

磁珠分选U251细胞系中的CD133⁺细胞及其生物学特性***

邓永文¹, 黄萌异¹, 舒毓高¹, 杨转移², 张明宇², 方加胜²

Biological characteristics of CD133⁺ cells in U251 cell line sorted by magnetic-activated cell sorting

Deng Yong-wen¹, Huang Meng-yi¹, Shu Yu-gao¹, Yang Zhuan-yi², Zhang Ming-yu², Fang Jia-sheng²

文章亮点:

运用磁珠分选技术分选后得到具有特异性标记物的脑肿瘤干细胞, 并通过一系列实验证实了新的分选方法得到的细胞即脑肿瘤干细胞, 且细胞纯度高。

Abstract

BACKGROUND: The theory of brain tumor stem cells reports that brain tumor stem cell is the seed cell among brain tumor cells and is the key cell to occurrence, infiltration and recurrence of brain tumor.

OBJECTIVE: To investigate the biological characteristics of CD133⁺ cells in U251.

METHODS: CD133⁺ and CD133⁻ subpopulation cells in the human GBM U251 cell line were sorted by magnetic-activated cell sorting. The purification of CD133⁺ subpopulation was performed by flow cytometry. MTT and monoclonal forming rate assay were performed to investigate the capacity of self-renewal and clonogenic potential of the subpopulation cells. Immunofluorescence staining was performed to investigate the multidifferentiation of CD133⁺ cells. The tumorigenic potential of the two subpopulation cells *in vivo* was investigated by xenografting in BALB/c nude mouse brain.

RESULTS AND CONCLUSION: Only 4.5% cells were CD133⁺ in the total population of U251 cell line. The CD133⁺ cells exhibited powerful proliferation capacity. The single CD133⁺ cell, rather than CD133⁻ cells, could proliferate and form typical brain tumor spheres. Cell growth curve showed that CD133⁺ cells proliferated remarkably faster than CD133⁻ cells while cultured in serum-free medium. Monoclonal forming rate of CD133⁺ and CD133⁻ cells was 78.5–92.4% and 0.8–2.4% respectively. Immunofluorescence staining showed that CD133⁺ cells could be induced to differentiate into mature neurocyte cells. Xenograft assay showed that CD133⁺ cells had tumorigenic potential *in vivo*, while CD133⁻ had not. The U251 cell line contained a small proportion of CD133⁺ cells, which had the capacity for proliferation and multi-differentiation, and tumorigenic potential *in vivo*. The subpopulation of CD133⁺ cells was the brain tumor stem cell subpopulation in U251.

Deng YW, Huang MY, Shu YG, Yang ZY, Zhang MY, Fang JS. Biological characteristics of CD133⁺ cells in U251 cell line sorted by magnetic-activated cell sorting. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(32): 6014-6018. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

摘要

背景: 脑肿瘤干细胞理论认为, 脑肿瘤干细胞是脑肿瘤细胞中“种子”细胞, 是脑肿瘤发生、浸润和复发的关键细胞。

目的: 观察人多形性胶质母细胞瘤 U251 细胞系中 CD133⁺细胞的增殖、分化及体内致瘤性等生物学特性。

方法: 运用磁珠分选技术分选 U251 细胞系中的 CD133⁺和 CD133⁻细胞亚群; MTT 法绘制两个亚群细胞的生长曲线; 单克隆形成率实验检测 2 个亚群细胞的增殖能力; 免疫荧光检测 CD133⁺细胞亚群的多向分化能力; 裸鼠移植实验检测 2 个亚群细胞在裸鼠体内致瘤性的差异。

结果与结论: U251 细胞系中只有约 4.5%的 CD133⁺细胞; 分选后的 CD133⁺细胞能增殖形成典型的脑肿瘤干细胞球, 生长曲线显示 CD133⁺细胞增殖能力明显强于 CD133⁻细胞; 单克隆形成率实验显示 CD133⁺细胞能形成脑肿瘤干细胞球的细胞比率达到 78.5%~92.4%, 而 CD133⁻细胞仅有 0.8%~2.4%; CD133⁺细胞能分化为具有 GFAP 和 NeuN 成熟表型的肿瘤细胞; CD133⁺的致瘤率为 71.42%, 而 CD133⁻细胞无致瘤性。提示 U251 细胞系中存在少量具有增殖、多向分化与体内致瘤能力的 CD133⁺细胞, CD133⁺细胞是符合肿瘤干细胞定义 of 的细胞亚群。

关键词: 脑肿瘤干细胞; 磁珠分选; 增殖; 分化; 致瘤性; 干细胞

邓永文, 黄萌异, 舒毓高, 杨转移, 张明宇, 方加胜. 磁珠分选 U251 细胞系中的 CD133⁺细胞及其生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(32):6014-6018. [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

¹Department of Neurosurgery, People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, Hunan Province, China; ²Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Deng Yong-wen★, M.D., Attending physician, Department of Neurosurgery, People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, Hunan Province, China

Corresponding author: Zhang Ming-yu, Associate professor, Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China hncszmy@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30600636*; Doctoral Innovative Project of Central South University, No. 76231*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.32.024

Received: 2011-12-08
Accepted: 2012-03-28

0 引言

脑肿瘤干细胞理论认为, 脑肿瘤干细胞是脑肿瘤细胞中一类特殊亚群的细胞, 是脑肿瘤的“种子细胞”, 其在增殖、分化、信号通路等与其他亚群细胞存在明显的差异性, 它们是脑肿瘤发生、浸润和复发的关键细胞^[1-5]。实验运用磁珠分选技术对U251细胞系中的CD133⁺细胞进行分选, 旨在观察其在增殖、分化及移植致瘤方面的特性。

1 材料和方法

设计: 观察性实验。

时间及地点: 实验于2007-07/2008-07在湘雅医院神经外科实验室完成。

材料: U251细胞系由中南大学细胞中心实验室提供, BALB/c-nu裸鼠购自中国科学院上海实验动物中心, 鼠龄五六周, 体质量19~22 g。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
PRMI1640 的完全培养基、DMEM/F12(1:1)	美国 GIBCO 公司
人表皮生长因子、人碱性成纤维细胞生长因子	英国 PeproTech 公司
特级胎牛血清	美国 Hyclone 公司
免疫磁珠细胞分选试剂盒	德国 Miltenyi 公司
小鼠抗人 CD133 单克隆抗体、小鼠抗人 NeuN 单克隆抗体	英国 R&D System 公司 (Chemicon International, Inc)
兔抗人 GFAP 单克隆抗体、FITC 标记羊抗小鼠 IgG、CY3 标记羊抗兔 IgG、FITC 标记羊抗兔 IgG	武汉博士德生物工程有限公司
CY3 标记羊抗小鼠 IgG	Sigma-Aldrich Corp.
CO ₂ 水套培养箱	美国 Thermo Electron 公司
FORMA3111 Series II 荧光显微镜	日本奥林巴斯公司
倒置相差显微镜 Nikon TMS-F	日本 Nikon 公司
CD133 免疫磁珠细胞分选系统	德国 Miltenyi 公司
FACS Vantage 流式细胞仪	美国 BD 公司

实验方法:

U251细胞系的培养: 将细胞培养于含体积分数为10%胎牛血清的PRMI1640培养基中, 于体积分数5%CO₂、37℃饱和湿度的培养箱中

培养, 每两三天换液、传代。

SABC法检测U251细胞系中CD133的表达: 将U251细胞接种到培养皿中的小盖玻片上, 洗涤, 固定, 封闭, 加入鼠抗人单克隆抗体CD133, 4℃孵育12 h, PBS洗涤, 加入羊抗鼠IgG工作液, PBS洗涤加入羊抗鼠CY3, 室温暗处孵育2 h, 荧光显微镜下观察。

免疫磁珠技术分选U251中CD133⁺与CD133⁻细胞: 按1:11的稀释比例加入PE标记的小鼠抗人CD133抗体, 4℃避光孵育后, 用缓冲液洗涤细胞2次。缓冲液重悬细胞, 按1:5的稀释比例加入抗PE磁珠, 混合均匀后4℃避光孵育15 min, 加入缓冲液洗涤, 1 000 r/min离心10 min, 弃上清, 重新用缓冲液重悬细胞。缓冲液洗柱后, 将细胞悬液过柱。1 mL缓冲液洗柱, 用泵加压, 收集洗液即为阳性部分细胞。取分选后的细胞用流式细胞仪检测CD133的表达率。

CD133⁺细胞的体外生长曲线绘制: 参照司徒镇强等^[6], 将分选的阳性和阴性细胞调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 种入96孔板中, 每组细胞种10孔, 10^3 个/孔, 然后加入含B27、20 μg/L碱性成纤维细胞生长因子和20 μg/L表皮生长因子的DMEM/F12细胞培养液至0.2 mL。同时设只加培养液、不加细胞的空白组用于调零。于培养箱中培养1, 3, 5, 7 d后, 用MTT比色法测定细胞增殖状态, 并绘制生长曲线。

单克隆形成率实验: 将分选的CD133⁺/CD133⁻细胞, 以每孔100 μL无血清培养基中含5活细胞/孔接种于96孔板。5~7 d后记录所有孔中肿瘤干细胞球的数量。计算阳性和阴性细胞中具有形成单细胞克隆能力的细胞百分率, 实验重复3次, 取3次实验的结果均值做统计分析。

CD133⁺细胞多向分化实验: 将分选出的CD133⁺细胞接种到包被多聚赖氨酸的小盖玻片上, 并置于含有血清培养基的培养皿中培养, 分别于第1天和第7天行NeuN、GFAP的免疫荧光染色。

CD133⁺/CD133⁻细胞的体内致瘤性实验: CD133⁺、CD133⁻细胞以 1×10^3 个/只的细胞数量移植至BALB/c裸鼠脑内, 操作方法参照文献[7]。40 d后处死裸鼠, 解剖取裸鼠全脑, 进行病理切片检查。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS For

¹ 湖南省人民医院神经外科, 湖南省长沙市 410005;
² 中南大学湘雅医院神经外科, 湖南省长沙市 410008

邓永文★, 男, 1979年生, 广西壮族, 2008年中南大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事中枢神经系统肿瘤的研究。
Robert_dyw@163.com

通讯作者: 张明宇, 副教授, 中南大学湘雅医院神经外科, 湖南省长沙市 410008
hncszmy@163.com

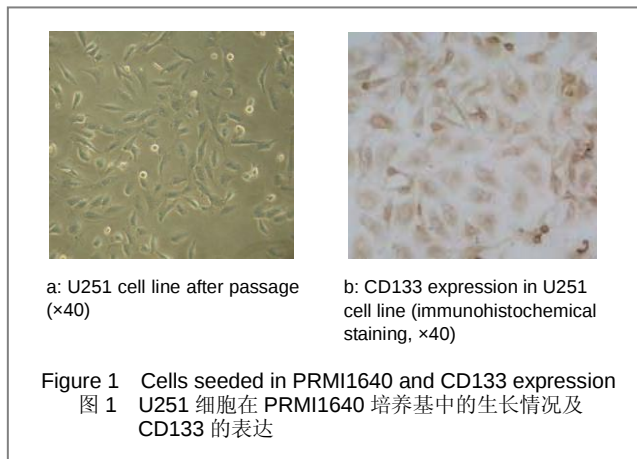
中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)32-06014-05

收稿日期: 2011-12-08
修回日期: 2012-03-28
(20110114022/WL-S)

Windows 13.0软件完成统计处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 U251细胞中CD133表达情况 细胞爬片后, 免疫组织化学及免疫荧光均显示CD133在U251上的表达, CD133主要表达于U251的细胞膜, 阳性表达低, 见图1。



2.2 分选阳性率 分选前, 流式细胞仪测试CD133⁺细胞的百分比为4.5%, 表明CD133⁺细胞是U251中含量极少的细胞亚群; 分选后, 流式细胞仪测试CD133⁺细胞群的CD133阳性百分比为92.4%。

2.3 分选后CD133⁺/CD133⁻细胞的增殖能力 初分选的CD133⁺细胞呈单个细胞分散存在, 接种于无血清培养基后, 培养24~48 h开始形成悬浮生长的细胞球, 即脑肿瘤干细胞球。CD133⁻细胞初分离时与CD133⁺细胞形态相似, 培养后部分细胞形成细胞球, 但细胞球数量明显少于CD133⁺, 接种于无血清培养基培养7 d后, 贴壁生长的细胞稀疏, 且死细胞明显增多。

在MTT实验中, CD133⁺在无血清培养基中的增殖能力最高, 其在第7天和第9天的A值明显高于CD133⁻细胞($P < 0.05$)。而在有血清培养基中, CD133⁺细胞的增殖能力亦高于CD133⁻细胞, 但两者差异无显著性意义($P > 0.05$)。提示无血清培养基中的表皮生长因子与碱性成纤维细胞生长因子对CD133⁺增殖能力有刺激作用, 见图2。

单克隆率实验中, 阳性分选细胞中具有增殖形成脑肿瘤干细胞球能力的脑肿瘤干细胞比率达到78.5%~92.4%, 而阴性分选细胞中仅有0.8%~2.4%。细胞增殖率与单克隆率的差异提示CD133⁺细胞具有很高的细胞增殖能力, 而CD133⁻细胞的增殖能力很低, 见表1。

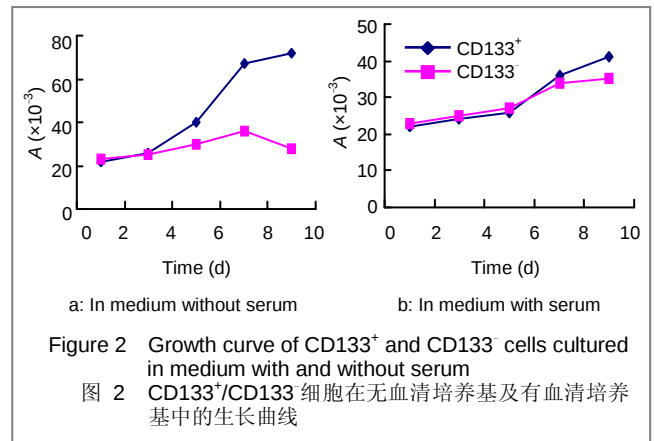
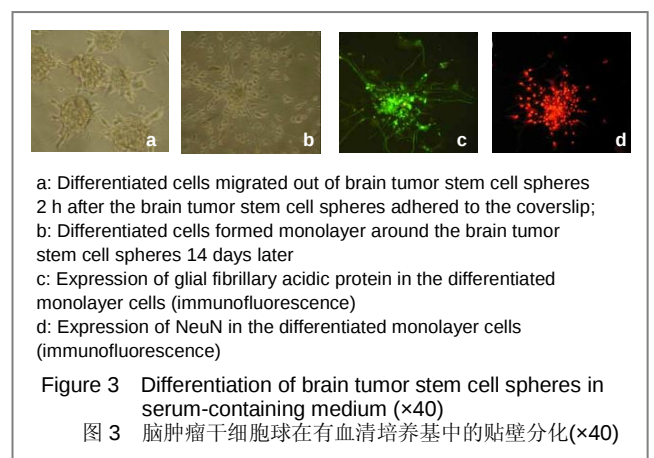


表1 CD133⁺/CD133⁻ 细胞单克隆形成率
Table 1 Comparison of monoclonal forming rate (MFR) formed by CD133⁺/CD133⁻ cells ($\bar{x} \pm s$, %)

Group	First experiment	Second experiment	Third experiment
CD133 ⁺	78.53 $\pm$ 2.45	92.45 $\pm$ 3.26	80.40 $\pm$ 1.84
CD133 ⁻	1.25 $\pm$ 2.26 ^a	0.82 $\pm$ 1.68 ^a	2.39 $\pm$ 2.85 ^a

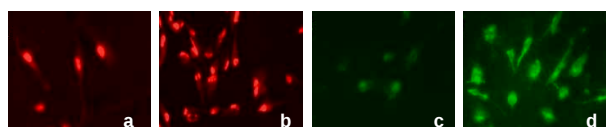
^a $P < 0.05$, vs. CD133⁺ group

2.4 CD133阳性细胞的异常分化及多向分化 免疫荧光检测表明, 脑肿瘤干细胞球中的脑肿瘤干细胞也有类似的多向分化能力。脑肿瘤干细胞球在含血清培养基中贴壁14 d后, 即使干细胞球未能完全消失, 其中CD133表达也较未分化状态明显降低; 而脑肿瘤干细胞球内NeuN、GFAP表达明显增高, 与未分化状态时对比明显; 且在干细胞球周围也出现大量NeuN和GFAP阳性细胞。脑肿瘤干细胞球一般在接种有血清培养基14~21 d内可完全消失并转变成单细胞层; 此时单细胞层中CD133表达较脑肿瘤干细胞球显著降低, 阳性细胞稀少; 而GFAP和NeuN阳性细胞在单细胞层中占主要比例, 见图3。



将CD133⁺细胞直接接种于有血清培养基中, 细胞在接种后2 h开始贴壁, 发出突起。1 d后行免疫荧光检测, 贴壁细胞主要以表达CD133⁺为主, 而表达NeuN与

GFAP 的细胞比较零散, 表明细胞还处于未完全分化状态; 在有血清培养基中培养 7 d 后, 再次行免疫荧光检测, 此时的贴壁细胞表达 NeuN 与 GFAP 明显增加, 表达 CD133 的细胞则减少, 此时的细胞以分化细胞为主, 表明了在有血清培养基中, CD133⁺ 细胞向成熟表型的细胞分化, 且具有多向分化的潜能, 见图 4a~d。

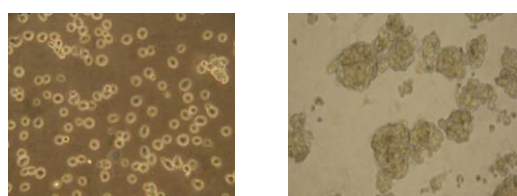


a: Expression of NeuN in CD133⁺ cells at 1 d after culture in serum-containing medium;
b: Expression of NeuN increased 7 d later;
c: Expression of glial fibrillary acidic protein in CD133⁺ cells 1 d after culture in serum-containing medium;
d: Expression of glial fibrillary acidic protein increased 7 d later

Figure 4 CD133⁺ cells can differentiate into cells with phenotypes of neurons and glial cells after inoculation into serum-containing medium (immunofluorescence, ×40)

图 4 CD133⁺ 细胞接种于有血清培养基贴壁后分化成具有神经元和胶质细胞表型的细胞(×40)

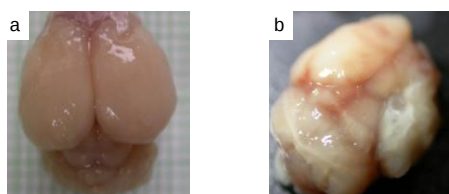
2.5 CD133⁺/CD133⁻ 细胞体内致瘤性 接受 CD133⁺ 细胞注射的裸鼠大脑均出现明显肿瘤块, 组织病理学检测证实为肿瘤组织; 而接受 CD133⁻ 细胞注射的裸鼠中, 注射部位在 40 d 后仍观察不到有新生肿瘤块出现, 见图 5~7。



a: CD133⁺ cells grew in single-cell manner
b: CD133⁺ cells formed brain tumor stem cell spheres

Figure 5 CD133⁺/CD133⁻ cells in serum-free medium before transplantation (phase contrast microscope, ×40)

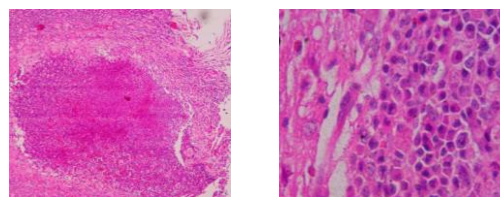
图 5 CD133⁺/CD133⁻ 细胞移植前在无血清培养基中的生长状态(相差显微镜, ×40)



a: No tumor formation after injection of CD133⁻ cells into nude mouse brain
b: Tumor tissue occupied the right cerebral hemisphere and cerebral cortex was soft with obvious necrotic tissue after injection of CD133⁺ cells into nude mouse brain

Figure 6 CD133⁺/CD133⁻ cells transplanted into the nude mouse brain (gross sample)

图 6 CD133⁺/CD133⁻ 细胞移植裸鼠脑内(大体标本)



a: Tumor developed locally, tumor tissue showed hemorrhage and necrosis and swelling surrounded the tumor tissue (optical microscope, ×40)
b: Tumor cells exhibited various morphological changes, with large and dark stained nuclei, high karyoplasmic ratio, obvious nucleolus, visible karyokinesis (optical microscope, ×200)

Figure 7 Histomorphological observation of tumors formed by CD133⁺ cells in nude mouse brain by hematoxylin-eosin staining

图 7 CD133⁺ 细胞裸鼠移植瘤的苏木精-伊红染色

3 讨论

Vescovi 等^[8] 提出了脑肿瘤干细胞的定义, 并得到了大多数学者的认同: 脑肿瘤干细胞是脑肿瘤内一个特殊的亚群细胞, 并同时具有如下特征: ①在体外和体内自我更新与增殖能力。②异常分化特性, 多向分化能力。③移植致瘤能力。④分化产生终末细胞能力。实验证明了通过免疫磁珠分选 U251 细胞系中的 CD133⁺ 细胞亚群是符合上述定义的脑肿瘤干细胞。

细胞免疫组织化学及免疫荧光实验表明, CD133 在部分 U251 细胞中有表达。流式细胞仪的定量分析说明, U251 细胞中含有约 4.5% 的 CD133⁺ 细胞。表明 CD133⁺ 细胞是 U251 细胞中含量极少的一个亚群。

CD133⁺ 细胞具有自我更新与增殖能力。实验将分选后的细胞接种于含表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的无血清培养基中, CD133⁺ 细胞逐渐增殖形成了细胞球, 呈悬浮生长, 增殖活跃, 与传统的悬浮培养的脑肿瘤干细胞球及神经干细胞球相似^[9]。说明 CD133⁺ 细胞有类似于神经干细胞受诱导增殖的特性。CD133⁺ 细胞在含生长因子无血清培养基中的增殖速度明显高于相同环境下的 CD133⁻ 细胞, 也高于在含血清培养基中培养的 CD133⁺ 细胞; 在含血清培养基中, CD133⁺ 细胞的增殖速度亦高于 CD133⁻ 细胞。从单克隆形成实验中观察到有将近 90% 的单个 CD133⁺ 细胞可以形成干细胞球, 而 CD133⁻ 细胞在相同环境下生长缓慢, 其只有不到 3% 的细胞可以形成克隆。

移植致瘤是肿瘤干细胞在体内具有增殖与分化能力的表现。实验将 CD133⁺ 和 CD133⁻ 细胞移植入裸鼠体内, 发现 CD133⁺ 细胞有 71.24% 的裸鼠致瘤率, 而

CD133⁺细胞却无一例致瘤。表明CD133⁺是U251细胞系中致瘤性细胞亚群,是具有在体内增殖能力的直接表现。同时,从移植瘤中分离培养的肿瘤干细胞与直接从U251细胞系中培养的肿瘤干细胞的生物学特征十分相似。Singh等^[10]由此认为CD133⁺细胞极有可能是脑肿瘤的起源细胞,Beier等^[11]与Wu等^[12]的研究中亦得到相同的结论。体外体内试验表明,在U251细胞系中,CD133⁺细胞是其增殖活力的主要来源。

多向分化是干细胞重要的内在特性。将在含生长因子的无血清培养基培养形成的脑肿瘤干细胞球置入撤除生长因子的含血清培养基中,脑肿瘤干细胞球的脑肿瘤干细胞可分化产生具有神经元、星形胶质细胞等成熟神经细胞表型的子代肿瘤细胞,同时表达CD133阳性的细胞则减少,表面标记物的变化显示了在脑肿瘤干细胞球中的细胞具有多向分化特征^[1, 5, 13-18]。实验亦证明CD133⁺细胞形成的脑肿瘤干细胞球具有此特征。实验还将CD133⁺细胞直接接种于撤除生长因子的含血清培养基中,可以观察到神经元和星形胶质细胞表型细胞的增加,此结果更为直接和客观地证实了脑肿瘤干细胞所具有的多向分化潜能。

异常分化可能是脑肿瘤干细胞更具特征的内在特性。双标免疫荧光检测CD133⁺细胞在SCF中贴壁分化中发现,有的分化细胞同时表达星形胶质细胞和神经元标志物。而此现象在正常神经干细胞分化过程中是没有的^[1, 13],这个现象反映了脑肿瘤干细胞的异常分化程序的激活。Singh等^[1]认为它们是具有双重分化潜能的肿瘤前体细胞。Galli等^[14]认为这种异常分化细胞的存在与脑肿瘤干细胞的增殖能力相关,可能反映了脑肿瘤干细胞的异常分化程序的激活。再如肿瘤干细胞存在“逆分化”的现象^[14-15],提示了肿瘤干细胞分化的不彻底性。

综上所述,磁珠分选的CD133⁺细胞具有体外及体内增殖能力、异常分化特性与多向分化能力及体内致瘤等特征,是符合肿瘤干细胞定义的亚群细胞。同时也证明了,运用磁珠分选系统以CD133作为细胞表面标记物来分选脑肿瘤干细胞的可行性,这将为深入研究脑肿瘤干细胞及将脑肿瘤干细胞理论及技术应用临床提供了基础^[16]。

4 参考文献

- [1] 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.

- [2] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105-111.
- [3] Deng YW, Fang JS, Li MC, et al. *Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi.* 2005;16(14):2449-2452.
邓永文,方加胜,李茗初,等.胶质瘤中肿瘤干细胞的分离、培养及鉴定[J].中国现代医学杂志,2005,16(14):2449-2452.
- [4] Li MC, Chen FH, Deng YW, et al. *Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi.* 2004;24(24):57-60.
李茗初,陈风华,邓永文,等.悬浮法培养C6胶质瘤细胞系和该细胞系中脑肿瘤干细胞的分离[J].中国现代医学杂志,2004,24(24):57-60.
- [5] Fang JS, Deng YW, Li MC, et al. *Zhonghua Yixue Zazhi.* 2007; 87(5):298-303.
方加胜,邓永文,李茗初,等.神经上皮来源脑肿瘤干细胞的分离培养与鉴定[J].中华医学杂志,2007,87(5):298-303.
- [6] Situ ZQ, Wu JZ. Beijing: Shijie Tushu Chubans Gongsi. 1996: 244-245.
司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].北京:世界图书出版公司,1996: 244-245.
- [7] Lal S, Lacroix M, Tofilon P, et al. An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals. *J Neurosurg.* 2000;92(2):326-333.
- [8] Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(6):425-436.
- [9] Qi L, Jin H, Ding LJ, et al. *Jilin Daxue Xuebao: Yixueban.* 2011; 37(3):441-444.
齐玲,金宏,丁丽娟,等.CD133免疫磁珠分选脑肿瘤干细胞的培养及生物学特性[J].吉林大学学报:医学版,2011,37(3):441-444.
- [10] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(7015):396-401.
- [11] Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* 2007;67(9):4010-4015.
- [12] Wu A, Oh S, Wiesner SM, et al. Persistence of CD133+ cells in human and mouse glioma cell lines: detailed characterization of GL261 glioma cells with cancer stem cell-like properties. *Stem Cells Dev.* 2008;17(1):173-184.
- [13] Wang J, Sakariassen PØ, Tsinkalovsky O, et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer.* 2008;122(4):761-768.
- [14] Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004;64(19):7011-7021.
- [15] Yuan X, Curtin J, Xiong Y, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2004;23(58): 9392-3400.
- [16] Eyler CE, Foo WC, LaFiura KM, et al. Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells.* 2008;26(12):3027-3036.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 国家自然科学基金资助项目 (30600636); 中南大学博士创新性课题(76231)。