

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201305003

· 论著 ·

# shRNA-hIAP2 增强 CNE-1 鼻咽癌 细胞对放射敏感性的实验研究

袁媛<sup>1,2</sup>, 蒋文娟<sup>3</sup>, 姜武忠<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅医院 肿瘤科, 湖南 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院 淋巴瘤血液放疗科, 湖南 长沙 410013; 3. 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院, 消化内二科, 湖南 长沙 410013)

**摘要:** 目的 构建人凋亡抑制蛋白(human inhibitor of apoptosis protein2, hIAP-2)的 shRNA, 靶向抑制 hIAP-2 基因联合放疗, 探讨其对 CNE1 鼻咽癌细胞株放射敏感性的影响。方法 首先采用 MTT 法确定最佳放射剂量; 再构建 4 条 hIAP-2-shRNA 沉默片段并用脂质体法转染 CNE1 细胞, 最后采用实时荧光定量 PCR(Q-PCR) 和免疫印迹法(Western blot, WB) 筛选出最佳沉默 shRNA 序列; 用最佳沉默 shRNA 序列转染 CNE1 细胞, 分别设置转染放射线照射组与未转染放射线照射组, 采用实时定量 PCR 和 WB 检测 hIAP-2 的基因及其蛋白表达; 流式细胞术测细胞凋亡, transwell 测细胞侵袭能力。结果 MTT 法明确 4 Gy 为最佳放射剂量; Q-PCR 和 WB 检测结果显示 4 条 hIAP-2-shRNA 均能有效抑制 hIAP-2 mRNA 及蛋白表达( $P < 0.05$ ), 以 hIAP-2-shRNA2 沉默效果最显著( $P < 0.05$ ); Q-PCR 和 WB 检测结果显示转染 hIAP-2-shRNA2 后照射组与未转染 hIAP-2-shRNA2 照射组的 CNE1 细胞中 hIAP-2 基因与蛋白表达比较, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 流式细胞术检测结果显示转染 hIAP-2-shRNA2 后照射组比未转染 hIAP-2-shRNA2 照射组凋亡率差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); transwell 检测结果显示转染 hIAP-2-shRNA2 后照射组与未转染 hIAP-2-shRNA2 照射组侵袭能力差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 转染 hIAP-2 基因沉默后放射可增加鼻咽癌细胞凋亡率, 降低其侵袭能力, 能够起到放疗增敏作用。

**关键词:** 人凋亡抑制蛋白; 鼻咽癌细胞; RNA 沉默; 放射敏感性

中图分类号: R730.5; R739.91 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2013)05-0393-06

## shRNA-hIAP2 enhancing radiation effect on nasopharyngeal carcinoma cell

YUAN Yuan, JIANG Wen-juan, JIANG Wu-zhong

(Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To construct the inhibitor of the shRNA of apoptosis protein (human inhibitor of apoptosis protein2, hIAP-2) for combination of inhibition hIAP-2 gene with radiotherapy, and to investigate its effect on the radiosensitivity of CNE1 nasopharyngeal carcinoma cell line. **Methods** MTT assay was used for determining the optimal dose of radiation. Four hIAP-2-shRNA silencing fragments were built and CNE1 cells were transfected by liposome. The best silencing shRNA sequences were screened with real-time quantitative PCR (Q-PCR) and Western blot (WB). CNE1 cells were transfected with the best silencing shRNA sequences and divided into transfected irradiated group and non-transfected irradiated group. In both groups, expression of hIAP-2 gene and protein was detected by real-time Q-PCR and WB, apoptosis by flow cytometry, and cell invasion by transwell. **Results** MTT assay demonstrated 4 Gy as the optimal radiation dose. The results of Q-PCR and WB test showed that four hIAP-2-shRNA could effectively inhibit the expression of hIAP-2 mRNA and protein ( $P < 0.05$ ), and hIAP-2-shRNA2 had the most significant silencing effect ( $P < 0.05$ ). The results also showed statistically significant differences of hIAP-2 gene and protein expression between the transfected group and the untransfected group ( $P < 0.05$ ). Flow cytometry

showed statistically significant difference of the apoptosis rate between the transfected group and untransfected group ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, transwell test showed statistically significant difference of the invasion ability between the two groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Transfection of silenced hIAP-2 gene can increase nasopharyngeal carcinoma cell apoptosis rate and reduce its invasion, which may play a role in radiosensitization.

**Key words**: hIAP-2; Nasopharyngeal carcinoma cell; RNA silencing; Radiosensitivity

鼻咽癌是我国南方地区的一种常见的恶性肿瘤疾病,为我国头颈部恶性肿瘤疾病的首位。由于鼻咽部位置特殊,周边重要脏器多,解剖复杂,肿瘤组织可以经颅底、颈动脉鞘区及咽旁间隙浸润或转移,而鼻咽癌大多为低分化鳞癌,对放疗敏感,原发病灶、周边组织及颈部淋巴结引流区域均可包括在照射靶区内,所以目前放射治疗仍然是鼻咽癌治疗的首选治疗方法<sup>[1]</sup>。但是放疗后患者易出现各种并发症,同时部分患者放疗敏感性较差,以及放疗后病情复发并远处转移等难题依然严重影响了患者的生存质量,研究者们除了改进放疗的技术,提高其效果外,也应从更深层次找寻更好、更高效安全的治疗手段。随着分子生物学以及相关学科的发展,人们通过对肿瘤凋亡基因的深入研究,鼻咽癌的治疗将进入了基因水平。

人凋亡抑制蛋白-2 (human inhibitor of apoptosis protein 2, hIAP-2) 是新发现的凋亡抑制蛋白家族中的一员,定位于人 11 号染色体 11q22-23, 编码 618 个氨基酸,分子量约为 69 kDa,广泛表达于人正常组织及 60 多种肿瘤细胞中<sup>[2]</sup>。本研究拟用 RNA 干扰技术靶向抑制 CNE1 细胞中 hIAP-2 基因,观察其对于鼻咽癌细胞放射生物学特性的影响,并初步探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

人鼻咽癌细胞株 CNE1 购自 ATCC;小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;脂质体 Lipofectamine TM 2000 转染试剂及 RNA 提取试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,反转录及 PCR 扩增试剂盒购自 Fermentas 公司;AV-PI 凋亡检测试剂盒购自南京凯基公司;鼠抗人 hIAP-2, GAPDH 抗体购自美国 SANTA 公司, hIAP-2, GAPDH 引物购自上海生工公司。

### 1.2 序列选择

上海吉玛公司设计并构建 4 对靶向 hIAP-2

基因的 shRNA 序列,分别为 shRNA1 序列;shRNA2 序列;shRNA3 序列;shRNA4 序列。Negative shRNA control 为阴性对照,碱基顺序随机排列,与人类基因外显子无同源性。

### 1.3 CNE1 细胞培养和转染

选用 hIAP-2 阳性 CNE1 细胞作为靶细胞,以含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基于含 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 及饱和湿度条件下培养箱中培养。转染前 24 h,将 CNE1 细胞传代之 6 孔板中,用不加抗生素的培养基培养,当细胞密度达到 40% 时转染,参照 invitrogen 公司 lipofectamine TM 2000 转染试剂说明进行转染。

### 1.4 MTT 法测细胞放射后的存活率

MTT 实验方法参照阮志华等<sup>[2]</sup>学者操作,在 96 孔板加入细胞 100 μL/孔(约  $1 \times 10^4$ ),置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 24 h,同时设立无细胞的培养液空白对照和细胞对照,放射剂量分别 0, 1, 2, 4, 6, 8 Gy,将 96 孔板在 37℃,含 5% CO<sub>2</sub> 空气及 100% 湿度的细胞培养箱中孵育 24 h,每孔加 50 μL 1 × MTT,在 37℃ 孵育 4 h,用酶标仪在 570 nm 波长测各孔吸光度(A)值。各放射剂量点均设置 3 个复孔,实验重复 3 次,按照下列公式计算存活率 = (给药细胞 OD/对照细胞 OD) × 100%。

### 1.5 Q-PCR 检测 hIAP-2 基因 mRNA 表达

1.5.1 引物的设计合成 hIAP-2 基因特异性引物序列如下 sense primer: 5'-CAT GCA GAC ACA TGC AGC TC-3'; antisense primer: 5'-ACC TTG GAA ACC ACT TGG CA-3',扩增片段为 103 bp。内参基因 3 磷酸甘油醛(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 特异性引物序列如下: antisense primer: 5'-CAA TGA CCC CTT CAT TGA CC-3', antisense primer: 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3',扩增片段为 106 bp。

1.5.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成 参照 Invitrogen 公司产品说明书和反转录试剂盒说明进行 RNA 反转录反应;反转录得到 cDNA 用作 PCR 反应模板, -20℃ 保存备用。

1.5.3 Q-PCR 扩增 PCR 反应体系为 25 μl,

包含 marster Mix ( $2 \times$ )  $12.5 \mu\text{l}$ , water nuclease-free  $10.5 \mu\text{l}$ , primer  $1 \mu\text{l}$ , cDNA  $1 \mu\text{l}$ 。PCR 扩增条件为  $94^\circ\text{C}$  预变性 3 min, 然后  $94^\circ\text{C}$  30 S,  $59^\circ\text{C}$  30 S,  $72^\circ\text{C}$  45 S, 扩增 40 个循环;再  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min, 最后绘制溶解曲线。同时以相同条件扩增内参 GAPDH。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算各样本的 hIAP-2 基因的相对表达量。

### 1.6 Western blotting 检测 hIAP-2 蛋白表达

提取的总蛋白采用 BCA 定量,取等量的总蛋白 ( $20 \mu\text{g}$ ) 进行 12% SDS-PAGE, 采用 Bio-Rad 转移槽在  $4^\circ\text{C}$  冷却条件下以恒流 300 mA 转印蛋白 1.5 h, 印迹到 NC 膜上, 然后用 5% 脱脂牛奶封闭, hIAP-2 抗体稀释度为 1:500, GAPDH 抗体稀释度 (1:800),  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 h, 洗膜, 羊抗鼠二抗 (1:80 000) 室温孵育 1 h, 洗膜, ECL 显色, 采用 gel pro 4.0 软件进行图像分析, 以 hIAP-2 与 GAPDH 灰度值的比值为 hIAP-2 蛋白相对表达水平。

### 1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

分别收集细胞对照组, 转染 hIAP-2-shRNA 再放射线照射组与未转染 hIAP-2-shRNA 再放射线照射组的细胞约  $2 \times 10^6$  个,  $1 \times$  PBS 洗涤细胞 2 次后加入  $500 \mu\text{l}$  的 Binding Buffer 悬浮细胞, 再加入  $5 \mu\text{l}$  Annexin V-FITC 混匀后, 加入  $5 \mu\text{l}$  Propidium Iodide 进行室温避光反应 10 min, 即刻进行流式检测。

### 1.8 Transwell 检测细胞侵袭能力

收集各组细胞, 用  $1 \times$  PBS 洗涤细胞 2 次, 用含 BSA 的无血清培养基重悬, 调整细胞密度至  $5 \times 10^4/\text{ml}$ , 在 6 孔板上室加入细胞悬液而在下室加入 1 ml 含 FBS 的培养基, 培养细胞 24 h。用棉签擦去基质胶和上室内的细胞, 再用 95% 酒精固定 20 min, 用甲苯胺蓝染色 10 min, 置于倒置显微镜下观察并计数。

### 1.9 统计学处理

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 16.0 统计软件处理数据, 采用单因素方差分析 (on way ANOVA), 分析各组间差异。

## 2 结果

### 2.1 MTT 法检测各放射剂量照射 CNE1 细胞后的存活率

放射剂量为 1, 2, 4, 6, 8 Gy 组与 0 Gy 组的

存活率分别比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 6 Gy 与 8 Gy 组存活率小于 70%, 细胞存活率较低, 不利于后续实验的进行。1 Gy 组与 2 Gy 组的存活率相比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 4 Gy 组的细胞存活率达到了 77.8%, 与其他各放射剂量组比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 并且细胞存活率高, 满足后续实验要求, 结果见图 1。

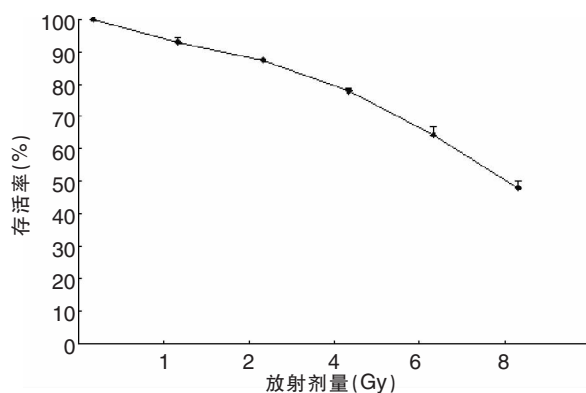


图 1 不同放射剂量对 CNE1 细胞存活率的影响

### 2.2 不同 hIAP-2-shRNA 序列对 CNE1 细胞中 hIAP-2 mRNA 和蛋白表达的影响

从图 2 可见未转染组与阴性对照组 (即转染 Negative shRNA, 下同) 中 hIAP-2 基因及蛋白表达相比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与各转染 shRNA 组间比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且未转染组与转染 shRNA2 组差异具有统计学意义 ( $F = 24.902, P < 0.01$ ); shRNA2 组中 hIAP-2 mRNA 和蛋白表达最低。Q-PCR 及 Western blotting 检测结果提示 4 条 shRNA 序列中以 shRNA2 作用效果最明显。

### 2.3 hIAP-2-shRNA 序列对于 CNE1 细胞放射敏感性的影响

#### 2.3.1 Q-PCR 及 Western blotting 结果分析

从图 3 中可见对照组 (即 CNE1 细胞未转染, 未照射处理, 下同) 与未转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组中 hIAP-2 基因及蛋白表达差异具有统计学意义 ( $F = 46.398, P < 0.05$ ), 未转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组与转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组中 hIAP-2 基因及蛋白表达比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 CNE1 细胞当中的 hIAP-2 基因在转染 hIAP-2-shRNA2 再放射后其表达量大幅度降低。

#### 2.3.2 hIAP-2-shRNA 对放射后 CNE1 细胞凋

亡的影响 对照组与未转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组 ( $F = 11.71, P < 0.05$ ), 未转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组与转染 hIAP-2-shRNA2 再

放射组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 CNE1 细胞在转染 hIAP-2-shRNA2 再放射后凋亡率大幅度增加(图4)。

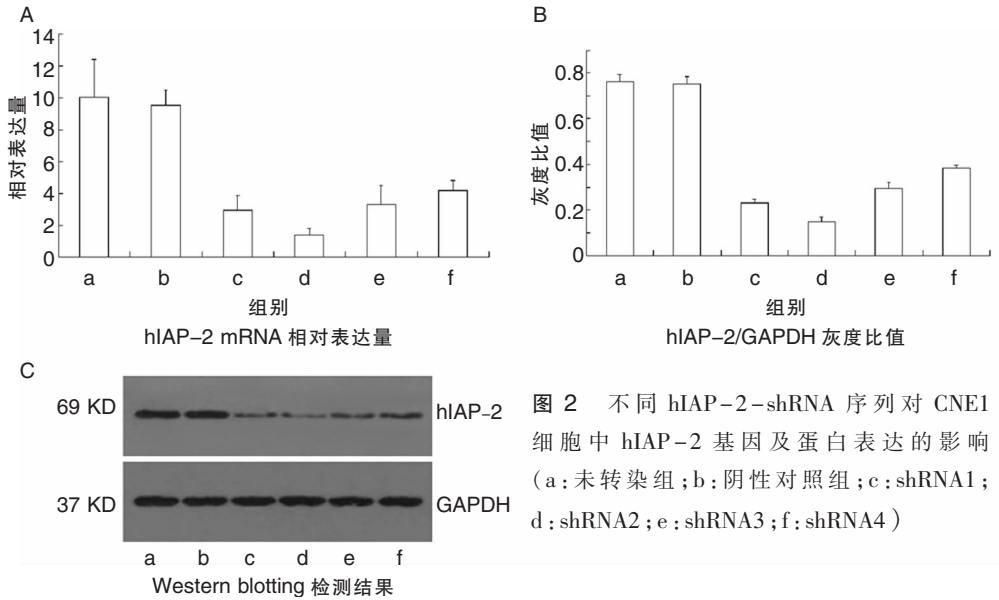


图2 不同 hIAP-2-shRNA 序列对 CNE1 细胞中 hIAP-2 基因及蛋白表达的影响 (a: 未转染组; b: 阴性对照组; c: shRNA1; d: shRNA2; e: shRNA3; f: shRNA4)

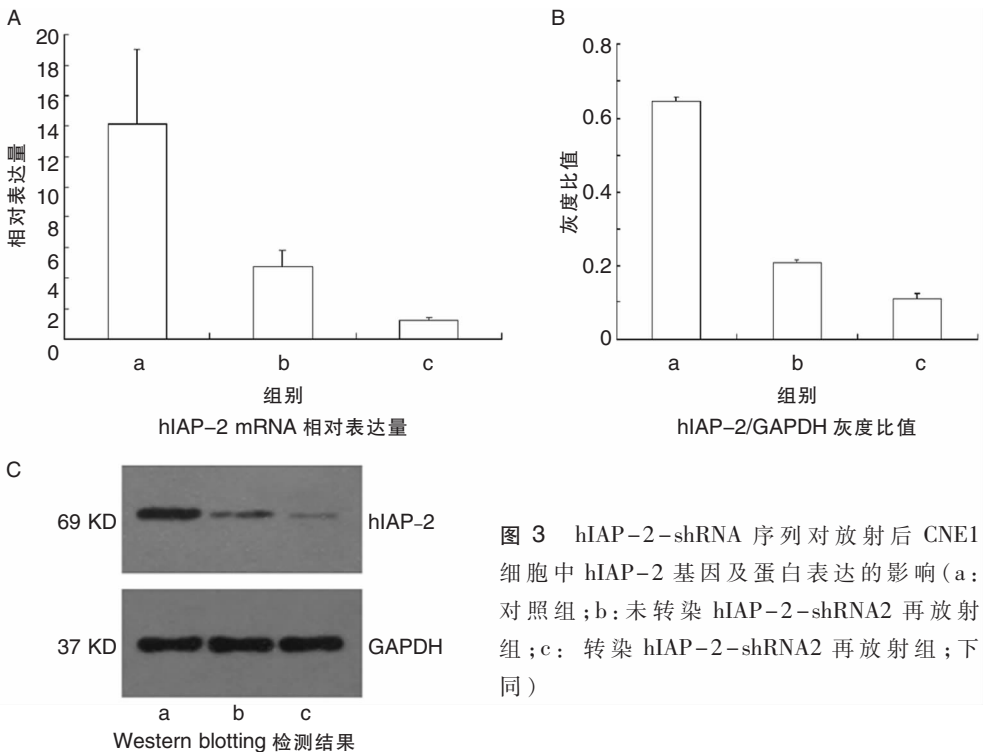


图3 hIAP-2-shRNA 序列对放射后 CNE1 细胞中 hIAP-2 基因及蛋白表达的影响 (a: 对照组; b: 未转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组; c: 转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组; 下同)

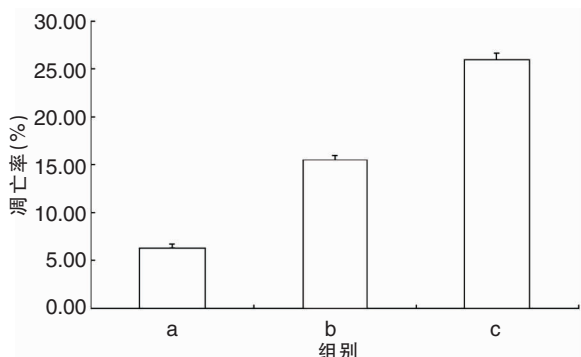


图 4 hIAP-2-shRNA 转染 CNE1 细胞再放射的凋亡率

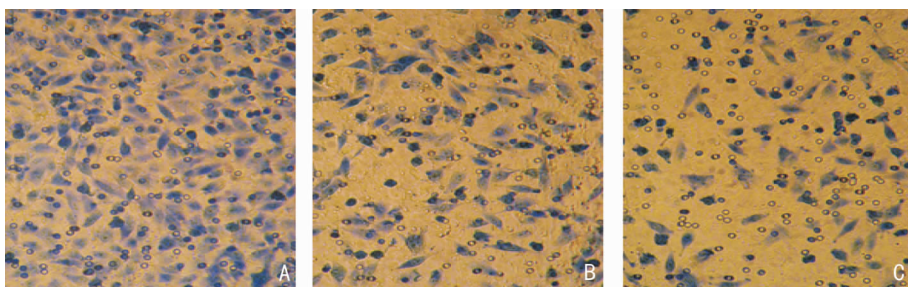


图 5 hIAP-2-shRNA 与对放射后 CNE1 细胞的侵袭能力的影响(甲苯胺蓝  $\times 200$ ) A: 对照组; B: 未转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组; C: 转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组

### 3 讨论

肿瘤细胞凋亡有:外源性与内源性两条途径。外源性途径又称死亡受体途径,凋亡信号(如 TNF、FASL)通过与细胞膜上的死亡受体(如 TNF 受体、FAS)结合,激活 caspase-8,启动凋亡程序;内源性途径又称线粒体途径,DNA 损伤信号通过 Bcl-2 等作用使线粒体膜的通透性增加,释放促凋亡的细胞色素 C,进而活化 Caspase-9 前体,进入凋亡过程。这两条途径共同的终末效应酶是 Caspase-3 和 Caspase-7。IAPs 家族蛋白最早在 baculoviruses 中被发现<sup>[3]</sup>,其功能是在病毒复制时保留主细胞的成活,hIAP-2 其结构和功能与 hIAP-1 较为相似,两者都是肿瘤坏死因子受体 2 (tumor necrosis factor receptor 2, TNFR2)复合体的成员。是由肿瘤坏死因子受体相关因子( TRAF1 或 TRAF2)作用于 TNFR2 介导的,其效应是激活核因子 NF-KB, NF-KB 本身能抑制凋亡有可能增强 IAPs 的表达,IAP 能抑制 TNF 或者 FAS 途径的凋亡是由于 IAP 与 TRAF (TNF-receptor associated factor)相互作用而形成 TNF 受体(TNFR)信号复合体,干扰

2.3.3 hIAP-2-shRNA 对放射后 CNE1 细胞的侵袭能力的影响 对照组与未转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组 ( $F = 24.877, P < 0.05$ ),未转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组与转染 hIAP-2-shRNA2 再放射组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),提示 CNE1 细胞在转染 hIAP-2-shRNA2 再放射后侵袭能力大幅度减弱(图 5)。

TNF 激活的死亡信号从而抑制凋亡。

目前研究表明 IAPs 的功能是能够抑制由各种刺激如抗 FAS 抗体<sup>[4]</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>[5]</sup>、病毒感染,化疗药物、紫外照射<sup>[6]</sup>等所引起的细胞凋亡。Imoto 等<sup>[7-8]</sup>发现在鳞状食管癌和颈腺肿瘤组织中 hIAP-2 基因高表达,是染色体 11q22 扩增的结果,hIAP-2 活化可能导致导致肿瘤恶性转化,包括侵袭力、转移性和抗药性的改变。有研究显示抑制乳腺癌 MCF-7 细胞中的 hIAP-2 基因后能显著抑制其增殖能力<sup>[9]</sup>,可以增强抗肿瘤药物的抑癌作用<sup>[10]</sup>。王杨等研究表明在 hepG2 肝癌细胞中靶向沉默 hIAP-2 基因可以显著抑制其增殖能力,并增加 hepG2 肝癌细胞的凋亡率<sup>[11]</sup>。白露等<sup>[12]</sup>研究表明采用一定剂量的放射线照射 CNE-1 鼻咽癌细胞,可以导致 CNE-1 鼻咽癌细胞产生不同程度的凋亡。

本实验中的研究结果提示我们抑制 CNE1 鼻咽癌细胞中 hIAP-2 基因的表达再放射可增加 CNE1 鼻咽癌细胞的凋亡率,其侵袭能力大幅度减弱,可以提高鼻咽癌细胞 CNE1 对于放射的敏感性,提示我们基因沉默联合放疗,更能有效抑制并杀死肿瘤细胞,这将为临床放射治疗提供了一条极具意义的策略。

## 参考文献:

- [1] 叶奕菁, 陆小军, 吴新光, 等. 鼻咽癌放疗后放射性脑病的多因素分析[J]. 中国医药导报, 2007, 4(9): 19.
- [2] 阮志华, 杨和平, 曾勇, 等. MTT法在测定细胞放射敏感性中的运用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(3): 360, 363.
- [3] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(23): 5315 - 5320.
- [4] Bartling B, Tostlebe H, Darmer D, et al. Shear stress-dependent expression of apoptosis-regulating genes in endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 278(3): 740 - 746.
- [5] Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, et al. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 10057 - 10062.
- [6] Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(1): 445 - 454.
- [7] Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, et al. Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(17): 4860 - 4866.
- [8] Imoto I, Yang ZQ, Pimkhaokham A, et al. Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at 11q22 in esophageal squamous cell carcinomas [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(18): 6629 - 6634.
- [9] 李莉萍, 梁念慈, 罗超权. hIAP-2 siRNA 表达质粒的构建及其对乳腺癌细胞 MCF-7 的作用 [J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(2): 150 - 155.
- [10] 李莉萍, 罗超权, 张志珍, 等. 抑制 hIAP-2 在 MCF-7 乳腺癌细胞中的表达增强抗肿瘤药物的抑癌作用 [J]. 广东医学, 2010, 31(2): 163 - 166.
- [11] 王杨, 罗映晖. hIAP-2-siRNA 对 hepG2 肝癌细胞抑制作用 [J]. 肿瘤药学, 2011, 1(5): 426 - 430.
- [12] 白露, 李光, 陈延治, 等. 延长分次照射时间对人鼻咽癌细胞 CNE1 放射生物效应的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(4): 624 - 627.
- (修回日期: 2013-07-20)
- 
- (上接第 392 页)
- tumors [J]. *World J Stem Cells*, 2012, 4(3): 17 - 20.
- [5] Wei XD, Zhou L, Cheng L, et al. Investigation of CD133 as putative marker of tumor-initiating cell in laryngeal carcinoma [J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2007, 42(9): 692 - 696.
- [6] Karimi-Busheri F, Zadorozhny V, Li T, et al. Pivotal role of CD38 biomarker in combination with CD24, EpCAM, and ALDH for identification of H460 derived lung cancer stem cells [J]. *J Stem Cells*, 2011, 6(1): 9 - 20.
- [7] 于锋, 张群慧. 5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记在喉黏膜干细胞的研究 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2012, 18(2): 90 - 93.
- [8] 程友, 王秋萍, 薛飞, 等. 自体骨髓间质干细胞诱导的软骨细胞修复兔耳廓软骨缺损 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2007, 13(3): 164 - 168.
- [9] 王亮亮, 刘强和. 骨髓基质干细胞移植与老年性耳聋的相关性研究 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2013, 19(1): 89 - 92.
- [10] Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, et al. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination [J]. *Semin Cancer Biol*, 2008, 18(4): 260 - 267.
- [11] Wang SJ, Wong G, de Heer AM, et al. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression [J]. *Laryngoscope*, 2009, 119(8): 1518 - 1530.
- [12] A1-Hajji M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cell [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983 - 3988.
- [13] Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10158 - 10163.
- [14] Wang C, Xie J, Guo J, et al. Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(4): 1301 - 1318.
- [15] Simon RA, di Sant' Agnese PA, Huang LS, et al. CD44 expression is a feature of prostatic small cell carcinoma and distinguishes it from its mimickers [J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(2): 252.
- [16] Takaishi S, Okumura T, Tu S, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44 [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(5): 1006 - 1020.
- [17] 王莹颖, 华清泉, 张志坚. CD44、CD133 在头颈部鳞状细胞癌中的表达及临床意义 [J]. 现代预防医学, 2010, 37(11): 2147 - 2149.
- [18] 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 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(3): 973 - 978.
- (修回日期: 2013-06-13)