基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000965

类肿瘤干细胞标记物及缺氧诱导因子-1α在口腔鳞癌组织中的表达及相关性研究

李立峰,季 平,王 俊

(重庆医科大学附属口腔医院颌面外科、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室、重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室,重庆 401147)

【摘 要】目的:检测类肿瘤干细胞(cancer stem-like cell,CSC)标记物(CD44、ALDH1、NANOG)及缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)在口腔鳞癌组织中的表达并进行相关性分析。**方法**:应用免疫组化法检测 40 例重庆医科大学附属口腔医院颌面外科手术切除的口腔鳞癌组织、10 例癌旁组织、10 例淋巴结转移的淋巴结组织以及 10 例正常淋巴结组织中 CD44、ALDH1、NANOG 及 HIF-1α 的表达,采用 Fisher 确切概率法及秩和检验分析这些标记物与 HIF-1α 之间及其与肿瘤分化程度、分期及淋巴结转移的关系。**结果**:(1)CD44、NANOG、HIF-1α 在口腔鳞癌组织与癌旁组织中的表达差异均存在统计学意义(P_{CD44}=0.000;P_{NANOG}=0.000;$P_{HIF-1\alpha}$=0.000);(2)HIF-1α 与 CD44 在口腔鳞癌中的表达存在相关性(r_s=0.498,P=0.027);(3)CD44、ALDH1、NANOG 及 HIF-1α 在口腔鳞癌组织中的表达与分化程度、临床分期及淋巴结转移均无明显相关性。**结论**:CD44、NANOG、HIF-1α 在口腔鳞癌组织中呈高表达,其中 CD44 与 HIF-1α 的表达具有相关性。联合检测 CD44、NANOG、HIF-1α 可能对口腔鳞癌早期诊断具有重要意义。

【关键词】类肿瘤干细胞标记物;缺氧诱导因子-1α;口腔鳞癌;相关性分析

【中图分类号】R739.86 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-12-18

作者介绍:李立峰,Email:llf1021@163.com,
研究方向:口腔颌面部肿瘤的临床与基础研究。

通信作者:季 平,Email:jiping_62@hotmail.com。

基金项目:重庆市卫生局重点项目专项资助项目(编号:2013-1-030)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1612.076.html (2016-05-13)

(9):1018-1026.

[13] Dijkstra MH,Pirinen E,Huusko J,et al. Lack of cardiac and high-fat diet induced metabolic phenotypes in two independent strains of Vegf-b knockout mice[J]. Sci Rep,2014(4):6238.

[14] Sun CY,Lee CC,Hsieh MF,et al. Clinical association of circulating VEGF-B levels with hyperlipidemia and target organ damage in type 2 diabetic patients[J]. J Biol Regul Homeost Agents,2014,28(2):225-236.

[15] Virkamaki A,Korsheninnikova E,Seppala-Lindroos A,et al. Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake,antilipolysis,and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle[J]. Diabetes,2001,50(10):2337-2343.

[16] Kuhlmann J,Neumann-Haefelin C,Belz U,et al. Intramyocellular lipid and insulin resistance:a longitudinal in vivo 1H-spectroscopic study in Zucker diabetic fatty rats[J]. Diabetes,2003,52(1):138-144.

[17] Zhou YP,Grill VE. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle[J]. J Clin Invest,1994,93(2):870-876.

[18] Grill V,Qvigstad E. Fatty acids and insulin secretion[J]. Br J Nutr,2000,8(Suppl 1):79-84.

[19] Poitout V,Hagman D,Stein R,et al. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids[J]. J Nutr,2006,136(4):873-876.

[20] Veret J,Coant N,Berdyshev EV,et al. Ceramide synthase 4 and de novo production of ceramides with specific N-acyl chain lengths are involved in glucolipotoxicity-induced apoptosis of INS-1 beta-cells[J]. Biochem J,2011,438(1):177-189.

[21] Barlow J,Affourtit C. Novel insights into pancreatic beta-cell glucolipotoxicity from real-time functional analysis of mitochondrial energy metabolism in INS-1E insulinoma cells[J]. Biochem J,2013,456(3):417-426.

[22] Piro S,Anello M,Di Pietro C,et al. Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets:possible role of oxidative stress[J]. Metabolism,2002,51(10):1340-1347.

[23] Shimabukuro M,Zhou YT,Lee Y,et al. Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of Zucker diabetic fatty rats[J]. J Biol Chem,1998,273(6):3547-3550.

(责任编辑:唐秋姗)

Expression and correlation of cancer stem-like cell markers CD44, ALDH1, NANOG and hypoxia inducible factor-1α in oral squamous cell carcinoma

Li Lifeng, Ji Ping, Wang Jun

(Department of Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education)

【Abstract】***Objective***: To investigate the expression and correlation of cancer stem-like cell(CSC) markers CD44, ALDH1, NANOG and hypoxia inducible factor-1α(HIF-1α) in oral squamous cell carcinoma. ***Methods***: Expression of CD44, ALDH1, NANOG and HIF-1α in 40 cases of oral squamous cell carcinoma tissues, collected form the Affiliated Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, 10 cases of metastatic lymph node tissues, 10 cases of non cancer tissues and 10 cases of normal lymph node tissues were detected using immunohistochemistry .The correlations of the expression of the makers and HIF-1α as well as their correlations with tumor differentiation, histological type, clinical stage and lymphoid metastasis were analyzed using Fisher exact test and Kruskal-Wallis test. ***Results***: (1)The expressions of CD44, NANOG, HIF-1α were significantly higher than those in non-cancer tissues(P_{CD44}=0.000; P_{NANOG}=0.000; $P_{HIF-1\alpha}$=0.000). (2)Only expression of CD44 was positively correlated with HIF-1α expression in oral squamous cell carcinoma(r_s=0.498, P=0.027). (3)Expression of CD44, ALDH1, NANOG and HIF-1α was not correlated with tumor differentiation, histological type and lymphoid metastasis. ***Conclusion***: The positive expressions of CD44, NANOG and HIF-1α in oral squamous cell carcinoma are higher than those of non-cancer tissues. Expression of CD44 showed significant correlation with HIF-1α expression. This may suggest that the combined examination of CD44, NANOG and HIF-1α may be significant for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma.

【Key words】cancer stem-like cell markers; hypoxia-inducible factor-1α; oral squamous cell carcinoma; correlation analysis

类肿瘤干细胞(cancer stem-like cell, CSC)是一类具有自我更新和分化潜能的干细胞特性的肿瘤细胞亚群，能同时分化出不同表型的非致瘤性肿瘤细胞及致瘤性肿瘤细胞[1]。CSC 研究的关键是对其进行分离纯化，而这需要依赖特异性的分子标记物。目前，口腔鳞癌特异性的 CSC 至今仍未被分离出来，其标记物也不清楚。缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)是哺乳动物在缺氧条件下广泛存在的一种转录调节因子，可调节如 CSC 干性维持相关因子、血管生成因子等多种靶基因的表达，在肿瘤细胞凋亡、转移及血管生成等生物学行为中起着重要作用[2]。目前研究较多的口腔鳞癌CSC标记物是 CD44、ALDH1、NANOG 等[3-8]，但它们在口腔鳞癌实体组织中的表达及其与 HIF-1α 之间的相互关系鲜见报道。本实验拟采用免疫组织化学染色的方法，分别检测口腔鳞癌组织及转移淋巴结组织中 CSC 标记物 CD44、ALDH1、NANOG 及 HIF-1α 的表达情况，并探讨这些指标之间及其与口腔鳞癌临床病理学指标之间的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2014 年 3 月至 2015 年 12 月间重庆医科大学附属口腔医院颌面外科手术切除的口腔鳞癌原发灶标本共 40 例，均经病理诊断为鳞状细胞癌，其中男性 31 例，女性 9 例；年龄 43~81 岁，中位年龄 62 岁；高分化 20 例，中分化 11 例，低分化 9 例；有淋巴结转移的为 20 例，无淋巴结转移的为20例。另外，10 例淋巴结转移的淋巴结组织切片及 10 例正常淋巴结组织切片购自重庆医科大学病理诊断中心。临床分期：Ⅰ期 4 例，Ⅱ期 5 例，Ⅲ期 17 例，Ⅳ期 14 例。所有患者诊断标准均依据口腔癌和口咽癌的国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)2010 分类进行诊断分类。另外在 40 例口腔鳞癌原发灶组织对应的癌旁正常口腔组织(术中快速冰冻病理诊断均为正常组织)取 10 例作对照研究。术前患者均未行化疗或放疗。

1.2 试剂来源

所选用抗体均购自美国 abcam 公司，CD44、ALDH1 及 HIF-1α 均为兔抗人单抗，NANOG 为兔抗人多抗。免疫组化所用的 SP 超敏试剂盒购自福州迈新生物技术公司。

1.3 免疫组化染色及结果判定

用于免疫组化标本分别经常规制成 4 μm 厚连续石蜡切

片，采用链菌素抗生物素蛋白-过氧化物酶法(S-P 法)分别检测 CD44、ALDH1、NANOG 及 HIF-1α 的表达，光镜下观察。免疫组化二步法染色程序严格按照试剂盒说明书操作步骤进行。PBS 磷酸缓冲液代替一抗作阴性对照。免疫组化染色结果判定标准按照参考文献报道标准[9]：每张切片取 4 个不同高倍视野下，计数 200 个癌细胞，阳性细胞数为 0，记 0 分，1%~10%记 1 分，11%~50%记 2 分，51%~80%记 3 分，81%~100%记 4 分；根据免疫阳性细胞染色强弱程度，无着色为 0 分，弱阳性为 1 分，中等强度为 2 分，强阳性为 3 分。2 项得分相乘≥3 分计为阳性病例。由 3 位病理科医生在不了解患者临床预后情况下独立进行观察判断，对独立判断不一致的病例再共同进行观察。

1.4 统计学方法

所有数据统计方法采用 SPSS 20.0 软件统计包分析处理，采用 Fisher 确切概率法分析 CD44、ALDH1、NANOG 及 HIF-1α 在所检测组织标本中阳性表达的差异性，采用秩和检验分析 CD44、ALDH1、NANOG 及 HIF-1α 在不同分化程度及不同临床分期肿瘤中表达的差异性。Spearman 相关分析 CD44、ALDH1、NANOG 及 HIF-1α 在口腔鳞癌组织表达的相关性。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 CD44、ALDH1、NANOG、HIF-1α 蛋白表达在口腔鳞癌组织、非癌组织、转移淋巴结以及正常淋巴结组织中的表达

口腔鳞癌组织中 CD44 蛋白表达主要定位于细胞膜，ALDH1 及 HIF-1α 蛋白表达主要定位于细胞质，NANOG 蛋白表达主要定位于细胞核，所有阳性表达产物均呈棕黄色颗粒。在 40 例口腔鳞癌组织中，CD44 阳性表达率为 95.0%，ALDH1 阳性表达率为 32.5%，NANOG 阳性表达率为 82.5%，HIF-1α 阳性表达率为 82.5%。CD44、NANOG、HIF-1α 在口腔鳞癌组织中的表达均高于癌旁组织，差异存在统计学意义（P_{CD44}=0.000；P_{NANOG}=0.000；$P_{HIF-1\alpha}$=0.000）（表 1）。其中，HIF-1α 主要表达于肿瘤坏死明显的区域。ALHD1 在口腔鳞癌组织及癌旁组织中表达差异无统计学意义（P_{ALDH1}=0.246）（图 1）。在 10 例淋巴结转移性淋巴结组织中，CD44、ALDH1 及 NANOG 均呈阳性表达，而在正常淋巴结组织中均为阴性表达。HIF-1α 在转移淋巴结及正常淋巴结中均呈阴性表达（图 2）。

2.2 CD44、ALDH1、NANOG、HIF-1α 蛋白与口腔鳞癌临床病理参数的关系

本研究结果显示，在 40 例口腔鳞癌组织中，CD44、ALDH1、NANOG、HIF-1α 蛋白的表达与患者性别、年龄、肿瘤分化程度、临床分期及有无淋巴结转移均无明显统计学意义（见表 2）。

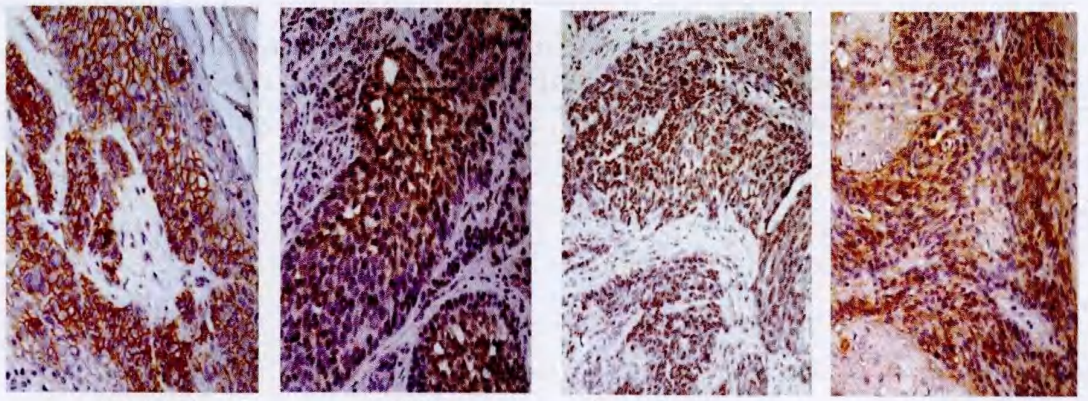
2.3 CD44、ALDH1、NANOG、HIF-1α 蛋白在口腔鳞癌组织中表达的相关性

Spearman 等级相关分析显示：在口腔鳞癌组织中，CD44 蛋白的表达与 HIF-1α 蛋白的表达具有相关性（r_s=0.498，P=0.027），其余各指标之间表达均无相关性（表 3）。

表 1 口腔鳞癌组织及癌旁组织中 CD44、ALDH1、NANOG、HIF-1α 的表达情况

Tab.1 Expressions of CD44,ALDH1,NANOG and HIF-1α in oral squamous cell carcinoma and non-carcinoma tissue

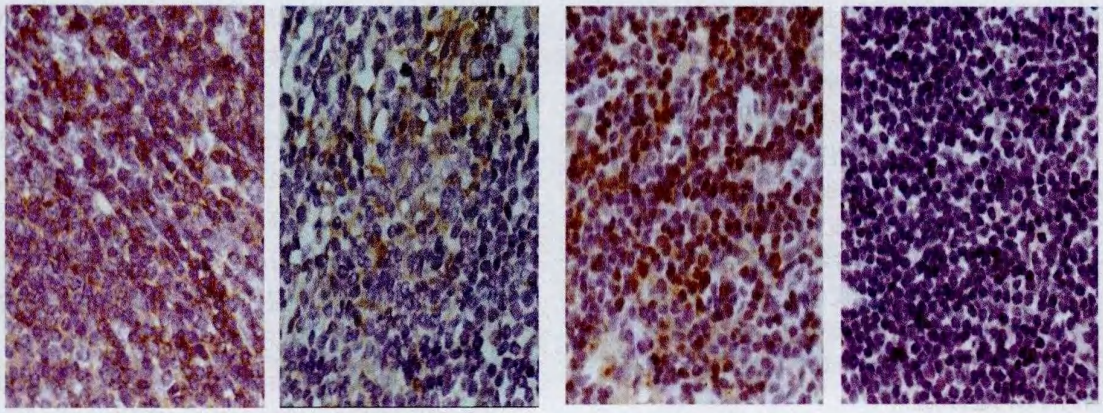
分组	CD44				ALDH1			NANOG			HIF-1α		
	n	−	+	阳性率(%)	−	+	阳性率(%)	−	+	阳性率(%)	−	+	阳性率(%)
口腔鳞癌组织	40	2	38	95.0	27	13	32.5	7	33	82.5	7	33	82.5
癌旁组织	10	8	2	20.0	9	1	10.0	10	0	0.0	9	1	10.0
P 值			0.000			0.246			0.000			0.000	



A. CD44　B. ALDH1　C. NANOG　D. HIF-1α

图 1 CD44、ALDH1、NANOG 以及 HIF-1α 在口腔鳞癌中的阳性表达(400×)

Fig.1 Positive expression of CD44, ALDH1, NANOG and HIF-1α in oral squamous cell carcinoma (400×)



A. CD44　　B. ALDH1　　C. NANOG　　D. HIF-1α

图 2　CD44、ALDH1、NANOG 以及 HIF-1α 在转移淋巴结中的表达情况（400×）

Fig.2　Expression of CD44,ALDH1,NANOG and HIF-1α in metastatic lymph node tissues（400×）

表 2　CD44、ALDH1、NANOG、HIF-1α 蛋白的表达与口腔鳞癌临床病理特征的关系（n=40）

Tab.2　Correlation between the expressions of CD44,ALDH1,NANOG,HIF-1α and clinical pathological feature of oral squamous cell carcinoma（n=40）

临床病	CD44		P 值	ALDH1		P 值	NANOG		P 值	HIF-1α		P 值
理特征	−	+		−	+		−	+		−	+	
性别												
男	2	29		20	11		5	26		5	26	
女	0	9	1.000	8	1	0.233	1	8	1.000	1	8	1.000
年龄（岁）												
≤60	2	16		14	4		3	15		3	15	
>60	0	22	0.196	14	8	0.491	4	18	1.000	4	18	1.000
分化程度												
高分化	1	19		15	5		5	15		3	17	
中分化	1	10		5	6		0	11		4	7	
低分化	0	9	0.657	8	1	0.091	1	8	0.172	0	9	0.101
临床分期												
Ⅰ	1	3		1	3		0	4		0	4	
Ⅱ	1	4		4	1		1	4		2	3	
Ⅲ	0	17		12	5		4	13		3	14	
Ⅳ	0	14	0.066	11	3	0.215	1	13	0.495	1	13	0.280
淋巴结转移												
有	0	20		16	4		1	19		4	16	
无	2	18	1.000	12	8	0.301	5	15	0.182	3	17	1.000

表 3　口腔鳞癌组织中 CD44、ALDH1、NANOG、HIF-1α 蛋白表达的关系

Tab.3　Relationship between expressions of CD44, ALDH1, NANOG, HIF-1α in oral squamous cell carcinoma

	CD44		P 值	r_s 值	ALDH1		P 值	r_s 值	NANOG		P 值	r_s 值	HIF-1α		P 值	r_s 值
	−	+			−	+			−	+			−	+		
ALDH1																
−	0	27														
+	2	11	0.100	−0.331												
NANOG																
−	0	7			5	2										
+	2	31	1.000	−0.106	22	11	1.000	0.039								
HIF-1α																
−	2	5			4	3			1	6						
+	0	33	0.027	0.498	23	10	0.662	−0.102	6	27	1.000	0.039				

3 讨 论

Kajita等[10]通过克隆演变和 CSC 模型，解释了癌症的异质性。CSC 具有明显的表型，可以通过表面标志物来鉴定。但迄今为止，在人体实体肿瘤中，尚未发现特异的 CSC 标志物。对非小细胞肺癌研究表明，干细胞标志物表达情况与肺癌的分化程度和淋巴结转移密切相关[11-12]。

CD44 是一种广泛的细胞表面跨膜糖蛋白，主要参与异质性粘附，即肿瘤细胞与宿主细胞和宿主基质的粘附，异质性粘附在肿瘤细胞侵袭转移中起促进作用。它是透明质酸的已知受体，并与其他“配体”相互作用，如基质金属蛋白酶。Prines 等首次表明，CD44 的表达可以用于分离在头颈部肿瘤中致瘤性增加的细胞亚群[13]。几个独立的研究也证实，CD44 单独或与其他因子共同具有 CSC 标志物的属性，并作为肿瘤启动因子[14]。CD44 的某些形式（如 V3、V6、V10）与肿瘤进展和头颈部鳞癌转移扩散密切相关[15]。乳腺癌干细胞标志物在非小细胞肺癌中的表达情况表明，肿瘤分化程度越低，CD44 表达阳性率越高[16]。本研究发现，CD44 在口腔鳞癌组织中呈高表达，阳性表达率为 95.0%，明显高于癌旁正常组织，具有显著意义。此外，在实验结果还表明，CD44 的阳性表达主要集中在肿瘤浸润边缘及基底膜，同一部位染色强度不均一，这一现象可能与 CD44 作为细胞表面的跨膜糖蛋白，与肿瘤的侵袭密切相关。然而，进一步分析发现，在本研究中，CD44 的表达与患者性别、年龄、肿瘤分化程度、临床分期及有无淋巴结转移均无明显相关性。

ALDH1 及 NANOG 均是胚胎干细胞的表面标志物，它们在胚胎干细胞和成体干细胞中表达增高，对维持干细胞的“干性”中起着重要作用。近年发现，ALDH1 在 CSC 中表达也升高，ALDH1 阳性细胞分别在乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌等实体肿瘤中鉴定出来[17]。在这些肿瘤中，ALDH1 阳性细胞表现为 CSC 的特征即高度致瘤性，并可自我更新。NANOG 基因是由 Mitsui 和 Chambers 等于 2003 年首次报道，并被认为是在研究维持胚胎干细胞亚全能性和胚胎发育相关基因领域取得的最大进展。最近研究表明，在乳腺癌、胶质瘤、膀胱癌等肿瘤中发现有 NANOG 的表达，而在正常组织中无表达或低表达，并且肿瘤分级越高，NANOG 的表达越强，患者临床预后越差，提示在脑 CSC 中，NANOG 发挥着与在胚胎干细胞中相似的功能[18]。此外，体外细胞实验研究认为，NANOG 的表达与口腔鳞癌的分化，转移和耐药有密切关系，并且认为 NANOG 可作为口腔鳞状细胞癌 CSC 表面标志物之一[4-7,19]。本研究结果显示，ALDH1、NANOG 在口腔鳞癌组织中的表达均较癌旁正常组织高，但未发现 ALDH1 在口腔鳞癌组织中的表达与癌旁正常组织的表达差异存在统计学意义。并且本研究进一步分析发现，ALDH1、NANOG 的表达与患者性别、年龄、肿瘤分化程度、临床分期及有无淋巴结转移均未发现明显相关性。

HIF-1 是调节肿瘤组织适应缺氧环境的一个重要因子。HIF-1 是由 α 亚基和 β 亚基共同组成的一个蛋白异二聚体，其中 HIF-1α 是调节缺氧应答的关键因子，它与血管的生成及肿瘤组织的增殖、凋亡、侵袭及淋巴结转移等特征关系密切。目前已证实 HIF-1α 在人类多种恶性肿瘤中高表达，而在正常组织中无表达或低表达[20]。此外，研究发现，HIF-1α 在食管癌、膀胱癌等恶性肿瘤中的高表达，与肿瘤的恶性程度、治疗的敏感性及术后生存率等临床特征具有相关性[21]。本次试验检测发现 HIF-1α 在口腔鳞癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织，但与患者性别、年龄、肿瘤分化程度、临床分期及有无淋巴结转移均无关。对各指标的相关性分析结果表明，HIF-1α 与 CD44 在口腔鳞癌中的表达存在显著相关性，而其余各指标间均无明显相关性。这可能提示，HIF-1α 与 CD44 在口腔鳞癌的发生发展过程中可能同时起着重要作用。

本研究检测的 10 例转移淋巴结组织中，CD44、ALDH1 及 NANOG 均呈阳性表达，表明 CD44、ALDH1 及 NANOG 可能与口腔鳞癌的转移密切相关。但是，本实验中 CD44、ALDH1 及 NANOG 在口腔鳞癌组织中的表达情况却与淋巴结转移情况无明显相关性。分析其中的原因后认为，这可能与本实验样本量偏少且本研究仅从免疫组化水平分析各指标可能影响实验结果有关。

综上所诉，本研究通过检测 CSC 标志物 CD44、ALDH1、NANOG 及 HIF-1α 在口腔鳞癌组织及转移淋巴结组织中的表达情况，分析各指标之间表达

的相关性及其与口腔鳞癌临床特征的相关性。结果表明，CSC 表面标志物 CD44、NANOG、HIF-1α 在口腔鳞癌组织中呈高表达，其表达与患者性别、年龄、肿瘤分化程度、临床分期及有无淋巴结转移等临床特征均无明显相关性。其中，CD44 与 HIF-1α 之间的表达存在显著相关性。这提示，联合检测 CD44、NANOG、HIF-1α 可能对口腔鳞癌早期诊断具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Velasco-Veldzquez MA, Homsi N, De La Fuente M, et al. Breast cancer stem cells[J]. Int J Biochem cell Biol, 2012, 44(4): 573-577.

[2] Liang X, Yang D, Hu J, et al. Hypoxia inducible factor-alpha expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma [J]. Anticancer Res, 2008, 28(3A): 1659-1666

[3] Chen YC, Chen YW, Hsu HS, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(3): 307-313

[4] Chiou SH, Yu CC, Huang CY, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(13): 4085-4095.

[5] Huang CE, Yu CC, Hu FW, et al. Enhanced chemosensitivity by targeting Nanog in head and neck squamous cell carcinomas[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(9): 14935-14948.

[6] Ravindran G, Sawant SS, Hague A, et al. Association of differential β-catenin expression with Oct-4 and Nanog in oral squamous cell carcinoma and their correlation with clinicopathological factors and prognosis[J]. Head Neck, 2015, 37(7): 982-993.

[7] Miyazawa K, Tanaka T, Nakai D. Immunohistochemical expression of four different stem cell markers in prostate cancer: High expression of NANOG in conjunction with hypoxia inducible factor 1α expression is involved in prostate epithelial malignancy[J]. Oncology Letters, 2014, 8(3): 985-992.

[8] Almeida LO, Guimarães DM, Squarize CH, et al. Profiling the behavior of distinct populations of head and neck cancer stem cells[J]. Cancers(Basel), 2016, 8(1): 7.

[9] DA Cruz Paula A, Marques O, Rosa AM, et al. Co-expression of stem cell markers ALDH1 and CD44 in non-malignant and neoplastic lesions of the breast[J]. Anticancer Res, 2014, 34(3): 1427-1434.

[10] Kajita M, Itoh Y, Chiba T, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration[J]. J Cell Biol, 2001, 153(5): 893-904.

[11] 林旭勇，刘树立，刘 楠，等. 干细胞标记物 CK19、Notch3、CD133、P75NTR、STRO-1 及 ABCG2 在肺鳞癌中的表达及意义[J]. 中国肺癌杂志，2009，12(4)：316-321.

[12] 梁洪享，钟 竑，罗 勇，等. 肿瘤干细胞标志物 CD133、CD44、SOX2、OCT4、ALDH1 在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治研究，2013，40(1)：1138-1142.

[13] Prince M, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104 (3): 973-978.

[14] Baumann M, Krause M. CD44: a cancer stem cell-related biomarker with predictive potential for radiotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2001, 16(21): 5091-5093.

[15] Wang S, Wong G, de Heer A, et al. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression[J]. Laryngoscope, 2009, 119(8): 1518-1530.

[16] 吕志强，李海刚，张惠忠，等. 乳腺癌肿瘤干细胞标记物 CD44+ESA+CD24-/low 在非小细胞肺癌组织中的表达及其意义[J]. 癌症，2008，27(6)：575-579.

[17] Ginestier C, Hur M, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(5): 555-567.

[18] HyslopL, StojkovicM, ArmstrongL, et al. Down regulation of nanog induces differentiation of human embryonic stem cells to extra embryonic lineages[J]. Stem Cells, 2005, 23(8): 1035-1043.

[19] Ben-Porath I, ThomsonMW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors[J]. Nat Genet, 2008, 40(5): 499-507.

[20] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases[J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5830-5835.

[21] Theodoropoulos VE, Lazaris AC, Kastriotis I, et al. Evaluation of hypoxia-inducible factor1 alpha over-expression as a predictor of tumor recurrence and progression in superficial urothelial bladder carcinoma[J]. BJU Int, 2005, 95(3): 425-431.

（责任编辑：冉明会）