

人淋巴瘤Raji细胞系中的边缘细胞：淋巴瘤干细胞存在之可能**

谢 健¹, 李晓进², 金从国³, 喻美佳², 李惠民¹

Side population cells in human lymphoma Raji cell line: Possibility of lymphoma stem cells

Xie Jian¹, Li Xiao-jin², Jin Cong-guo³, Yu Mei-jia², Li Hui-min¹

¹Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650021, Yunnan Province, China;
²Department of Hematology, Fourth Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China;
³Institute of Tumor, Third Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650106, Yunnan Province, China

Xie Jian★, Master, Physician, Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650021, Yunnan Province, China
ls_xiejian@163.com

Correspondence to: Li Hui-min, Professor, Chief physician, Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650021, Yunnan Province, China
lihuimin@medmail.com.cn

Supported by: the Natural Science Foundation of Yunnan Province, No. 2006C0076M*

Received: 2010-07-07
Accepted: 2010-10-18

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have demonstrated that cancer stem cells enriched SP cells in the acute leukemia and multiple myeloma. Moreover, immunophenotype and biological characteristics have significant heterogeneity compared with main population cells. However, there is few study concerning lymphoma stem cells.

OBJECTIVE: To examine whether the human lymphoma cell line-Raji contains SP cells, to investigate the difference in differentiation antigen, P-glycoprotein expression and cell cycle between SP cells and non-SP cells, and to explore the existing possibility of lymphoma stem cells.

METHODS: After Hoechst-33342 staining, Raji cell line SP cells were detected and sorted using flow cytometry with ultraviolet. Inhibitory effects of various mass concentrations of verapamil on SP cells were observed and an optimal inhibitory concentration was selected. After sorting, P-glycoprotein, differentiation antigen CD34, CD20, CD19, CD5 and cell cycle were determined and compared between SP and non-SP cells.

RESULTS AND CONCLUSION: SP cells accounted for about 2% of viable cells in Raji, and could be blocked when verapamil was 50 mg/L. SP expressed 18.2% CD20+ cells compared with non-SP (93.6% CD20+), 78.0% CD5+cells compared with non-SP (22.2% CD5+). No significant difference in P-glycoprotein expression was detected between the two populations, but the P-glycoprotein (+) cells in SP displayed more intensive fluorescence compared with non-SP. These indicated that there are significant differences in differentiation degree and multidrug resistance between SP cells and non-SP cells in Raji cell line. SP cells are heterogeneous subset. We supposed that Raji cell line might be organized similarly as cancer stem cell hierarchy, and it is possible that lymphoma stem cells are enriched in SP cells.

Xie J, Li XJ, Jin CG, Yu MJ, Li HM. Side population cells in human lymphoma Raji cell line: Possibility of lymphoma stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(6): 1070-1074.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 已有研究提示急性白血病、多发性骨髓瘤中肿瘤干细胞富集于 SP 细胞中, 且免疫表型及生物学特性相比于主群细胞存在明显的异质性。而关于淋巴瘤淋巴瘤干细胞的研究报道甚少。

目的: 检测人淋巴瘤 Raji 细胞系中是否存在 SP 细胞, 分选该群细胞后观察其与非 SP 细胞在分化抗原和 P-糖蛋白表达以及细胞周期方面的差异, 探讨淋巴瘤干细胞存在的可能性。

方法: Hoechst-33342 染色细胞后运用带紫外激发的流式细胞仪进行 Raji 细胞系 SP 细胞的检测及分选。观察不同质量浓度维拉帕米对 SP 细胞抑制的程度, 选择最佳抑制浓度。分选后分别检测 SP 和非 SP 细胞 P-糖蛋白、分化抗原 CD34, CD19, CD20, CD5 表达以及细胞周期, 并进行对比。

结果与结论: Raji 细胞系中存在 SP 细胞, 比例在 2% 左右, 当维拉帕米质量浓度为 50 mg/L 时能被完全抑制。SP 和非 SP 细胞 CD20 阳性表达率分别为 18.2% 和 93.6%, CD5 阳性表达率分别为 78.0% 和 22.2%; P-糖蛋白表达差异无显著性意义, 但 SP 中阳性细胞的平均荧光强度强于非 SP 细胞。提示 Raji 细胞系中 SP 与非 SP 细胞在分化程度、多药耐药性方面具有明显的差异, SP 细胞是具有明显“异质性”的细胞亚群。据此可初步推测, Raji 细胞系的构成也类似肿瘤干细胞分级组成模式, 而淋巴瘤干细胞则有可能富集于 SP 亚群中。

关键词: 淋巴瘤; SP 细胞; 异质性; 分化抗原; 肿瘤干细胞
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.06.026

谢健, 李晓进, 金从国, 喻美佳, 李惠民. 人淋巴瘤 Raji 细胞系中的边缘细胞: 淋巴瘤干细胞存在之可能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(6):1070-1074. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的研究始于造血系统肿瘤, 已有越来越多的研究表明多数白血病和浆细胞肿瘤中存在 CSCs^[1-3], 它们都符合 CSCs 理论中的“分级组成模式”。通过特异性抗原标记可以分离纯化 CSCs, 而在特异性标记未知的情况下还可以通过研究 SP 细胞的方法研究 CSCs。近来的研究

发现急性白血病和骨髓瘤中的 SP 细胞亚群同样具有 CSCs 的特性^[4-6], 而关于淋巴瘤 CSCs 的研究报道甚少。

本文运用类似的方法对人淋巴瘤 Raji 细胞系中的 SP 亚群进行了初步分析, 从而探讨淋巴瘤干细胞存在的可能性。

1 材料和方法

设计: 细胞水平的对比观察实验。

时间及地点: 于2007-02/2008-02在昆明医学院药物所、云南省肿瘤医院肿瘤所完成。

材料:

细胞及试剂	来源
人 Burkitt's 淋巴瘤细胞系 Raji RPMI-1640 培养基、体积分数 10%新生小牛血清	中科院上海药物所 杭州四季青公司
Hoechst-33342、维拉帕米、PI	Sigma 公司
CD5-FITC, CD20-FITC, CD34-PE, CD19-ECD, EPIX-ALTRA 流式细胞仪、EPIX-XL 流式细胞仪	Beckman-Coulter 公司

方法:

Raji细胞系的培养和传代: 由RPMI-1640加体积分数10%新生小牛血清构成完全培养基, 同时适量添加葡萄糖、丙酮酸钠、Hepes, 使其质量终浓度分别为2.5, 0.11, 2.383 g/L, 置于37 °C恒温培养箱(含体积分数5%CO₂, 湿度95%)。选取对数生长期细胞实验。

SP细胞亚群的检测^[7-8]: 取对数生长期的细胞, 调整活细胞数浓度至10⁹ L⁻¹, 重悬于新鲜的培养液。设实验管和对照管, 每管均加入上述细胞悬液1 mL, 使各管Hoechst-33342的最终质量浓度为5 mg/L; 对照管同时加入维拉帕米, 终质量浓度分别为25, 37.5, 50 mg/L; 置37 °C的恒温摇床, 避光, 染色时间严格控制在90~120 min。染色完成后, 试管中立即加入4 °C冰PBS液终止反应; 低温离心5 min后将细胞重新悬浮于4 °C PBS液, 在上机检测之前所有细胞都保存于4 °C低温环境中。355 nm UV为激发光源, 610 nm双色长通反射滤镜, 450 nm和675 nm边缘长通滤镜分别检测散射光、蓝光和红光部分。以H-red作为横轴, H-blue作为纵轴作二维散点图, 观察细胞在图上的分布; 设门: 将低H-red和低H-blue区域作为SP细胞的基础区域, 同时将加入不同质量浓度维拉帕米的对照管与实验管比较, 前者在二维散点图上缺失的细胞区域即为真正的SP细胞区域, 并计算比例, 观察不同质量浓度维拉帕米对SP细胞抑制的程度, 选择最佳抑制质量浓度。

SP细胞的分选: 调整活细胞浓度至10⁹ L⁻¹, 所备活细胞总量>10⁷。将细胞悬液分别移入若干试管, 加入配制好的染液H, 使各管的细胞、染液H的终浓度为10⁶/5 mg/L; 对照管加入维拉帕米, 终质量浓度为50 mg/L, 染色完成后于4 °C PBS终止反应, 低温保存。各试管样品细

胞均上机检测, 检测方法同前。分选后收集到的SP细胞数约10⁵, 非SP细胞(N-SP细胞)细胞数约10⁶; 将收集到的2份细胞离心后弃上清, PBS液洗涤2次, 置于4 °C保存。

主要观察指标: 运用EPIX-XL流式细胞仪, 对上述两份细胞分别检测相关分化抗原(CD34, CD20, CD5, CD10等)和P-糖蛋白(P-gp)表达, 以及细胞周期情况。检测细胞周期时, 观察二倍体、四倍体峰, 记录分析各组细胞G₀/G₁, S, G₂/M期比例的差异性。

2 结果

2.1 Raji细胞系中SP细胞的比例 见图1。多次实验结果显示, 当抑制剂维拉帕米质量浓度为25 mg/L时, SP区域抑制不明显; 当维拉帕米浓度至37.5 mg/L时, 可见SP区域已有部分抑制, 但尚不完全; 而当维拉帕米质量浓度至50 mg/L时, SP细胞区域已完全缺失, 见图1b, Raji细胞系中SP细胞比例约2%。

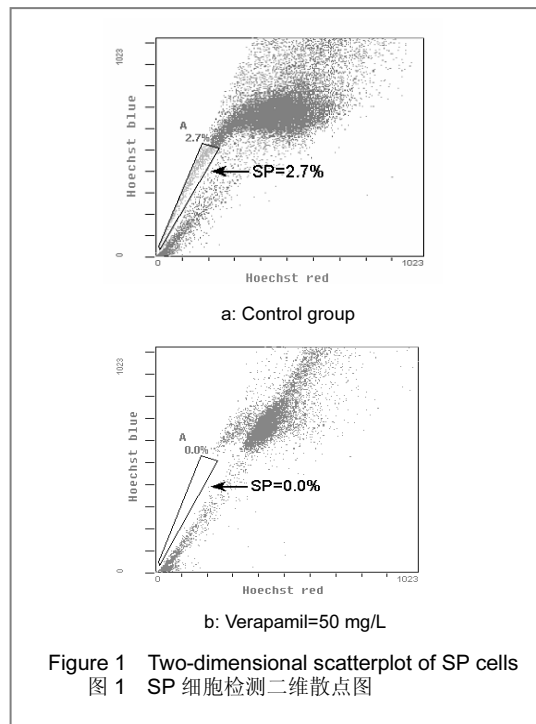


Figure 1 Two-dimensional scatterplot of SP cells
图1 SP细胞检测二维散点图

2.2 SP细胞的分选 分选后收集到的SP细胞总数约为10⁵, N-SP约10⁶。

2.3 分化抗原的表达情况 CD20在N-SP和SP细胞群的阳性表达率分别为93.6%和18.2%, CD5为22.2%和78.0%, 两种分化抗原在两群细胞中的表达率差异性有显著性意义; 而CD19的表达分别为98.8%和70%。其中作者所检测到的CD34在未分选的Raji中的表达

¹ 昆明医学院第一附属医院血液科, 云南省昆明市650021; ² 昆明医学院第四附属医院血液科, 云南省昆明市650031; ³ 昆明医学院第三附属医院肿瘤所, 云南省昆明市650106

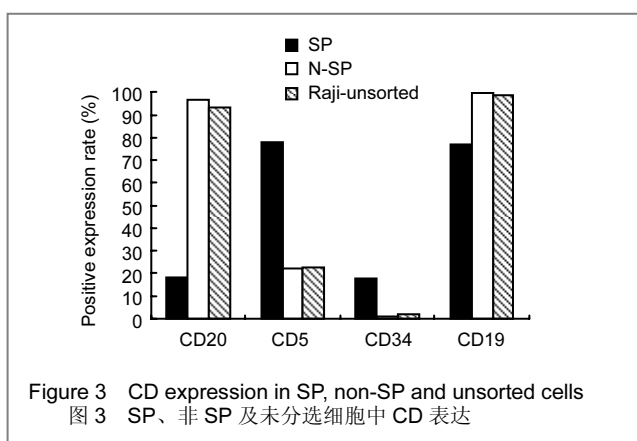
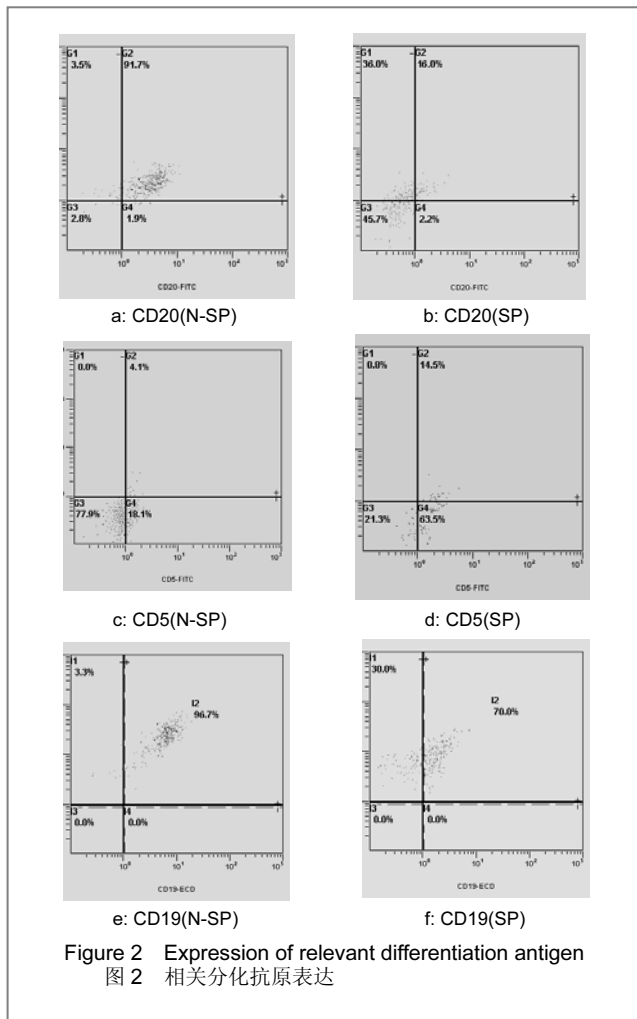
谢健★, 男, 1982年生, 四川省乐山市人, 汉族, 2008年昆明医学院毕业, 硕士, 医师, 现工作于四川省宜宾市第一人民医院血液科, 主要从事恶性血液病的诊治。
Is_xiejian@163.com

通讯作者: 李惠民, 教授, 主任医师, 昆明医学院第一附属医院血液科, 云南省昆明市650021
lihuimin@medmail.com.cn

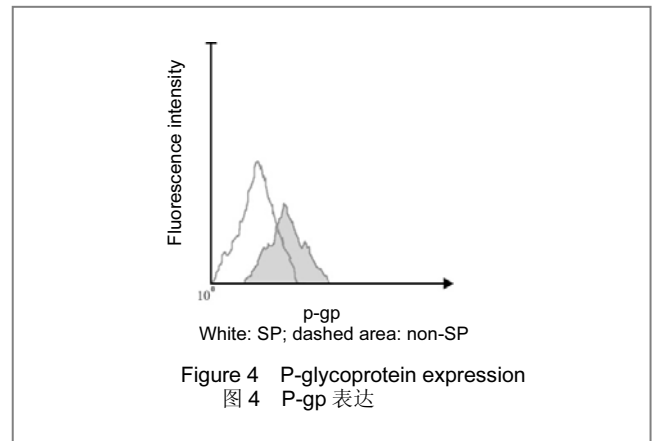
中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)06-01070-05

收稿日期: 2010-07-07
修回日期: 2010-10-18
(20100514023/G · Q)

率为0.4%, 而SP中CD34⁺细胞比例达18.0%。N-SP与未分选的Raji细胞在各分化抗原表达上差异无显著性意义。见图2, 3。

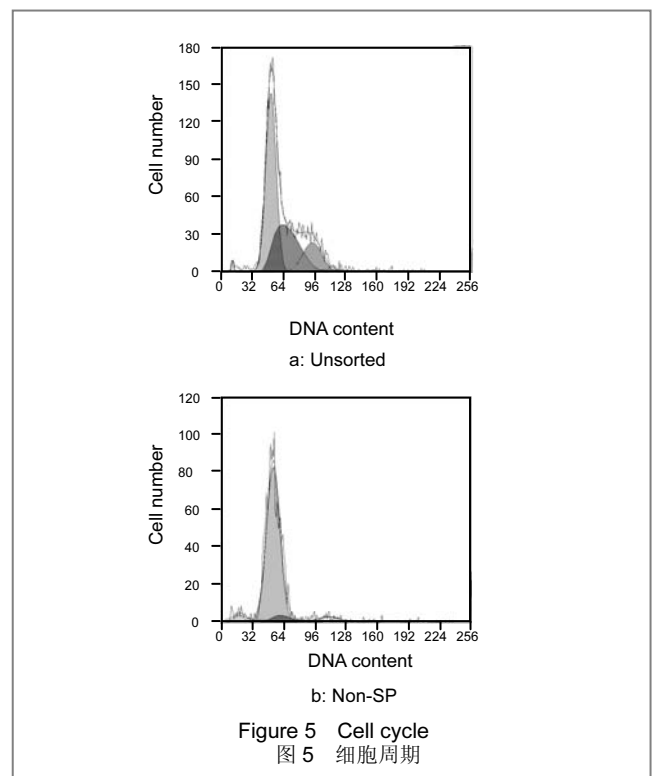


2.4 P-gp 表达情况 多药耐药糖蛋白 P-gp1 在 N-SP 和 SP 细胞中的阳性表达率分别为 6.1%, 12.5%, 但在流式分析处理软件的一维直方图上, 可以发现 SP 细胞群 P-gp1 荧光强度明显高于 N-SP 细胞群, 平均值几乎是 N-SP 细胞群的 2 倍, 见图 4, 这说明该耐药蛋白的表达强度在两群细胞之间存在着一一定的差异。



2.5 细胞周期 未分选的Raji细胞各细胞周期比例分别为G₀/G₁: 52.0%, S期: 29.5%, G₂/M: 18.5%。N-SP 细胞群各细胞周期比例分别为G₀/G₁: 92.7%, S期: 7.0%, G₂/M: 0.2%。上述结果均为流式自带数据软件分析处理后的统计学结果。

因分选后的SP细胞数量较少, 而PI染色细胞周期检测所需细胞数量相对较多, 因而未检测SP细胞群所在细胞周期情况。见图5。



3 讨论

SP细胞是由 ABCG2和P-gp所介导的染料外泵机制的结果^[7, 9]。运用流式细胞术检测, 在二维散点图上该群细胞明显偏离主群细胞而分布在靠近原点的低染区域, 同时, 在SP细胞群的判定上必须结合被维拉帕米

所抑制的区域。Goodell等^[7]推荐在SP细胞检测中维拉帕米的浓度为50 mmol/L(25 mg/L),虽然大多数研究在检测SP细胞时使用上述推荐浓度,但SP区域被完全抑制的不多见。而本实验过程中,在对照管中做了3种维拉帕米质量浓度(25, 37.5, 50 mg/L)的对照,发现推荐浓度的维拉帕米并不完全抑制SP区域;增加维拉帕米至2倍(即50 mg/L)时,基本能完全抑制(SP细胞比例下降至0),而并未发现此浓度的维拉帕米对N-SP区域细胞分布形态有明显的影响。因此,作者认为维拉帕米质量浓度在50 mg/L时所抑制的这部分低染区域细胞确实是Raji中的SP细胞。本实验结果表明,Raji细胞系中可检测到的SP细胞比例在2%左右,与大多数肿瘤中SP细胞比例接近^[10-12],同时也有研究表明在一些肿瘤细胞中SP细胞的比例并不占少数^[13-14],而临床上这类肿瘤往往表现出难治性、高耐药性^[14]。因此,“SP表型”也许最主要的是反映了干细胞在耐药方面的“异质性”,有学者指出,数量的多少并不是CSCs的本质特征,应当转变对CSCs概念的认识^[15]。

Raji为人Burkitt's淋巴瘤的建株系,该类型肿瘤为淋巴组织滤泡的生发中心B细胞来源^[16],表达成熟B淋巴细胞相关抗原,如CD20, CD22和CD19,同时表达CD10, Bcl-6等生发中心抗原,而静止期B淋巴细胞抗原CD5表达为阴性^[17]。因此,Raji是一群CD20⁺CD5⁻肿瘤细胞,这与作者所检测到的Raji中N-SP细胞(即主群细胞)抗原表达一致,而与其中的SP细胞亚群相反,后者表达CD5,而不表达CD20,提示Raji中的SP细胞是较主群细胞具有明显“异质性”的亚群细胞。在B淋巴细胞成熟过程中,CD20的表达最早出现在前B淋巴细胞,并持续表达至成熟B淋巴细胞的整个过程,而其后分化至浆细胞的过程中失去表达,因此它是成熟B淋巴细胞最广泛的分化标记^[18];CD5最典型的是表达于静止的成熟B淋巴细胞(未接受抗原刺激),迁移至淋巴组织皮质部分套区时仍表达,而后至滤泡区受到有丝分裂原刺激后开始增殖后,CD5的表达逐渐失去,这一点也与CD5在慢性淋巴细胞白血病和套区淋巴瘤的表达高度一致(生发中心来源淋巴瘤不表达)^[19]。WHO淋巴瘤组织肿瘤类型及分化程度界定以正常淋巴细胞各分化阶段为参照基础,分化抗原表达情况是主要指标,反映了肿瘤分化停滞所在的阶段。因而从分化抗原表达情况来看,生发中心B淋巴细胞来源的肿瘤细胞Raji,其中的SP细胞亚群并非具有生发中心B淋巴细胞特点,似乎处于更早的分化阶段(更类似予静止期或套区B淋巴细胞的表达)。从分化程度来看,Raji中CD5⁺CD20⁻SP亚群可能为该类型肿瘤的起源细胞,而CD5⁺CD20⁺主群细胞(N-SP)极有可能是由前者分化而来,这一点与Matsui等^[3]在多发性骨髓瘤干细胞研究中的理论相似。他们发现多发性骨髓瘤中主群细胞CD20⁺CD138⁺并不具有致

瘤能力,而具有成熟B淋巴细胞标记的CD20⁺CD138⁻细胞亚群具有干细胞特性,后者分化程度更早期,且在正常淋巴及浆细胞成熟过程中CD20⁺CD138⁺细胞由CD20⁺CD138⁻分化而来;而在更早的关于急性白血病患者研究也显示,CD34⁺CD38^{lin}⁻亚群具有干细胞特性,CD34^{lin}⁺主群细胞却不具备^[1, 4, 20],从分化程度来看,前者也处于更早期阶段。作者认为,Raji所代表的该类型肿瘤与急性白血病和多发性骨髓瘤中干细胞与主群细胞的分化关系类似,似乎“复制”了正常造血细胞分化成熟的某个过程,只是各处的阶段不同而已,因此CD5⁺CD20⁻SP亚群可能为该类型肿瘤的“干细胞”。

虽然CD34在Raji中SP和N-SP细胞中表达有一定差异性,但作者认为意义不大。CD34为造血干细胞重要标记,CD34⁺提示造血细胞分化较早,也是急性白血病CSCs重要标记^[21]。目前的观点认为造血系统肿瘤CSCs有两个来源:①直接来源于正常的造血干细胞。②非正常干细胞直接来源,例如可以来源于外周处于持续增值状态的成熟淋巴细胞^[22-23]。对于分化程度较低的肿瘤(如急性白血病)来说,已有研究提示其CSCs来源于前者(CD34⁺),而对于分化程度相对较高的外周成熟淋巴瘤来说(如生发中心来源淋巴瘤Raji),人们更倾向于其CSCs来源于后者,因此CD34并不是其特异标志。

P-gp是最早发现的介导肿瘤细胞多药耐药机制的重要分子^[24]。通过其外排药物分子使肿瘤细胞避免化疗药物的打击,从而长期存活。该蛋白分子高表达于正常的干细胞及肿瘤干细胞中,和肿瘤耐药有直接关系。最早发现钙离子通道拮抗剂维拉帕米可以阻断P-gp“外泵”功能,因此临床上用于逆转肿瘤细胞的多药耐药性^[25]。从SP及N-SP两组细胞P-gp的表达可以发现,虽然阳性表达率无明显差异,但SP细胞群中阳性细胞的表达强度明显高于N-SP,前者的平均荧光道数为后者的2倍以上。这说明在SP细胞中,与多药耐药有关的蛋白分子P-gp含量高于N-SP细胞群,这也与SP细胞本身外泵染料而表现为低染的特征相符,并与肿瘤干细胞高度耐药性有直接关系;而N-SP细胞P-gp的表达率和荧光强度已经有明显下调趋势。上述结果和现象也提示着Raji中SP细胞有可能富集了CSCs。

相关研究表明,富集了CSCs(或SP细胞)群中的细胞绝大多数处于G₀/G₁期^[5, 26],而N-SP细胞中G₀/G₁期细胞比例则明显减少。正是由于CSCs所具备这一特性,它们才能避免大多数化疗药物(细胞周期依赖性药物)的“攻击”。而本实验却发现,所检测到的分选后的RajiN-SP细胞中,G₀/G₁期比例竟然高达90%以上,这与目前的观点相悖,可能与本实验在设定细胞范围时只设定了其中一小部分为所需细胞范围,而作者所设定的这部分极有可能是属于二倍体区,因此,所检测到的N-SP细胞周期结果恰好是G₀/G₁期高比例。

结论: CSCs在造血系统肿瘤中的急性白血病和原发性骨髓瘤研究相对较多, 也较深入, 而仅有极少数关于分化成熟的淋巴细胞肿瘤干细胞的研究报道^[27-30]。CSCs理论强调“异质性”细胞亚群, 表现为致瘤能力、耐药性及分化程度的差异性, 而本实验主要是从分化程度上的“异质性”(即分化抗原表达的差异性)来论证了淋巴细胞肿瘤中CSCs存在的可能性, 这也为研究淋巴瘤提供了一定的理论依据。其次, 作者在研究中发现Raji中SP细胞亚群为CD20⁻, 这一点似乎暗示了在Raji所能代表的该类型的成熟B淋巴细胞肿瘤中, 经利妥昔单抗治疗后该群CD20⁻细胞能逃避其打击, 从而存活下来成为肿瘤复发的根源? 这其实也是目前在临床上治疗B淋巴细胞肿瘤所面临的重要问题之一。当然, 作者的研究只是初步的, 尚需要更多的实验加以论证和完善。

4 参考文献

- [1] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-737.
- [2] Griffin JD, Löwenberg B. Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*. 1986;68(6):1185-1195.
- [3] Matsui W, Huff CA, Wang Q, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;103(6):2332-2336.
- [4] Feuring-Buske M, Hogge DE. Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34(+)CD38(-) progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97(12):3882-3889.
- [5] Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*. 2008;68(1):190-197.
- [6] Moshaver B. Identification of a small subpopulation of candidate leukemia initiating cells in the side population of patients with acute myeloid leukemia. *Stem Cells*. 2008;26(12):3059-3067.
- [7] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996;183(4):1797-1806.
- [8] Goodell MA, McKinney-Freeman S, Camargo FD. Isolation and characterization of side population cells. *Methods Mol Biol*. 2005;290:343-352.
- [9] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001;7(9):1028-1034.
- [10] Rasmussen T, Kastrop J, Knudsen LM, et al. High numbers of clonal CD19+ cells in the peripheral blood of a patient with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1999;105(1):265-267.
- [11] Ramadan A, Nobuhisa I, Yamasaki S, et al. Cells with hematopoietic activity in the mouse placenta reside in side population. *Genes Cells*. 2010;15(9):983-994.
- [12] Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):311-21.
- [13] Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, et al. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;98(4):1166-1173.
- [14] Kelly PN, Dakic A, Adams JM, et al. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*. 2007;317(5836):337.
- [15] Kennedy JA, Barabé F, Poepl AG, et al. Comment on "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells" *Science*. 2007;318(5857):1722.
- [16] Epstein MA, Barr YM. Characteristics and mode of growth of tissue culture strain (EB1) of human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Natl Cancer Inst*. 1965;34: 231-240.
- [17] Jaff ES. Beijing: People's Medical Publishing House. 2006. Jaff ES. 造血与淋巴组织肿瘤病理学和遗传学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006.
- [18] Beutler F. Beijing: People's Medical Publishing House. 2004. Beutler F. 威廉姆斯血液学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004.
- [19] Hardy RR. B-1 B cell development. *Immunol*. 2006;177(5): 2749-2754.
- [20] Cobaleda C, Gutiérrez-Cianca N, Pérez-Losada J, et al. A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95(3):1007-1013.
- [21] Ren LR, Liu YQ. Jieyou Xuebao. 2005;36(4):367-371. 任乐荣, 刘玉琴. 血液系统肿瘤细胞系中CD34+干细胞特性研究[J]. 解剖学报, 2005;36(4):367-371.
- [22] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-111.
- [23] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006;66(19): 9339-9344.
- [24] Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *Clin Pharmacol*. 2005;45(8):872-877.
- [25] Merry S, Courtney ER, Fetherston CA, et al. Circumvention of drug resistance in human non-small cell lung cancer in vitro by verapamil. *Br J Cancer*. 1987;56(4):401-405.
- [26] Falcatori I, Borsellino G, Haliassos N, et al. Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis. *FASEB J*. 2004;18(2):376-8.
- [27] Nakashima M. The side population, as a precursor of Hodgkin and Reed-Sternberg cells and a target for nuclear factor kappaB inhibitors in Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci*. 2010.
- [28] Gu X, Lin HL. Linchuang yu Shiyan Binglixue Zazhi. 2003;19(2): 185-188. 顾霞, 林汉良. 淋巴结及淋巴瘤内干细胞初探[J]. 临床与实验病理学杂志, 2003, 19(2):185-188.
- [29] Gross E, L'faqihi-Olive FE, Ysebaert L, et al. B-chronic lymphocytic leukemia chemoresistance involves innate and acquired leukemic side population. *Leukemia*. 2010.
- [30] Kayo H, Yamazaki H, Nishida H, et al. Stem cell properties and the side population cells as a target for interferon-alpha in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;364(4):808-814.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 云南省自然科学基金资助项目 (2006C0076M)。课题名称: 白血病细胞株边缘细胞分离、鉴定及生物学特性研究。

作者贡献: 谢健、李惠民主要参与整个实验设计、具体实施以及结果结论分析; 李晓进、喻美佳主要参与实验评估; 金从国主治医师长期从事肿瘤基础及临床研究, 参与整个实验具体操作及技术指导。所有作者均在昆明医学院下属肿瘤研究单位、临床相关科室及细胞培养室经过正规培训。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 无涉及伦理冲突的内容。

本文创新性: 肿瘤干细胞及 SP 细胞研究范围虽然越来越广泛和深入, 但在该领域对于外周成熟淋巴细胞肿瘤的研究却极少。课题以 Raji 作为生发中心 B 淋巴细胞肿瘤代表模型, 选择特异性较强的 CD20, CD5 作为区别不同分化阶段的外周 B 淋巴细胞指标, 从分化程度、异质性的角度论证肿瘤干细胞在成熟 B 淋巴细胞肿瘤中存在的可能性, 为今后的成瘤性实验奠定了基础, 且技术方法操作简便可行, 利于重复操作。参考文献检索基本来源于 2006 年以后 Pubmed 数据库相关资料。