

转基因溶瘤性单纯疱疹病毒对人类乳腺癌细胞及其干细胞的溶瘤作用

李俊杰^{1,2}, 刘仁斌^{1*}, 王佳妮¹, 黄泽楠¹, 张琪³

(1.中山大学附属第三医院乳腺疾病诊治中心,广东广州 510630;2.四川省肿瘤医院乳腺科,四川成都 610041;
3.中山大学附属第三医院肝病实验室,广东广州 510630)

摘要:【目的】通过体外实验观察溶瘤性单纯疱疹病毒(HSV)载体 G47 Δ 对人类原代乳腺癌细胞及乳腺癌干细胞毒效应,探讨其对人乳腺癌的治疗作用。【方法】选取 6 例浸润性导管癌组织,体外培养人原代乳腺癌细胞及人原代乳腺癌干细胞,将 G47 Δ 按不同感染复数(MOI),即 MOI=0.01 和 MOI=0.1 加入各实验组中,观察每天细胞的生长情况。G47 Δ 含有 LacZ 基因,其表达产物可被 X-gal 染色检测。【结果】G47 Δ 病毒在乳腺癌细胞中可复制和传播通过 X-gal 染色法得以证实。G47 Δ 对人原代乳腺癌细胞及乳腺癌干细胞都具有杀伤作用,对乳腺癌细胞更加敏感。在 MOI=0.01 组及 0.1 组中,感染病毒后第 4 d,人原代乳腺癌细胞被杀灭的比例分别是 91%及 96%,乳腺癌干细胞被杀灭的比例分别是 43%及 78%;感染病毒后第 6 天,两组中人原代乳腺癌细胞接近全部被杀灭,乳腺癌干细胞被杀灭的比例分别是 92%、98%。【结论】G47 Δ 可有效杀灭人乳腺癌细胞及其干细胞;乳腺癌细胞比乳腺癌干细胞对 G47 Δ 更具有敏感性。

关键词: 单纯疱疹病毒; 溶瘤性病毒; 乳腺肿瘤; 干细胞; 基因治疗

中图分类号: R737.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)04-0426-07

Effect of Transgenic Oncolytic Herpes Simplex Virus Vectors on Human Breast Cancer and Its Stem Cells

LI Jun-jie^{1,2}, LIU Ren-bin^{1*}, WANG Jia-ni¹, HUANG Ze-nan¹, ZHANG Qi³

(1. Breast Disease Center, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Breast Surgery, The Sichuan Province Cancer Hospital, Chengdu 610041, China; 3. Hepatopathy Laboratory, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the efficacy of oncolytic herpes simplex virus (HSV) vector, G47 Δ for the treatment of the human breast cancer through the observation of cytotoxicity on human primary breast cancer cells and its stem cells in vitro. 【Methods】 Human primary breast cancer cells and breast cancer stem cells from 6 breast invasive ductal carcinoma samples were cultured and inoculated with G47 Δ of two different multiplicities of infection (MOI), MOI=0.01 and MOI=0.1. The condition of cell growth was observed every day. G47 Δ contained the LacZ gene, and expression in infected cells was detected with X-gal histochemistry. 【Results】 It was confirmed that G47 Δ can multiply and disseminate in breast cancer cells with X-gal histochemistry. G47 Δ was cytotoxic for human primary breast cancer cells and breast cancer stem cells in vitro, but the cytotoxicity for human primary breast cancer cells was stronger than its stem cells. X-gal staining of infected tumor cells in vitro illustrated the replication and spread of the virus. In the MOI=0.01 group and 0.1 group, on the fourth day after infection, 91% and 96% human primary breast cancer cells were killed, 43% and 78% human primary breast cancer stem cells were killed. In the MOI = 0.01 and MOI = 0.1 group, on the sixth day after infection, the killing rates of human primary breast cancer cells were nearly 100% in both groups; the killing rates of human primary breast cancer stem cells were 92% and 98%, respectively. 【Conclusions】 Oncolytic herpes simplex virus (HSV) vector G47 Δ was effective at killing human primary breast cancer cells and breast cancer stem cells in vitro. Breast cancer cells were more sensitive to G47 Δ than its stem cells.

Key words: herpes simplex virus; oncolytic virus; breast neoplasms; stem cells; gene therapy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4): 426-432]

收稿日期: 2011-03-09

基金项目: 国家自然科学基金(30672410); 广州市科技局国际合作项目(2007Z3-I0021)

作者简介: 李俊杰, 硕士研究生, 研究方向: 乳腺癌干细胞, E-mail: lijunjie@163.com; * 通信作者: 刘仁斌, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向: 乳腺癌基因治疗、靶向治疗、内分泌治疗, E-mail: liur@vip.163.com

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,也是女性常见的死亡原因。大约30%的早期乳腺癌患者尽管得到有效治疗,最终仍出现复发或转移。传统的治疗方法只能暂时控制转移性乳腺癌进展,大多数患者依旧会复发^[1]。肿瘤干细胞在肿瘤复发以及难治性转移性乳腺癌方面扮演着重要角色,其特点是化疗、放疗抵抗性,缺氧耐受性、高致瘤性和高侵袭转移性^[2]。因此,对肿瘤干细胞的治疗显得尤其重要。本实验使用乳腺癌原代上皮细胞的分离及微球体培养富集干细胞,为进一步证明其干细胞特性,检测了常用干细胞标记物 oct4、sox2 和 nanog 的表达情况^[3-6]。运用溶瘤病毒治疗恶性肿瘤是一种较新的治疗方法,其主要作用机制是溶瘤病毒能特异性感染恶性肿瘤细胞,并能在恶性肿瘤细胞中增殖,进而溶解破坏肿瘤细胞,同时释放更多的病毒感染破坏残留的肿瘤细胞,从而达到清除恶性肿瘤的目的,但其对正常细胞无明显毒副作用^[7-8]。第二代溶瘤性单纯疱疹病毒 G207,已在美国用于恶性胶质瘤临床治疗并取得确切疗效^[9-10]。本研究所用的 G47Δ 是在其母代 G207 的基础上改良而成,减弱了毒性,增强了病毒的复制、繁殖能力,溶瘤作用优于 G207^[11]。目前,有关病毒对肿瘤干细胞毒性作用的研究较少,虽然国外有少量研究^[4],但与国外研究相比本实验所用病毒量远远少于其病毒用量,且在杀伤时间上体现出了一定的优势。我们通过体外实验证实 G47Δ 对人原代乳腺肿瘤细胞及乳腺癌干细胞的杀伤作用来探讨其在乳腺癌治疗中的作用。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

DMEM-F12、DMEM (美国 Gibco 公司),胎牛血清、小牛血清(美国 Gibco 公司),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),CD44-FITC 单克隆抗体、CD24-PE 单克隆抗体(美国 Beckman Coulter 公司),oct4、sox2 抗体(美国 Santa Cruz 公司),反转录试剂盒(日本 Toyobo 公司),B27 (1:50, 美国 Gibco 公司),表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(美国 Peprotech 公司),I型胶原酶(美国 Gibco, USA 公司),透明质酸酶(美国 Sigma 公司),人胰岛素及牛胰岛素(美国 Sigma 公司),链霉素+青霉素(美国 Gibco 公司),流式细胞仪

(美国 BD 公司),Nikon 荧光倒置显微镜,超净工作台,CO₂ 恒温培养箱,Coulter 计数板。

1.2 转基因溶瘤单纯疱疹病毒制取

37℃、体积分数5% CO₂、饱和湿度的培养箱培养 vero 细胞(非洲绿猴肾细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院)于 T175 培养瓶(corning),当培养瓶底面覆盖率达80%左右时,将 G47Δ 病毒悬液加入 T175 培养瓶中(溶瘤性单纯疱疹病毒 G47Δ 由哈佛大学 Samuel D. Rabkin 教授惠赠,其结构已在文献[12]中详述),常温下均匀、缓慢摇动 T175 细胞培养瓶 5 min,使病毒悬液充分接触细胞。再将 T175 细胞培养瓶放置于 37℃、体积分数5% CO₂、饱和湿度的培养箱中,孵育 90 min。吸出 T175 中 G47Δ 病毒悬液后,加入 30 mL 含 3% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养基,培养于 34.5℃ 细胞培养箱,约 48~72 h,当超过 95% 的贴壁 vero 细胞由纺锤形变为折光性强的圆形细胞时收获被 G47Δ 病毒感染的 vero 细胞。其滴度通过 vero 细胞进行噬菌斑测定。

1.3 乳腺癌干细胞的分离与培养

乳腺癌原代上皮细胞的分离及微球体培养主要步骤参照文献^[13-14]:取未行新辅助化疗的乳腺癌标本(标本来自于随机选取的中山大学附属第三医院 2009 年 5 月至 2010 年 5 月收治的乳腺浸润性导管癌病例 6 例,本研究获得中山大学附属第三医院伦理委员会批准),用 PBS 冲洗干净,去掉脂肪组织,剪碎乳腺癌组织,加入含有 0.5 g/L 透明质酸酶+5×10⁻³ g/L 牛胰岛素+0.5 g/L I 型胶原酶+50 mL/L 小牛血清(FCS)+6×10⁻² g/L 青霉素+0.1 g/L 链霉素的 DMEM-F12 培养基,置于 37℃ 培养箱 10~16 h,100×g 离心 5 min,弃去上清液,在沉淀中继续加入胰酶,反复吹打消化 10 min,筛网过滤,再次离心,将沉淀(沉淀即为上皮细胞)加入干细胞培养液(含 1×10⁻⁵ g/L bFGF,5×10⁻³ g/L 胰岛素、2×10⁻⁵ g/L EGF 和 B27 的 DMEM-F12)重悬,以 1×10⁵ 个/mL 接种至培养瓶中,在 37℃、体积分数5% CO₂、饱和湿度条件下进行培养,每 2~3 d 更换培养基,第 7~9 天收集微球体细胞。用 2.5 g/L 胰蛋白酶(含 0.05% EDTA)消化微球体 5~10 min,经 400 目的细胞筛网过滤后获得单细胞悬液。将获得的细胞悬液加入干细胞培养基进行悬浮培养。为了更好的观察细胞毒实验,我们将微球体贴壁培养,通过流式分析仪检测来比较微球体

悬浮培养与贴壁培养细胞中 CD44⁺CD24^{-low} 比例。

1.4 原代乳腺癌细胞分离与培养

将微球体用消化成单细胞悬液,将细胞悬液加入普通培养基(DMEM+50 mL/L 胎牛血清),在 37 °C、体积分数 5%CO₂、饱和湿度条件下进行培养,每 2~3 d 更换培养基。

1.5 乳腺癌干细胞的鉴定

1.5.1 流式分析仪检测 CD44、CD24 的表达 取培养 7~9 d 的微球体细胞消化为单细胞悬液,细胞重悬于 PBS 中(含 2.5%胎牛血清),按 1×10^6 细胞加入 20 μ L CD44-FITC 单克隆抗体及 CD24-PE 单克隆抗体,不加抗体组为空白对照,避光冰上孵育 30 min,以含 25 mL/L 胎牛血清的 PBS 漂洗两次,再用含 10 g/L 多聚甲醛的 PBS 液固定,最后使用流式细胞仪进行检测^[14]。

1.5.2 干细胞标志物 sox2、oct4、nanog 检测 使用免疫荧光以及半定量 RT-PCR 验证干细胞常用标志物 sox2、oct4、nanog 在微球体中的表达,以下是 sox2、oct4、nanog、 β -actin 的引物序列。sox2 正义链:5'-TGCAGTACAACCTCCATGACCA-3',反义链:5'-GTGCTGGGACATGTGAAGTCT-3'。oct4 正义链:5'-CTCCTGAAGCAGAAGAGGATCAC-3',反义链:5'-CTTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA-3'。nanog 正义链:5'-GTCTTCTGCTGAGATGC-3',反义链:5'-AGTTGTTTTTCTGCCACC-3'。 β -actin 正义链:5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3',反义链:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'^[15]。

1.6 G47 Δ 细胞毒实验

经胰酶消化后的原代乳腺癌细胞或原代乳腺癌干细胞,铺于六孔板中,37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养 24 h。分别以感染复数(multiplicities of infection, MOI) 0.1 和 0.01 的病毒悬液感染细胞。置于 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱中,90 min 后吸出病毒悬液,用含 1%灭活胎牛血清的 DMEM 培养基或干细胞培养基继续培养。每天观察各组细胞生长状态并计数存活细胞数目。每株细胞实验重复 2 次^[7]。

1.7 X-Gal 细胞染色

细胞感染病毒后每天均进行 X-Gal 细胞染色,更加直观显示被感染的细胞数量变化。吸出细胞培养基,加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液,室温下固定 10 min,吸出固定液,PBS 润洗细胞 3 次,每次 3 min,最后加入 1 mL 染色液,37 °C 恒温

下孵育 2 h 直至细胞被蓝染。

2 结 果

2.1 原代乳腺癌细胞及乳腺癌干细胞的分离培养

消化后的组织经细胞筛网过滤获得单细胞悬液,将悬液加入干细胞培养基可见细胞呈悬浮生长,培养 7~9 d 后形成大量大小约 100 μ m 的微球体(图 1A)。将培养第 7~9 天的微球体细胞进行干细胞含量分析。流式分析显示,悬浮培养的微球体细胞的 CD44⁺CD24^{-low} 比例为 $(98 \pm 0.5)\%$ (图 1C),贴壁培养的微球体细胞的 CD44⁺CD24^{-low} 比例为 $(95 \pm 1.3)\%$ (图 1B、D),两者之间无统计学差异($P > 0.05$)。将微球体富集后的干细胞放入普通培养基后(图 2A),普通培养的乳腺癌细胞 CD44⁺CD24^{-low} 比例明显下降,从 98%下降至约 5%(图 2B),证实微球体培养能富集乳腺癌干细胞。此外,微球体细胞能在蛋白及基因水平很好的表达干细胞标志物 sox2、oct4、nanog,充分说明了微球体具有干细胞特性(图 3)。

2.2 G47 Δ 对人原代乳腺癌细胞的毒性作用

人原代乳腺癌细胞在 MOI = 0.01 的实验组,感染病毒后第 3 天及第 4 天,可见超过 62%及 91%以上的细胞被杀灭;在 MOI = 0.1 的实验组,感染病毒后第 3 天及第 4 天,可见超过 81%及 96%以上的细胞被杀灭(图 4)。因 G47 Δ 具有转入的 LacZ 基因,感染病毒的细胞被 X-Gal 染成蓝色(图 5)。

2.3 G47 Δ 对人乳腺癌干细胞的毒性作用

为了更好的观察细胞毒实验,我们将微球体贴壁培养,通过流式分析仪检测比较发现微球体悬浮培养与贴壁培养细胞中 CD44⁺CD24^{-low} 比例分别为 98%及 95%,无显著差异。此外,贴壁培养的微球体也能非常好的表达干细胞标志物 sox2、oct4、nanog,充分说明了微球体具有干细胞特性。与乳腺癌细胞相比,G47 Δ 对人原代乳腺癌干细胞的杀伤起效时间延迟,在 MOI = 0.01 的实验组,感染病毒后第 4、5、6 天,分别有 43%、79%、92%的细胞被杀灭;在 MOI = 0.1 的实验组,感染病毒后第 4、5、6 天,分别见 78%、91%、98%的细胞被杀灭(图 6)。感染病毒的细胞被 X-Gal 染成蓝色(图 7)。

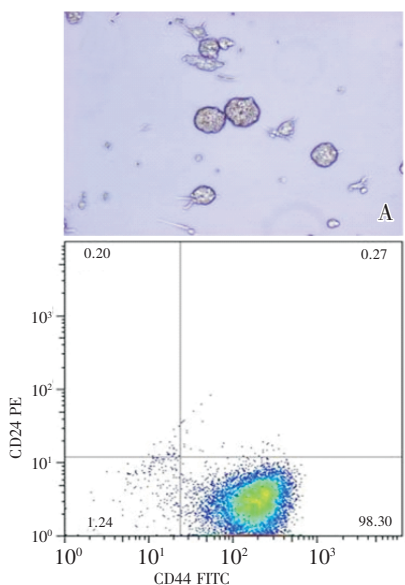


图 1 人原代乳腺癌细胞微球体图片及流式分析结果

Fig.1 Pictures of human primary mammosphere and primary mammosphere cells were analyzed by flow cytometry

A: Microscope image of primary mammospheres, $\times 100$; B: Microscope image of mammosphere adherent culture, $\times 100$; C: The proportion of CD44⁺CD24^{-low} expressing cells in suspension culture was 98.30%; D: The proportion of CD44⁺CD24^{-low} cells in primary mammosphere adherent cultures was 95.97%

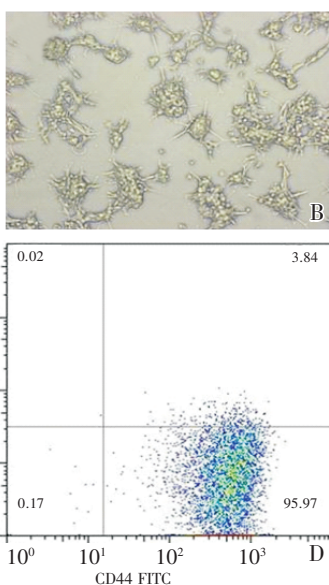


图 2 人原代乳腺癌细胞普通培养图片及流式分析结果

Fig.2 Pictures of human primary breast cancer cells in normal cultures and these cells were analyzed by flow cytometry

A: Microscope image of mammosphere adherent culture, $\times 100$; B: The proportion of CD44⁺CD24^{-low} of human primary breast cancer cells in normal culture was 4.79%

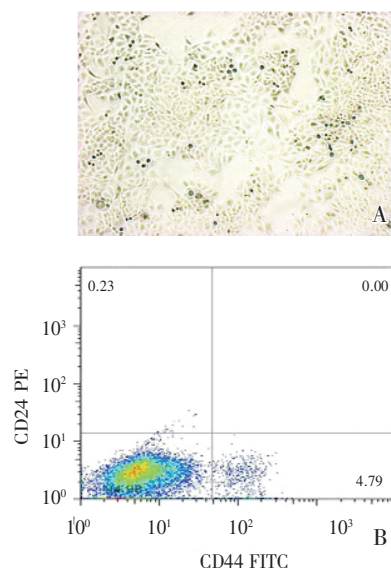


图 3 人原代乳腺癌微球体干细胞特征

Fig.3 Stem cell features of human primary mammosphere cells

A, B: Immunofluorescent staining of Oct4 (A) and Sox 2 (B) expression in mammospheres, $\times 200$; C: Expression of stem cell markers sox2, nanog and oct4 in mammosphere cells was determined by RT-PCR. β -actin served as a control for total RNA

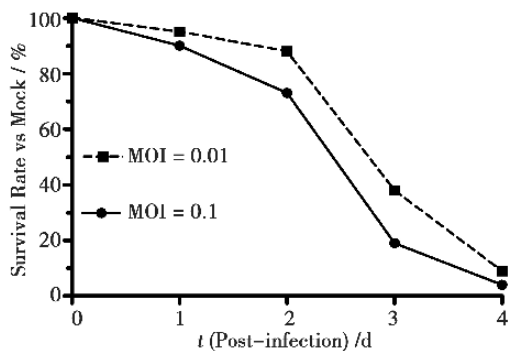


图 4 G47 Δ 对人原代乳腺癌细胞的杀伤作用

Fig.4 In vitro killing of human primary breast cancer cells by G47 Δ

human primary breast cancer cells in 6-well dishes were infected with G47 Δ at a MOI = 0.01 or 0.1, or Mock, and the average number of cells from duplicate wells is plotted as the percent in the mock wells

转移以及治疗抵抗的重要原因。尽管越来越多证据表明肿瘤中存在干细胞, 但如何鉴定干细胞仍为争论的问题。大量假说集中在肿瘤起源上, 认为肿瘤干细胞是由正常组织干细胞或祖细胞突变所致, 把肿瘤干细胞称为一种突变亚型, 并推测其可

3 讨论

目前普遍认为肿瘤干细胞是肿瘤发生、复发、

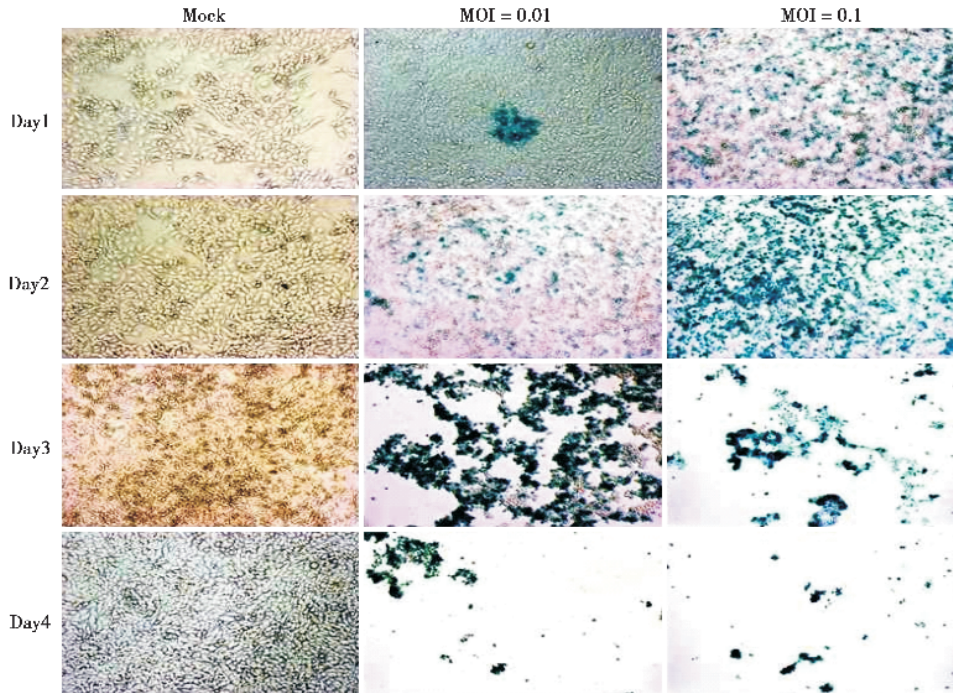


图 5 人原代乳腺癌细胞感染 G47Δ 后 X-gal 染色

Fig.5 X-gal staining of human primary breast cancer cells infected with G47Δ

Human primary breast cancer cells in 6-well dishes were infected with G47Δ at MOI = 0.01 or 0.1, or Mock, and cells stained with X-gal to identify infected cells (blue), × 100

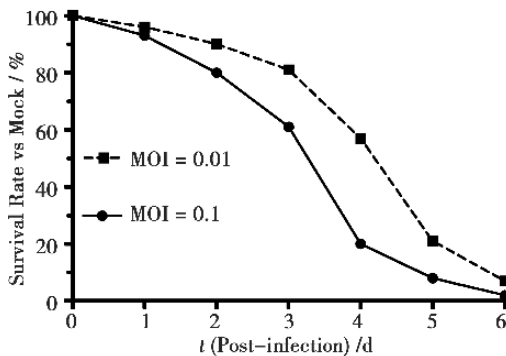


图 6 G47Δ 对人原代乳腺癌干细胞的杀伤作用

Fig. 6 In vitro killing of human primary breast cancer stem cells by G47Δ

Human primary breast cancer stem cells in 6-well dishes were infected with G47Δ at a MOI = 0.01 or 0.1, or Mock, and the average number of cells from duplicate wells is plotted as the percent in the mock wells

以上上皮与间充质之间相互转化^[2,16-17]。自 Al-Hajj 等从乳腺癌组织中分选出 $ESA^+CD44^+CD24^{-low}$ 细胞以来,对 $CD44^+CD24^{-low}$ 细胞亚群研究日益增多,因为大量研究表明乳腺癌干细胞就是一群表面标记为 $CD44^+CD24^{-low}$ 的细胞^[18]。目前,侧群细胞分选、特异性干细胞表面标志物鉴定、乙醛脱氢

酶 1 (ALDH1) 分析、微球体培养是常用的干细胞分选鉴定方法^[13, 17, 19-22]。总之,随着对肿瘤干细胞进一步认识,将会对肿瘤的治疗产生深远的影响。本实验中,我们利用无血清的微球体悬浮培养富集干细胞,同时利用流式检测 $CD44^+CD24^{-low}$ 表达。结果发现微球体能表达干细胞表面标记物 $sox2$ 、 $oct4$ 和 $nanog$,更进一步支持本实验中的原代微球体具有干细胞特性。将微球体富集后的干细胞放入普通培养基培养后, $CD44^+CD24^{-low}$ 比例明显下降,说明干细胞具有向肿瘤细胞分化的特性和潜能。针对肿瘤干细胞在肿瘤发生、发展、复发、转移中的特殊地位,且目前尚无较好的治疗方法,我们尝试用溶瘤性病毒对肿瘤干细胞进行毒性杀伤实验,探索新的治疗方法。我们在以往的实验中已经证实 G47Δ 对正常乳腺细胞没有毒性或杀伤作用。溶瘤病毒是一种较新的肿瘤治疗方法,运用其内在毒性以及选择性的在肿瘤细胞中复制、繁殖从而达到清除肿瘤细胞的目的。溶瘤性单纯疱疹病毒具有许多特性能让其成为十分有潜力的肿瘤治疗方法,如:特异性感染肿瘤细胞,原位扩增,导入肿瘤治疗基因,介导抗肿瘤免疫。更为重要的是其对正常组织没有毒性作用,这一点对今后的

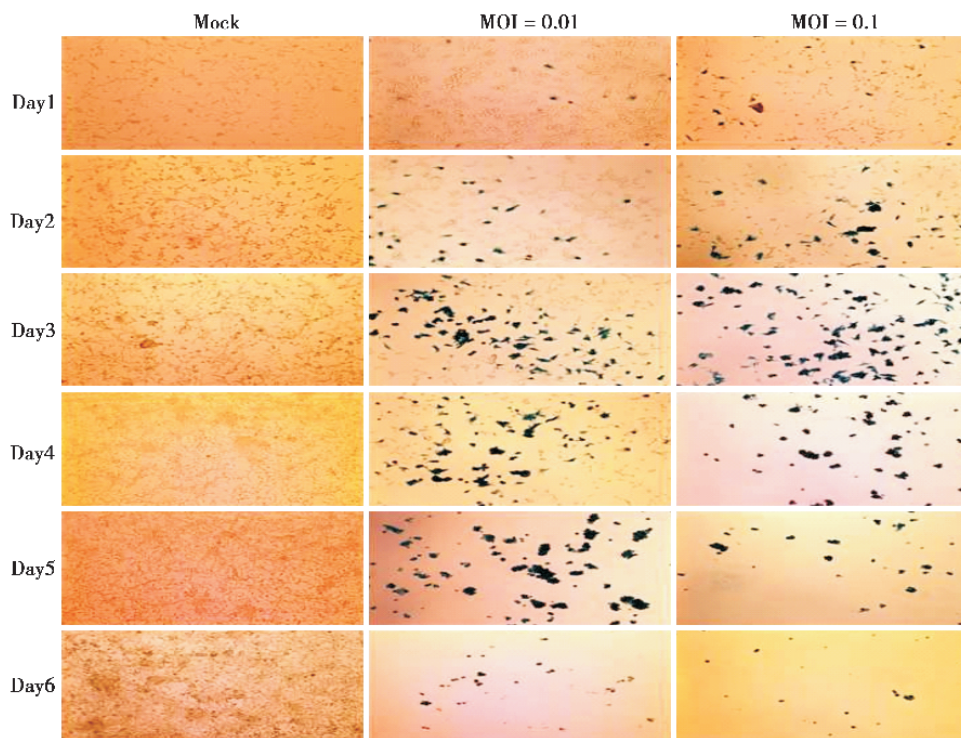


图7 人原代乳腺癌干细胞感染 G47 Δ 后 X-gal 染色

Fig.7 X-gal staining of human primary breast cancer stem cells infected with G47 Δ

primary breast cancer stem cells in 6-well dishes were infected with G47 Δ at MOI = 0.01 or 0.1, or Mock, and cells stained with X-gal to identify infected cells (blue), $\times 100$

临床应用显得尤为重要。第二代溶瘤性单纯疱疹病毒, G207 目前已在用于神经胶质瘤治疗并取得了确切疗效^[9-10]。G207 灭活了病毒神经毒性决定基因 $\gamma 34.5$, 同时在 IPC6 基因区 (UL39) 插入了 *Escherichia coli LacZ* 基因, 导致核苷酸还原酶 (RR) 失活, 病毒 DNA 合成必须依赖于 RR, 此酶在正常细胞中缺乏, 所以病毒在正常细胞中无法繁殖, 但肿瘤细胞中存在核苷酸还原酶, 可以被病毒利用完成 DNA 合成, 进而繁殖, 产生溶瘤作用。G47 Δ 是在其母代 G207 基础上进一步敲出 IPC47 基因, 使 US11 基因直接位于 $\alpha 47$ 启动子之下, 进一步提高了复制、繁殖能力及免疫原性, 由于多位点基因改造使其更难恢复成具毒性的野生型而变得更加安全^[11, 23]。近年来大量报道显示现有的肿瘤治疗方法如放疗、化疗、内分泌治疗及靶向治疗对肿瘤干细胞治疗效果甚微^[4-5, 24], 说明乳腺癌干细胞在治疗耐药或治疗失败中扮演重要角色。本实验发现在病毒滴度很低的 MOI = 0.01 及 MOI = 0.1 组, 在 G47 Δ 感染后第 4 天对原代乳腺癌细胞的杀灭率分别达到 91% 及 96%, 而 G47 Δ 感染后

第 4 天对原代乳腺癌干细胞的杀灭率分别为 43% 及 78%, 而实验显示 G47 Δ 感染后第 6 天对原代乳腺癌干细胞的杀灭率可到达 92% 及 98%。我们以往的研究发现普通培养的原代乳腺癌细胞及乳腺癌细胞株 SK-BR-3 和 MDA-MB-435 在相同病毒滴度下 4 d 后亦获得相似结果, 其杀灭率均超过 90%^[7]。这说明 G47 Δ 对干细胞的杀伤稍滞后于原代乳腺癌细胞以及乳腺癌细胞株, 从而提示其干细胞比乳腺癌细胞更具有治疗抵抗性。但本实验显示 G47 Δ 对乳腺癌干细胞仍然有着较高的杀伤作用, 在我们另一实验中发现 G47 Δ 对乳腺正常细胞并没有杀伤毒性。

综上所述, G47 Δ 能有效杀灭原代乳腺癌细胞及其干细胞, 因此, 对于一些中晚期乳腺癌和其他治疗方法无效的乳腺癌, G47 Δ 可能是一种有效的治疗选择。G47 Δ 既能通过静脉注射又能局部瘤内注射, 在感染并杀灭乳腺癌细胞及乳腺癌干细胞的同时不损伤正常细胞。本实验发现 G47 Δ 能有效杀灭乳腺癌干细胞, 这一特性为其进一步用于乳腺癌治疗的临床试验提供了重要依据。

参考文献:

- [1] Smith RA, Cokkinides V, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2009: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening[J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(1): 27-41.
- [2] Lawson JC, Blatch GL, Edkins AL. Cancer stem cells in breast cancer and metastasis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 118(2): 241-254.
- [3] Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 780-783.
- [4] Eriksson M, Guse K, Bauerschmitz G, et al. Oncolytic adenoviruses kill breast cancer initiating CD44⁺CD24^{-low} cells[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(12): 2088-2093.
- [5] Fan M, Yan PS, Hartman-Frey C, et al. Diverse gene expression and DNA methylation profiles correlate with differential adaptation of breast cancer cells to the antiestrogens tamoxifen and fulvestrant[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11954-11966.
- [6] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 506-513.
- [7] 王佳妮, 刘仁斌, 李俊杰, 等. 转基因溶瘤性单纯疱疹病毒对人类乳腺癌的治疗作用[J/CD]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2009, 3(6): 642-650.
- [8] Russell SJ, Peng KW. Viruses as anticancer drugs[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28(7): 326-333.
- [9] Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(10): 867-874.
- [10] Markert JM, Liechty PG, Wang W, et al. Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre-and post-tumor resection for recurrent GBM [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(1): 199-207.
- [11] Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, et al. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(11): 6396-6401.
- [12] Todo T. "Armed" oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy[J]. *Cell Adh Migr*, 2008, 2(3): 208-213.
- [13] Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, et al. Functional and molecular characterisation of mammary side population cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2003, 5(1): R1-8.
- [14] 黄明主, 张凤春, 张雁云, 等. 乳腺癌干细胞微球体形成的影响因素[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2008, 40(5): 500-504.
- [15] Huang CY, Pelaez D, Dominguez-Bendala J, et al. Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament[J]. *Regen Med*, 2009, 4(6): 809-821.
- [16] Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 41-50.
- [17] Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24^(-/low)/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(24): 1777-1785.
- [18] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [19] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 555-567.
- [20] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13): 5506-5511.
- [21] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cancer cells are similarly tumorigenic [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6207-6219.
- [22] Liu R, Wang X, Chen GY, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(3): 217-226.
- [23] Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, et al. Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas[J]. *Nat Med*, 1995, 1(9): 938-943.
- [24] Brendel C, Scharenberg C, Dohse M, et al. Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells[J]. *Leukemia*, 2007, 21(6): 1267-1275.

(编辑 孙慧兰)