

喉癌顺铂耐药细胞株的建立及干性生物学特性分析

于 锋,龚小蓉,周毅波

(广州医科大学耳鼻咽喉头颈外科研究所 广州市耳鼻咽喉头颈外科医院 广州市第十二人民医院 耳鼻咽喉头颈外科,广东 广州 510620)

摘 要: **目的** 建立人喉癌顺铂(CDDP)耐药细胞株并鉴定其干细胞生物学特性,探讨其对 CDDP 耐药机制及与干细胞的关系。**方法** 以药物浓度梯度递增法诱导建立人喉癌 Hep-2 的顺铂耐药细胞株 Hep-2/CDDP;倒置显微镜观察细胞的形态;CCK-8 法检测细胞 IC50 及耐药指数;无血清细胞球体培养观察成球能力;实时定量 RT-qPCR 法检测 MDRI/P-gp、ABCG2、CD44、CD133 mRNA 的表达情况;Western blot 法检测 MDRI/P-gp、ABCG2、CD44、CD133 蛋白表达情况。**结果** 顺铂体外缓慢诱导历时 12 个月建成的 Hep-2/CDDP 耐药细胞株,与亲本 Hep-2 细胞相比,细胞形态改变明显;耐药性能稳定耐药指数为 5.43;无血清球体培养实验示细胞成球率升高($P<0.05$);RT-qPCR 和 Western blot 结果表明耐药相关基因 MDRI/P-gp、ABCG2 表达上调(均 $P<0.05$);干性相关标记基因 CD44、CD133 升高(均 $P<0.05$)。**结论** Hep-2/CDDP 细胞株具有稳定的顺铂耐药性,是研究喉癌顺铂耐药和逆转机制的良好模型,且其耐药机制与顺铂诱导的肿瘤干细胞有关,可为研究逆转耐药提供参考。

关 键 词: 顺铂;喉癌;耐药;干细胞
中图分类号:R739.65 文献标识码:A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2018,24(1):39-44]

Establishment of a cisplatin-resistant human laryngeal carcinoma cell line and its stem cell biological characteristics

YU Feng, GONG Xiao-rong, ZHOU Yi-bo

(Institute of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Guangzhou Medical University; Guangzhou Hospital of Otolaryngology Head and Neck Surgery; Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Guangzhou 12th People's Hospital, Guangzhou, 510620, China)

Abstract: **Objective** To establish a cisplatin-resistant cell line from human laryngeal carcinoma and identify its stem cell biological characteristics for study on the mechanism of cisplatin resistance and its relation with the stem cells. **Methods** Cisplatin-resistant human laryngeal carcinoma cell line Hep-2/CDDP was established with induction by gradient increment method of cisplatin concentration. Cell morphology was observed with inverted microscope. The half maximal inhibitory concentration (IC50) value and drug resistant index (RI) were detected by CCK-8 assay. Microsphere formation ability was detected by culturing in serum-free medium (SFM). The relative mRNA expression levels of MDRI/P-gp, ABCG2, CD44 and CD133 were detected by RT-qPCR. Their protein expression levels were detected by Western blot. **Results** The Hep-2/CDDP cell line was successfully established in vitro after cisplatin induction for 12 months. Compared with parent Hep-2 cells, cellular morphology of Hep-2/CDDP was changed obviously. The resistant ability was stable and RI value was 5.43. Microsphere formation test indicated increased formation ratio of Hep-2/CDDP ($P<0.05$). The expressions of resistance-associated genes MDRI/P-gp, ABCG2 in Hep-2/CDDP were up-regulated significantly (all $P<0.05$). The expression levels of stem cell-associated gene CD44、CD133 in Hep-2/CDDP were increased significantly (all $P<0.05$). **Conclusions** The Hep-2/CDDP cell line, possessing stable cisplatin resistance, may serve as a model for study of both drug-resistance and reversing mechanisms in laryngeal carcinoma. Furthermore, the mechanism of resistance is associated with cisplatin-induced stem cells, which may provide reference for the study of reverse resistance.

基金项目:广州市喉癌临床医学与转化中心试点建设项目(201604020005)。
作者简介:于 锋,男,教授,主任医师。
通信作者:于 锋,Email:fishwoo@sina.com

Key words: Cisplatin; Laryngeal neoplasm; Drug resistance; Stem cell

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2018, 24(1): 39-44]

喉癌是头颈部鳞状细胞癌中常见的恶性肿瘤,其发病与吸烟、酗酒及感染等因素有关,已成为仅次于肺癌的呼吸道第二位高发恶性肿瘤^[1]。以顺铂为基础的联合化疗是头颈部鳞癌中应用最广泛的治疗方案,且对于晚期喉癌或者术后复发患者,化疗是不可或缺的治疗方法^[2]。但由于越来越多患者对药物敏感性降低而导致化疗失败,与其相关的耐药仍然是影响患者生存率的一个重要原因^[3-4]。研究表明,顺铂作用于肿瘤细胞能显著诱导其肿瘤干细胞的形成^[5],肿瘤干细胞是肿瘤细胞自我更新维持多潜能分化的前提,对化疗药物抵抗作用明显强于非干细胞。目前治疗喉癌化疗药物包括顺铂、5-氟尿嘧啶、紫杉醇、长春新碱等,5-FU、紫杉醇、长春新碱喉癌耐药细胞株已经诱导建成^[6-8],但喉癌顺铂耐药细胞株建立及其与干细胞关系尚未明确,因此建立喉癌 CDDP 耐药细胞株是深入进行顺铂耐药机制研究的前提。本研究旨在以 Hep-2 细胞为研究对象,采用顺铂缓慢递增诱导建立喉癌顺铂耐药细胞系并鉴定其干性生物学特性,初步探讨喉癌顺铂耐药与干细胞特性的关系。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人喉癌细胞株 Hep-2 购自中山大学细胞库;RPMI1640、PBS 缓冲液、0.25% 胰蛋白酶、B27 购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购自 Bio Ind; EGF、bFGF 购自 peprotech,顺铂购自 Sigma 公司;Trizol、RT Master Mix 和 SYBR® Premix Ex Taq 检测试剂盒购自大连宝生物 Takara 公司;蛋白浓度检测试剂盒购自杭州弗德生物科技有限公司;GAPDH、MDR1 抗体购自武汉三鹰 proteintech; CD44、CD133、ABCG2 抗体,二抗购自美国 CST;ECL 发光液购自美国 Millipore。

1.2 主要仪器

荧光定量 LightCycler® 480 System PCR 仪购自瑞士 Roche 公司;酶联免疫检测仪购自美国 BIO-RAD 公司;化学发光成像系统购自中国 Tanon。

1.3 细胞培养

Hep-2 及 Hep-2/CDDP 细胞采用 RPMI1640 培养液 + 10% FBS + 1% 双抗,置于 37℃、5% CO₂ 细胞

培养箱内进行培养。在培养皿中细胞培养覆盖率约 80% 左右时,采用 0.25% 胰蛋白酶 - EDTA 消化细胞,并进行传代培养,最后选取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.4 顺铂诱导

Hep-2 细胞生长至对数期时,以 0.1 μg/ml 的顺铂浓度开始缓慢诱导,培养 48 h 后撤去培养基,并按上述方法换液或传代。约一周后当细胞生长状态良好时再以 0.1 μg/ml 的顺铂浓度递增诱导培养细胞 48 h,以此重复,最终在浓度为 4 μg/ml 的顺铂浓度诱导完毕后进行其他实验。

1.5 RNA 提取与逆转录

Trizol 法从细胞中提取总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 纯度和浓度,将每个样品浓度调整为 500 ng/μl 时进行反转录成 cDNA,体系按 Prime-Script™ RT Master Mix 反转录试剂盒说明书进行,37℃、15 min;85℃、5 s;4℃ 操作完毕将样本用 DEPC 水稀释合适浓度并置于 -80 度保存备用。

1.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

应用 SYBR® Premix Ex Taq 的说明书配置 PCR 反应体系,反应条件为 95℃、30 s、1 cycle; 95℃、5 s、60℃、30 s、40 cycles; 95℃ 5 s、60℃ 1 min, 95℃ 1 cycle,每个样品 3 个复孔。检测各基因在 Hep-2 及 Hep-2/CDDP 样品中的相对表达水平。以 GAPDH 为内参,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示, $\Delta\Delta CT = \text{实验组}(Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因}) - \text{对照组}(Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因})$ 。GAPDH: 上游 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3' 下游 5'-AGGGGC-CATCCACAGTCTTC-3'; MDR1: 5'-GGGAGCTTAA-CACCCGACTTA-3' 下游 5'-GCCAAAATCA-CAAGGGTTAGCTT-3'; ABCG2: 上游 5'-CAGGTG-GAGGCAAATCTTCGT-3' 下游 5'-ACCCTGTTAATC-CGTTCGTTTT-3'; CD44: 上游 5'-CTGCCGCTTTG-CAGGTGTA-3', 下游 5'-CATTGTGGGCAAGGTGC-TATT-3'; CD133: 上游 5'-TTCTTGACCGACTGAGAC-CCA-3', 下游 5'-TCATGTTCTCCAACGCCTCTT-3'。

1.7 CCK-8 法检测 IC50

将上述细胞按照细胞密度为 5 000 个/孔接种至 96 孔板中,多余孔周边用无菌 PBS 液铺满,24 h 贴壁后以浓度梯度为 0、2、4、6、8、10 μg/ml CDDP 浓度加入 96 孔板。24 h 后向接种细胞的每孔中加

入 10 μ l CCK-8 溶液(10%), 37℃ 孵育 2 h 后, 置于紫外分光光度计, 在 450 nm 波长下检测光密度(OD)值, 每个样本做 3 个复孔, 并重复 3 次实验。

1.8 成球实验

取对数生长期的 Hep-2/CDDP 和亲本 Hep-2 细胞, 以每孔 5 000 个接种于超低吸附培养六孔板中, 每两天换半量的成球实验培养液(EGF 20 ng/ml, bFGF 10 ng/ml, B27 1%)。观察并计数耐药细胞 Hep-2/CDDP 和亲本 Hep-2 细胞的成球情况, 培养 10 d, 拍照, 计算成球率, 每组设 3 个重复, 每孔计数 3 次, 取平均值。

1.9 Western blot

采用 R10A 细胞裂解液, 加入蛋白酶抑制剂 PMSF(1:100), 混匀用于提取细胞中的总蛋白。根据弗德 BCA 试剂盒操作说明绘制的标准曲线检测各样品中蛋白浓度, 并用适量的 loading buffer 混匀后将样品置于 100℃ 煮沸 5 min 使蛋白变性 -80℃ 保存备用。根据蛋白浓度上样等量的蛋白样品及 Marker 后采用 SDS-PAGE 凝胶电泳, 以 GAPDH 作为内参, 恒压 70 V 电泳时间 0.5 h, 分离胶使用 120 V 电泳 1 h, 待溴酚兰到凝胶最低处即终止。完成后按照分子量大小进行转膜至 PVDF 膜上, 避免产生气泡, 以 200 mA 恒流转膜 3 h, 用 BSA 室温封闭 1 h。一抗稀释比例为 1:1 000, GAPDH 稀释比例为 1:2 000, 4℃ 过夜后以 TBST 洗膜 3 次除去未结合一抗, 二抗稀释比例为 1:1 000, 将显影结果扫描, 用 Image J 软件分析各组条带的灰度值。

1.10 统计学分析

实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间的比较采用方差分析, 计数资料采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 实验

Hep-2 细胞的 IC₅₀ 值为 2.33 μ g/ml, 顺铂缓慢诱导喉癌 Hep-2 细胞株, 历时 12 个月顺铂诱导剂量为 4 μ g/ml, Hep-2/CDDP 的 IC₅₀ 值为 12.675 μ g/ml, 耐药指数 RI = 5.43 (Hep-2/CDDP IC₅₀) / (Hep-2 IC₅₀), Hep-2 及 Hep-2/CDDP 在倒置显微镜下细胞形态变化见图 1、2; 抑制率见图 3。

2.2 RT-qPCR 和 Western blot

RT-qPCR 检测发现耐药基 MDRI/P-gp 在 Hep-2/CDDP 细胞中的表达水平为 6.92 ± 0.12 , 与 Hep-2 细胞相比, 差异具有统计学意义 ($t = 48.44, P < 0.0001$); ABCG2 在 Hep-2/CDDP 细胞中的表达水平为 2.54 ± 0.40 , 与 Hep-2 细胞相比差异具有统计学意义 ($t = 3.82, P = 0.0087$), 见图 4。Western blot 示 MDRI/P-gp 蛋白在 Hep-2/CDDP 细胞中的表达水平也高于 Hep-2 细胞 (0.43 ± 0.022 VS $0.076 \pm 0.0088, t = 14.83, P < 0.0001$), ABCG2 蛋白在 Hep-2/CDDP 细胞中的表达水平高于 Hep-2 细胞 (0.37 ± 0.037 VS 0.23 ± 0.04), 差异均具有统计学意义 ($t = 2.53, P = 0.0445$)。具体见图 5、6。

2.3 干性成球实验

EGF20 ng/ml, bFGF10 ng/ml, B27 1% 培养 10 d 后观察并计数亲本 Hep-2 细胞和耐药细胞 Hep-2/CDDP 的成球率, 分别为 (6.0 ± 0.58)% VS (16.0 ± 1.16)%, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 5.1, P < 0.05$), 说明 Hep-2/CDDP 成球能力显著高于 Hep-2 细胞。成球实验结果见图 7、8, 成球率见图 9。

2.4 RT-qPCR 和 Western blot

在 Hep-2/CDDP 中干性标记基因 CD44 ($5.4 \pm 0.53, t = 8.27, P < 0.05$)、CD133 ($3.57 \pm 0.31, t = 8.12, P < 0.05$), 在 Hep-2/CDDP 中表达显著升高, 具体见图 10; Western blot 示 CD44 (0.47 ± 0.036 VS $0.88 \pm 0.06, t = 6.09, P < 0.05$)、CD133 (0.43 ± 0.046 VS $0.69 \pm 0.04, t = 4.03, P < 0.05$) 蛋白在 Hep-2/CDDP 中表达也上调, 差异均具有统计学意义。具体见图 11、12。

3 讨论

顺铂作为铂类化疗药物的代表抗癌谱较广, 是临床治疗头颈部鳞癌、卵巢癌、肺癌等多种实体瘤的一线用药, 它是一种细胞周期非特异性药物, 能与 DNA 结合引起交叉联结, 从而破坏 DNA 的功能, 并抑制细胞有丝分裂, 最终导致细胞凋亡^[9]。目前建立肿瘤耐药细胞系的方法有药物浓度递增法和大剂量间歇诱导法, 采用药物浓度递增法建立的耐药细胞系的优点是耐药性稳定、可靠, 且以此方法建立的耐药细胞株近年来在舌鳞状细胞癌、胃癌等多种肿瘤中均已报道^[10-11]。本研究前期预实验采用 0.5、

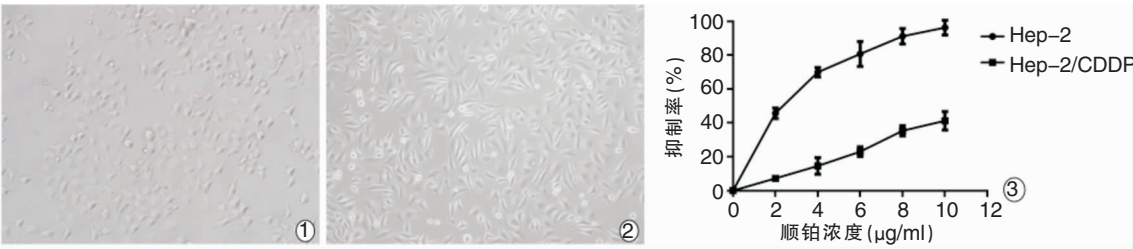


图 1 Hep-2 细胞形态 (×100) 图 2 Hep-2/CDDP 细胞形态 (×100) 图 3 Hep-2 和 Hep-2/CDDP 细胞与不同浓度顺铂作用后抑制率的变化

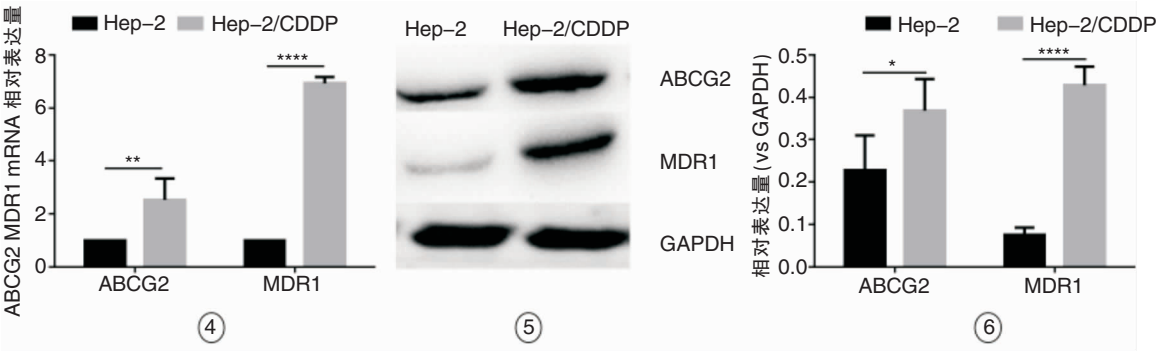


图 4 ABCG2、MDR1 mRNA 在 Hep-2 和 Hep-2/CDDP 中相对表达量 图 5 ABCG2、MDR1 在 Hep-2 和 Hep-2/CDDP 中 Western blot 结果 图 6 ABCG2、MDR1 蛋白在 Hep-2 和 Hep-2/CDDP 中相对表达量, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

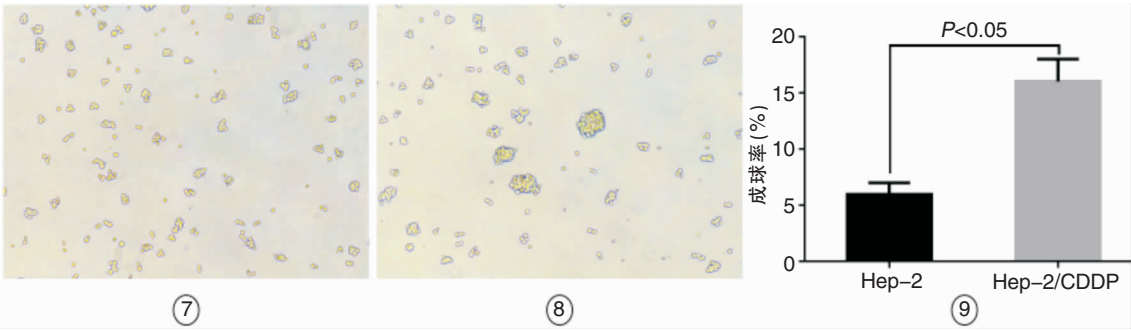


图 7 Hep-2 细胞球体形成实验 (×100) 图 8 Hep-2/CDDP 细胞球体形成实验 (×100) 图 9 成球率比较

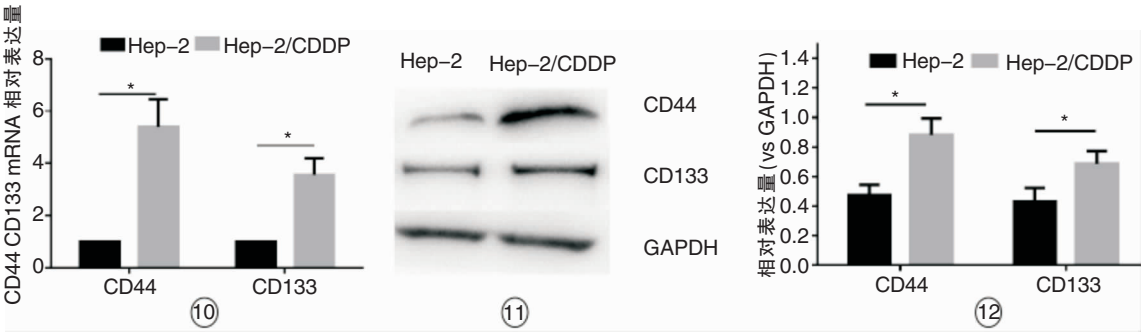


图 10 CD44、CD133 mRNA 在 Hep-2 和 Hep-2/CDDP 中相对表达量 图 11 CD44、CD133 在 Hep-2 和 Hep-2/CDDP 中 Western Blot 结果 图 12 CD44、CD133 蛋白在 Hep-2 和 Hep-2/CDDP 中相对表达量, * $P < 0.05$

1、2、3 $\mu\text{g/ml}$ 等各浓度梯度大剂量长时间冲击诱导耐药细胞,都以细胞大量死亡而结束,最终采取低浓度 CDDP 缓慢递增法进行体外诱导,避免了大剂量药物长时间冲击导致细胞全部死亡而使实验中途被迫中断的弊端,历经 12 个月的体外诱导、培养,成功建立了人喉癌 CDDP 耐药细胞株 Hep-2/CDDP。

本实验发现与亲本 Hep-2 细胞相比, Hep-2/CDDP 细胞形态由椭圆形变为长梭形,细胞变得狭长,体积变大,细胞间连接较松散。实验中还能观察到 Hep-2/CDDP 细胞的群体倍增时间较 Hep-2 细胞延长,而肿瘤细胞的倍增时间越长,则分裂细胞数越少对化疗的敏感性就下降,疗效越差。Western blot 结果显示, Hep-2 细胞极少量 MDR-1/P-gp 蛋白的表达,而在 Hep-2/CDDP 细胞中耐药相关蛋白 MDR-1 和 ABCG2 的表达高于亲本 Hep-2 细胞。P-gp 蛋白是 MDR1 基因编码的蛋白产物,它是一种 ATP 依赖性能量泵,能将入细胞的毒性药物转运排出。当抗肿瘤药物进入细胞后与 P-gp 结合蛋白, P-gp 蛋白利用 ATP 水解释放的能量激活药泵,将结构不同或药理作用不同的药物和疏水化合物泵出细胞,使肿瘤细胞内药物浓度降低^[12]。这说明 CDDP 在诱导 Hep-2 细胞获得性耐药方面与 P-gp、ABCG2 药物泵蛋白表达升高相关,抑制相关蛋白表达相关通路可成为逆转耐药的有效作用靶点。

Visvader 等^[13-14] 研究认为一些化疗抵抗的肿瘤细胞表现出自我更新和多潜能分化的能力,即所谓的肿瘤干细胞(CSCs),肿瘤干细胞是肿瘤发生发展的起源,与肿瘤的复发转移密切相关。化疗耐药是导致肿瘤复发、转移的重要原因之一,因此我们认为化疗和肿瘤干细胞之间也有密切的联系,干细胞的存在可能是导致化疗抵抗的关键原因。肿瘤干细胞的识别在于细胞表面干性标记基因和干性培养的成球能力,这些标记基因包括 CD24、CD44、CD133 等^[15]。细胞球体培养实验发现耐药细胞株 Hep-2/CDDP 细胞较 Hep-2 细胞成球能力增强,PCR 和 Western blot 显示干性相关因子 CD44 和 CD133 较亲本升高,说明顺铂诱导过程中伴随有肿瘤干细胞表达增加,可能是由于化疗药物顺铂杀死敏感细胞而筛选出了残留的具有耐药特性的肿瘤干细胞,也可能是顺铂处理后调控干性相关基因表达增高,提高干性细胞比例。研究表明,多种获得性耐药的肿瘤细胞具有肿瘤干细胞特点,基于化疗药物抵抗与肿瘤干细胞的特性关系密切,可用来解释一线化疗药物治疗后仍然存在的较高复发率和进展率^[16-17],

如 Chen 等运用基因追踪技术证明顺铂治疗能够消灭增殖的头颈部肿瘤细胞,也能富集 Bmi1⁺ 的肿瘤干细胞,这些细胞的存在成为了肿瘤复发的关键原因^[18]。同时通过图 1~3 观察到 Hep-2/CDDP 细胞有典型的上皮间质(EMT)形态学改变,且有报道称经过化疗药物诱导后的耐药细胞表现出干细胞样特性同时也会发生上皮间质转化, EMT 使鼻咽癌肿瘤细胞获得更强的侵袭和迁移能力^[19],干扰 EMT 相关转录因子 Twist 能降低喉癌细胞的侵袭增殖能力^[20],因此我们通过 PCR 比较上皮间质转化相关的转录因子 Snail、Slug、Twist 在亲本细胞和耐药细胞中的表达情况,初步结果发现 Snail 表达显著上升,证明耐药细胞株有间质细胞转化的倾向,后续可以此为线索做更为详细深入的探索。另有研究示耐药细胞的发生机制伴随有糖基化结构蛋白的表达,这些物质能促进肿瘤生长,降低细胞间黏附促进迁移和远处转移,免疫逃脱等^[21-22]。可见,肿瘤细胞的耐药机制非常复杂,喉癌 Hep-2/CDDP 细胞耐药可能是耐药蛋白 MDR1、ABCG2 表达上调、干细胞诱导增多、上皮细胞发生间质转化共同作用的结果。当然,本实验也存在一定的缺陷和不足,如喉癌细胞株 Hep-2 有报道被 Hela 细胞污染,但我们认为通过此途径建立起来的顺铂耐药细胞株仍然具有一定的研究价值,同时我们也正在培养喉癌原代细胞,并通过相同方法对其进行诱导,以此来补充完善此实验结果。

综上所述,本研究以 CDDP 浓度逐步递增法诱导历时 12 个月成功建立了对 CDDP 耐药的细胞株 Hep-2/CDDP,耐药蛋白表达量增加,成球能力增强,干性标记基因表达升高,针对喉癌化疗耐药这一难题的重要原因——肿瘤干细胞,提供了实验依据,但仍需要通过干细胞信号通路等分子机制进一步探索。该细胞系的建立,为研究喉癌 CDDP 耐药机制和筛选耐药逆转剂提供了细胞株模型,对于研究喉鳞状细胞癌顺铂耐药、干细胞和上皮间质转化的关系提供思路和实验基础。

参考文献:

- [1] 周菱,邓世山,刘海. USP7 在喉癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2015,21(1):27-30.
Zhou J, Deng SS, Liu H. Expression of USP7 in human laryngeal carcinoma and its significance[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery,2015,21(1):27-30.
- [2] Pignon J, Matre AL, Maillard E, et al. Meta-analysis of chemo-

- therapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients[J]. *Radiotherapy and Oncology*, 2009, 92(1): 4–14.
- [3] Pùez-Ribes M, Allen E, Hudock J, et al. Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(3): 220–231.
- [4] Crea F, Duhagon MA, Farrar WL, et al. Pharmacogenomics and cancer stem cells: a changing landscape[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2011, 32(8): 487–494.
- [5] Liu J, Tang Q, Li S, et al. Inhibition of HAX-1 by miR-125a reverses cisplatin resistance in laryngeal cancer stem cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 86446–86456.
- [6] 李莉,董频,万夷,等. 人喉癌紫杉醇耐药细胞株的建立及其生物学特性[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 21(18): 843–847.
- Li L, Dong P, Wan Y, et al. The building of multiple drug resistant human laryngeal cancer cell line and its characteristics[J]. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*, 2007, 21(18): 843–847.
- [7] 尹万忠,王苹,祝威. 人喉癌长春新碱耐药细胞株的建立及其生物学特性[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(2): 129–131, 135.
- Yin WZ, Wang P, Zhu W. Establishment of a multidrug resistance cell line from human laryngeal cancer cells and its biologic features [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2010, 26(2): 129–131, 135.
- [8] 陈婕,王家东. 人喉癌5-氟尿嘧啶耐药细胞株的建立及其生物学特性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(2): 201–205.
- Chen J, Wang JD. Establishment of a 5-fluorouracil resistance laryngeal cancer cell line and its biology characteristics[J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2012, 19(2): 201–205.
- [9] Ann L. Pinto, Stephen J. Lippard. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) to DNA[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1985, 780(1): 167–180.
- [10] 姜慧,张桐菲,杨鹤,等. 人舌鳞状细胞癌顺铂耐药细胞株 CAL-27/DDP的建立及其生物学评价[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2016, 42(3): 506–511.
- Jiang H, Zhang TF, Yang H, et al. Establishment of human tongue squamous cell carcinoma cisplatin resistant cell line CAL-27/DDP and its biological evaluation[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2016, 42(3): 506–511.
- [11] 黄昊,韩勇,吴健,等. 胃癌细胞 MGC-803 耐药细胞株的建立及分泌蛋白差异分析[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2014, 46(2): 183–189.
- Huang H, Han Y, Wu J, et al. Establishment of drug resistant cell line of MGC-803 and analysis of differential secretome[J]. *Journal of Peking University(Health Science)*, 2014, 46(2): 183–189.
- [12] Shapira A, Livney YD, Broxterman HJ, et al. Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance [J]. *Drug Resistance Updates*, 2011, 14(3): 150–163.
- [13] Brooks MD, Burness ML, Wicha MS. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(3): 260–271.
- [14] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(10): 755–768.
- [15] 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.
- [16] Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, et al. A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2015, 31: 16–27.
- [17] Freitas DP, Teixeira CA, Santos-Silva F, et al. Therapy-induced enrichment of putative lung cancer stem-like cells[J]. *International Journal of Cancer*, 2014, 134(6): 1270–1278.
- [18] Chen D, Wu M, Li Y, et al. Targeting BMI1⁺ Cancer Stem Cells Overcomes Chemoresistance and Inhibits Metastases in Squamous Cell Carcinoma[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(5): 621–634.
- [19] 杨年婷,刘超,李果,等. MiR-324-3p 经上皮-间质转化调控鼻咽癌迁移侵袭的实验分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2016, 22(2): 95–99.
- Yang NT, Liu C, Li G, et al. MiR-3243p regulates the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma via epithelial-mesenchymal transition [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery*, 2016, 22(2): 95–99.
- [20] 孙志宏,齐莹. RNAi 干扰 Twist 基因对喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞株增殖与侵袭力及 E-钙黏蛋白甲基化的影响[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2016, 22(6): 467–471.
- Sun ZH, Qi Y. Effects of Twist gene silenced by RNAi interference on proliferation, invasiveness and methylation of E-cadherin in laryngeal squamous cell carcinoma Hep2 cells[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery*, 2016, 22(6): 467–471.
- [21] Christiansen MN, Chik J, Lee L, et al. Cell surface protein glycosylation in cancer[J]. *Proteomics*, 2014, 14(4–5): 525–546.
- [22] Ferreira JA, Peixoto A, Neves M, et al. Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation[J]. *Drug Resistance Updates*, 2016, 24: 34–54.

(收稿日期:2017–10–16)