论著

文章编号:1000-5404(2014)17-1790-05

乳腺癌残存细胞通过表达乳腺癌干细胞样特性促进裸鼠移植瘤的形成

谢 佳[1],刘 红[1],余腾骅[1],刘 毫[1],张 澍[1],李 聪[2],吴诚义[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:内分泌乳腺外科[1],妇科[2])

[摘要] **目的** 探讨化疗后乳腺癌残存细胞(drug surviving cells,DSCs)的干细胞样特性及其对裸鼠移植瘤的影响,阐明DSCs细胞的潜在生物学特性。**方法** 以0.5 μg/mL浓度的多西紫杉醇(docetaxel,DTX)每周1次药物处理乳腺癌细胞MCF-7,分别获得处理4次后的DSCs,记为DSCs(1~4)组,未处理的MCF-7细胞为空白对照组。流式细胞仪检测空白对照组及DSCs(1~4)组中细胞周期分布。无血清悬浮培养法培养MCF-7细胞和DSCs(1~4)细胞,获得乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells, BCSCs)微球体,荧光定量PCR和Western blot法分别检测MCF-7细胞和DSCs(1~4)细胞中乳腺癌干细胞标志物ALDH1、CD44、CD24及ABCG2 mRNA和蛋白表达水平;采用裸鼠移植瘤实验比较MCF-7细胞及DSCs(1~4)细胞的成瘤时间、成瘤率及瘤体大小。**结果** 与MCF-7细胞相比,药物处理后得到的DSCs(2~4)细胞中处于静止期(G_0/G_1期)的细胞比例明显升高。DSCs(2~4)细胞形成乳腺癌干细胞微球体的能力更强,表达的干细胞标志物ALDH1、$CD44^+/CD24^-$和ABCG2显著增多,差异均有统计学意义($P<0.05$);DSCs(2~4)细胞的成瘤能力更强,瘤体体积较MCF-7细胞明显升高($P<0.05$)。DSCs(1)细胞与MCF-7细胞相比无明显差异。**结论** 经多西紫杉醇药物筛选后的DSCs表达乳腺癌干细胞样特性,促进裸鼠移植瘤的生成。

[关键词] 残存细胞;乳腺肿瘤;肿瘤干细胞;裸鼠移植瘤

[中图法分类号] R730.23;R730.53;R737.9 [文献标志码] A

Drug surviving cells promote formation of transplanted tumor model in nude mice through expressing breast cancer stem-like traits

Xie Jia[1], Liu Hong[1], Yu Tenghua[1], Liu Hao[1], Zhang Shu[1], Li Cong[2], Wu Chengyi[1] ([1]Department of Endocrinology and Breast Surgery, [2]Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the breast cancer stem-like traits of drug surviving cells (DSCs) and the effect on the formation of transplanted tumor in nude mice for the DSCs' biological features. **Methods** Breast cancer cell line MCF-7 was weekly treated with docetaxel (DTX) at the concentration of 0.5 μg/mL, and the cells at the 1st to 4th generation of DSCs were individually named as DSCs 1 to 4. The untreated MCF-7 cells served as blank control cells. The cell cycle distribution of MCF-7 and DSCs 1 to 4 were tested by flow cytometry. MCF-7 cells and DSCs 1 to 4 were cultured in serum-free suspension culture medium to acquire microspheres of breast cancer stem cells (BCSCs). The expression of BCSCs marker ALDH1, CD44, CD24 and ABCG2 at mRNA and protein levels were detected by real-time q-PCR and Western blotting. Nude mice transplantation tumor was prepared to evaluate the time, rate and volume of tumor formation of MCF-7 cells and DSCs 1 to 4, respectively. **Results** The cell population of stationary phase (G_0/G_1) was significantly increased in DTX treated groups DSCs 2 to 4 compared with MCF-7 cells. Moreover, DSCs 2 to 4 had stronger ability of forming microspheres of BCSCs than MCF-7 cells. The results of real-time qPCR and Western blotting showed that the expression of BCSCs markers ALDH1, $CD44^+/CD24^-$ and ABCG2 was obviously up-regulated in DSCs 2 to 4 ($P<0.05$). Furthermore, the growth rate, the volumes of tumors were significant elevated in DSCs 2 to 4 compared with MCF-7 cells ($P<0.05$). Whereas, DSCs 1 had no significant difference in above

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81100399)

[通信作者] 吴诚义,E-mail:ChengyiWu11@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140621.0850.006.html (2014-06-21)

indexes compared with blank control MCF-7 cells. **Conclusion** DSCs exhibit the features of BCSCs after being treated with DTX, and promote the formation of xenograft tumor in nude mice.

[**Key words**] drug surviving cells; breast neoplasms; cancer stem cells; transplanted tumor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81100399). Corresponding author: Wu Chengyi, E-mail: ChengyiWu11@163.com

规范性化疗是乳腺癌综合治疗的重要组成部分,它能显著提高乳腺癌患者的生存率。然而,在化疗过程中出现的多药耐药及化疗后的肿瘤复发仍然是临床上的棘手问题,其中可能涉及的机制包括:药泵表达增加,TopoⅡ水平下降,抑癌基因突变,解毒作用增强等[1-2]。但是上述机制并不能完全诠释患者对化疗产生抵抗作用的原因。研究发现,乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells,BCSCs)的富集对化疗抵抗及耐药发挥着重要作用,是导致化疗后乳腺癌患者出现肿瘤复发转移的根源之一[3-4]。我们在前期研究中发现化疗后体内残存的乳腺癌组织含有较高比例的BCSCs[5]。本研究拟通过在体外用多西紫杉醇(docetaxel,DTX)筛选乳腺癌MCF-7细胞获得不同时间点的乳腺癌残存细胞(drug surviving cells,DSCs),检测DSCs细胞周期分布情况以及BCSCs标志物ALDH1、CD44、CD24及ABCG2 mRNA和蛋白表达,探讨DSCs是否具有干细胞样特性以及在裸鼠体内验证DSCs细胞的成瘤能力,旨在阐明DSCs细胞的潜在生物学特性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

乳腺癌细胞株MCF-7购于中国科学院上海细胞库,DMEM/F12、高糖DMEM、胎牛血清培养液及B27添加剂(美国Gibco公司),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)(北京中杉金桥生物技术有限公司),多西他赛注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司),CCK-8试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司),ALDH1抗体、CD44抗体、CD24抗体及ABCG2抗体(Abcam公司),山羊抗兔IgG抗体、山羊抗鼠IgG抗体(Bioworld Technology,Inc.),β-actin抗体(中杉金桥公司)。总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒(TaKaRa公司),荧光定量PCR试剂盒(BioTeKe公司),激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5),琼脂糖(赛百思公司),MiniOpticon实时PCR仪和稳压DNA电泳仪(BioRad公司),凝胶成像仪、SDS-PAGE蛋白电泳仪和蛋白转膜仪(上海天能公司),高速离心机(日立公司),Gilson移液器(吉尔森公司),二氧化碳培养箱(Thermo scientific),多功能酶标仪(Sunrise),倒置荧光显微镜(Nikon)。

1.2 实验动物

BALB/c-nude无胸腺裸小鼠25只(购自北京大学实验动物中心),雌性,4~6周龄,体质量12~16 g,饲养于本院实验动物中心,恒温22~25 ℃,恒湿50%~65%,SPF级。饮用水、饲料及实验用品均经灭菌消毒处理,实验操作遵守无菌原则。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将MCF-7细胞接种到含10% FBS的DMEM高糖培养基培养,并添加0.01 mg/mL普通胰岛素,每3天换液1次,每6天传代1次,按1∶2比例传代。细胞株置于37 ℃、5% CO_2及饱和湿度培养箱中培养,细胞呈单层贴壁生长。

1.3.2 获得DSCs细胞 用MTT法测得DTX IC_{50}的浓度约为0.5 μg/mL,将此浓度的DTX持续作用于对数生长期的MCF-7细胞72 h弃培养基,用PBS冲洗3次,加新鲜培养基继续培养1周记为DSCs(1),将DSCs(1)再用浓度为0.5 μg/mL DTX作用72 h,更换新鲜培养基继续培养1周记为DSCs(2),重复上述方法依次得到DSCs(3)、DSCs(4)[6-8]。倒置显微镜下观察DSCs(1~4)的细胞形态。

1.3.3 DSCs(1~4)及MCF-7细胞来源的无血清悬浮法培养"BCSCs微球体"及形态学观察 将MCF-7细胞及DSCs(1~4)细胞分别重悬于不含血清但添加了生长因子bFGF(20 ng/mL)、EGF(20 ng/mL)、2% B27、5 U/L胰岛素、2 mmol/L的L-谷氨酰胺DMEM/F-l2培养液中,以3×10^4/mL接种细胞于低粘附6孔板中培养,每3天半量或全量换液1次。每天于倒置光学显微镜下观察,并计算"BCSCs微球体"的形成率。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期MCF-7细胞及DSCs(1~4)细胞胰酶消化离心重悬后,用PBS洗涤细胞3次,加入1 mL 70%乙醇溶液,4 ℃固定过夜。次日重悬细胞于500 μL PBS,加入2 mg/mL碘化丙啶(PI)后,避光染色30 min,然后使用流式细胞仪计数各细胞周期的细胞数。实验重复3次。

1.3.5 荧光定量PCR检测ALDH1、CD44、CD24及ABCG2 mRNA在DSCs(1~4)及MCF-7中的表达 用TRIzol试剂从MCF-7及DSCs(1~4)中提取总RNA,逆转录为cDNA。逆转录及PCR反应按照TaKaRa试剂盒及荧光定量PCR试剂盒说明书进行操作,β-actin为内参,实验操作均按试剂公司提供的说明书进行。相关引物序列见表1。

表1 RT-PCR引物序列

基因	引物序列	片段大小(bp)
ALDH1	上游:5′-GGCAGCCATTTCTTCTCA-3′	168
	下游:5′-TTGTCCAAGTCGGCATCA-3′	
CD44	上游:5′-CATCTACCCCAGCAACCCTA-3′	127
	下游:5′-ACTGTCTTCGTCTGGGATGG-3′	
CD24	上游:5′-TACCCACGCAGATTTATTCC-3′	154
	下游:5′-ACCACGAAGAGACTGGCTGT-3′	
ABCG2	上游:5′-AGAGTGGCTTTCTACCTTGTCG-3′	124
	下游:5′-AATAACGAAGATTTGCCTCCAC-3′	
β-actin	上游:5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′	285
	下游:5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′	

1.3.6 Western blot 检测 ALDH1、CD44、CD24 及 ABCG2 的蛋白在 DSCs(1~4)及 MCF-7 细胞中的表达 收集对数生长期细胞，加入 RIPA 裂解液及 PMSF，冰上静置 30 min；4 ℃，12 000 r/min 离心 10 min，将上清移至 EP 管中，BCA 法蛋白定量，将蛋白煮沸 5 min 上样。8% 十二烷基酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳，将电泳产物转移至聚偏乙烯(PVDF)膜上，20 mL 封闭液 37 ℃孵育 2 h，加一抗(1∶500)4 ℃孵育过夜。次日 TBST 洗膜 3 次，加入 HRP 标记的二抗(1∶1 000)，37℃孵育 1.5 h，TBST 洗膜 3 次。ECL 孵育 1 min，暗盒内曝光拍照。重复 3 次，Quantity one 软件进行灰度值测定，取平均值。

1.3.7 建立裸鼠移植瘤模型 将 25 只裸鼠随机分为 5 组($n=5$)，取对数生长期的 MCF-7 细胞及 DSCs(1~4)细胞，调整细胞数至 2×10^5/mL，每只裸鼠背部近后肢皮下分别注射细胞悬液 0.1 mL。接种 7 d 后观察成瘤情况，5 周后处死裸鼠，完整剥离瘤体，计算瘤体体积。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两个样本均数比较应用 t 检验，组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 DSCs 细胞形态

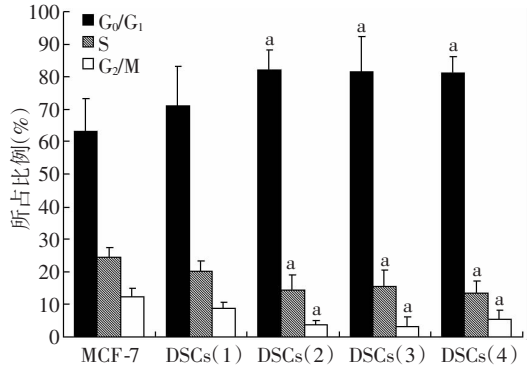
与 MCF-7 细胞相比，DSCs(1~4)细胞单个细胞变小，折光性减弱，整个视野可见细胞数量逐渐减少，细胞间渐渐失去紧密连接，细胞排列开始呈极性铺展并向四周伸长，细胞呈现出异型性，随着药物处理次数增多，上述现象越明显(图 1)。

2.2 MCF-7 及 DSCs(1~4)细胞来源的“BCSCs 微球体”培养及形态学观察

将 5 组细胞在无血清悬浮培养条件下培养，第 10 天时可见 MCF-7、DSCs(2)、DSCs(3)、DSCs(4)形成“BCSCs 微球体”，DSCs(1)未见明显的微球体形成(图 2)。MCF-7 组微球体形成率为(1.03±0.18)%，DSCs(2~4)组分别为(5.26±1.98)%、(7.43±2.47)%、(10.24±3.47)%，差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 MCF-7 和 DSCs(1~4)细胞周期分布

流式细胞仪检测细胞周期显示，DSCs(2~4)细胞中处于静止期(G_0/G_1期)的细胞比例高于 MCF-7 细胞，而处于增殖期(S+G_2/M 期)的细胞比例低于 MCF-7 细胞，差异具有统计学意义($P<0.05$，图 3)。DSCs(1)细胞中处于静止期(G_0/G_1期)的细胞较 MCF-7 细胞增多，但差异无统计学意义($P>0.05$)。

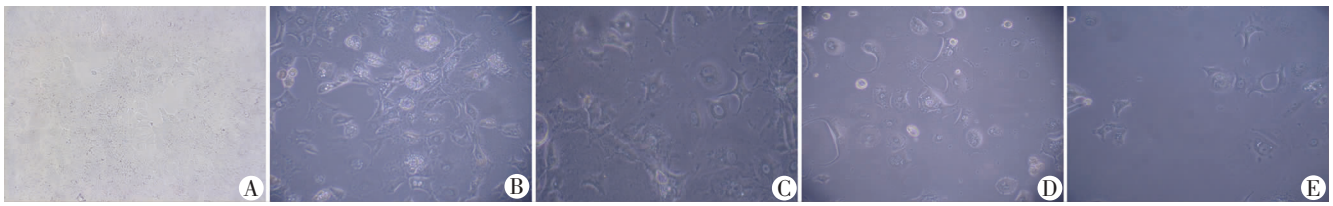


a：$P<0.05$，与 MCF-7 细胞比较

图 3 流式细胞仪检测 MCF-7 细胞及 DSCs(1~4)细胞周期分布

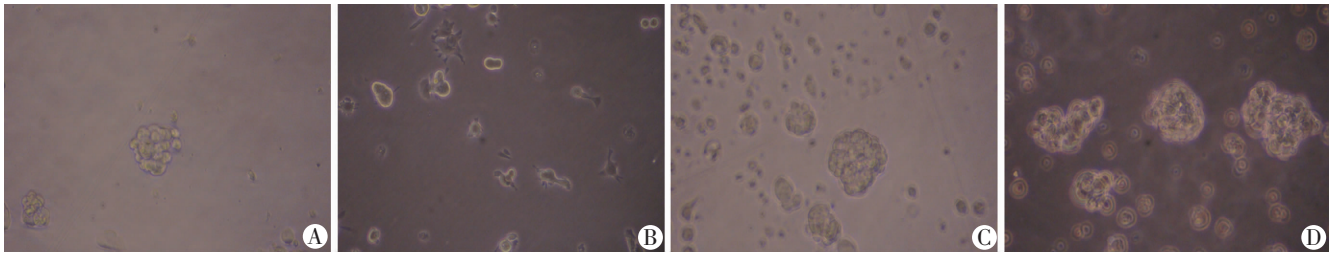
2.4 MCF-7 及 DSCs(1~4)细胞中 ALDH1、CD44、CD24 及 ABCG2 mRNA 表达

与 MCF-7 细胞相比，DSCs(2~4)细胞中 ALDH1、CD44 及 ABCG2 mRNA 表达量呈增高趋势，而 CD24 表达量逐渐降低，差异具有统计学意义($P<0.05$)。DSCs(1)细胞仅有 CD44 表达略微增加，差异无统计学意义($P>0.05$)，ALDH1、CD24、ABCG2 表达量则减少，见图 4。



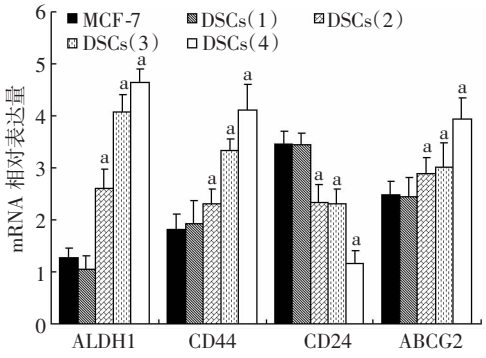
A：MCF-7 细胞；B：DSCs(1)；C：DSCs(2)；D：DSCs(3)；E：DSCs(4)

图 1 相差显微镜观察 MCF-7 细胞及 DSCs(1~4)细胞的形态 (×100)



A：MCF-7 细胞；B：DSCs(2)；C：DSCs(3)；D：DSCs(4)

图 2 相差显微镜观察各组细胞形成的“BCSCs 微球体”形态 (×100)

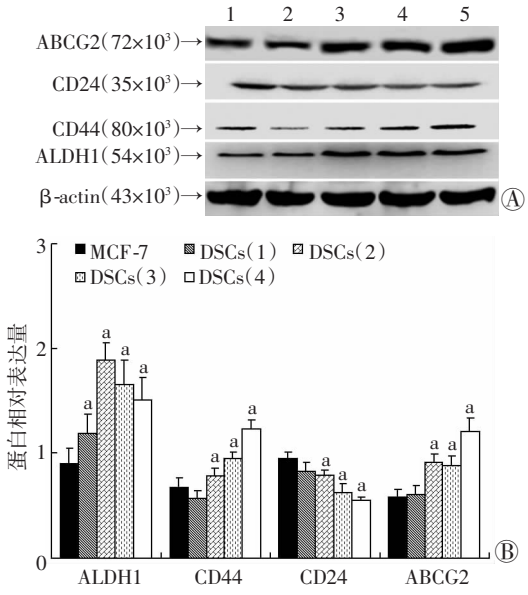


a:$P<0.05$,与 MCF-7 细胞比较

图 4　荧光定量 PCR 检测 ALDH1、CD44、CD24 及 ABCG2 蛋白在 MCF-7 细胞及 DSCs(1～4)细胞中的表达

2.5　MCF-7 及 DSCs(1～4)细胞中 ALDH1、CD44、CD24 及 ABCG2 蛋白表达

与 MCF-7 细胞相比,DSCs(2～4)细胞中 ALDH1、CD44 及 ABCG2 蛋白表达量显著增高,而 CD24 蛋白表达量降低($P<0.05$)。DSCs(1)中 ALDH1 蛋白表达增加($P<0.05$),ABCG2 蛋白表达较 MCF-7 细胞略微升高,CD44、CD24 蛋白表达量则减少,见图 5。

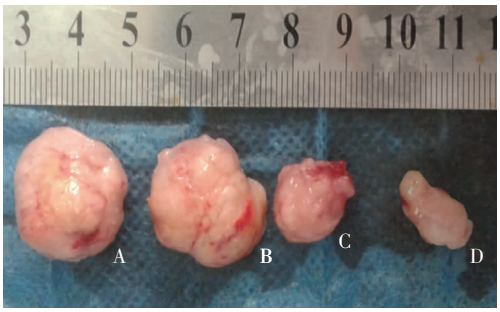


A:Western blot 检测　1:MCF-7 细胞;2～5:DSCs(1～4);B:半定量分析 a:$P<0.05$,与 MCF-7 细胞比较

图 5　Western blot 检测 ALDH1、CD44、CD24 及 ABCG2 蛋白在 MCF-7 细胞及 DSCs(1～4)细胞中的表达

2.6　MCF-7 及 DSCs(1～4)细胞在裸鼠中的成瘤能力

MCF-7 组接种后 2 周左右可触及皮下结节,DSCs(2～4)组于接种后 1 周可触及皮下结节。DCSs(1)组未见明显瘤体形成。接种 MCF-7 细胞仅有 1 只成瘤,接种 DSCs(2～4)细胞的裸鼠均能成瘤,成瘤率为 100%,DCSs(1)组细胞未成瘤。MCF-7 组瘤体体积为(0.57±0.32)cm^3,DSCs(2～4)组瘤体体积较 MCF-7 组大,分别为(1.82±0.21)、(3.46±0.37)、(5.92±0.31)cm^3($P<0.05$,图 6)。



A:DSCs(4)组;B:DSCs(3)组;C:DSCs(2)组;D:MCF-7 组

图 6　MCF-7 和 DSCs(2～4)组裸鼠移植瘤组织大体观察

3　讨论

BCSCs 的存在是导致乳腺癌患者预后不良的重要因素之一。既往研究发现,在接受规范化疗后的乳腺癌组织中可检测到 $CD44^+/CD24^-$ 高表达的细胞亚型,在体外分离培养这种细胞后发现其具有高增殖潜能,利用构建耐药株、长程低剂量药物维持的方法可以富集出 BCSCs 微球体[9-10]。我们在前期研究中,通过采集临床上不同化疗周期患者的乳腺癌组织进行无血清悬浮培养,在化疗 2 个周期以上的组织中成功获得 BCSCs 微球体,并且高表达 ALDH1 表型[11-12],提示化疗后 DSCs 可能具有癌干细胞样特性。

本研究利用短期内大剂量药物作用筛选出不同时间点的 DSCs 细胞(间歇期未用低剂量药物维持)进行检测,细胞周期结果显示这些细胞大部分处于细胞周期的静止期(G_0/G_1期)。利用体外无血清悬浮培养法培养 MCF-7 细胞和 DSCs(1～4)细胞后,观察到 MCF-7 细胞和 DSCs(2～4)细胞能够培养出 BCSCs 微球体,该球体形态与前期分离培养化疗后残存乳腺癌组织得到的 BCSCs 微球体形态相同[12]。这些结果与乳腺肿瘤干细胞的特点相符。荧光定量 PCR 及 Western blot 结果显示 DSCs 细胞高表达标志物 ALDH1、$CD44^+/CD24^-$[13-15],且随药物作用次数呈现梯度性增加。上述结果与我们前期实验检测到化疗后残存的乳腺癌组织高表达 BCSCs 标志物 $CD44^+/CD24^-$,乳腺癌耐药蛋白 ABCG2 以及 P-糖蛋白[5]的结果一致,说明 DSCs 细胞具有癌干细胞样的特性,且常常处于细胞静止期,可能是其逃逸化疗药物杀伤作用的机制之一。

裸鼠体内成瘤实验进一步证实 DSCs 细胞表现出更强的成瘤能力,其中 DSCs(2～4)细胞的成瘤率为 100%,且成瘤速度和大小均强于 MCF-7 细胞。我们同时也观察到 DSCs(1)组中无明显瘤体形成,DSCs

(1)细胞在悬浮培养法中也未见明显微球体,这与我们前期实验发现化疗1个周期的乳腺癌组织不能分离培养出乳腺癌微球体的现象一致[12]。其可能的原因为DTX在杀伤乳腺癌细胞的同时对DSCs细胞造成了一定程度的损伤,DSCs还未能及时适应新环境,此时无血清悬浮培养DSCs(1)及体内成瘤可能对其造成二次打击导致细胞死亡。

此外,ABCG2是另一个BCSCs标志物[16]和公认的乳腺癌耐药蛋白[17]。研究认为,BCSCs高表达乳腺癌相关多药耐药蛋白尤其是ABCG2,化疗药物能诱导ABCG2基因启动子区域发生去甲基化,导致ABCG2转录因子上调,使ABCG2蛋白表达增多[18]。本研究发现,随药物作用次数的增多,DSCs细胞中ABCG2 mRNA及蛋白表达量逐渐增加,趋势与ALDH1、$CD44^+/CD24^-$同步。这与其他研究者检测到化疗后乳腺癌组织中ABCG2、P-糖蛋白表达增多,且增加趋势和ALDH1,$CD44^+/CD24^-$同步的结论一致[5]。说明DSCs细胞具有干细胞特性的同时高表达乳腺癌耐药蛋白ABCG2,推测DSCs细胞可能与化疗多药耐药性相关。

综上所述,DSCs细胞具有乳腺癌干细胞样特性,高表达BCSCs标志物,具有较强的体内成瘤能力。同时,DSCs细胞高表达ABCG2蛋白可能与化疗抵抗以及多药耐药性相关,这需要更多的体外实验及前瞻性临床研究进一步验证。

参考文献:

[1] Noguchi K, Katayama K, Mitsuhashi J, *et al*. Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(1): 26-33.

[2] Sharom F J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance[J]. Pharmacogenomics, 2008, 9(1): 105-127.

[3] Al-Ejeh F, Smart C E, Morrison B J, *et al*. Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(5): 650-658.

[4] 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.

[5] 屈洪波, 范原铭, 韩明利, 等. 化疗后残存乳腺癌组织中乳腺癌耐药蛋白、P-糖蛋白的表达及其与癌干细胞的相关性[J]. 中国医学科学院学报, 2013, 35(2): 171-176.

[6] Culine S, Terret C, Cupissol D, *et al*. Risk-adapted, dose escalation study of weekly docetaxel in the first-line treatment of elderly patients with advanced cancer[J]. J Geriatr Oncol, 2013, 4(2): 122-127.

[7] Koutras A K, Kotoula V, Papadimitriou C, *et al*. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and clinical outcome in patients with metastatic breast cancer treated with weekly docetaxel [J]. Pharmacogenomics J, 2014, 14(3): 248-255.

[8] Chalvatzis N, Manthou M E, Tzamalis A, *et al*. Erosive conjunctival and corneal inflammatory changes in a patient receiving weekly docetaxel for breast cancer[J]. Ocul Immunol Inflamm, 2014, 22(2): 164-166.

[9] Creighton C J, Li X, Landis M, *et al*. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(33): 13820-13825.

[10] Calcagno A M, Salcido C D, Gillet J P, *et al*. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(21): 1637-1652.

[11] 陈元文, 吴诚义, 陈鑫, 等. 长程无血清培养人乳腺癌细胞球的生物学特性[J]. 肿瘤, 2010, 30(4): 283-287.

[12] 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.

[13] Atkinson R L, Yang W T, Rosen D G, *et al*. Cancer stem cell markers are enriched in normal tissue adjacent to triple negative breast cancer and inversely correlated with DNA repair deficiency [J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(5): R77.

[14] Ricardo S, Vieira A F, Gerhard R, *et al*. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype[J]. J Clin Pathol, 2011, 64(11): 937-946.

[15] Croker A K, Goodale D, Chu J, *et al*. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(8B): 2236-2252.

[16] Kusanagi R, Umemoto T, Yamato M, *et al*. Nectin-3 expression is elevated in limbal epithelial side population cells with strongly expressed stem cell markers[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 389(2): 274-278.

[17] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, *et al*. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas $ABCG2^+$ and $ABCG2^-$ cancer cells are similarly tumorigenic[J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6207-6219.

[18] Mo W, Zhang J T. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance[J]. Int J Biochem Mol Biol, 2012, 3(1): 1-27.

(**收稿**:2014-01-28;**修回**:2014-03-19)

(编辑 龙 亮)