

肝癌干细胞分离及其细胞生物学特性

刘岩, 周越塑, 赫兢, 刘鹏(解放军第三〇二医院急诊科, 北京市 100039)

文章亮点:

1 文章首次采用流式细胞技术在人高转移肝癌细胞系 MHCC97 中筛选肿瘤干细胞, 并进行细胞鉴定及生物学分析。
2 实验结果显示, 人肝癌细胞系中 CD133⁺CD34⁺MHCC97 具有肿瘤干细胞的特性, 可以向内皮和上皮细胞分化, 同时具有肿瘤干细胞的生物学特性, 是肿瘤复发转移的根源, 也是临床治疗的靶点, 为临床肝癌的个性化治疗提供了理论依据。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 人肝癌细胞系 MHCC97; 培养; 分离; 生物学特性

主题词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 肝肿瘤; 细胞分离

摘要

背景: 正常干细胞和肿瘤干细胞在基因表达和依赖的细胞信号通路上应该存在不同, 如何发现能选择性杀伤肿瘤干细胞的治疗手段是一个仍然需要大量研究的课题。

目的: 分离人肝癌细胞系肿瘤干细胞 MHCC97, 分析其细胞生物学特性。

方法: 采用流式细胞技术在人高转移肝癌细胞系 MHCC97 中筛选肿瘤干细胞, 分离正常人肝脏干细胞 CD133⁺CD34⁻ MHCC97 和人肝癌细胞系肿瘤干细胞 CD133⁺CD34⁺ MHCC97, 分别检测其表型、生长曲线、细胞周期和多系分化能力。

结果与结论: 人肝癌细胞系 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 肿瘤干细胞的表型为 CD133⁺CD34⁺, 人肝癌细胞系 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 具有与 CD133⁺CD34⁻ MHCC97 相似的细胞曲线和生长周期, 可以向上皮和内皮细胞分化, 并表达相应特异性的分子标志。提示人肝癌细胞系中 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 细胞具有肿瘤干细胞的特性, 可以向内皮和上皮细胞分化, 同时具有肿瘤干细胞的生物学特性, 是肿瘤复发转移的根源, 也是临床治疗的靶点。

刘岩, 周越塑, 赫兢, 刘鹏. 肝癌干细胞分离及其细胞生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28):4549-4554.

Liver cancer stem cell isolation and biological characteristics

Liu Yan, Zhou Yue-su, He Jing, Liu Peng (Department of Emergency, the 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China)

Abstract

BACKGROUND: Normal stem cells and tumor stem cells have differences in cell signaling pathway of gene expression and dependence. How to find a therapeutic method of selectively killing tumor stem cells is a topic that should be studied greatly.

OBJECTIVE: To isolate human liver cancer stem cells MHCC97 and to investigate the biological characteristics of them.

METHODS: Tumor stem cells were selected from highly metastatic human hepatoma cell line MHCC97 by flow cytometry. CD133⁺CD34⁻ MHCC97 from normal human liver stem cells and CD133⁺CD34⁺ MHCC97 from tumor stem cells were isolated. Their phenotypes, growth curve, cell cycle and multi-lineage differentiation were measured.

RESULTS AND CONCLUSION: Phenotypes of CD133⁺CD34⁺ MHCC97 cancer stem cells were CD133⁺ and CD34⁺ and they had the same growth curve and cell cycle with the liver stem cells CD133⁺CD34⁻ MHCC97, besides, they had the differential ability to epithelial cells and endothelial cells that proved to be stem cells. These results indicated that human cancer stem cells CD133⁺CD34⁺ MHCC97 had the specific characteristics of tumor stem cells, could differentiate into epithelial cells and endothelial cells, had the biological property of tumor stem cells, was an origin of tumor relapse and metastasis, and a target of clinical therapy.

Subject headings: stem cells; neoplastic stem cells; liver neoplasms; cell separation

Liu Y, Zhou YS, He J, Liu P. Liver cancer stem cell isolation and biological characteristics. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(28):4549-4554.

刘岩, 女, 北京市人, 汉族, 2013年北京大学医学部毕业, 硕士, 医师, 主要从事肝癌干细胞的基础研究和临床应用。

通讯作者: 周越塑, 解放军第三〇二医院急诊科, 北京市 100039

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.28.020
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)28-04549-06
稿件接受: 2014-05-12

Liu Yan, Master, Physician, Department of Emergency, the 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Corresponding author: Zhou Yue-su, Department of Emergency, the 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Accepted: 2014-05-12

0 引言 Introduction

近年来, 肿瘤干细胞理论的提出为肿瘤的治疗研究提供了新的思路。肿瘤干细胞学说认为肿瘤组织中绝大多数细胞只具备有限增殖能力^[1-2], 对化疗药物产生抗性的仅是肿瘤中极少一部分细胞, 即肿瘤干细胞, 治疗如果不能杀死导致肿瘤形成并维持肿瘤生长的肿瘤干细胞, 那么肿瘤仍会复发, 故对肿瘤的治疗应针对肿瘤干细胞^[3-5]。

实际上, 肿瘤干细胞与正常干细胞的区别是由其来源和本质决定的: 肿瘤干细胞来源于肿瘤组织, 而正常干细胞来源于正常组织。

具体说来, 首先, 正常干细胞的自我更新具有反馈机制调节, 增殖和分化处于平衡状态, 是有序的; 而在肿瘤干细胞中, 这一调节机制已失衡, 它的增殖分化是无序的, 失控的; 其次, 肿瘤干细胞没有分化为成熟细胞的能力, 其分化程序异常, 这与有正常分化程序的干细胞有着本质的不同; 最后, 肿瘤细胞倾向于积累复制错误, 而正常干细胞的发育机制要防止这种现象的出现^[6-8]。因此, 肿瘤干细胞概念的提出, 更多的是体现在对肿瘤发生机制的认识上, 根据目前已知的研究结果还不能简单地把它评价为一种新的干细胞。肿瘤细胞组织具有异质性, 这些特殊的细胞就是肿瘤干细胞, 并且推论是肿瘤干细胞对肿瘤的增殖、转移和复发起决定性作用。

越来越多的证据证明肿瘤来源于肿瘤干细胞, 肿瘤干细胞在肿瘤的发生发展乃至进展过程中发挥着重大的作用, 肿瘤干细胞的关键技术平台在于利用流式细胞技术分离和提纯特殊表型下的干细胞, 分离纯化技术对于肿瘤干细胞有着重要的意义^[9-10]。肿瘤干细胞的异常分化和克隆增生使其失去正常细胞具有的凋亡能力。

肝癌作为最常见的恶性肿瘤之一, 在所有恶性肿瘤中居第3位。肝脏肿瘤干细胞备受瞩目, 肝癌肿瘤干细胞成为干细胞领域最为活跃的部分, 越来越多的数据证明肝脏肿瘤干细胞对肝脏恶性肿瘤的发病起着重要作用, 是肝脏恶性肿瘤化疗疗效差、容易复发和转移的根本原因。

肝癌肿瘤干细胞是肿瘤组织中具有很强增殖能力, 表现部分干细胞特性的细胞亚群, 对肿瘤放化疗抗性的产生和肿瘤的复发起关键作用。目前用于靶向肿瘤干细胞的药物多为小分子抑制剂和融合蛋白。以溶瘤腺病毒为载体携带外源基因表达的新型治疗策略——病毒基因疗法, 在各种抗癌方案中展现出明显的优势, 对实体瘤表现出很好的疗效, 将其应用于靶向肿瘤干细胞的治疗具有良好的发展前景。

课题采用流式细胞技术在MHCC97细胞系(人高转移肝癌细胞系)中筛选肿瘤干细胞, 对其表型、生长曲线和多系分化能力进行探讨, 以期为临床肝脏肿瘤的肿瘤干细胞靶向治疗提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学水平, 随机双盲实验。

时间及地点: 于2012年3月至2013年10月在解放军第三〇二医院完成。

材料: 人肝癌细胞系MHCC97购自中国医学科学院基础医学研究所细胞库。

肝癌干细胞分离及其细胞生物学特性实验的主要试剂:

试剂	来源
胎牛血清, CD25单克隆抗体, CD28单克隆抗体, 胶原酶、胰蛋白酶、谷氨酰胺	GibcoBRL公司
β -巯基乙醇	Merck公司
转化生长因子、血管内皮生长因子、甘油硫酸、抗坏血酸、抗人IgG-FITC	Sigma公司
内皮细胞生长因子	Gibco公司
抗羊 IgG-TRITC	Santa Cruz Biotechnology

方法:

流式细胞仪检测人肝癌干细胞膜表面分子标记物表达: 待肝癌细胞PLC细胞系MHCC97长至80%浓度时, 用0.25% 胰酶消化后离心去上清, 细胞计数, 每 1×10^7 细胞中加入100 μ L PBS后加入10 μ L抗体, 充分混匀, 4 $^{\circ}$ C避光孵育10 min, 流式检测膜干细胞分子标记物表达量。

细胞倍增时间(doubling time, tD)的测定: 提取细胞, 传代后将细胞消化分离, 计数细胞数量, 接种于24孔板内(5×10^3 /孔), 于37 $^{\circ}$ C、体积分数5%CO₂培养箱中放置12 h后, 收集细胞悬液, 离心(1 500 r/min, 10 min)后取上清液, 细胞生长成熟时, 计算均值, 绘制生长曲线。在指数生长期细胞倍增时间 $t_0 = 0.301t / \log N_t - \log N_0$, t为细胞培养时间(h)。

体外内皮诱导: 24孔培养板用Matrigel(factor reduced, BD Bioscience)包被, 按 5×10^4 /孔接种CD133⁺CD34⁺ MHCC97。内皮诱导液为M199、体积分数2%胎牛血清、50 μ g/L血管内皮细胞生长因子、10 μ g/L碱性成纤维细胞生长因子和100 mg/L青霉素及100 U/mL硫酸链霉素, 诱导二至三天。光学显微镜下记录48 h内细胞形态变化过程, 并以RT-PCR和免疫荧光方法鉴定分化结果, 未诱导的MHCC97作为阴性对照, 肝微血管内皮细胞作为阳性对照^[11]。

体外上皮诱导: 细胞按 5×10^8 L⁻¹浓度重悬于DF-12溶液中, 进行10 Gy放射(照射速率, 1.0 Gy/min)。于37 $^{\circ}$ C、体积分数5%CO₂培养箱中放置12 h后, 收集细胞悬液, 离心(1 500 r/min, 10 min)后取上清液, 再加入等体积的DF-12溶液。并以此作为母液, 添加10 μ g/L胰岛素样生长因子、20 μ g/L肝细胞生长因子、10 μ g/L成纤维细胞生长因子4和体积分数2%胎牛血清。该培养液即作为上皮诱导培养液。

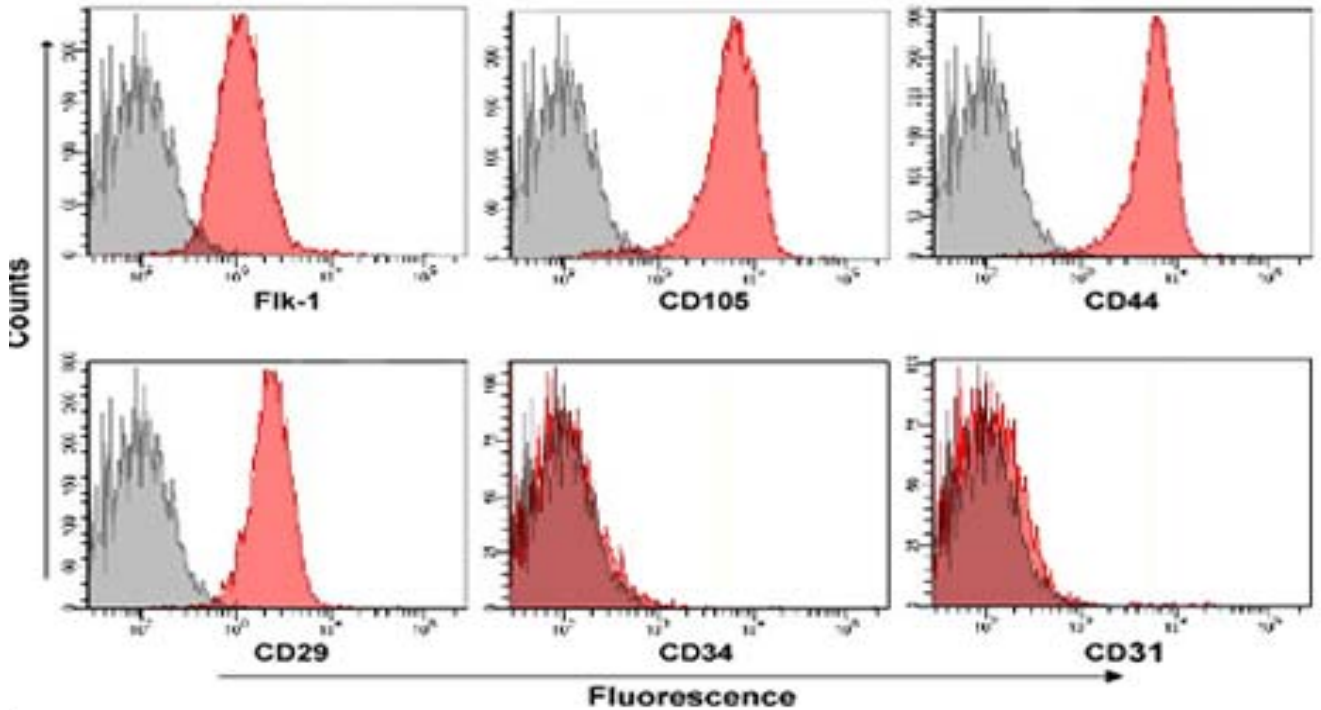


图 1 人肝癌干细胞表型的流式细胞术检测结果

Figure 1 Flow cytometry results of human liver cancer stem cell phenotype

图注: 利用流式细胞技术分离 CD133⁺CD34⁺ MHCC97, 表型特征为 CD11a(-)、CD31(-)、CD34(-)、CD45(-)、CD133(+)、CD44(+)、CD73(+)、CD105(+)、CD166(+).

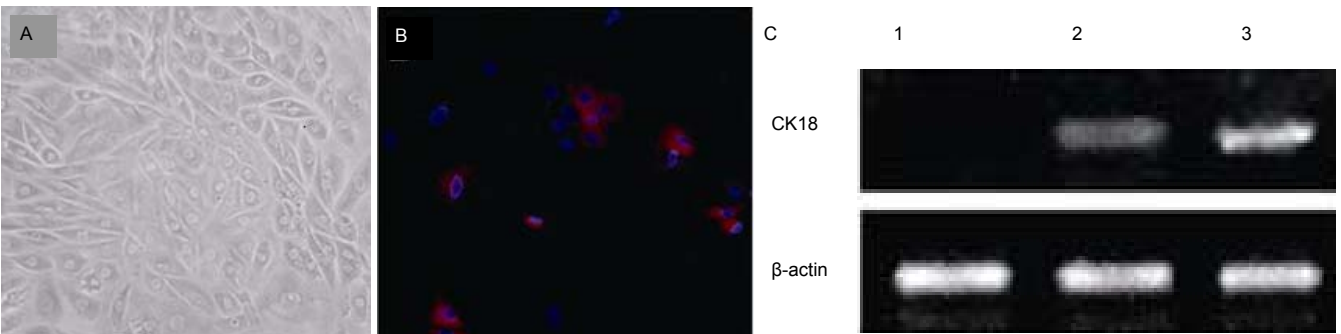


图 3 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 上皮细胞分化

Figure 3 Differentiation of CD133⁺CD34⁺ MHCC97 epithelial cells

图注: 图中 A 显示 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 在 EpDM 中诱导培养 3 周后, 部分细胞由梭形变为典型的卵石样上皮细胞形态($\times 200$); B 为免疫荧光染色, 显示诱导后约 60% 细胞表达广谱上皮细胞标志 pan-CK($\times 200$); C 为 RT-PCR 结果, 显示分化后的细胞表达上皮细胞特异标志 CK18, 而未经诱导的 MHCC97 则并不表达。图中 1, 2, 3 分别为未经诱导的 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 组、EpDM 诱导 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 组及肝脏上皮细胞组。

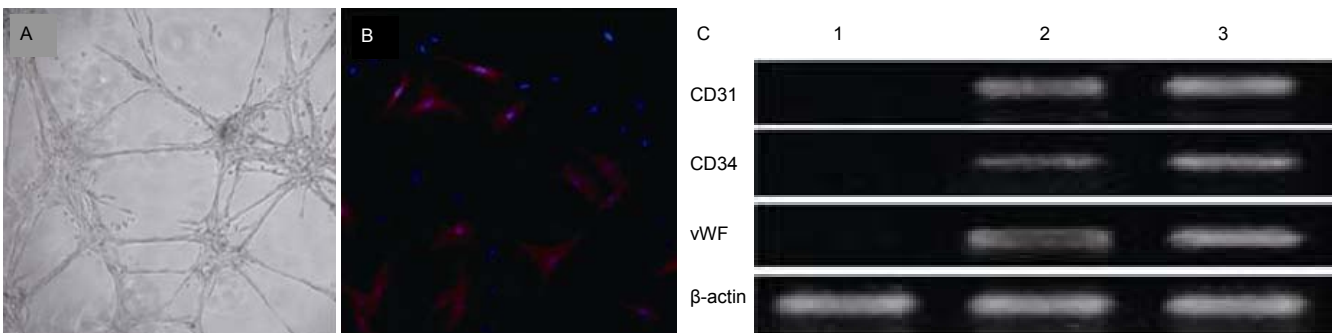


图 4 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 血管内皮细胞分化

Figure 4 Differentiation of CD133⁺CD34⁺ MHCC97 vascular endothelial cells

图注: 图中 A 显示 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 在内皮诱导 24 h 后即出现了典型的血管网状结构($\times 200$); B 为 vWF 免疫荧光染色, 显示约 70% 的细胞呈阳性($\times 200$); C 为 RT-PCR 结果, 显示分化后的细胞表达内皮细胞特异性标志 CD31、vWF 和 CD34。图中 1, 2, 3 分别为未经诱导的 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 组、内皮诱导 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 组及肝微血管内皮细胞组。

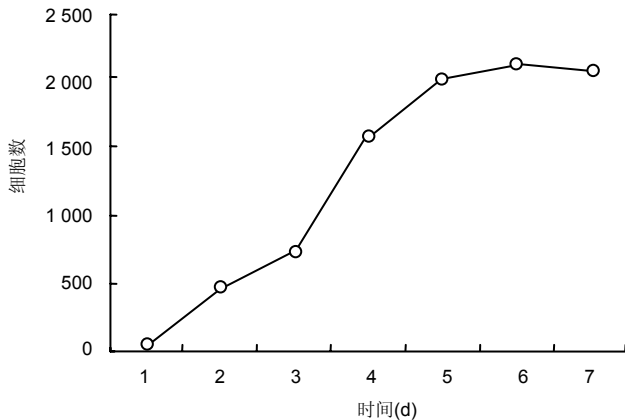


图2 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 细胞的生长曲线

Figure 2 Growth curve of CD133⁺CD34⁺ MHCC97 cells

图注: CD133⁺CD34⁺ MHCC97 细胞的生长曲线与 CD133⁻CD34⁻ MHCC97 细胞没有区别。

CD133⁺CD34⁺ MHCC97按每孔 2×10^5 个细胞接种于6孔板中, 分别在如下诱导培养基中进行上皮诱导3周: 单纯EpDM; EpDM加10 $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 β_1 ; EpDM加100 $\mu\text{g/L}$ 转化生长因子 β_1 ; 用EpDM与120 d肝细胞共培养(两种细胞用8 μm 孔径的transwell板相分隔^[12]). 各组培养液均每三至四天半量换液。未经诱导的MHCC97作为阴性对照, 肝脏上皮作为阳性对照。

主要观察指标: 人肝癌干细胞表型、生长曲线和细胞周期, CD133⁺CD34⁺ MHCC97的体外诱导分化结果。

统计学分析: 应用SPSS 13.0软件进行数据处理, CD133⁺CD34⁺ MHCC97和CD133⁻CD34⁻ MHCC97的细胞周期比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 显示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人肝癌干细胞表型 利用流式细胞技术分离CD133⁺CD34⁺ MHCC97, 这种细胞为类卵圆形梭形细胞, 表型特征为CD11a(-)、CD31(-)、CD34(-)、CD45(-)、CD133(+)、CD44(+)、CD73(+)、CD105(+)、CD166(+)(**图1**)。

与CD133⁻CD34⁻ MHCC97相比, CD133⁺CD34⁺ MHCC97恶性程度更高, 更容易侵袭转移, 在现在的分离方法上, 其更容易被消化和传代, 作者推测, 细胞特异性的CD133⁺CD34⁺的表型可能在这一过程中起重要作用, 更多分子形态的验证会更进一步阐明肿瘤干细胞的生物学特性。

2.2 人肝癌干细胞生长曲线和细胞周期 肿瘤干细胞的特征在于可以逃逸化疗, 比较恶性能力的一个指标就是体外扩增和分化能力, 本实验证明CD133⁺CD34⁺ MHCC97细胞的生长曲线与CD133⁻CD34⁻ MHCC97细胞没有区别(**图2**)。

24 h后, 去除悬浮细胞, 补充培养基, 细胞每隔3 d换液1次, 待细胞长至70%–80%汇合时, 用0.125%胰蛋白酶+0.01% EDTA消化传代。CD133⁺CD34⁺ MHCC97来源

表1 CD133⁺CD34⁺ MHCC97 和 CD133⁻CD34⁻ MHCC97 的细胞周期比较

Table 1 Cell cycles of CD133⁺CD34⁺ MHCC97 versus CD133⁻CD34⁻ MHCC97 cells

细胞周期	CD133 ⁺ CD34 ⁺ MHCC97	CD133 ⁻ CD34 ⁻ MHCC97
G ₀ -G ₁ 期	70.55%	61.24%
G ₂ -M期	19.03%	17.63%
S期	10.43%	21.12%

表注: 细胞周期分析对数生长期的细胞, 结果证明两者差别不大。

的细胞在第6天细胞基本上达到汇合, 而CD133⁻CD34⁻ MHCC97来源的细胞在第9天达到汇合。CD133⁺CD34⁺ MHCC97和CD133⁻CD34⁻ MHCC97的倍增时间分别为26 h和37 h。细胞周期分析对数生长期的细胞, 结果证明两者差别不大, 差异无显著性意义(**表1**)。

2.3 CD133⁺CD34⁺ MHCC97在体外经诱导可分化为上皮细胞 CD133⁺CD34⁺ MHCC97在EpDM中诱导培养3周后, 部分细胞由梭形变为典型的卵石样上皮细胞形态(**图3A**)。免疫荧光染色显示, 诱导后约60%细胞表达广谱上皮细胞标志pan-CK(**图3B**)。

RT-PCR结果显示, CD133⁺CD34⁺ MHCC97的细胞表达上皮细胞特异标志CK18, 而CD133⁻CD34⁻ MHCC97并不表达(**图3C**)。

2.4 CD133⁺CD34⁺ MHCC97在体外经诱导可分化为血管内皮细胞 CD133⁺CD34⁺ MHCC97在内皮诱导24 h后即出现了血管网状结构(**图4A**)。

vWF免疫荧光染色显示, 约70%的细胞呈阳性, 用血管内皮细胞特异的vWF抗体进行免疫荧光双染, 可见 $\beta_2\text{M/vWF}$ 双阳性的供体来源的血管内皮细胞(**图4B**)。

RT-PCR显示分化后的细胞表达内皮细胞特异性标志CD31、vWF和CD34(**图4C**)。

3 讨论 Discussion

肿瘤干细胞是肿瘤复发和转移的根源已经被越来越多的认可, 肿瘤复发和转移的根本原因在于肿瘤干细胞对化疗的耐受和肿瘤干细胞的免疫逃逸, 而肿瘤细胞之所以发生逃逸的一个重要原因在于其特征性的表型, 导致免疫系统对恶性肿瘤干细胞监视的失效, 从而引起肿瘤的免疫逃逸。肿瘤干细胞的异常分化和克隆增生使其失去正常细胞具有的凋亡能力^[13-15]。

现有的治疗癌症的方法, 包括肿瘤外科、肿瘤放射治疗、肿瘤化学治疗以及通常的免疫及基因治疗, 其目标大多数是尽可能杀死或清除一切肿瘤细胞。这些治疗方法多具有其局限性, 如不良反应强烈、无法抑制肿瘤的复发等。目前肿瘤的常规治疗、如放疗、化疗的确能杀死大部分恶性细胞, 但是对存在于肿瘤中的数量稀少的干细胞样细胞群却作用甚微。治疗后残存肿瘤干细胞的增殖, 足以使肿瘤复发和转移。

由于肿瘤干细胞与干细胞的相似性, 如何避免对肿瘤干细胞具有杀伤作用的治疗手段影响到正常的干细胞就显得十分重要, 如果采用的治疗手段不合适, 有可能引发严重的不良反应, 使人类正常的干细胞受到损害。干细胞的活动受到其微环境的严格调控, 是人类正常的生理活动, 而肿瘤干细胞的活动则产生肿瘤, 因此正常的干细胞和肿瘤干细胞在基因表达和依赖的细胞信号通路上应该存在不同, 如何发现能选择性地杀伤肿瘤干细胞的治疗手段是一个仍然需要大量研究的领域^[16-17]。据此可以通过改善肝脏的微环境来诱导癌细胞向正常细胞分化, 或者通过诱导癌细胞凋亡来达到治疗目的, 而且已有相关的此类研究的报道^[18]。

本实验对 CD133⁺CD34⁺MHCC97 和 CD133⁻CD34⁻MHCC97 进行了比较研究。由于在使用半透膜把 CD133⁺CD34⁺MHCC97 和 CD133⁻CD34⁻MHCC97 分割开后, 免疫调节作用依然存在, 所以很多的研究者认为间充质干细胞抑制免疫细胞增殖, 活化, 是通过分泌可溶性的抑制性因子实现的。目前已经被研究证实的发挥作用的因子有很多种, 其中主要包括转化生长因子 β 1、干细胞生长因子、前列腺素E2、白细胞介素10、一氧化氮、吲哚胺-2, 3-双加氧酶等等。已经有很多研究显示, CD133⁺CD34⁺MHCC97 可以归巢到骨髓或者其他受损组织, 有一些研究认为表达 CXCR4 的 CD133⁺CD34⁺MHCC97 是通过基质细胞衍生因子1这个途径归巢的^[19-20]。虽然 CD133⁺CD34⁺MHCC97 可能通过这种细胞间直接接触发挥其免疫抑制活性, 但究竟有哪些表面分子介导了这种细胞间的相互作用还有待进一步研究。最新一项研究结果推动了该方向的进展, CD133⁺CD34⁺MHCC97 细胞表面组成性表达的 HLA-G 抗原参与介导了 CD133⁺CD34⁺MHCC97 间充质干细胞的免疫抑制作用。

CD133⁺CD34⁺MHCC9 三系分化的能力, 从而证明其肿瘤干细胞的特性。有许多研究表明, CD133⁺CD34⁺MHCC97 群体在合适的诱导环境下, 能向3个胚层细胞分化(神经细胞、上皮细胞、间质细胞)。但 CD133⁺CD34⁺MHCC97 是一个异质性群体的事实也已经被广泛承认^[21]。作为临床应用的希望, 间充质干细胞的这些免疫调节优势已经在许多不同的疾病动物模型中开展研究, 包括了异体免疫排斥(器官和干细胞移植), 自身免疫和肿瘤免疫。而且, 相应的临床病例也有报道。但从目前的研究中发现 CD133⁺CD34⁺MHCC97 的这种免疫调节能力对于急性炎症似乎更有效; 在慢性或稳定性的炎症状况下 CD133⁺CD34⁺MHCC97 的免疫耐受效应并不理想, 而很可能是因为在这种情况下, 似乎并不需要再去控制已经超负荷的免疫系统反应。分化掉的细胞在整个细胞群体中的比例会越来越高, 那么如果利用这个细胞群体中绝大多数细胞的表面标志来定义 CD133⁺CD34⁺MHCC97 群体, 很可能反映的不是 CD133⁺CD34⁺MHCC97 在体内本来的性状。所以, 怎样区分出原始的以及成熟的细胞会

很有价值。

肿瘤干细胞学说这一新概念的提出及认定无疑将会是人类攻克癌症的一大进步, 将会对癌症的诊断、治疗及预防产生深远的影响, 为人类治愈癌症提供重要帮助。但目前这一研究领域仅是初级阶段, 还有许多问题有待解决, 如是否各种肿瘤都含有肿瘤干细胞、肿瘤干细胞的具体生物学特性、肿瘤干细胞的调节机制、肿瘤干细胞的药物研制及其疫苗的研制等等, 此外近年发现的 SP 细胞与肿瘤干细胞的具体内在联系也是需要搞清的问题之一, 因为这种细胞可能与肿瘤的耐药性有很大关系^[22]。

已经通过实验证实, 瘤细胞就是由肿瘤干细胞分化而来的。因而, 只要对肿瘤干细胞准确实施医学打击, 就可能从根本上摧毁肿瘤细胞母体, 整个肿瘤也会随之溃散, 从而可避免常规放疗、化疗等传统癌症治疗方法不能根除癌症等弊端。其他部位癌症的发生, 也是由某个母体繁殖、扩增的。只要同样打击肿瘤细胞的“母体”, 治疗癌症将更加有效, 这将有待于进一步去证实。肿瘤干细胞作为一种新的发现虽然时间还不长, 但它从一个全新的角度开启了人们的思维、开拓科研工作者的思路。肿瘤干细胞的分离和鉴定, 为临床彻底根治癌症带来了希望。肿瘤原发灶的手术根治及特异性免疫和生物治疗将是彻底清除残存肿瘤干细胞治愈肿瘤的有效手段。

相信随着对肿瘤干细胞研究的不断深入, 研究结果将有利于深入了解肿瘤的发生机制, 为肿瘤治疗提供新的靶点, 人类将有望从根本上根治癌症。

致谢: 感谢解放军第三〇二医院实验技术保障研究中心对实验的支持。

作者贡献: 刘岩设计、完成课题及细胞生物学实验, 并对文章进行校正。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验获得解放军第三〇二医院伦理委员会批准。

学术术语: 肿瘤干细胞学说-肿瘤组织中绝大多数细胞只具备有限增殖能力, 对化疗药物产生抗性的仅是肿瘤中极少一部分细胞, 即肿瘤干细胞, 治疗如果不能杀死导致肿瘤形成并维持肿瘤生长的肿瘤干细胞, 那么肿瘤仍会复发, 故对肿瘤的治疗应针对肿瘤干细胞。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Gao X, Johnson KD, Chang YI, et al. Gata2 cis-element is required for hematopoietic stem cell generation in the mammalian embryo. *J Exp Med*. 2013;210(13):2833-2842.
- [2] Wang H, Qiu X, Ni P, et al. Immunological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells and the therapeutic effects of their transplantation on hyperglycemia in diabetic rats. *Int J Mol Med*. 2014;33(2):263-270.

- [3] Parchur AK, Ansari AA, Singh BP, et al. Enhanced luminescence of CaMoO₄:Eu by core@shell formation and its hyperthermia study after hybrid formation with Fe₃O₄: cytotoxicity assessment on human liver cancer cells and mesenchymal stem cells. *Integr Biol (Camb)*. 2013;6(1): 53-64.
- [4] Elhefnawi M, Soliman B, Abu-Shahba N, et al. An Integrative Meta-analysis of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2013. pii: S1672-0229 (13)00117-4.
- [5] Barone M, Scavo MP, Maiorano E, et al. Bone marrow-derived stem cells and hepatocarcinogenesis in hepatitis B virus transgenic mice. *Dig Liver Dis*. 2013. pii: S1590-8658(13)00622-1.
- [6] Ng R, Song G, Roll GR, et al. A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration. *J Clin Invest*. 2012;122(3): 1097-1108.
- [7] Trivedi S, Wiber SC, El-Zimaity HM, et al. Glucagon-like peptide-2 increases dysplasia in rodent models of colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(8): G840-849.
- [8] Du J, Chen Y, Li Q, et al. HIF-1 α deletion partially rescues defects of hematopoietic stem cell quiescence caused by Cited2 deficiency. *Blood*. 2012;119(12):2789-2798.
- [9] Newman RG, Ross DB, Barreras H, et al. The allure and peril of hematopoietic stem cell transplantation: overcoming immune challenges to improve success. *Immunol Res*. 2013; 57(1-3):125-139.
- [10] Hsu HW, Wall NR, Hsueh CT, et al. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers. *Oral Oncol*. 2014;50(1):19-26.
- [11] Saran S, Tran DD, Klebba-Färber S, et al. THOC5, a member of the mRNA export complex, contributes to processing of a subset of wingless/integrated (Wnt) target mRNAs and integrity of the gut epithelial barrier. *BMC Cell Biol*. 2013; 14(1):51.
- [12] Ali N, Allam H, Bader T, et al. Fluvastatin Interferes with Hepatitis C Virus Replication via Microtubule Bundling and a Doublecortin-like Kinase-Mediated Mechanism. *PLoS One*. 2013;8(11):e80304.
- [13] Govaert KM, Emmink BL, Nijkamp MW, et al. Hypoxia After Liver Surgery Imposes an Aggressive Cancer Stem Cell Phenotype on Residual Tumor Cells. *Ann Surg*. 2013. [Epub ahead of print]
- [14] Zubeldia IG, Bleau AM, Redrado M, et al. Epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes leading to liver metastasis are abrogated by the novel TGF β 1-targeting peptides P17 and P144. *Exp Cell Res*. 2013;319(3):12-22.
- [15] Malfitano A, Barbaro G, Perretti A, et al. Human immunodeficiency virus-associated malignancies: a therapeutic update. *Curr HIV Res*. 2012;10(2):123-132.
- [16] 曹莹.脂肪来源的间充质干细胞的生物学特性以及间充质干细胞在急性肝损伤中治疗机制的研究[D].中国协和医科大学, 2006.
- [17] 朱希山,施薇,台卫平等.脂肪与骨髓来源间充质干细胞生物学特性的比较[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(32): 5936-5940.
- [18] Neumann J, Reu S, Kirchner T. Prognostic marker profiles for risk of distant metastases in colorectal cancer. *Pathologe*. 2012;33(1):39-44.
- [19] Okazaki I, Inagaki Y. Novel strategies for hepatocellular carcinoma based on MMPs science. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12(7):753-763.
- [20] Nakagawa M, Matsuda M, Masaji H, et al. Successful preoperative diagnosis of biliary cystadenoma with mesenchymal stroma and its characteristic imaging features: report of two cases. *Turk J Gastroenterol*. 2011;22(6): 631-635.
- [21] Nautiyal J, Du J, Yu Y, et al. EGFR regulation of colon cancer stem-like cells during aging and in response to the colonic carcinogen dimethylhydrazine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(7):G655-663.
- [22] Belton A, Gabrovsky A, Bae YK, et al. HMGA1 induces intestinal polyposis in transgenic mice and drives tumor progression and stem cell properties in colon cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e30034.