论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201410186

缺氧诱导胶质瘤细胞肿瘤干样细胞形成体外初步研究

汪 攀,赵秀文,兰 川,吴 南 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室)

[摘要] **目的** 通过体外研究初步探讨缺氧可以诱导胶质瘤细胞逆分化形成肿瘤干样细胞。**方法** ①采用 $CD133^+$ 细胞免疫磁珠分选法分离胶质瘤细胞得到 $CD133^-$ 细胞群。②缺氧处理 $CD133^-$ 细胞 48 h 后行免疫荧光染色鉴定肿瘤干细胞样标记蛋白(SOX2,OCT-4,KLF-4,Nanog,CD133)表达情况,并分别缺氧处理 0、3、6、9、12、24 h 及 0、12、24、48、72 h 行 qRT-PCR 及 Western blot 检测。流式细胞术检测胶质瘤细胞缺氧培养后 $CD133^+$ 细胞比例变化,检测时间为缺氧培养 1、3、5、7 d。③缺氧处理胶质瘤细胞 1、3、5、7 d 后流式分析细胞周期及凋亡改变。**结果** ①荧光检测结果表明,肿瘤干细胞样标记蛋白在 $CD133^-$ 胶质瘤细胞缺氧处理 48 h 后高表达;qRT-PCR 及 Western blot 检测结果表明,缺氧处理胶质瘤细胞可以明显上调肿瘤干细胞样蛋白表达($P<0.05$),其中 qRT-PCR 显示 SOX-2,OCT-4 及 Nanog 最高表达在缺氧后 9 h,KLF-4 及 CD133 在缺氧后 12 h 表达最高。Western blot 蛋白检测显示 OCT-4 最高表达在缺氧后 12 h,CD133 表达最高在缺氧 24 h 后,KLF-4 及 Nanog 最高表达则在缺氧 48 h 后,SOX-2 在缺氧 72 h 后表达量最高。另外随着缺氧时间的延长,$CD133^+$ 细胞数比例逐渐升高($P<0.05$)。②细胞周期结果提示缺氧处理肿瘤细胞后,G_0/G_1 期延长,$G_2/M+S$ 缩短($P<0.05$);凋亡结果提示常氧培养组更易凋亡($P<0.05$)。**结论** 缺氧可以诱导 $CD133^-$ 胶质瘤细胞肿瘤干样细胞形成。

[关键词] 缺氧;胶质瘤;肿瘤干样细胞

[中图法分类号] R364.4;R730.23;R730.264 [文献标志码] A

Hypoxia induces cancer stem-like cells from glioma cells

Wang Pan, Zhao Xiuwen, Lan Chuan, Wu Nan (Institute of Neurosurgery, Key Laboratory of Neurotrauma Prevention and Treatment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore whether cancer stem-like cells (CSCs) can be induced under hypoxia from glioma cells *in vitro*. **Methods** Glioma cell lines U87 and GL261 and primary glioma cells cultured from pathologically confirmed glioma patients were cultured in DMEM/F12 + 10% FBS, and magnetic-activated cell sorting (MACS) was used to sort $CD133^-$ cells. The markers of CSCs, CD133, SOX-2, OCT-4, KLF-4 and Nanog, were detected by immunofluorescence staining after the $CD133^-$ cells exposure to hypoxia for 48 h. qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of above markers at RNA and protein levels under hypoxia in 0, 3, 6, 9, 12 and 24 h or 0, 12, 24, 48 and 72 h respectively. Flow cytometry was used to detect the proportion of $CD133^+$ cells, cell cycle and cell apoptosis in 1, 3, 5 and 7 d after hypoxia. **Results** Immunofluorescence staining demonstrated the above CSCs markers were highly expressed in 48 h after hypoxia. Both qRT-PCR and Western blotting showed obviously increase in the expression of markers ($P<0.05$). Specifically, qRT-PCR proved that SOX-2, OCT-4 and Nanog reached the

[基金项目] 国家自然科学基金(81272784)

[通信作者] 吴 南,电话:(023)68765265,E-mail:wunan881@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1126.005.html(2015-03-27)

highest expression in 9 h after hypoxia, and KLF-4 and CD133 in 12 h. Western blotting displayed the highest expression of CD133 was seen in 12 h, that of KLF-4 and Nanog in 48 h, and that of SOX2 in 72 h. With the elapse of hypoxic treatment, the proportion of $CD133^+$ was also increased greatly ($P<0.05$). What's more, hypoxia treatment induced $CD133^-$ cells arrested in G_0/G_1 phase, decreased the cells at $G_2/M+S$ phase ($P<0.05$), and resulted in lower apoptotic rate than the cells under normoxia ($P<0.05$). **Conclusion** Hypoxia induces the formation of CSCs from glioma cells.

[**Key words**] hypoxia; glioma; cancer stem-like cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81272784). Corresponding author: Wu Nan, Tel:86-23-68765265, E-mail: wunan881@163.com

包括胶质瘤在内的各种恶性肿瘤处于一个特殊的外部环境中,我们将其称之为肿瘤微环境[1]。肿瘤微环境包括了肿瘤细胞、肿瘤干细胞、基质细胞、免疫细胞以及各种细胞产生的相关因子[1-2],这些细胞及相关因子被认为处在缺氧的特殊环境中[3-4]。研究发现,这样的缺氧微环境在促进实体瘤生长及维持肿瘤恶性上扮演着十分重要的角色。究其原因,目前多数研究归因于缺氧微环境可以增强肿瘤干细胞干性,主要表现为促进肿瘤干细胞增殖及自我更新[5]。而胶质瘤作为颅内最常见的恶性肿瘤,发现其生理状态下的氧浓度范围实际波动在0.5%~7%[6]。最新研究表明在干细胞培养基中(DMEM/F12 + EGF + bFGF + B27)缺氧培养$CD133^-$胶质瘤细胞后,可以高表达肿瘤干细胞样标记蛋白CD133、SOX-2及OCT-4[7],但由于局限于干细胞培养基自身所含生长因子对$CD133^-$肿瘤细胞的影响,因此目前仍不清楚单独缺氧微环境是否可以诱导$CD133^-$胶质瘤细胞表达肿瘤干细胞样蛋白进而诱导肿瘤干样细胞形成。为此,本研究以SOX-2、OCT-4、KLF-4、Nanog及CD133作为胶质瘤干细胞样标记蛋白,初步探讨单纯缺氧微环境下培养胶质瘤细胞蛋白表达变化情况,并从细胞周期及凋亡改变对该现象进行验证,从而证明缺氧可以诱导胶质瘤细胞发生逆分化形成肿瘤干样细胞这一科学假设的正确性。本研究结果可以很好解释胶质瘤术后为何高复发,并为高压氧治疗胶质瘤提供另一科学依据。同时,本研究也证明了胶质瘤干细胞除了来源于正常神经干细胞突变外,分化期胶质瘤细胞发生逆分化形成胶质瘤干样细胞也是其来源的重要途径之一。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM/F12培养基、胎牛血清及胰蛋白酶均购自美国HyClone公司。免疫磁珠分选试剂盒购自德国Miltenyi Biotech公司。细胞周期与凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。鼠抗人单克隆抗体:GFAP(R&D Systems, USA),CD133(MyBiosource, USA)、SOX-2(R&D Systems, USA)、OCT-4(R&D Systems, USA)、KLF-4(R&D Systems, USA)、Nanog(R&D Systems, USA),兔抗人β-actin单克隆抗体购自于Santa Cruz公司。缺氧处理条件:5% CO_2,1% O_2,94% N_2;常氧处理条件:5% CO_2,21% O_2,74% N_2。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及$CD133^-$细胞磁珠分选 原代胶质瘤标本取自于临床经过影像及病理确诊为胶质瘤患者,病理分型为胶质母细胞瘤(WHO Ⅳ级)。将新鲜胶质瘤组织块取下,PBS清洗组织块后移除组织块上的血管及坏死组织。将剩下组织块在胰酶中消化直到有悬浮细胞出现。移取细胞悬液至离心管中离心($300\times g$)5 min后倒掉上清。加入2 mL DMEM/F12完全培养基(DMEM/F12,10%胎牛血清,100 U/mL青霉素,100 μg/mL链霉素)至离心管内重悬细胞。将上述重悬细胞液分装于两个100 mL培养瓶中,再向培养瓶中加入DMEM/F12完全培养基4 mL。细胞置于37 ℃、5% CO_2、足够湿度下培养,隔日换液。上述细胞培养3 d后,按照$CD133^+$细胞磁珠(Miltenyi Biotech, Germany)分选试剂盒说明书进行操作[8],收集非粘附细胞悬液即为$CD133^-$细胞,上述操作重复3遍。所得$CD133^-$细胞于DMEM/F12完全培养基中培养以维持分化状态。U87、GL261胶质瘤细胞系采用相同方法进行$CD133^-$细胞分选。

1.2.2 免疫荧光观察 免疫荧光用于分选后胶质瘤(GFAP)鉴定及干细胞样标记蛋白(CD133, SOX-2, OCT-4, KLF-4, Nanog)检测。分选后传代3代且状态佳的原代细胞用4%多聚甲醛于4 ℃条件下固定15 min。PBS清洗3遍,每次3 min。滴加1% Triton于载玻片上持续25~30 min后PBS清洗2遍,每次5 min。羊血清37 ℃下封闭20 min后孵育GFAP(1∶100),并于4℃下孵育过夜。37 ℃下PBS清洗

5遍,每次3 min。37 ℃孵育二抗1 h,PBS清洗3遍,每次5 min。晾干封片并于激光共聚焦显微镜(LSM780,ZEISS, Germany)下行图像采集。原代胶质瘤细胞缺氧处理48 h后采用上述相同方法行免疫荧光检测。

1.2.3 荧光定量PCR(qRT-PCR)检测 CD133⁻胶质瘤细胞暴露于缺氧环境0、3、6、9、12、24 h,收集各时间点细胞并提取总RNA后,以β-actin作为内参,加入合成的miRNA引物序列后行逆转录反应,并进行Real-time PCR。引物序列:CD133(人)上游引物:5′-GCCCCCAGGAAATTTGAGGAAC-3′,下游引物:5′-GCTTTGGTATAGAGTGCTCAGTGATTG-3′;SOX-2(人)上游引物:5′-GGAGGGGTGCAAAAGAGGAGAG-3′,下游引物:5′- TCCCCCAAAAAGAAGTCCAGG-3′;OCT-4(人)上游引物:5′-CCCGCCGTATGAGTTCTGTGG-3′,下游引物:5′-CCGGGTTTTGCTCCAGCTTCTC-3′;KLF-4(人)上游引物:5′-GGCTGCGGCAAAACCTACAC-3′,下游引物:5′-CGGGCGAATTTCCATCCAC-3′;Nanog(人)上游引物:5′-CCGCGCCCTGCCTAGAAAAGAC-3′,下游引物:5′- AGCCTCCCAATCCCAAACAATACG-3′。反应条件:94 ℃ 2 min→65 ℃ 40 s→72 ℃ 1 min,共40个循环。通过Bio-Rad CFX Manager Software软件分析得到PCR相对表达量。

1.2.4 Western-blot检测蛋白表达 CD133⁻胶质瘤细胞暴露于缺氧环境0、12、24、48、72 h,收集各时间点细胞提取总蛋白并予以定量,行SDS-PAGE电泳2 h至PVDF膜。封闭采用10%脱脂奶粉。予以一抗CD133(1∶1 000),SOX-2(1∶1000),OCT-4(1∶1 000),KLF-4(1∶1 000)及Nanog(1∶1 000)4 ℃过夜,予以抗人IgG二抗1∶10 000孵育30 min,洗涤后显影。Quantity One分析软件进行目的条带及内参条带灰度值分析,二者比值(目的条带灰度值/内参条带灰度值)作为蛋白相对表达量。

1.2.5 流式细胞仪CD133⁺细胞比例检测 CD133⁻胶质瘤细胞暴露于缺氧环境1、3、5、7 d,以常氧培养组作为对照组。重悬各时间点细胞并计数,取约1×10^6个细胞,离心($300\times g$)5 min后弃上清,加入1 mL 4 ℃预冷PBS重悬细胞,离心($300\times g$)5 min;弃上清,加入100 μL PBS重悬细胞,再加入1.25 μL CD133⁻ APC(0.25 μL/test),4℃避光孵育45 min后离心($300\times g$)5 min,弃上清;1 mL PBS重悬细胞并离心($300\times g$)5 min,弃上清后200 μL PBS重悬细胞并予流式细胞仪(Beckman,USA)检测,ModfitLT for Mac 3.0软件数据分析。

1.2.6 流式细胞术细胞周期及凋亡检测 细胞周期检测:CD133⁻胶质瘤细胞暴露于缺氧环境1、3、5、7 d,以常氧培养组作为对照组。重悬各时间点细胞并细胞计数,取约1×10^6个细胞,($300\times g$)5 min;弃上清,加入1 mL 4 ℃预冷75%乙醇固定细胞24 h,离心($300\times g$)5 min;弃上清,1 mL PBS重悬细胞,($300\times g$)5 min,弃上清;120~150 μL RNAase,37 ℃孵育40 min;150~200 μL PI,4 ℃孵育2 h后予流式细胞术(Beckman,USA)检测,ModfitLT for Mac 3.0软件数据分析。细胞凋亡检测:CD133⁻胶质瘤细胞暴露于缺氧环境1、3、5、7 d,以常氧培养组作为对照组。各时间点细胞收集后予4 ℃预冷PBS重悬细胞并计数,调整细胞密度约为1×10^6个/mL,取100 μL细胞(约10万个细胞)悬液,($300\times g$)5 min;弃上清,加入195 μL结合缓冲液轻轻重悬细胞,加入5 μL Annexin V-FITC轻轻混匀,室温(20~25 ℃)避光孵育15 min后离心($300\times g$)5 min;弃上清,加入190 μL结合缓冲液轻轻重悬细胞,10 μL PI(碘化丙啶)溶液,轻轻混匀,室温避光放置20 min后予流式细胞仪(Beckman,USA)检测,ModfitLT for Mac 3.0软件数据分析。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件处理,统计方法采用独立样本t检验。

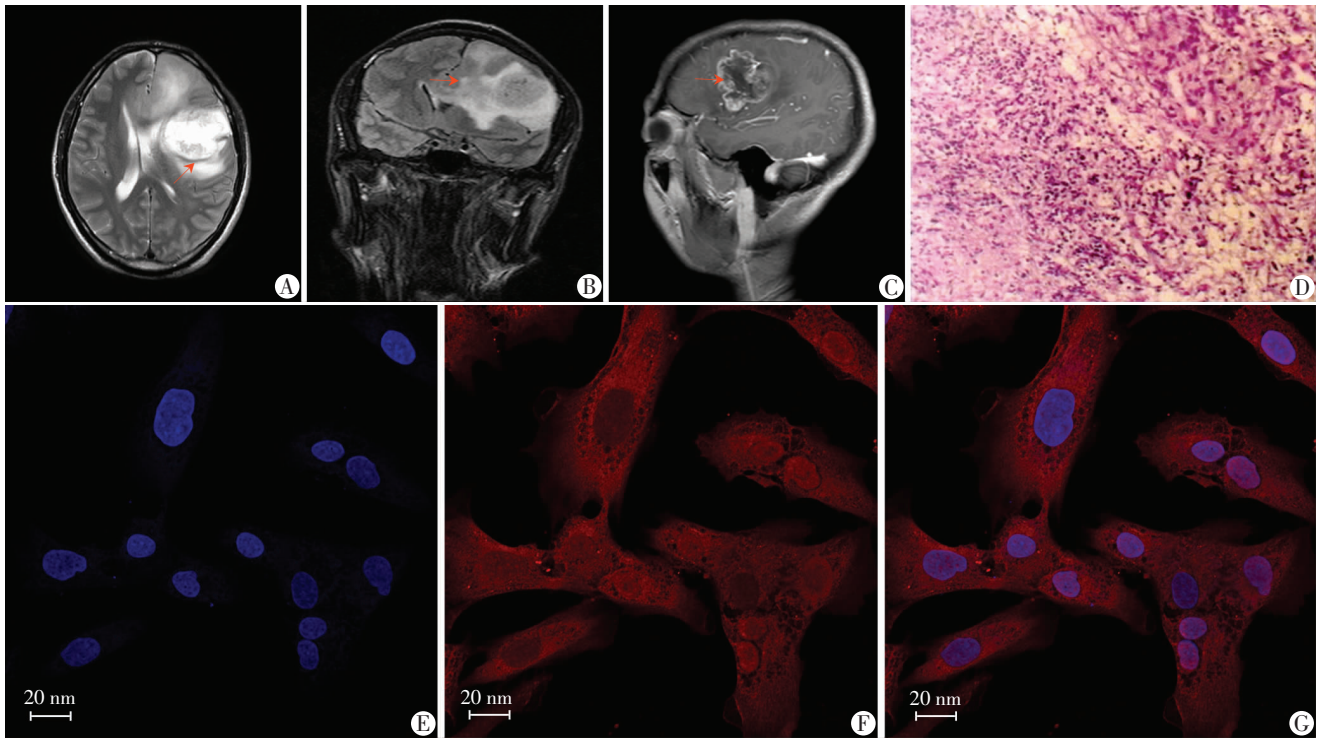
2 结果

2.1 临床胶质瘤影像学、病理学诊断及分选后胶质瘤鉴定

术前颅脑MRI显示额顶叶占位性病变,术后HE示胶质瘤性改变,免疫组化染色:GFAP弱(+),Vim(+),Ki67阳性细胞数40%,Olig-2(+),MGMT部分细胞(+),CD34血管(+),Pgp(+),GST-π(−),TOP-Ⅱ(+),ERCC1(+),病理诊断为胶质母细胞瘤(WHO Ⅳ级)。分选后GFAP荧光鉴定示该肿瘤细胞为胶质瘤细胞(图1)。

2.2 荧光染色检测缺氧处理CD133⁻细胞48h肿瘤干细胞样标记蛋白表达

原代胶质瘤细胞经免疫磁珠分选后所得CD133⁻细胞于DMEM/F12完全培养基中缺氧培养48 h后行免疫荧光染色鉴定肿瘤干细胞样标记蛋白。结果显示常氧培养胶质瘤细胞并不表达肿瘤干细胞样标记蛋白OCT-4,缺氧处理48 h后SOX-2,OCT-4,KLF-4,Nanog及CD133均高表达,提示缺氧可以诱导肿瘤干细胞样标记蛋白表达,GL261、U87胶质瘤细胞系缺氧培养后得到相同结果(图2)。



A－C:术前颅脑 MRI 表现 ↑:示肿瘤部位;D:术后 HE 染色;E－F:细胞分选后 GFAP 鉴定

图 1 胶质瘤标本临床影像、病理及分选后 GFAP 荧光鉴定

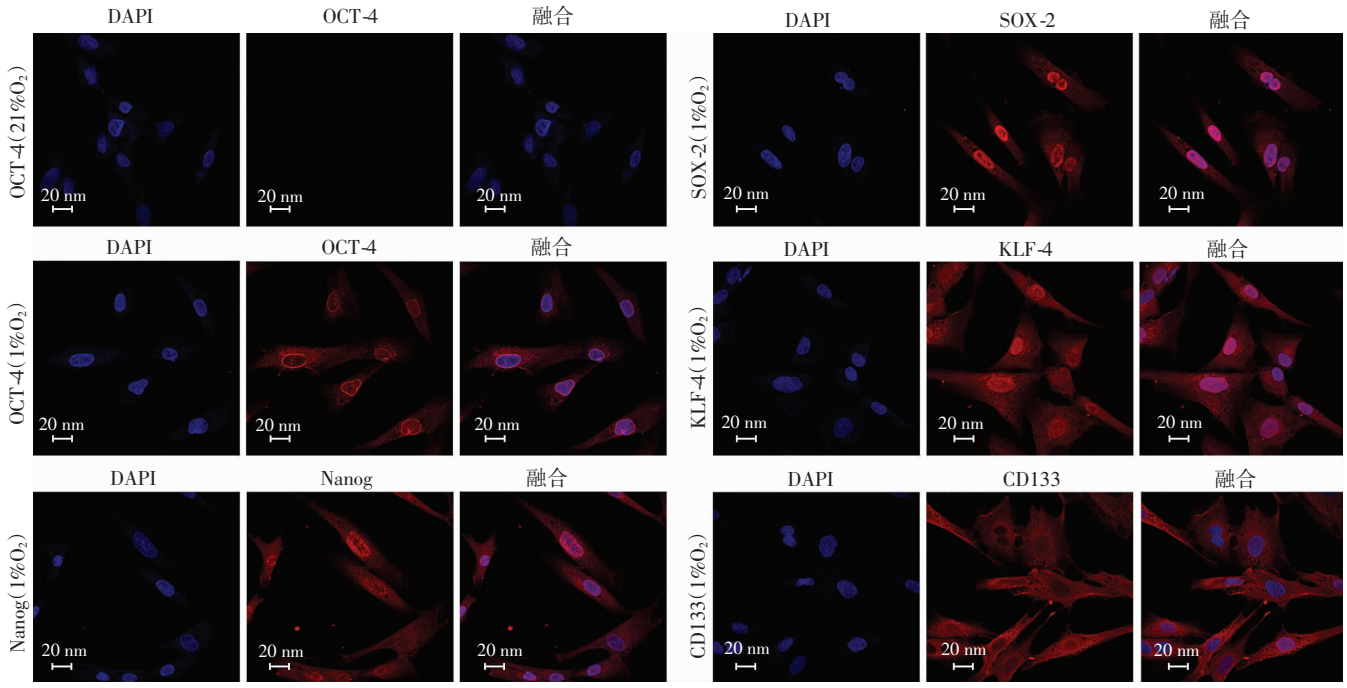
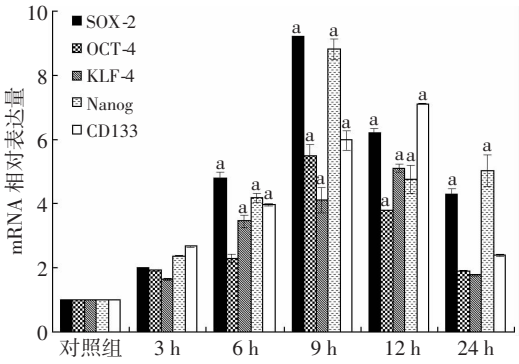


图 2 荧光染色检测缺氧处理 $CD133^-$ 细胞后 48 h 肿瘤干细胞样标记蛋白表达

2.3 qRT-PCR 定量结果及 Western blot 检测结果

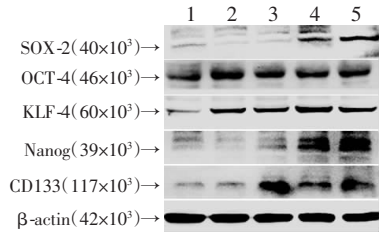
qRT-PCR 显示随着缺氧时间的延长,肿瘤干细胞样标记物 RNA 含量逐渐升高。SOX-2,OCT-4,Nanog 最高表达在缺氧 9h,KLF-4 及胶质瘤干细胞经典标记物 CD133 最高表达均在缺氧后 12 h,GL261、U87 胶质瘤细胞系验证表明肿瘤干细胞样标记物与缺氧培养同样具有时间依赖性($P<0.05$)。常氧培养终末分化胶质瘤细胞低表达或不表达肿瘤干细胞样蛋白,缺氧处理后,蛋白表达含量逐渐升高。具体而言,OCT-4 最高表达在缺氧后 12 h,CD133 表达最高在缺氧 24 h 后,

KLF-4及Nanog最高表达则在缺氧48 h后,SOX-2在缺氧72 h后表达量最高($P<0.05$)。GL261、U87胶质瘤细胞系验证表明随着缺氧时间的延长,其肿瘤干细胞样标记蛋白同样呈升高趋势(图3、4)。



$n=3$, a:$P<0.05$

图3 qRT-PCR定量检测胶质瘤细胞高表达肿瘤干细胞样标记蛋白表达



1:对照组;2:12 h;3:24 h;4:48 h;5:72 h

图4 Western blot检测缺氧处理后的胶质瘤细胞高表达肿瘤干细胞样标记蛋白

2.4 缺氧培养CD133⁻胶质瘤细胞后CD133⁺数比例改变

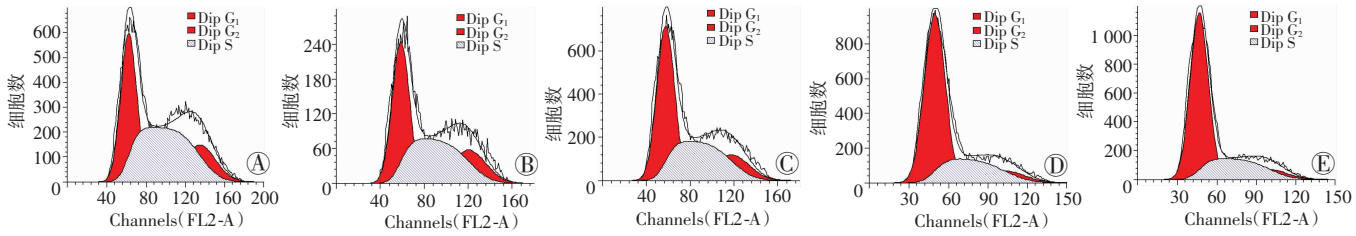
经CD133⁺细胞磁珠分选后的原代胶质瘤细胞行缺氧培养,流式细胞术检测发现对照组CD133⁺细胞比例仅为5.59%,缺氧培养3 d后该比例增加到11.9%,第5天后其比例为23.1%,7 d后比例达到49.2%,统计学分析得差异具有统计学意义($P<0.05$),即CD133⁺细胞数随着缺氧时间的延长,其比例逐渐升高。GL261、U87胶质瘤细胞系缺氧处理得到相同结果。

2.5 缺氧培养CD133⁻胶质瘤细胞后周期、凋亡检测结果

周期检测结果表明CD133⁻原代胶质瘤细胞随着缺氧时间的延长,其G_0/G_1期逐渐延长,$G_2/M+S$逐渐减少($P<0.05$);凋亡检测结果从总体凋亡角度出发,可见缺氧组凋亡率明显低于常氧组,尤其以第3天及第5天比较明显;早期凋亡可见在第3天,常氧组凋亡率高于缺氧组,而晚期凋亡常氧组凋亡主要在5 d后,缺氧组一直到第7天仍未见细胞凋亡($P<0.05$)。GL261、U87胶质瘤细胞系缺氧处理得到相同结果(图5、6)。

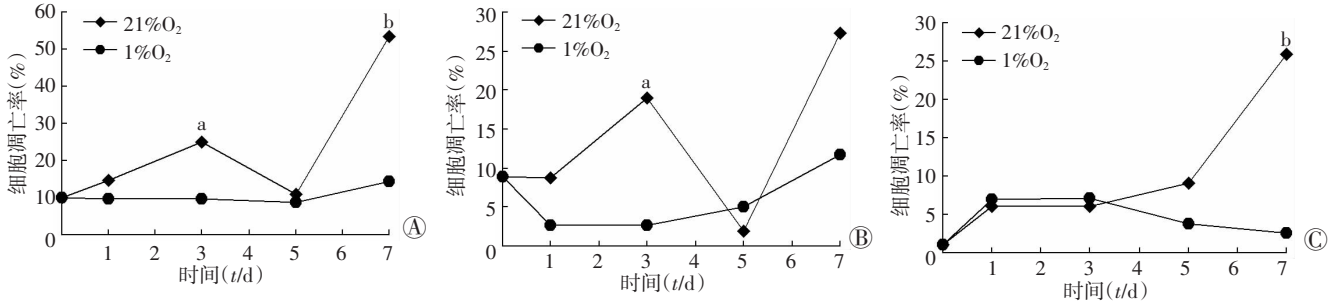
3 讨论

肿瘤干细胞因为具有自我更新和无限增殖能力而在肿瘤耐药过程中扮演重要角色,而肿瘤干细胞的这



A:常氧组(21% O_2);B:缺氧组(1% O_2)1 d;C:缺氧组(1% O_2)3 d;D:缺氧组(1% O_2)5 d;E:缺氧组(1% O_2)7 d

图5 CD133⁻原代胶质瘤细胞缺氧培养后周期检测结果



A:总体凋亡率;B:早期凋亡率;C:晚期凋亡率 a:$P<0.05$,b:$P<0.05$,与1% O_2比较

图6 CD133⁻原代胶质瘤细胞缺氧培养后凋亡检测结果

种高度耐药性被认为与缺氧微环境密切相关[9]。既往研究表明肿瘤干细胞在缺氧环境下表现为增殖加快并使得肿瘤干细胞样蛋白表达增加[6-7]。但由于肿瘤干细胞在实体瘤中比例极少,因此单纯认为缺氧促进肿瘤干细胞增殖并加重其恶性程度还不足以成为解释胶质瘤术后高复发及高度耐药的可靠依据。基于此,我们着手研究缺氧对非胶质瘤干细胞的影响并以此分析缺氧是否可以增加肿瘤干细胞样蛋白表达。CD133作为胶质瘤经典标记物[10],尽管目前有研究报道认为$CD133^-$细胞同样具有自我更新和无限增殖能力[11],但大多数研究者仍将其视作胶质瘤干细胞有效的分选标记蛋白。除此之外,SOX-2、OCT-4及KLF-4作为多能性转录因子[12],不仅在诱导多能干细胞中起着至关重要的作用,近年来在实体瘤中也发现了其作为肿瘤干细胞标记物的可靠依据[13-14]。Nanog作为胚胎干细胞经典标记物,在脑癌、结肠癌等中已成功分理出$Nanog^+$细胞并鉴定出具有自我更新,无限增殖及高度侵袭能力[15-16]。基于上述理论基础,我们以SOX-2、OCT-4、KLF-4、Nanog及CD133作为肿瘤干细胞样标记物,分析研究了$CD133^-$胶质瘤细胞在缺氧环境下是否可以发生逆分化而形成肿瘤干样细胞,并从细胞周期及凋亡特性上予以验证。

荧光检测结果显示$CD133^-$胶质瘤细胞在缺氧处理48h后高表达肿瘤干细胞样标记蛋白,包括SOX-2、OCT-4、KLF-4、Nanog及CD133。荧光定量PCR(qRT-PCR)及Western blot检测结果同样发现随着缺氧时间的延长,肿瘤干细胞样标记蛋白呈升高趋势。流式细胞术检测发现胶质瘤细胞随着缺氧时间的延长,经典胶质瘤干细胞标记物$CD133^+$数也呈升高趋势。上述结果提示缺氧可以诱导分化期胶质瘤细胞发生逆分化形成新的胶质瘤干样细胞,这也提示胶质瘤干细胞除了来源于正常干细胞突变外,终末分化胶质瘤细胞同样有可能形成新的胶质瘤干细胞。为了验证这种理论的正确性,我们从胶质瘤干细胞的细胞周期及凋亡特性予以验证。实验结果表明,缺氧培养$CD133^-$胶质瘤细胞后细胞周期特异性阻滞于G_0/G_1期,而$G_2/M+S$比例逐渐减少,这与Watanabe等[17]报道的肿瘤干细胞周期特性一致;另外细胞凋亡检测结果表明$CD133^-$胶质瘤细胞缺氧培养后,其抗凋亡能力明显增强,这符合了Peng等[18]报道的肿瘤干细胞抗凋亡能力强于非肿瘤干细胞的特性。因此,从细胞周期及凋亡角度也证明了缺氧逆分化胶质瘤而形成肿瘤干样细胞理论的正确性。研究表明胶质瘤富含缺氧微环境[19],而且胶质瘤起始于$CD133^+$细胞[10,20],因此本研究可以很好解释胶质瘤术后短期高复发的机制,并为高压氧联合放化疗治疗胶质瘤的临床应用和机制研究提供新的实验证据。另外,本研究提示$CD133^-$胶质瘤细胞在缺氧后12 h最先开始高表达OCT-4,提示OCT-4在包含SOX-2、KLF-4及Nanog在内的所有转录因子中维持干细胞干性上占据着主导地位[21],这与诱导多能干细胞只需要SOX-2及OCT-4就可以成功诱导相符[22]。SOX-2、KLF-4主要通过维持OCT-4水平予以维持干细胞干性,Nanog则通过阻止干细胞分化而维持干性,这与我们SOX-2、OCT-4及KLF-4高表达滞后于OCT-4结果相符。近年来研究者认为肿瘤是一种干细胞疾病,尽管已经在各实体瘤中成功分离出上述各种转录因子阳性细胞并证明其具有干细胞特性,但具体如何调控肿瘤细胞的未分化及分化状态仍需进一步研究。本研究还发现CD133高表达先于Nanog,而Nanog作为一种多能性转录因子在缺氧后的胶质瘤细胞中高表达也为Nanog作为肿瘤干细胞标记物提供了新的理论依据,而CD133与Nanog之间如何相关,具体调控机制如何以及Nanog作为胶质瘤干细胞标记物的可靠性仍待进一步研究。

参考文献:

[1] Yi S Y, Hao Y B, Nan K J, *et al*. Cancer stem cells niche: a target for novel cancer therapeutics[J]. Cancer Treat Rev, 2013, 39(3): 290-296.

[2] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, *et al*. A perivascular niche for brain tumor stem cells[J]. Cancer Cell, 2007, 11(1): 69-82.

[3] Yun Z, Lin Q. Hypoxia and regulation of cancer cell stemness [J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 772: 41-53.

[4] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in tumors: pathogenesis-related classification, characterization of hypoxia subtypes, and associated biological and clinical implications[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 812: 19-24.

[5] Zhu T S, Costello M A, Talsma C E, *et al*. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells[J]. Cancer Res, 2011, 71(18): 6061-6072.

[6] Bar E E, Lin A, Mahairaki V, *et al*. Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres [J]. Am J Pathol, 2010, 177(3): 1491-1502.

[7] Li P, Zhou C, Xu L, *et al*. Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an *in vitro* study [J]. Int J Med Sci, 2013, 10(4): 399 - 407.

[8] 王勇, 唐川, 兰曦, 等. 沉默 CD133 基因对 $CD133^+$ 肝癌干细胞放射敏感性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(23): 2373 - 2377.

[9] Semenza G L. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy [J]. Trends Pharmacol Sci, 2012, 33(4): 207 - 214.

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

[11] Wang J, Sakariassen P O, Tsinkalovsky O, *et al*. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells [J]. Int J Cancer, 2008, 122(4): 761 - 768.

[12] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4): 663 - 676.

[13] Kumar S M, Liu S, Lu H, *et al*. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation [J]. Oncogene, 2012, 31(47): 4898 - 4911.

[14] Papapetrou E P, Tomishima M J, Chambers S M, *et al*. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(31): 12759 - 12764.

[15] Amsterdam A, Raanan C, Schreiber L, *et al*. LGR5 and Nanog identify stem cell signature of pancreas beta cells which initiate pancreatic cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 433(2): 157 - 162.

[16] 朱传琳, 姚超, 钱程, 等. 应用 Lv-pNanog-GFP 慢病毒载体探讨 Nanog 在调控结直肠癌细胞的自我更新与转移能力中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(1): 29 - 32.

[17] Watanabe Y, Yoshimura K, Yoshikawa K, *et al*. A stem cell medium containing neural stimulating factor induces a pancreatic cancer stem-like cell-enriched population[J]. Int J Oncol, 2014, 45(5): 1857 - 1866.

[18] Peng Z, Wang C X, Fang E H, *et al*. Role of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer initiation and progression[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(18): 5403 - 5410.

[19] Sgubin D, Wakimoto H, Kanai R, *et al*. Oncolytic herpes simplex virus counteracts the hypoxia-induced modulation of glioblastoma stem-like cells [J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(4): 322 - 332.

[20] Kang T W, Choi S W, Yang S R, *et al*. Growth arrest and forced differentiation of human primary glioblastoma multiforme by a novel small molecule[J]. Sci Rep, 2014, 4: 5546.

[21] Shi Y, Desponts C, Do J T, *et al*. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds [J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(5): 568 - 574.

[22] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, *et al*. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(11): 1269 - 1275.

(**收稿**:2014-10-16;**修回**:2015-01-29)

(编辑 栾 嘉)