

不同体外环境下舌癌干细胞标志CD44及ESA和CXCR4的表达**

黄英华¹, 姚金光², 邝晓聪³, 蔡捷⁴, 解继胜⁵, 李俊², 陈海波², 杨永荣²

Expression of tongue cancer stem cells marker CD44, ESA and CXCR4 in different environments

Huang Ying-hua¹, Yao Jin-guang², Kuang Xiao-cong³, Cai Jie⁴, Xie Ji-sheng⁵, Li Jun², Chen Hai-bo², Yang Yong-rong²

Abstract

BACKGROUND: Cancer stem cells marker expression in different environments differ greatly because the microenvironment can impact the expression of proteins.

OBJECTIVE: To discuss whether different cultures *in vitro* have influence on the expressions of cancer stem cells marker CD44, ESA and CXCR4.

METHODS: Tongue cancer stem cells TCA8113 cell line was obtained. *In vitro*, three different microenvironments were established: stem cell culture medium, conventional standard medium and conventional standard medium supplemented with adriamycin. The expressions of three proteins in TCA8113 tongue carcinoma cells were detected by immunohistochemistry (IHC) and flow cytometry (FCM).

RESULTS AND CONCLUSION: In all microenvironments, IHC showed the expressions of CD44 and ESA were “++”. In stem cell culture medium and the other microenvironments, the expressions of CXCR4 were “±” and “+” respectively. FCM found the expressions of CD44 and ESA were above 90% in all microenvironments; compared with conventional standard medium, the expression of CXCR4 was super low in stem cell culture medium, and recovery when tongue cancer cells reversed into conventional standard medium from stem cell culture medium; the expression of CXCR4 was increased in conventional standard medium supplemented with adriamycin. The expressions of cancer stem cell markers were various in different microenvironments; it needs to take various markers into account and combine with the expressions of markers on cancer cells *in vivo* to identify cancer stem cell markers. Different kinds of cancer stem cells may accumulate together by different microenvironments model.

Huang YH, Yao JG, Kuang XC, Cai J, Xie JS, Li J, Chen HB, Yang YR. Expression of tongue cancer stem cells marker CD44, ESA and CXCR4 in different environments. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2571-2575. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 细胞生存的微环境与蛋白的表达密切相关, 在不同的环境中癌干细胞标志的表达可能存在差异。

目的: 探讨癌干细胞标志 CD44、ESA、CXCR4 的表达是否会在不同的细胞生存环境中发生改变。

方法: 选取舌癌 TCA8113 细胞系, 分别建立干细胞培养基、常规标准培养基以及在标准培养基中添加阿霉素的 3 种体外培养微环境, 采用免疫组化及流式细胞术, 检测不同培养环境中 3 种标志在舌癌细胞中的表达。

结果与结论: 免疫组化法检测显示, 在所有培养环境中 CD44、ESA 强阳性表达, CXCR4 在干细胞培养基环境中弱阳性表达, 其余为阳性表达; 流式细胞术检测 CD44 与 ESA 在所有培养环境中均高水平表达; 与常规标准培养基环境比较, 在干细胞培养基的微环境中 CXCR4 极低水平表达, 将舌癌细胞从干细胞培养基转回常规标准培养基后, CXCR4 的表达回升; 在阿霉素干预的培养环境中, CXCR4 表达水平升高。结果表明舌癌干细胞标志在不同体外微环境下的表达存在差异, 需结合体内环境与肿瘤组织的表达情况来寻找癌干细胞标志。并且不同微环境模式可能富集不同性质的癌细胞。

关键词: 舌癌; 癌干细胞; 肿瘤干细胞; 体外培养; 微环境; TCA8113

缩略语注释: CSCs: cancer stem cells, 癌干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.021

黄英华, 姚金光, 邝晓聪, 蔡捷, 解继胜, 李俊, 陈海波, 杨永荣. 不同体外环境下舌癌干细胞标志 CD44 及 ESA 和 CXCR4 的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2571-2575. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

癌干细胞(cancer stem cells, CSCs)假说认为, 癌干细胞是肿瘤的起源^[1-2], 并与癌细胞的转移、耐药及复发密切相关^[3-6], 已成为癌症研究领域的新“靶点”。目前大多通过筛选癌细胞表面分子以及结合成瘤性实验来确定某些蛋白是否为CSCs标志蛋白^[7]。现已在大量肿瘤中发现CSCs标志物, 如乳腺癌干细胞标志是CD44⁺/CD24^{LOW}、结肠癌干细胞标志为

ESA^{hi}CD44⁺或者CD133⁺; 胰腺癌干细胞标志是CXCR4⁺或CD133⁺、脑胶质瘤标志是CD133⁺等^[3, 8-10]。有研究认为, 细胞所生存的微环境会影响、调控细胞的生物学特性^[11-12]。根据此观点, 目前所认定的CSCs标志是否也与癌细胞所处的微环境有密切关系? 针对此问题, 本实验以舌癌细胞为研究对象, 以CSCs理论与肿瘤“微环境”学说为基础, 探讨CSCs标志的表达与癌细胞所处微环境是否密切相关。实验选取CSCs标志CD44、ESA和CXCR4, 设计了3种体外培养微环境(常规标准培养基、干细胞培养

¹Department of Pathology, Guilin Medical School, Guilin 541002, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Department of Stomatology; ³Department of Histology and Embryology, Youjiang Medical College, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ⁴Department of Pathophysiology; ⁵Medical Research Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Huang Ying-hua★, Master, Lecturer, Department of Pathology, Guilin Medical School, Guilin 541002, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
hyh8150@gmail.com

Yao Jin-guang☆, Doctor, Professor, Department of Stomatology, Youjiang Medical College, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
yao7760698@126.com

Huang Ying-hua and Yao Jin-guang were considered as co-first authors.

Corresponding author: Yao Jin-guang, Doctor, Professor, Department of Stomatology, Youjiang Medical College, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
yao7760698@126.com

Corresponding author: Kuang Xiao-cong, Master, Associate professor, Department of Pathophysiology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China bskxc@yahoo.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30860326*

Received: 2011-09-25
Accepted: 2011-10-08

¹ 桂林市卫生学校病理教研室, 广西壮族自治区桂林市 541002; 右江民族医学院, ² 口腔系, ³ 组胚教研室, 广西壮族自治区百色市 533000; ⁴ 广西医科大学, ⁵ 病理生理学教研室, ⁶ 医学实验中心, 广西壮族自治区南宁市 530021

黄英华★, 男, 1982 年生, 广西壮族自治区桂林人, 壮族, 2009 年广西医科大学毕业, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤干细胞方面的研究。hyh8150@gmail.com

并列第一作者: 姚金光☆, 男, 1965 年生, 广西壮族自治区百色市人, 壮族, 2006 年四川大学华西口腔医学院毕业, 博士, 教授, 主要从事肿瘤干细胞方面的研究。yao7760698@126.com

通讯作者、课题负责人: 姚金光, 博士, 教授, 右江民族医学院口腔系, 广西壮族自治区百色市 533000 yao7760698@126.com

并列通讯作者: 邝晓聪, 硕士, 副教授, 广西医科大学病理生理学教研室, 广西壮族自治区南宁市 530021 bskxc@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)14-02571-05

收稿日期: 2011-09-25
修回日期: 2011-10-08
(20110625006/M · C)

基、添加阿霉素的标准培养基)用于调控癌干细胞标志物的表达, 为寻找舌癌干细胞提供初步的实验依据。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察实验。

时间及地点: 实验于 2008-08/2009-05 在广西医科大学实验中心基础研究实验室完成。

材料:

舌癌细胞系来源: 人舌癌细胞系 Tca8113 由上海第二医科大学附属第九人民医院口腔颌面外科肿瘤生物实验室建系, 四川大学口腔医学院赠送。

主要材料与试剂:

材料与试剂	来源
阿霉素	海正药业
胎牛血清	Hyclone 公司
RPMI1640 培养基	GIBCO 公司
人胚胎干细胞培养基 (mTeSR TM 1)	STEM CELL TECHNOLOGIES 公司
PE 标记 anti-human CD44、FITC 标记 ESA 抗体、PE/cy5 anti-human CD184 抗体、同型对照抗体	Biolegend 公司
RatIgG2b-κ、mouse IgG1、mouse IgG2a-κ	
兔抗人 CD44 抗体、鼠抗人 ESA 抗体、兔抗人 CXCR4 抗体、即用型链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶连接法 (SP 法) 染色试剂盒	福建迈新生物技术开发公司
Epics XL 流式细胞仪	美国 Coulter 公司
CO ₂ 培养箱	日本三洋公司
倒置光学显微镜	OLYMPUS 公司

方法:

体外培养环境建立与分组: ①体外常规标准培养环境: RPMI1640 培养基、体积分数为 10% 胎牛血清、体积分数为 5% CO₂、37 °C 培养箱, 此为常规组。②干细胞培养环境: 人胚胎干细胞培养基 (mTeSRTM1), 其含多种细胞生长因子, 无血清培养, 体积分数为 5% CO₂、37 °C 培养箱, 此为干细胞培养基组。③干细胞培养环境转回标准培养环境: 在培养出体外“球状”舌癌细胞团后, 将其转入常规体外培养环境, 此为转回组。④阿霉素条件培养环境: 在常规组培养基基础上, 逐步添加阿霉素至 0.1 mg/L 质量浓度, 待舌癌细胞能传代和增殖后, 进行相关标志检测, 此为阿霉素组。

免疫组化检测: 将细胞消化后, 离心成细胞团, 40 g/L 多聚甲醛固定后, 常规脱水、制备蜡块, 切片后对 CD44、ESA、CXCR4 进行 SP 免疫组化检测, 严格按试剂盒步骤操作, 观察三者的表达, 以细胞膜染黄褐色为阳性表达, 在 100 倍视野中, 阳性细胞低于 5% 为阴性“-”, 5%~25% 为弱阳性“±”, 25%~50% 为阳性“+”, 50% 以上为强阳性“++”。

流式细胞术检测: 收集细胞, 离心冲洗后将细胞悬液分别移入若干试管中 (每管体积为 500 μL), 其中一管为对照管, 其他为样本管。在对照管中, 加入同型对照 (Rat IgG2b-κ、mouse IgG1、mouse IgG2a-κ) 各 5 μL, 在样本管中加入荧光抗体 (PE anti-human CD44、FITC anti-human ESA、PE/cy5 anti-human CD184) 各 5 μL, 避光, 室温孵育 30 min, 上机检测。

统计学分析: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件处理数据, 采用方差分析两两比较组间差异。

2 结果

2.1 舌癌细胞 CD44、CXCR4、ESA 的表达 免疫组化法检测结果显示, CD44、ESA 表达在常规组、干细胞培养基组、转回组与阿霉素组中均为强阳性; CXCR4 的表达在常规组、转回组与阿霉素组为阳性, 在干细胞培养基组为弱阳性, 见图 1 与表 1。

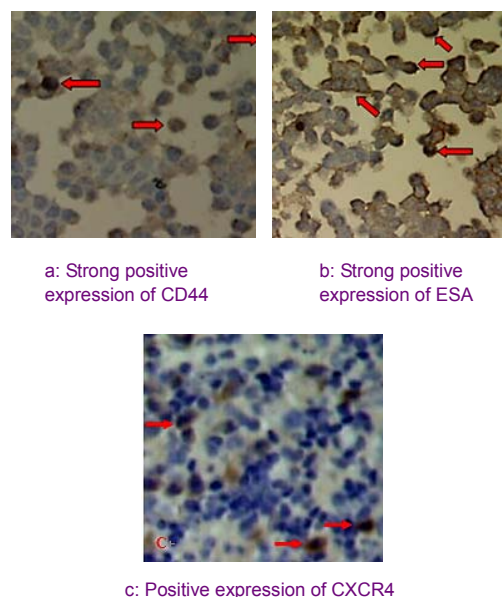


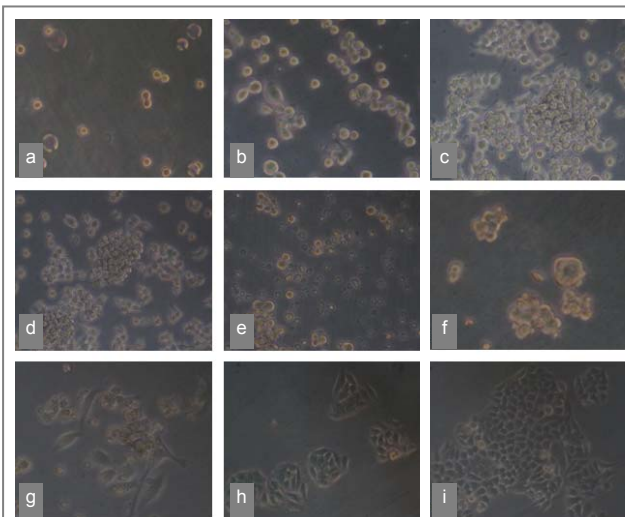
Figure 1 Expression of CD44, ESA and CXCR4 (arrows, ×400)
图 1 CD44、ESA、CXCR4 的表达强弱示例 (箭头所指, ×400)

表 1 不同微环境下 TCA8113 细胞系舌癌细胞中 CD44、CXCR4、ESA 表达情况
Table 1 Expression of CD44, CXCR4 and ESA on TCA8113 tongue cancer cells in different microenvironments

Group	n	CD44	ESA	CXCR4
Conventional	5	++	++	+
Stem cell culture medium	5	++	++	±
Conventional environment reversed from stem cell environment	5	++	++	+
Adriamycin	5	++	++	+

2.2 常规标准培养环境与干细胞培养环境转换过程中舌癌细胞形态的变化 将标准培养环境培养的舌癌细胞接种至孔板后, 加入干细胞培养基, 24 h 后绝大多数细胞单个、散在, 若干个细胞聚集; 48 h 后细胞悬浮或附壁, 有聚集成团趋势。第3, 4天, 大多数细胞悬浮或附壁, 聚集成团。第5~11天, 大多细胞悬浮或附壁, 聚集成团的现象更加明显; 少数细胞仍然单个存在, 大部分仍处于悬浮状态, 极少数细胞贴壁。第15~20天, 单个悬浮细胞皱缩, 聚集成团的细胞仍然悬浮或者附壁生长。第22天, 镜下见有细胞融合成一球形细胞团, 为悬浮状细胞球, 见图2a~f。

将干细胞培养环境的舌癌细胞“悬浮状细胞球”转移至标准培养环境, 24 h 后镜下观察, “悬浮球”细胞贴壁, 呈上皮样生长方式。48 h 后, 细胞数量增多, 形成克隆。72 h 后, 细胞克隆之间融合成片, 生长方式与形态与始终在标准培养培养环境的舌癌细胞相似, 见图2g~i。



a, b, c, d, e, f: Morphology of tongue cancer cells after cultured in stem cell environment for 24 h, 48 h, 3-4 d, 5-11 d, 15-20 d, 22 d, respectively; g, h, i: Morphology and growth pattern of suspended ball after the culture environment reversed from stem cell environment to conventional environment for 24 and 48 h

Figure 2 Morphology changes of tongue cancer cells during the process of conventional environment reverse from stem cell environment (×200)

图 2 标准培养环境与干细胞培养环境转换过程中舌癌细胞形态的变化(×200)

2.3 舌癌细胞CSCs标志的定量表达 流式细胞术检测结果显示, 在标准培养条件下, 舌癌细胞CD44和ESA的表达率很高, CXCR4相对于前两者而言表达较低, 但表达率仍达(35.60±7.07)%。置于干细胞培养环境后22 d, 舌癌细胞形成悬浮状细胞球后, CD44与ESA的表达率仍很高, 但CXCR4表达只有(2.75±1.67)%; 将悬浮状细胞球回置于标准培养条件下, CXCR4表达率升高至(36.70±4.63)%。此外, 在阿霉素组舌癌细胞中CD44和ESA表达非常高, 而CXCR4也有升高, 见表2与图3。

表 2 不同体外“微环境”中舌癌细胞相关标志物的表达
Table 2 Expression of cancer stem cell associated markers on tongue cancer cells in different microenvironments (x̄±S, %)

Group	n	CD44	ESA	CXCR4
Conventional	3	98.2±0.49	99.7±0.21	35.6±7.07
Stem cell culture medium	3	99.9±0.03	98.7±0.19	2.75±1.67 ^a
Conventional environment reversed from stem cell environment	3	99.7±0.26	99.0±1.14	36.70±4.63
Adriamycin	3	96.3±1.56	98.21±0.98	58.01±3.24 ^{bc}

^aP < 0.01, vs. other group; ^bP < 0.01, vs. conventional and stem cell culture medium group; ^cP < 0.05, vs. conventional environment reversed from stem cell environment

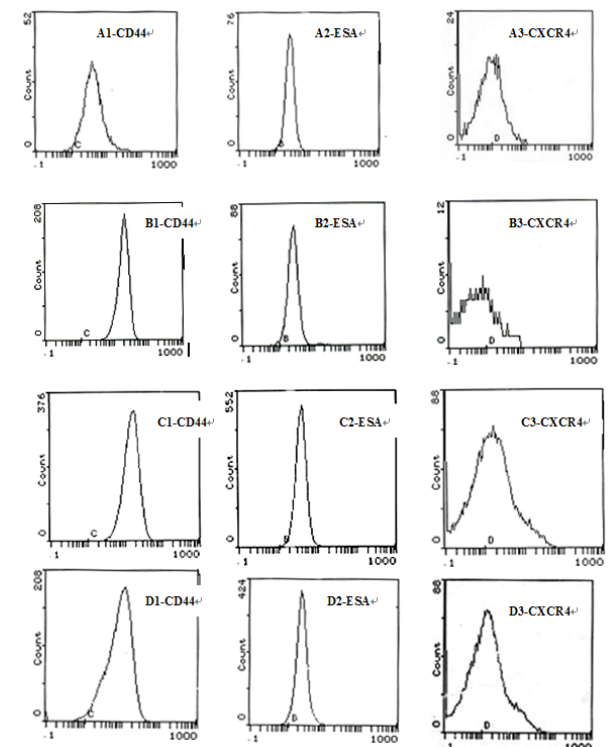


Figure 3 Expression of CD44, ESA and CXCR4 in tongue cancer cells by flow cytometry: A1-A3 were conventional group, B1-B3 were stem cell culture medium group, C1-C3 were conventional environment reversed from stem cell environment group and D1-D3 were adriamycin group

图 3 流式细胞仪检测舌癌细胞中 CD44, ESA, CXCR4 的表达: A1~A3 为常规组, B1~B3 为干细胞培养基组, C1~C3 为转回组, D1~D3 为阿霉素组

3 讨论

在头颈部鳞状细胞癌的研究中, Prince等^[13-14]认为 CD44⁺癌细胞是头颈部鳞癌干细胞。鉴于此, 本实验将其作为舌癌干细胞的检测标志之一。根据CSCs理论, 肿瘤组织或细胞系中CSCs所占比例极低, 处于万分之一到千分之一的数量级水平^[1]。但本实验结果提示, 在各种体外微环境中两者的表达均高于90%, 提示绝大部分舌癌细胞表达此两种蛋白。结合Mack等^[15]研究结果发现, 无论是在头颈部的正常组织中, 还是在口腔黏膜白斑, 以及中度分化的腺癌中, 都存在CD44的高表达。因此, 不能将CD44单独作为舌癌干细胞标志。对于ESA, 在上述多种环境中也处于高表达水平, 其原因可能是舌癌TCA8113细胞来源于鳞状上皮, ESA正是上皮组织来源的标志。Yanamoto等^[16]检测了临床患者的舌癌组织, 口腔黏膜正常组织与舌癌细胞系(SAS、HSC-2、OSC19、C20)均高水平表达ESA。因此, 也无法将ESA单独作为舌癌干细胞标志。对于CD44与ESA在体外各种不同培养环境下均呈极高表达的现象, 提出两种解释: ①两者的高表达正是体现了组织特异性, 即上皮组织来源的癌细胞均表达此两种蛋白。提示可将二者作为组织来源的筛选指标。②此两种蛋白极有可能是TCA8113舌癌细胞在体外环境生存所必须的。

根据CSCs理论, CSCs与癌症的转移密切关系, 甚至认为CSCs才是转移的根源^[3, 17-19]。而在众多研究发现, 与癌症转移密切相关的标记物中, CXCR4报道的频率最为多见。在对胰腺癌以及口腔鳞癌的研究发现CXCR4是CSCs的标志^[3, 20], 因此也将其列为考察的蛋白之一。本次实验发现, 不同环境条件下CXCR4在舌癌细胞的表达差异明显, 与标准培养环境相比较, 在干细胞培养基的“微环境”中, CXCR4极低水平表达; 将舌癌细胞转回常规标准培养基“微环境”后, CXCR4又恢复至(36.70±4.63)%的阳性表达水平; 在化疗药物(阿霉素)干预的培养环境中, CXCR4的表达水平升高至(58.01±3.24)%。由此, 可认为TCA8113舌癌细胞群体中CXCR4分子表达受所处的“微环境”调控。但在干细胞培养基中, 癌细胞生长方式变成“球形”悬浮生长, 而CXCR4为低水平表达, 只有(2.75±1.67)%, 表明CXCR4阳性细胞在细胞群中的比例明显降低。对于此, 可从两种相反的角度探讨: ①有研究认为在干细胞培养基环境下形成的“细胞球”中富集了CSCs, 且已采用此法用于从肿瘤组织中分离和培养CSCs^[3, 17, 20], 结合CSCs占所有癌细胞比例极低的理论, 提示了CXCR4可能并不是舌癌干细胞标志。②相反, 回顾干细胞培养基的研发目的与过程, 干细胞培养基培养方法最早用于培养神经干细胞^[21], 然后将其应用于培养CSCs, 如脑肿

瘤干细胞和乳腺癌干细胞^[22-23], 其特点是形成悬浮生长的“细胞球”, 但是否所有CSCs都能形成悬浮“细胞球”, 或是否所有的“悬浮球”都是CSCs, 这仍需探讨。因此, 无法完全将CXCR4排除在舌癌干细胞标志之外。其次, 实验结果提示干细胞培养基中CXCR4的低表达应与“微环境”的调控有关, 因为将其培养环境恢复为常规标准环境时CXCR4的表达回升。此外, TCA8113舌癌细胞在化疗药物(阿霉素)干预的培养环境中, CXCR4分子表达升高, 表明在化疗药物作用的压力下, CXCR4阳性细胞的比例增多, 提示CXCR4阳性细胞有可能伴随舌癌干细胞的富集而增多, 与文献报道的癌细胞富集模式有类似结果^[19, 24]。

本实验着眼于体外培养环境改变对舌癌干细胞标志表达的影响, 其依据是癌细胞、干细胞等诸多种类的细胞, 其存活、增殖和分化均受到相应的“微环境”的支持与调控, 甚至可以出现逆转或恶变现象^[25-27], 如将转移性黑色素瘤细胞移植到发育中的鸡胚中, 会遵循神经脊的通路迁移, 导致致瘤性缺失并表现出神经脊细胞类似的表型, 出现良性细胞的行为表现^[28]; 而衰老的人成纤维细胞作为饲养层细胞, 可以促使临界恶变的乳腺上皮细胞恶性转化, 成为具有侵袭性的肿瘤细胞^[29]。因此, 在不同的环境下, 可促使癌细胞或CSCs表达不同的标志, 发挥其生物学功能, 如在环境中增殖或分化或生存, 可以认为是细胞与环境的互动结果, 也体现适者生存, 不适者淘汰的规律。据此, 有研究进行癌干细胞的富集, 其中的研究模式是建立乳腺癌荷瘤小鼠, 并在化疗药物顺铂的持续作用下持续传代, 在化疗药的压力下富集乳腺癌干细胞, 可获得高比例的CSCs^[30]。该现象在临床也得到证实, 从肿瘤组织上分离乳腺癌干细胞, 由于癌症干细胞抵制化疗, 在经过化疗的乳腺癌标本中获取的CSCs比例为1/17, 而从未接受过化疗的乳腺癌组织中, 此比例仅为1/250^[31]。

总之, 本次实验基于癌细胞生存的体外环境, 脱离了癌细胞真正生存的“体内”环境, 因此对于明确CSCs标志, 还需结合人舌癌组织中各标志的表达。尽管如此, 综合本实验结果以及CSCs的生物学特性, 营造一定的“微环境”, 如添加化疗药物干预、干细胞培养基等环境, 可以富集舌癌细胞。但CXCR4的变化提示, 不同“微环境”模式有可能富集不同性质的癌细胞, 提示舌癌细胞也有异质性, 例如Hermann等^[3]认为CXCR4⁺的胰腺癌干细胞是惟一具备转移特性的癌细胞。因此, 分离、纯化不同“微环境”下的舌癌细胞, 需对不同的CSCs标志进行组合筛选。

致谢: 感谢广西医科大学皮肤科罗红老师在病理组织切片的制作过程中给予的帮助; 感谢广西医科大学基础医学院组胚教研室陈维平教授在实验设计及科研思维上的启发与指导。

4 参考文献

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-111.
- [2] Bates SE. Targeting the Journey: From Embryogenesis to Cancer Stem Cell. *Clinical Cancer Research*. 2010.
- [3] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):313-323.
- [4] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):275-284.
- [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] Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(1):48-53.
- [7] Gilbert CA, Ross AH. Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem*. 2009;108(5):1031-1038.
- [8] Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, et al. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*. 2008;10(1):R10.
- [9] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445(7123):111-115.
- [10] Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res*. 2008;14(1):123-129.
- [11] Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132(4):598-611.
- [12] Shipitsin M, Polyak K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest*. 2008;88(5):459-463.
- [13] Prince ME, Ailles L. Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(17):2871-2875.
- [14] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):973-978.
- [15] Mack B, Gires O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS One*. 2008;3(10):e3360.
- [16] Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, et al. Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy. *Oral Oncol*. 2007;43(9):869-877.
- [17] Kalani MA, Dalerba P, Clarke M. Implications of Cancer Stem Cells for Tumor Metastasis. *Current Clinical Oncology*. 2009;10:443-453.
- [18] Baiocchi M, Biffoni M, Ricci-Vitiani L, et al. New models for cancer research: human cancer stem cell xenografts. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(4):380-384.
- [19] Croker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med*. 2008;12(2):374-390.
- [20] Collier J, Waseem A, Farthing P. The chemokine receptor CXCR4 demonstrates several features of a cancer stem cell marker in OSCC. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2009;47(7):e68.
- [21] Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, et al. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature*. 2001;412(6848):736-739.
- [22] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821-5828.
- [23] Fillmore C, Kuperwasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Res*. 2007;9(3):303.
- [24] Adhikari AS, Agarwal N, Wood BM, et al. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. *Cancer Res*. 2010;70(11):4602-4612.
- [25] Yang ZJ, Wechsler-Reya RJ. Hit 'em where they live: targeting the cancer stem cell niche. *Cancer Cell*. 2007;11(1):3-5.
- [26] Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res*. 2006;66(9):4553-4557.
- [27] Sneddon JB, Werb Z. Location, location, location: the cancer stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):607-611.
- [28] Lee LM, Seftor EA, Bonde G, et al. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev Dyn*. 2005;233(4):1560-1570.
- [29] Parrinello S, Coppe JP, Krtoch A, et al. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 3):485-496.
- [30] Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*. 2007;67(10):4827-4833.
- [31] Yu F, Yao H, Zhu P, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007;131(6):1109-1123.

来自本文课题的更多信息—

基金声明: 国家自然科学基金(30860326)资助, 课题名称: SELDI-TOF-MS 技术筛选舌癌干细胞蛋白标记物的研究。

作者贡献: 课题研究设计主要由邝晓聪、姚金光、黄英华三位人员共同参与。黄英华、蔡捷二人作为主要实验实施、资料收集及文章撰写者。此外, 邝晓聪老师还负责实验评估。文章审校由邝晓聪及姚金光二人负责。其余各作者均参与了研究设计、实验实施等研究工作。黄英华对文章负责。

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。

伦理要求: 不涉及伦理学问题。

本文创新性: 检索 PUBMED, HIGHwire, scencedirect 等数据库, 检索关键词为 cancer stem cell, tumor stem cell, niche, Pancreatic cancer AND cancer stem cell, breast cancer AND cancer stem cell 等。优先选区 5 年内的文献作为参考对象。本次研究的创新点在于: 在最基础的层面探讨目前通行的如何确定癌干细胞标志物的思维理念, 为后续的癌干细胞标志的确定奠定实验基础。