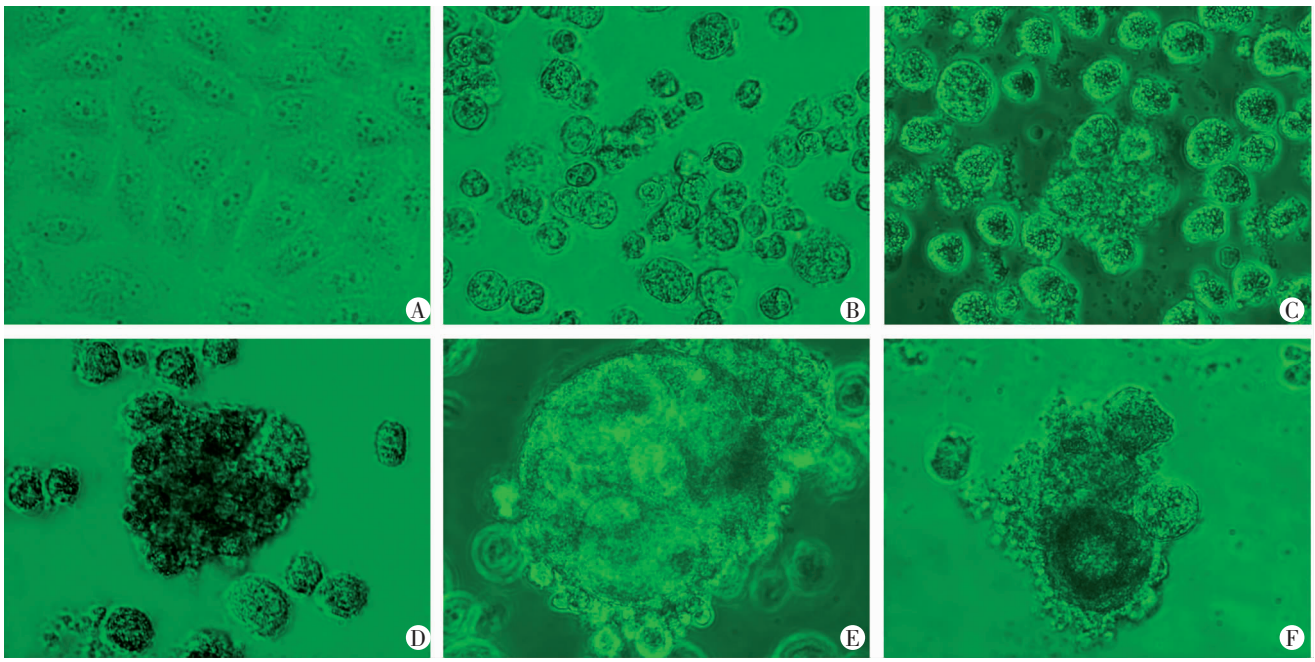
2.5 各组细胞在无血清培养基中成球能力比较及 EMT 形态学改变

各组细胞在无血清培养基中的形态差异明显。SGC-7901 在 1640 培养基中贴壁平铺生长(图 2A),而在无血清培养基中培养后细胞变圆,局部有小团细胞聚集,但培养至 21 d 未见典型细胞球生成(图 2B)。5-FU 5 μg/mL 处理后,细胞体积明显变大,而在无血清培养基中形态与未处理组类似,培养 21 d 亦未见明显细胞球(图 2C)。而 5-FU 7.5 μg/mL 处理后,少量细胞呈梭形,呈现间质细胞的特点,可能发生了 EMT 改变,培养 21 d 后可见局部少量聚集细胞团,但结构比较疏松,成球不典型(图 2D)。而 VCR 处理后的两组细胞发生明显的 EMT 改变,在 21 d 时可观察到大小不等的多个典型的细胞球,与其他组形态上差异明显(图 2E、F)。



A:SGC-7901 组(空白对照组);B:5-FU-5 组;C:5-FU-7.5 组;D:VCR-1 组;E:VCR-1.5 组

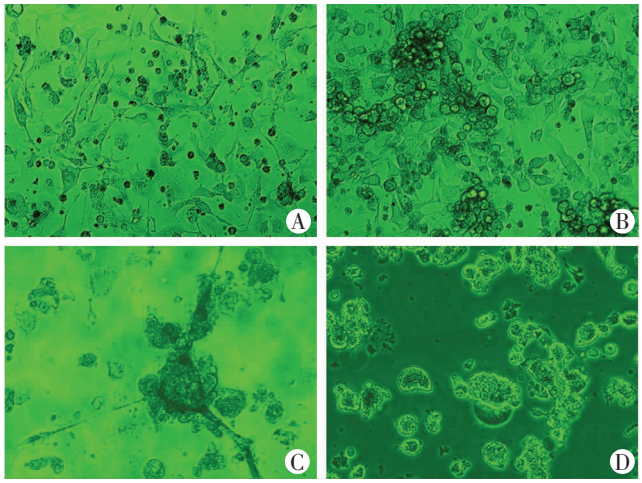
图 1 各组 SGC-7901 细胞生长情况 (LM ×100)



A:SGC-7901 细胞在 1640 培养基中平铺生长;B~F:各组细胞在无血清培养基中培养 21 d 后形态;B:SGC-7901 细胞;C:5-FU-5 组;D:5-FU-7.5 组;E:VCR-1 组;F:VCR-1.5 组;VCR 处理后的两组均观察到典型细胞球

图 2 各组 SGC-7901 细胞在无血清培养基中生长形态及成球情况 (LM ×200)

追踪不同剂量VCR处理后两组细胞的成球过程均可观察到其培养早期出现的EMT改变(图3),与未处理组及5-FU组差异明显,而不同VCR剂量处理组细胞差别不明显。培养3 d时,细胞变为多边形,可见多个触角向周边延伸(图3A),与SGC-7901在含血清的1640培养基中平铺生长状态(图2A)或无血清培养基中圆形细胞形态(图2B)明显不同。培养至7 d时,可见由多个细胞聚集形成的松散的细胞团(图3B)。培养14 d时,细胞形态改变更为明显,同一细胞可伸出多个触角样结构向周边延伸,同时可见周边圆形细胞沿触角样结构聚集,融合形成了大小不等的细胞球,细胞间连接致密(图3C)。到21 d再观察,EMT的现象不再典型,可见多个大小不等的细胞团,细胞恢复圆形结构,多边形细胞少见(图3D)。



A:3 d;B:7 d;C:14 d;D:21 d

图3 不同培养时间VCR处理SGC-7901细胞在无血清培养基中成球过程及EMT形态学变化 (LM ×100)

2.6 药物处理后SGC-7901细胞EMT相关基因mRNA表达量的变化

在4组细胞中,用VCR处理的2组细胞在作用3 d后其相对SGC-7901相关基因的mRNA表达发生了典型的EMT改变,表现为波形蛋白的显著增加及E-钙黏蛋白的显著下降(表3)。而5-FU处理的细胞并未观察到相应的改变。

表3 各组细胞EMT相关基因mRNA相对表达量 (相对于SGC-7901相应基因)

组别	E-cadherin	Vimentin
5-FU-5组	4.08[a]	1.01
5-FU-7.5组	4.81[a]	0.99
VCR-1组	0.59[a]	3.51[a]
VCR-1.5组	0.45[a]	2.32[a]
SGC-7901组	1.00	1.00

a: $P<0.05$,与SGC-7901组比较

3 讨论

目前分离或富集肿瘤干细胞的方法主要有以下几种:①以具有干性标志的细胞表面分子为标志用流式或磁珠分离;②利用肿瘤干细胞能够持续形成克隆形成球的特性分离;③利用肿瘤干细胞的生物学特性,如侧群细胞的特性分离。对于胃癌干样细胞而言,由于其表面分子标志尚不明确,因此通过其生物学特性来进行富集,再对得到的细胞群进行表型及功能的验证,是值得探索的富集策略。近年的研究表明,化疗抵抗是肿瘤干细胞的重要特性,是导致化疗失败的重要原因,并且与肿瘤干细胞其他重要的特性,如EMT有着密切的联系。而临床上常用的化疗药物如5-FU和VCR在常规3~5 d化疗后能否直接影响胃癌细胞干细胞相关表型及功能尚不清楚。因此在本研究中,我们初步探讨了对化疗药物5-FU、VCR碱抵抗的SGC-7901细胞中干细胞相关表型及功能特性的变化情况。

在本实验中,我们探讨了5-FU、VCR短期处理后对胃癌干细胞候选标志如CD44、CD133的变化情况。结果显示,药物短期刺激后,剩余细胞中这两个分子尤其是CD44的表达水平高于未用药的细胞。CD44是目前较受关注的胃癌干细胞候选标志,但其是否能够作为胃癌干细胞的分选标志一直存在争议。有研究发现CD44阳性的胃癌细胞具有多向分化及放疗、化疗耐受及与肿瘤EMT相关等肿瘤干细胞的特点[5-8]。而另有学者研究发现CD44的表达与细胞的成瘤能力并不完全一致[5]。在本实验中,流式细胞学检测及定量PCR检测结果表明,5-FU和长春新碱作用后均能使CD44阳性细胞比例增加,mRNA表达水平明显上调。不过此时肿瘤干细胞相关的功能特性,包括克隆形成能力、成瘤能力等均未观察到明显增加,提示化疗药物作用后,在一定时间内,胃癌细胞包括其中耐药的胃癌干细胞的增殖有可能尚处于抑制状态。该结果显示了胃癌干细胞相关表面标志的改变可在药物短期作用下即可发生。这也从另一角度提示了CD44的上调并不完全与干细胞的相关功能变化一致,化疗药物可能从其他方面调控了CD44的上调。

另一方面,本实验还观察到了不同药物刺激后胃癌细胞EMT相关改变。EMT是上皮来源的肿瘤细胞向间质细胞的转化,在这过程中,细胞黏附力降低,运动性增强,肿瘤细胞可以向远端侵袭及转移,是肿瘤发展过程中重要的生物学行为。发生EMT的细胞,相关转录因子及标志蛋白如波形蛋白等显著上调,而E-钙黏蛋白则明显下降[9]。最近研究表明,肿瘤干细胞具有EMT细胞的基因表达特点,而诱导发生EMT的肿瘤细胞则具有肿瘤干细胞的表型[10]。EMT被认为是肿瘤干细胞重要的功能特点,与肿瘤的侵袭、转移及耐药等均有密切联系[10-11]。本实验通过检测EMT重要

标志蛋白E-钙黏蛋白及波形蛋白mRNA的表达水平发现,VCR处理后SGC-7901细胞呈现典型的EMT表达特点,但5-FU处理组细胞在2种药物浓度下并未发生典型的EMT改变。VCR对肿瘤细胞的抑制机制主要涉及对有丝分裂的抑制,有研究认为VCR对微管结构的抑制及对有丝分裂的破坏可能诱导了肿瘤干细胞的形成[5],但目前尚不清楚VCR可通过怎样的具体机制来进一步调节肿瘤干细胞的成球能力。在本实验中,我们不仅检测到VCR作用后细胞mRNA表达发生EMT样改变,在无血清培养基中,还观察到了在肿瘤细胞成球早期细胞形态出现的明显异质性:一部分细胞有多个长触角伸出,类似神经细胞突触样结构,而许多球形细胞则延此突起聚集,形成大小不等的细胞球。该现象提示了细胞成球能力的增加可能与细胞的EMT改变有关,为我们后续进行EMT与胃癌干细胞之间相互关系的研究提供了参考。

肿瘤细胞球在胃癌转移研究中具有重要的意义。腹腔转移是胃癌最常见的转移方式,研究发现,与其他肿瘤包括卵巢癌、乳腺癌、肝癌等类似[12-14],能引起胃癌转移的常常是多个细胞相互粘连形成的肿瘤细胞球,这些细胞可抗失巢凋亡而得以在腹腔乏氧环境中增殖、重塑并获得恶性侵袭表型而形成新的转移灶,而单个脱落细胞则易发生凋亡而不易形成新的肿瘤。这些肿瘤细胞球除了抗失巢凋亡外,还能通过多种机制抵抗化疗药物的攻击[15],被认为是引起肿瘤转移的真正的"种子",其形成后并引起的患者腹腔种植转移是导致胃癌患者术后死亡的重要原因,因此研究胃癌肿瘤细胞球的形成机制具有重要意义。在本实验中我们发现,化疗药物短期作用尚不能增加胃癌细胞的克隆形成、体内增殖等肿瘤干细胞相关特性,但当药物作用使胃癌细胞发生EMT后,肿瘤细胞在无血清培养基中表现出典型的异质性,且细胞球的形成能力明显增强。该现象提示了耐受化疗药物的胃癌细胞早期形成细胞球的可能过程,可为研究胃癌细胞球的形成及腹腔转移的发生提供参考。

综合以上结果分析,本实验用5-FU及长春新碱作用于胃癌细胞SGC-7901后,表达CD44及CD133的细胞比例增加,但克隆形成能力、成瘤能力等未观察到明显增加,提示化疗药物在早期对胃癌细胞及干细胞可能均产生抑制作用。而VCR作用的细胞在形态上表现出明显的异质性,基因表达也呈现出EMT的特点,同时成球能力增强,提示了胃癌细胞成球能力的增加可能与EMT的发生有关。此外,两种化疗药物对胃癌细胞的不同影响也反映了肿瘤细胞对不同药物反应可能存在的异质性。近年随着对肿瘤干细胞研究的重视及新辅助化疗在胃癌治疗中的应用,了解化疗药物处理后肿瘤细胞的改变及相关机制,尤其是肿瘤干细胞相关表型和功能的变化,对我们认识和把握肿瘤治疗的策略和方法具有重要意义。

参考文献:

[1] Subramaniam D, Ramalingam S, Houchen C W, *et al*. Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment[J]. Mini Rev Med Chem, 2010, 10(5): 359-371.

[2] Takaishi S, Okumura T, Wang T C. Gastric cancer stem cells[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(17): 2876-2882.

[3] Saikawa Y, Fukuda K, Takahashi T, *et al*. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis[J]. Gastric Cancer, 2010, 13(1): 11-24.

[4] Xu G, Shen J, Ou Yang X, *et al*. Cancer stem cells: the 'heartbeat' of gastric cancer[J]. J Gastroenterol, 2012, [Epub ahead of print].

[5] Xue Z, Yan H, Li J, *et al*. Identification of cancer stem cells in vincristine preconditioned SGC7901 gastric cancer cell line[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(1): 302-312.

[6] Takaishi S, Okumura T, Tu S, *et al*. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44[J]. Stem Cells, 2009, 27(5): 1006-1020.

[7] Zhang C, Li C, He F, *et al*. Identification of $CD44^+CD24^+$ gastric cancer stem cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(11): 1679-1686.

[8] Chen W, Zhang X, Chu C, *et al*. Identification of $CD44^+$ cancer stem cells in human gastric cancer[J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(127)[Epub ahead of print].

[9] Kalluri R, Weinberg R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420-1428.

[10] Biddle A, Mackenzie I C. Cancer stem cells and EMT in carcinoma[J]. Cancer Metastasis Rev, 2012, 31(1/2): 285-293.

[11] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer[J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4741-4751.

[12] Sodek K L, Ringuette M J, Brown T J. Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype[J]. Int J Cancer, 2009, 124(9): 2060-2070.

[13] Krohn A, Song Y H, Muehlberg F, *et al*. CXCR4 receptor positive spheroid forming cells are responsible for tumor invasion *in vitro*[J]. Cancer Lett, 2009, 280(1): 65-71.

[14] Vinci M, Box C, Zimmermann M, *et al*. Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents[J]. Methods Mol Biol, 2013, 986: 253-266.

[15] Oshikata A, Matsushita T, Ueoka R. Enhancement of drug efflux activity *via* MDR1 protein by spheroid culture of human hepatic cancer cells[J]. J Biosci Bioeng, 2011, 111(5): 590-593.

(**收稿**:2013-04-09;**修回**:2012-04-24)

(编辑 王 红)