

## 人鼻咽癌细胞株中肿瘤干细胞分离鉴定方法及肿瘤多药耐药机制

刘超群

中南大学湘雅三医院肿瘤科, 湖南 长沙 410013

**【摘要】目的:** 研究人鼻咽癌细胞株中肿瘤干细胞分离鉴定方法及对肿瘤多药耐药机制。**方法:** 取鼻咽癌细胞株(SUNE), 进行细胞的培养、传代及鉴定, 采用免疫荧光细胞化学技术联合流式细胞仪检测SUNE中CD133<sup>+</sup>及CD133<sup>-</sup>细胞体外分化能力。利用免疫磁珠分选技术完成CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞纯化, 测定CD133<sup>+</sup>细胞体外增殖能力, 将其与未分选及CD133<sup>-</sup>细胞进行比较。取顺铂、紫杉醇化疗药物, 采用CCK-8法测定CD133<sup>+</sup>细胞耐药性。取10只4周龄ICR小鼠, 皮下注射人鼻咽癌细胞株和普通细胞株, 分析耐药性。**结果:** 分离培养的SUNE在含有血清的培养基中呈贴壁生长, 并且生长活跃, 培养2~3 d后倒置显微镜下显示细胞呈梭形、扁平状, 光泽度良好, 培养2周左右细胞融合瓶底80.00%; 流式细胞仪检测结果显示: 约0.35%细胞表面膜存在抗原CD133。免疫细胞化学显示: SUNE细胞贴壁爬行, 部分细胞能与SUNE中的CD133<sup>+</sup>相互结合, 荧光显微镜下显示呈现橙红色, 球状; 向经免疫磁珠分选后的细胞中加入培养基, 细胞呈单细胞, 球形, 悬浮生长。随着培养时间的不断延长, 细胞开始出现团状生长, 体积增加, 细胞数量增多, 培养24 h后细胞开始贴壁生长, 培养7 d后呈串状生长; CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞、CD133<sup>-</sup>肿瘤细胞及未分选细胞随着时间的延长细胞均出现增长, 且CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞增殖能力显著高于CD133<sup>-</sup>肿瘤细胞及未分选细胞( $P<0.05$ )。10只小鼠均可见瘤体形成, 种植人鼻咽癌细胞株组的瘤体体积显著大于普通细胞株组( $P<0.05$ )。**结论:** 鼻咽癌干细胞中CD133<sup>+</sup>对化疗药物的耐药性强。

**【关键词】** 鼻咽癌; 恶性肿瘤; 肿瘤干细胞; 分离鉴定; 多药耐药; 免疫荧光细胞化学技术; 流式细胞仪; 鼻咽癌细胞株; 体外分化; 免疫磁珠分选技术

**【中图分类号】** R739.6

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1005-202X(2018)08-0956-06

## Separation and identification of tumor stem cells in human nasopharyngeal carcinoma cell lines and its mechanism of multidrug resistance

LIU Chaoqun

Department of Oncology, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China

**Abstract: Objective** To study the method for separating and identifying tumor stem cells in human nasopharyngeal carcinoma cell lines, and investigate the mechanism of multidrug resistance. **Methods** The cell culture, subculture and identification of nasopharyngeal carcinoma cell lines (SUNE) were carried out, and the *in vitro* differentiation ability of CD133<sup>-</sup> cells and CD133<sup>+</sup> cells in SUNE was detected with immunocytochemistry combined with flow cytometry. CD133<sup>+</sup> tumor cells were purified with immunomagnetic cell separation technology. The *in vitro* proliferation ability of CD133<sup>+</sup> cells was determined, and then compared with that of unsorted cells and CD133<sup>-</sup> cells. The drug resistance of CD133<sup>+</sup> cells in the treatment of cisplatin and paclitaxel was determined by CCK-8 method. ten ICR mice aged 4 weeks were injected subcutaneously with human nasopharyngeal carcinoma cell lines and normal cell lines, and the mechanism of multidrug resistance was analyzed. **Results** The SUNE isolated and cultured in serum-containing medium were adherent growth, with active growth. After SUNE being cultured for 2-3 d, inverted microscope showed that the cells were spindle, flat, with good gloss. After SUNE being cultured for about 2 weeks, the cell fusion bottle was 80.00%; and with the use of flow cytometry, antigen CD133 was detected on about 0.35% of cell surface membrane. Immunocytochemistry showed that SUNE cells were adherent growth, some of which were combined with CD133<sup>+</sup> in SUNE, appearing orange red and globose under fluorescence microscope. The cells after immunomagnetic cell separation were added to the medium, and the cells were single cells, spherical, in suspended growth. With the prolonging of culture time, cells began to appear nodular growth, increase in volume and cell quantity. The cells were adherent growth after being cultured for 24 h, and began to grow in clusters after 7 d of culture. The number of unsorted cells, CD133<sup>-</sup> tumor cells and CD133<sup>+</sup> tumor cells were increased with the extension of time, and the proliferation of CD133<sup>+</sup> tumor cells was significantly higher than that of CD133<sup>-</sup> tumor cells and unsorted cells ( $P<0.05$ ). The tumors were found in all 10 mice, and the volume of human nasopharyngeal

**【收稿日期】** 2018-02-15

**【基金项目】** 中国博士后科学基金(015T80890; 2014M552167)

**【作者简介】** 刘超群, 住院医师, 主要从事恶性肿瘤的综合治疗, 在职研究生, E-mail: liuchaoqun0312@163.com

carcinoma cell lines in the right side were significantly larger than that of the common cell lines ( $P<0.05$ ). **Conclusion** CD133<sup>+</sup> cells in nasopharyngeal carcinoma stem cells have a strong resistance to chemotherapeutic drugs.

**Keywords:** nasopharyngeal carcinoma; malignant tumor; tumor stem cell; isolation and identification; multidrug resistance; immunocytochemistry; flow cytometry; nasopharyngeal carcinoma cells; *in vitro* differentiation; immunomagnetic cell separation technology

## 前言

鼻咽癌是临床上常见的恶性肿瘤,在我国南方及东南亚地区发病率较高,享有“广东瘤”之称<sup>[1]</sup>。目前,临床上对于鼻咽癌以放、化疗治疗为主,上述方法能延缓病情的发展、改善患者症状,但是患者治疗过程中毒副反应发生率较高,再加上鼻咽部位淋巴组织相对丰富,多数患者发病早期已经发生转移,持续的放疗、化疗增加了鼻咽癌耐药性,治疗后复发率较高<sup>[2]</sup>。因此,要想提高鼻咽癌治疗效果,关键是要深入研究人鼻咽癌的发生、发展及其肿瘤多药耐药机制<sup>[3]</sup>。

传统的肿瘤研究和治疗将肿瘤视为一个总体,忽略了总体中个体差异,在一定程度上影响肿瘤研究的进展及肿瘤的治疗现状。肿瘤干细胞理论为肿瘤的研究提供新的思路。该理论认为:肿瘤干细胞是一类特殊的细胞,具有自我更新能力,能在特定的条件下进行分化,是肿瘤发生、发展、转移及复发的主要原因<sup>[4-5]</sup>。但是,临床上对于鼻咽癌肿瘤干细胞的分离、培养方法存在较大争议。有学者从人鼻咽癌细胞株中鉴定出干细胞样的SP细胞,但是SP细胞分离技术存在一定的缺陷性,难以全面反映肿瘤干细胞的生物学特性<sup>[6-7]</sup>。再加上临床上对于肿瘤干细胞的鉴定尚缺乏统一的标准,导致细胞纯度较低<sup>[8]</sup>。CD133是继CD34后又一重要的造血干细胞表面抗原标志,它作为一种干细胞标志物在肝癌、结肠癌、肺癌等多种实体肿瘤中均有表达。文献[9-10]报道显示:CD133肿瘤细胞与肿瘤的发生、发展、耐药及复发等关系密切。但是,目前临床上对于CD133与鼻咽癌的关系尚不完全知晓<sup>[11]</sup>。

笔者成功分离、鉴定人鼻咽癌细胞株,并且完成其耐药机制体外实验,探讨人鼻咽癌细胞株中肿瘤干细胞分离鉴定方法及其对肿瘤多药耐药机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

设计:细胞分离、培养试验。时间及地点:2014年12月~2016年6月在中南大学湘雅三医院完成。对象:取10只4周龄ICR小鼠,雌雄随机,体重23~45 g,平均(32.9±3.0) g,所选动物均由中南大学湘雅三医院动物实验中心提供。实验过程中对裸鼠饲养、处理均符合《关于善待实验动物的指导意见》相关规则。所有试

验均通过中南大学湘雅三医院动物委员会批准同意。

主要仪器和试剂:人鼻咽癌细胞株SUNE(中南大学湘雅三医院病理科提供)、10.0%胎牛血清(杭州四季青公司)、倒置相差显微镜(日本Olympus公司)、DMEM培养基(GIBCO公司)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,美国R&D公司)、CD133细胞分选试剂盒(德国Miltenyi Biotec公司)、顺铂和紫杉醇(齐鲁制药有限公司)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 人鼻咽癌细胞株(SUNE)培养及传代** ①取医院病理实验室提供的人鼻咽癌细胞株,将其放置在浓度为10.0%的胎牛血清的完全培养液中,在浓度为5% CO<sub>2</sub>, 37℃的饱和温度培养箱中进行培养,每天换液1次。待细胞生长融合80.0%时加完全培养液,按照1:2比例进行传代培养。②流式细胞仪测定。取获得的人鼻咽癌细胞SUNE,计数10<sup>7</sup>个,采用浓度为0.25%胰酶消化,加入培养液终止消化,采用浓度为0.01%磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution, PBS)进行洗涤,重悬,5 min离心,速度为1 000 rpm,去除上层清液后加入藻红蛋白完成对抗CD133的标记,加入20 μL FcR阻断剂,80 μL buffer,充分混合均匀后放入4℃下避光,洗涤后重悬,离心后去除上层清液,并加入500 μL buffer重悬细胞<sup>[11]</sup>。③免疫细胞化学法测定。取5×10<sup>4</sup>个SUNE细胞,加入浓度为0.25%胰酶消化,将其接种在盖玻片上,加入少许培养液,待细胞贴壁后加入足够的培养液,连续进行2~3 d培养,采用浓度为4%多聚甲醛进行15~20 min固定,PBS洗涤后加入浓度1%小牛血清进行30 min封闭。最后25 μL加入PE标记的CD133<sup>+</sup>抗体,PBS冲洗3次,每次2 min;加入生物素标记羊抗鼠IgG,在室温下反应10 min,PBS冲洗3次,每次2 min;加入链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶,室温下反应10 min,PBS冲洗3次,每次2 min,避光保存30 min,采用缓冲甘油封片,在倒置显微镜下观察细胞形态<sup>[12]</sup>。

**1.2.2 CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞纯化及增殖能力测定** ①CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞纯化。取已经培养的细胞,细胞总量为10<sup>7</sup>数量级,采用浓度为0.01%PBS进行冲洗,加入适当的胰酶进行消化,采用buffer洗涤,重悬、离心后去除上层清液。加入300 μL buffer重悬细胞,加入100 μL FC受体后加入100 μL抗CD133<sup>+</sup>免疫磁珠,充

分混合均匀后放置在4~8℃下避光保存。加入5 mL buffer重悬,10 min离心,速度为300 rpm,离心完毕后去除上层清液,加入0.5 mL buffer重悬细胞,安装磁珠分选架和LS柱及3 mL buffer湿柱,加入缓冲液分4次分选洗涤,然后将其移出磁场,将获得的细胞再次根据上述步骤进行分选<sup>[13]</sup>。② CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞增殖能力测定。利用甲基偶氮唑蓝(MTT)测定细胞CD133<sup>+</sup>的增殖能力。将分选后的CD133<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>及未分选的细胞接种在96孔板中,每孔中加入0.2 mL含有20 mg/mL EGF和bFGF的无血清培养液中,在浓度为5% CO<sub>2</sub>,37℃的饱和温度培养箱中进行培养,每3 d换液一次,采用MTT比色法在细胞生长第1、3、5、7天增殖状态进行测定,在490 nm下测定细胞的吸光度(A),绘制生长曲线<sup>[14-15]</sup>。

**1.2.3 CD133<sup>+</sup>细胞多药耐药性测定** 采用CCK-8法测定人鼻咽癌细胞株CD133<sup>+</sup>干细胞对顺铂、紫杉醇化疗药物的耐药指数,测定药物半数有效抑制浓度(IC<sub>50</sub>),研究人鼻咽癌细胞株中干细胞多药耐药性。不同化疗药

物均采用连续倍比法稀释为10个浓度,顺铂、紫杉醇最大浓度为200及800 μg/mL<sup>[16-17]</sup>。

**1.2.4 小鼠成瘤试验** 为了检测人鼻咽癌细胞株的成瘤能力进行小鼠成瘤试验。取10只小鼠,分为2组种植部位均为背部,左侧种植CNE2普通细胞,右侧种植人鼻咽癌细胞株,细胞数量为1×10<sup>5</sup> cells,比较2种细胞成瘤能力。

**1.2.5 统计学分析** 采用SPSS18.0软件处理,计数资料采用n(%)表示,行卡方检验,计量资料采用均数±标准差表示,行t检验,P<0.05表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人鼻咽癌细胞培养情况

原代人鼻咽癌细胞加入培养基后生长缓慢,多为椭圆形、分布缺乏规律性;培养2~3 d后人鼻咽癌细胞株多数开始贴壁生长,且细胞生长活跃,呈梭形、扁平状,光泽度良好;培养2周后细胞融合瓶底80.00%,细胞增殖稳定,见图1。

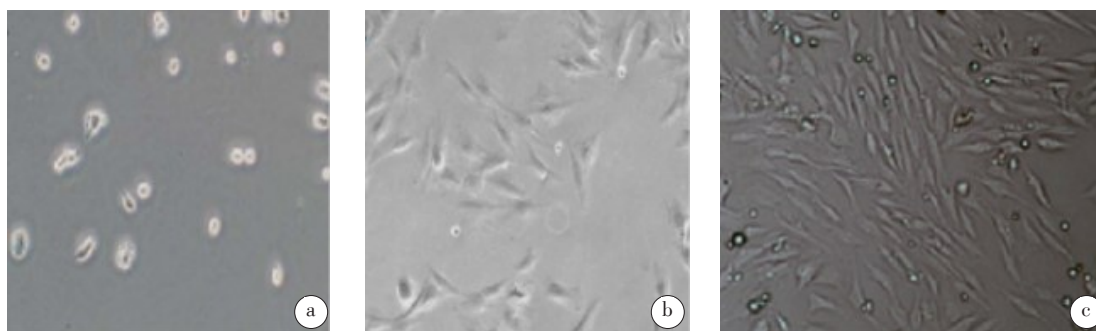


图1 人鼻咽癌细胞株SUNE生长情况(1:50)

Fig.1 Growth of nasopharyngeal carcinoma cell lines SUNE (1:50)

a: Initial culture of human nasopharyngeal carcinoma cells SUNE; b: 2-3 days after culture, cells were adherent growth; c: Human nasopharyngeal carcinoma SUNE growth for 2 weeks

### 2.2 CD133在SUNE中的表达情况

免疫细胞化学显示:SUNE细胞贴壁爬行,少许细胞与CD133结合,荧光显微镜下显示呈现橙红色,球状,见图2。

### 2.3 免疫磁珠分选后CD133<sup>+</sup>细胞形态

向经免疫磁珠分选后细胞中加入培养基,细胞呈单细胞,球形,悬浮生长。培养24 h后开始贴壁生长;培养2 d后细胞开始出现团状生长,体积增加;培养3 d后细胞数量增多,呈团簇状;7 d后呈串状生长,见图3。

### 2.4 CD133肿瘤细胞增殖能力测定

CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞、CD133<sup>-</sup>肿瘤细胞及未分选细胞培养后均存在明显的增殖能力;CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞增殖能力,高于CD133<sup>-</sup>肿瘤细胞及未分选细胞

(P<0.05),见表1。

### 2.5 人鼻咽癌细胞株体内成瘤试验

10只小鼠均可见瘤体形成,右侧种植人鼻咽癌细胞株组瘤体体积,大于普通细胞株组(P<0.05),见图4。

### 2.6 CD133<sup>+</sup>细胞不同化疗药物多药耐药性比较

顺铂、紫杉醇对CD133<sup>+</sup>细胞和未分选细胞的半数抑制浓度均较高,耐药性均较强,且顺铂对CD133<sup>+</sup>细胞和未分选细胞的半数抑制浓度、耐药性均高于紫杉醇(P<0.05),见表2。

## 3 讨论

鼻咽癌是临床上常见的疾病,患者发病早期临床症状缺乏特异性,多数患者一旦确诊已经是中、晚

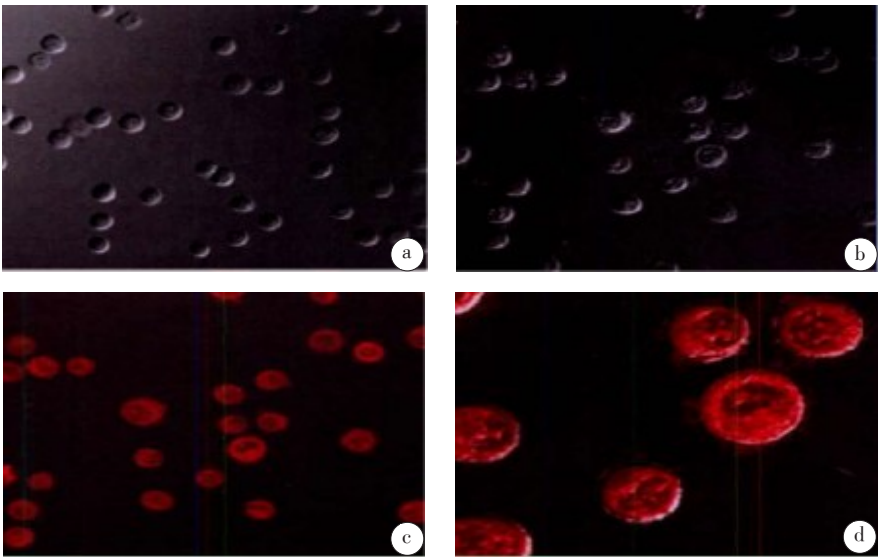


图2 CD133<sup>+</sup>在SUNE中的表达情况  
Fig.2 CD133<sup>+</sup> expression in SUNE  
a-b: CD133<sup>+</sup> expression in SUNE detected by flow cytometry; c-d: CD133<sup>+</sup> expression in SUNE under fluorescence microscope

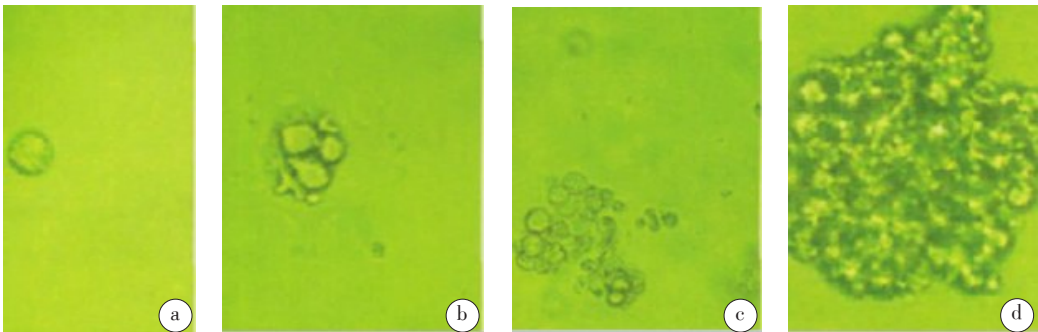


图3 免疫磁珠分选后CD133<sup>+</sup>细胞形态  
Fig.3 Morphology of CD133<sup>+</sup> cells after immunomagnetic cell separation  
a: Cell morphology after 1 d of culture; b: Cell morphology after 2 d of culture; c: Cell morphology after 3 d of culture;  
d: Cell morphology after 7 d of culture

表1 CD133肿瘤细胞增殖能力测定(  $\bar{x} \pm s$  )  
Tab.1 CD133 tumor cell proliferation assay (Mean±SD)

Cell type	1 d	3 d	5 d	7 d
CD133 <sup>+</sup> tumor cell	0.334±0.041 <sup>ab</sup>	0.565±0.081 <sup>ab</sup>	1.536±0.083 <sup>ab</sup>	1.591±0.084 <sup>ab</sup>
CD133 <sup>-</sup> tumor cell	0.401±0.040 <sup>b</sup>	0.415±0.057 <sup>b</sup>	1.124±0.078 <sup>b</sup>	1.241±0.076 <sup>b</sup>
Unsorted cell	0.335±0.039	0.371±0.052	0.989±0.074	1.028±0.071

Compared with CD133<sup>+</sup> tumor cells, <sup>a</sup>*P*<0.05; compared with unsorted cells, <sup>b</sup>*P*<0.05

期,患者多以化疗等辅助治疗为主<sup>[18]</sup>。该方案虽然能改善患者症状,但是药物不良反应发生率较高,肿瘤多药耐药率较高,难以达到预期的治疗效果。文献报道显示<sup>[19]</sup>:肿瘤多药耐药的出现是影响肿瘤患者治疗、复发及转移的主要原因。

随着组织工程技术的不断发展,肿瘤干细胞成为

人们研究的热点和重点。肿瘤干细胞是一类特殊的细胞,具有自我更新和多向分化潜能,是肿瘤发生、发展、复发及转院的主要原因。目前,临床上对于肿瘤细胞的鉴定尚存在较大的争议,其最权威的方法是测定肿瘤干细胞表面的特异性标志<sup>[20-21]</sup>。本研究中,分离培养的人鼻咽癌细胞株SUNE在含有血清的培养基中呈贴



图4 人鼻咽癌细胞株体内成瘤试验  
Fig.4 Human nasopharyngeal carcinoma cell line *in vivo* tumorigenicity test

壁生长,并且生长活跃,培养2~3 d后倒置显微镜下显示细胞呈梭形、扁平状,光泽度良好,培养2周左右细胞融合瓶底80.00%。文献报道[22-23]显示:在鼻咽癌细胞株中能分离出SP细胞,该细胞具有较强的致瘤性,对放、化疗等具有明显的抵抗作用。由此说明:在鼻咽癌组织及细胞株中存在一类特殊的细胞,在肿瘤的发生、发展中发挥了重要的作用<sup>[24]</sup>。本研究中,流式细胞仪检测结果显示:约0.35%细胞表面膜存在抗原CD133。免疫细胞化学显示:SUNE细胞贴壁爬行,部分细胞能与SUNE中的CD133相互结合,荧光显微镜下显示呈现橙红色,球状。CD133又称为prominin-1,属于具有独特的5个跨膜结构域和2个大的N糖基化细胞外的跨膜糖蛋白,该物质的表达显著特点是能随着细胞的分化迅速下调,能成为细胞分离、鉴定的独立标志物。

表2 CD133<sup>+</sup>细胞和未分选细胞不同化疗药物多药耐药性比较  
Tab.3 Comparison of multidrug resistance of CD133<sup>+</sup> cells and unsorted cells

Chemotherapeutic drug	Median inhibitory concentration (IC50 value)/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		Resistance index
	CD133 <sup>+</sup> cell	Unsorted cell	
Cisplatin	453.36 $\pm$ 22.15 <sup>*</sup>	20.19 $\pm$ 0.35 <sup>*</sup>	22.521 <sup>*</sup>
Paclitaxel	17.28 $\pm$ 0.22	3.20 $\pm$ 0.33	6.102

Compared with paclitaxel, <sup>\*</sup>*P*<0.05

CD133最早用于鉴定造血干细胞、内皮组细胞的鉴定,后来CD133在脑肿瘤、肺癌、前列腺癌的表达中发挥重要的作用<sup>[25]</sup>。文献[26-27]报道显示:CD133可以联合其他表面标志完成干细胞的分离、鉴定。本研究中,将免疫磁珠分选后获得的细胞加入培养基中培养,细胞呈单细胞,球形,悬浮生长。随着培养时间的不断延长,细胞开始出现团状生长,体积增加,细胞数量增多,培养24 h后细胞开始贴壁生长,培养7 d后呈串状生长。本研究中,CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞、CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞及未分选细胞随着时间的延长细胞均出现增长,且CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞增殖能力,显著高于CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞及未分选细胞(*P*<0.05)。由此看出:CD133细胞经过免疫磁珠分选后CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞能快速生长,不仅能促进肿瘤的生长、繁殖,还具备较强的分化能力。而CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞及未分选细胞则不会促进肿瘤的发生、发展。提示:CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞具备自我更新,促进肿瘤分化能力,符合干细胞的生物学特性<sup>[28]</sup>。为了进一步验证鼻咽癌中CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞的耐药性,实验中以常用化疗药物顺铂、紫杉醇作为研究对象,采用CCK8法检测药物耐药性,测定其耐药性,结果显示:CD133<sup>+</sup>细胞和未分选细胞对顺铂、紫杉醇耐药性强,且CD133<sup>+</sup>细胞耐药性,

显著高于未分选细胞(*P*<0.05)。由此看出:常用的化疗药物虽然能杀死一般鼻咽癌细胞,但是CD133<sup>+</sup>干细胞具有更强的耐药性,并且抗精神药物氯丙嗪能像杀灭鼻咽癌细胞一样杀死鼻咽癌CD133<sup>+</sup>干细胞。文献[29-30]报道显示:氯丙嗪是临床上常用的抗精神药物,患者用药后药物能在鼻咽癌细胞中产生过量的P糖蛋白,能协同其他药物发挥明显的抑制作用,延长患者寿命,改善患者生活质量,能为鼻咽癌的治疗提供新的思路和方法。综上所述,利用免疫荧光细胞化学技术联合流式细胞仪能完成人鼻咽癌细胞株中肿瘤干细胞的分离、鉴定,CD133<sup>+</sup>干细胞对化疗药物的耐药性强。

【参考文献】

[1] 张军红,李青,王春华,等. 恶性肿瘤干细胞标记物CD34在鼻咽癌细胞系的表达[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(23): 3374-3379. ZHANG J H, LI Q, WANG C H, et al. Expression of malignant tumor stem cell marker CD34 in nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2016, 20(23): 3374-3379.

[2] CHEN Y, ORLICKY D J, MATSUMOTO A, et al. Aldehyde dehydrogenase 1B1(ALDH1B1) is a potential biomarker for human colon cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 405(2): 173-

- 179.
- [3] ZHANG W, YAN W, YOU G, et al. Genome-wide DNA methylation profiling identifies ALDH1A3 promoter methylation as a prognostic predictor in G-CIMP-primary glioblastoma[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(1): 120-125.
- [4] AKALAY I, JANJI B, HASMIM M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8): 2418-2427.
- [5] MAO P, JOSHI K, LI J, et al. Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(21): 8644-8649.
- [6] CHEN C Y, LIN Y S, CHEN C H, et al. Annexin A2-mediated cancer progression and therapeutic resistance in nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 30.
- [7] JI J, YU Y, LI Z L, et al. XIAP limits autophagic degradation of Sox2 and is a therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma stem cells[J]. *Theranostics*, 2018, 8(6): 1494-1510.
- [8] 罗勇, 崔新浩, 姜永光, 等. 细胞株源人前列腺肿瘤干细胞的分离与鉴定[J]. *中华男科学杂志*, 2012, 18(12): 1062-1068.
- LUO Y, CUI X H, JIANG Y G, et al. Cell sorting and identification of human prostate cancer stem cells[J]. *National Journal of Andrology*, 2012, 18(12): 1062-1068.
- [9] PETKOVA N, HENNENLOTTER J, SOBIESIAK M, et al. Surface CD24 distinguishes between low differentiated and transit-amplifying cells in the basal layer of human prostate[J]. *Prostate*, 2013, 73(14): 1576-1590.
- [10] EL-KHATTOUTI A, SELIMOVIC D, HAÏKEL Y, et al. Identification and analysis of CD133<sup>+</sup> melanoma stem-like cells conferring resistance to taxol: an insight into the mechanisms of their resistance and response[J]. *Cancer Lett*, 2014, 343(1): 123-133.
- [11] 王苏萍, 杜标炎, 张广献. 自杀基因疗法治疗黑色素瘤的研究进展[J]. *广州中医药大学学报*, 2013, 30(3): 433-436.
- WANG S P, DU B Y, ZHANG G X. Research progress of suicide gene therapy for melanoma[J]. *Journal of Guangzhou University of Chinese Medicine*, 2013, 30(3): 433-436.
- [12] 糕银玲, 李世云, 赵晨晴, 等. 洛铂联合依托泊苷治疗广泛期小细胞肺癌的临床疗效观察[J]. *山东医药*, 2012, 52(14): 61-62.
- ZHUO Y L, LI S Y, ZHAO C J, et al. The clinical efficacy of luoplatin combined with etoposide in the treatment of broad stage small cell lung cancer[J]. *Shandong Medical Journal*, 2012, 52(14): 61-62.
- [13] 高文斌, 邓蓉, 韩佩妍, 等. 洛铂对肺癌HTB-56、HTB-56/DDP细胞株生长抑制作用的研究[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2012, 5(2): 137-140.
- GAO W B, DENG R, HAN P Y, et al. Study on the inhibitory effect of luoplatin on lung cancer HTB-56, HTB-56/DDP cell line [J]. *Chinese Journal of Lung Disease (Electronic Edition)*, 2012, 5(2): 137-140.
- [14] KINEHARA Y, MINAMI T, KIJIMA T, et al. Favorable response to trastuzumab plus irinotecan combination therapy in two patients with HER2-positive relapsed small-cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2015, 87(3): 321-325.
- [15] ENOMOTO Y, KENMOTSU H, WATANABE N, et al. Efficacy and safety of combined carboplatin, paclitaxel, and bevacizumab for patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer with pre-existing interstitial lung disease: a retrospective multi-institutional study[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(7): 4259-4263.
- [16] 向立丽, 李曼, 顾伟英, 等. 急性髓系白血病患者miRNA-181b表达特点及预后意义[J]. *临床内科杂志*, 2013, 30(6): 417-419.
- XIANG L L, LI M, GU W Y, et al. The expression and prognostic significance of miRNA-181b in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Journal of Clinical Internal Medicine*, 2013, 30(6): 417-419.
- [17] HE L, YAO H, FAN L H, et al. MicroRNA-181b expression in prostate cancer tissues and its influence on the biological behavior of the prostate cancer cell line PC-3[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(2): 1012-1021.
- [18] ZHENG Y S, ZHANG H, ZHANG X J, et al. MiR-100 regulates cell differentiation and survival by targeting RBSP3, a phosphatase-like tumor suppressor in acute myeloid leukemia[J]. *Oncogene*, 2012, 31(1): 80-92.
- [19] 黄琼, 陈志雄, 陶琳, 等. 重组腺病毒Ad-PTEN-EGFP对肺癌细胞A549的体外实验研究[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2015, 24(3a): 247-252.
- HUANG Q, CHEN Z X, TAO L, et al. Experimental study of recombinant adenovirus Ad-PTEN-EGFP on lung cancer cell A549 *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2015, 24(3a): 247-252.
- [20] LIU X L, LI F Q, LIU L X, et al. TNF- $\alpha$ , HGF and macrophage in peritumoral liver tissue relate to major risk factors of HCC recurrence[J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60(125): 1121-1126.
- [21] 赵娜, 胡婉丽, 张连生. 嵌合抗原受体疗法在血液肿瘤免疫治疗中的研究进展与应用前景[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2014, 8(6): 1158-1161.
- ZHAO Y, HU W L, ZHANG L S. The progress and application of chimeric antigen receptor therapy in the immunotherapy of blood tumor[J]. *Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition)*, 2014, 8(6): 1158-1161.
- [22] 蔡慧, 赵连君, 邹征云. 嵌合抗原受体基因修饰T淋巴细胞在肿瘤免疫治疗中的研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(11): 2730-2734.
- CAI H, ZHAO L J, ZOU Z Y. Research on the immunotherapy of chimeric antigen receptor gene modified T lymphocyte in tumor immunotherapy[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2014, 22(11): 2730-2734.
- [23] 尤茜, 杨玉成. 鼻咽癌肿瘤干细胞的分离筛选及与癌基因相关性的研究进展[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 48(3): 254-257.
- YOU Q, YANG Y C. Separation and screening of cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma and research progress on the association with oncogenes[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2013, 48(3): 254-257.
- [24] 潘素明, 杜日昌, 彭淑平, 等. 微小染色体维持蛋白2在鼻咽癌中的免疫组织化学表达及临床意义[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2016, 25(2): 148-152.
- PAN S M, DU R C, PENG S P, et al. The immunohistochemical expression and clinical significance of minute chromosome maintenance protein 2 in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2016, 25(2): 148-152.
- [25] 张明生, 刘萍萍, 朱宇, 等. 肿瘤干细胞在人骨肉瘤细胞株MG63耐顺铂效应中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(4): 828-831.
- ZHANG M S, LIU P P, ZHU Y, et al. The role of tumor stem cells in human osteosarcoma cell line MG63 resistant cisplatin effect[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2014, 31(4): 828-831.
- [26] 雷旦生, 喻晶, 童先丽, 等. 细胞角蛋白片段19-2G2对鼻咽癌的辅助诊断价值[J]. *中华病理学杂志*, 2012, 41(7): 461-465.
- LEI D S, YU J, TONG X L, et al. The auxiliary diagnostic value of cytokeratin fragment 19-2G2 for nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2012, 41(7): 461-465.
- [27] 黄亮, 陈志坚, 余剑书, 等. Survivin和富含亮氨酸重复序列免疫球蛋白2在人膀胱移行细胞癌组织中的表达及临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(8): 1595-1597.
- HUANG L, CHEN Z J, YU J S, et al. Expression and clinical significance of Survivin and leucine rich repeat immunoglobulin 2 in human transitional cell carcinoma of the bladder[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2012, 29(8): 1595-1597.
- [28] 饶洁, 赵利容, 袁静萍, 等. LMP2A、Snail和N-cadherin在鼻咽癌及其淋巴结转移灶中高表达[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2017, 26(1): 48-54.
- RAO J, ZHAO L R, YUAN J P, et al. High expression of LMP2A, Snail and N-cadherin in nasopharyngeal carcinoma and lymph node metastasis[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2017, 26(1): 48-54.
- [29] CURTHOYS I S, IWADAKI S, CHIHARA Y, et al. The ocular vestibular-evoked myogenic potential to air-conducted sound, probabesuperior vestibular nerve origin[J]. *Clin Neurophysiol*, 2015, 122(3): 611-616.
- [30] LIU Z B, LIU G Y, YANG W T, et al. Triple negative breast cancer types exhibit a distinct poor clinical characteristic in lymph node negative Chinese patients[J]. *Oncol Rep*, 2014, 20(4): 987-994.

(编辑:薛泽玲)