

人 PC-3 细胞系中前列腺癌干细胞的富集与鉴定

张波¹, 范新兰², 林天歆¹, 许可慰¹, 黄健^{1*}

(中山大学附属孙逸仙纪念医院 1. 泌尿外科; 2. 医学研究中心, 广东 广州 510012)

摘要:【目的】从人前列腺癌 PC-3 细胞系中分离、富集并鉴定前列腺癌干细胞。【方法】采用无血清培养液(SFM)悬浮细胞聚球法体外培养 PC-3 细胞系,通过传代更新、诱导分化、交替在含血清/无血清培养液中培养等方法鉴定 PC-3 悬浮成球细胞具有强增殖性、自我更新和分化潜能等肿瘤干细胞特性。以 PC-3 悬浮成球细胞为实验组,常规在含血清培养液(SSM)中单层贴壁培养的 PC-3 细胞为对照组,采用流式细胞术检测两种细胞中 CD44⁺ CD133⁺细胞及侧群(SP)细胞比例。【结果】PC-3 成球细胞可以在 SFM 中生存并形成悬浮细胞球,悬浮培养第 5 天时开始可以观察到典型的悬浮细胞球形成,第 10 天时细胞球形成效率约为(2.6 ± 1.0)%,较第 5 天时明显增多($P < 0.05$)。PC-3 悬浮成球细胞具有自我更新和分化能力,在体外可以连续、稳定传代,在 SFM 中滴加血清后可以分化,交替培养于 SSM 和 SFM 中可以实现与贴壁细胞之间的相互转化。PC-3 悬浮成球细胞中 CD44⁺ CD133⁺ 细胞比率为 13.94%,SP 细胞含量为 3.1%,均显著高于常规培养的 PC-3 贴壁细胞(分别为 0.77%和 0.0%, $P < 0.05$)。【结论】PC-3 悬浮成球细胞具有肿瘤干细胞特性,采用无血清悬浮细胞聚球培养法可以从 PC-3 细胞系中简便、高效地富集前列腺癌干细胞。

关键词: PC-3; 前列腺癌; 悬浮培养; 聚球法; 肿瘤干细胞; 富集; 鉴定

中图分类号: R737.25

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)06-0878-06

Enrichment and Identification of Prostate Cancer Stem Cells in Human Prostate Cancer PC-3 Cell Line

ZHANG Bo¹, FAN Xin-lan², LIN Tian-xin¹, XU Ke-wei¹, HUANG Jian^{1*}

(1. Department of Urology, 2. Center of Medical Research, The Sun Yat-Sen Memorial Hospital,
Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To isolate, enrich and identify the prostate cancer stem cells in human prostate cancer PC-3 cell line. 【Methods】PC-3 cells were suspension cultured in vitro with a serum-free medium (SFM) and reformed into floating spheres which were isolated. Then, the isolated floating PC-3 sphere-forming cells with the properties of cancer stem cells, such as strong proliferative, self-renewal and differentiation potentials, were identified by self-renewal assay, differentiation assay, and alternative cultivation assay with SFM and serum supplemented medium (SSM). The suspension sphere-forming PC-3 cells were the experimental groups and the single-layer adherent PC-3 cells cultured with SSM conventionally were the control groups. The percentages of CD44⁺ CD133⁺ cells and side population (SP) cells in the two kinds of cells were detected with flow cytometry (FCM). 【Results】The PC-3 sphere-forming cells could survive in SFM and form floating cell spheres successfully. The typical floating cell spheres could be observed after 5 days and the proportion of cell spheres formed was (2.6 ± 1.0)% in day 10, which was significantly higher than that of day 5 ($P < 0.05$). The PC-3 floating sphere-forming cells possessed the potentials of self-renewal and differentiation and could propagate stably in vitro. Added FBS into the SFM, the sphere-forming cells could differentiate to adherent cells. When cultured alternately in SSM and SFM, the growth modes of the PC-3 sphere-forming cells could transform between adherent mode and sphere-forming mode alternately. The percentages of CD44⁺ CD133⁺ cells and SP cells in the PC-3 floating sphere-forming cells were higher significantly than that of the PC-3 adherent cells (13.94% vs. 0.77%, 3.1%

收稿日期: 2010-07-23

基金项目: 国家自然科学基金(30500507, 30672092); 广东省自然科学基金重点项目(6104605); 广东省自然科学基金(5001758, 07117366); 教育部博士点基金(20060558027)

作者简介: 张波, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 泌尿系肿瘤, E-mail: zhangbo@zsu.edu.cn; * 通信作者: 黄健, 教授, 博士生导师, E-mail: yehjn@yahoo.com.cn

vs. 0.0%, respectively, $P < 0.05$). 【Conclusion】 The PC-3 sphere-forming cells which were suspension cultured possess some properties of cancer stem cells. Using our suspension culture method with SFM, the prostate cancer stem cells in PC-3 cell line can be isolated and enriched conveniently and effectively.

Key words: PC-3; prostate cancer; suspension culture; sphere-forming; cancer stem cells; enrichment; identification

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(6):878-883]

前列腺癌是男性最常见的恶性肿瘤之一,通过手术切除、放疗和内分泌治疗等传统治疗手段虽然可以获得较好的早期疗效,但并不能完全阻止前列腺癌的进展和复发。肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)是存在于肿瘤细胞系或肿瘤组织中的一小部分特殊细胞,具有自我更新、多向分化、强增殖性和高致瘤性等干细胞特性^[1],而且对化疗和放疗具有抵抗性^[2-3],不易被常规治疗手段根除,被认为是肿瘤形成的起始细胞并维持肿瘤生长,是肿瘤发生、发展、转移和复发的根源。但是由于在全部肿瘤细胞中所占比例极低^[4],极难获得数量充足的前列腺癌干细胞以对其进行深入研究,因此,寻找能够简便高效地培养和富集前列腺癌干细胞的方法具有重要科学价值和现实意义。我们通过无血清体外悬浮聚球法培养人前列腺癌PC-3细胞系,可以简便、高效、稳定地富集前列腺癌干细胞。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人前列腺癌PC-3细胞系,购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 试剂 F12培养液、DMEM/F12培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、重组人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、B27购自GIBCO公司,Hoechst 33342、维拉帕米、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、胰岛素购自Sigma公司,anti-CD44-FITC单克隆抗体购自Invitrogen公司,anti-CD133-PE单克隆抗体购自Miltenyi Biotec公司。F12培养液中加入体积分数为10%的FBS配成完全培养液(serum supplemented medium, SSM)。DMEM/F12培养液中加入20 $\mu\text{g/L}$ EGF、5 mg/L 胰岛素、4 g/L BSA和体积分数为

2%的B27,配制成悬浮培养PC-3细胞系的无血清培养液(serum-free medium, SFM)。

1.1.3 仪器 流式细胞仪购自Becton Dickinson公司,由中山大学附属孙逸仙纪念医院林百欣医研中心提供。

1.2 方法

1.2.1 PC-3细胞系的常规贴壁培养 PC-3细胞系培养于SSM培养液,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 的细胞培养箱内培养,2 h左右贴壁。当细胞增殖至80%~90%时,处于对数生长期,用2.5 g/L 胰蛋白酶和0.2 g/L EDTA消化、离心、重悬后传代。

1.2.2 PC-3细胞系的悬浮聚球法培养 选择常规贴壁培养的对数生长期PC-3细胞,PBS缓冲液洗涤,2.5 g/L 胰蛋白酶和0.2 g/L EDTA消化,重悬于SFM培养液,调整细胞密度为 $1 \times 10^3/\text{mL}$,然后接种于100 cm^2 细胞培养皿,每个皿接种 1×10^4 个细胞,以SFM培养液进行悬浮培养,每天摇动培养皿数次以阻止细胞贴壁。待细胞增殖形成悬浮细胞球后,收集于离心管中,自然沉降20 min后弃去半量陈旧上清液,加入等量新鲜SFM并机械吹打成单细胞悬液,重悬于SFM,按1:2的比例传代,继续在37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 细胞培养箱中培养。每次均于接种细胞后5、10和15 d时,倒置显微镜下观察并计数其中直径 $> 60 \mu\text{m}$ 的悬浮细胞球数目,选取5个连续视野,取平均数,计算悬浮细胞球的形成效率。

1.2.3 向SFM中滴加血清诱导PC-3悬浮成球细胞分化 当悬浮前列腺癌细胞球形成后,每2~3 d向SFM中滴加FBS,显微镜下观察并记录悬浮细胞球生长方式的变化。

1.2.4 PC-3悬浮成球细胞交替在SSM和SFM培养液中培养 待PC-3细胞在SFM培养液中形成悬浮细胞球后,收集并重悬于SSM培养液中常规培养,待其呈单层细胞贴壁生长后,再次消化、收

集并重悬于 SFM 培养液中,细胞可以再次悬浮聚球生长形成悬浮细胞球。如此反复 2 次。

1.2.5 流式细胞学分选 CD44⁺ CD133⁺细胞 以 PC-3 悬浮成球细胞为实验组,常规在 SSM 中培养的 PC-3 单层贴壁细胞为对照组,分别收集两种细胞,重悬为单细胞悬液,根据厂商说明书标示的操作流程进行染色,应用荧光激活细胞分选(fluorescence activated cell sorting, FACS)分别检测两种细胞中 CD44⁺ CD133⁺ 细胞的比率。

1.2.6 流式细胞学分选侧群(side population, SP)细胞 以 PC-3 悬浮成球细胞为实验组,常规在 SSM 中培养的 PC-3 单层贴壁细胞为对照组,分别将两种细胞制备成单细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,各设实验管和对照管。实验管加入 Hoechst 33342(终质量浓度为 5 mg/L),对照管则先加入维拉帕米(终质量浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$)孵育 30 min,然后再加入 Hoechst 33342(终浓度为 5 mg/L),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 90 min,期间每 15 min 振荡混匀 1 次,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心 5 min,弃上清液,4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 缓冲液洗涤 2 遍,重悬于含体积分数 2% FBS 的 PBS 中,加入 PI 溶液(终质量浓度为 1 mg/L),冰上孵育 30 min。FACS 流式细胞仪 350 nm 紫外光激发后采用双波长分析(蓝:424 ~ 444 nm;红:675 nm)检测 SP 细胞比率。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 PC-3 悬浮细胞球的形成

肿瘤细胞可以在无血清替代培养液中悬浮培养和聚成球体^[5]。PC-3 细胞系在 SFM 中培养 48 ~ 72 h 后可见少量体积较小松散的悬浮细胞团,第 5 天开始观察到典型的 PC-3 悬浮细胞球,直径 $> 60 \mu\text{m}$,但是细胞球形成效率仅为 $(0.7 \pm 0.3)\%$ 。此后细胞球逐渐增大、增多,第 10 天时悬浮细胞球数量显著增多,细胞球形成效率达到 $(2.6 \pm 1.0)\%$,较第 5 天时数量显著增多($P < 0.05$),且

形态大小各异,也较前更为致密。随着时间延长,细胞球数量和体积继续逐渐增大(图 1),培养第 15 天时细胞球形成效率达到 $(3.3 \pm 1.1)\%$,但与第 10 天时差异并无统计学意义($P > 0.05$)。而用 SSM 培养的 PC-3 细胞系,则在接种后 2 h 左右开始贴壁,不产生悬浮细胞团。

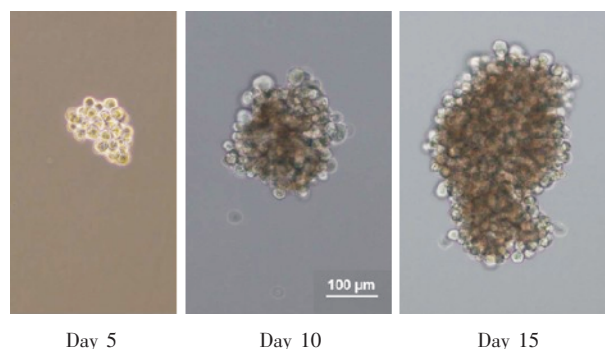


图 1 单个 PC-3 细胞形成的悬浮细胞球

Fig.1 Spheres in suspension generated from single PC-3 cells

Part of the single PC-3 cells could survive and form floating cell spheres in the SFM culture environment. From left to right is the floating cell spheres observed in day 5, 10, and 15. ($\times 100$, scale bar = 100 μm)

2.2 PC-3 悬浮成球细胞的自我更新与分化

PC-3 细胞系在 SFM 中培养形成悬浮细胞球后,将其收集、吹散并重悬为单细胞悬液后再次接种于 SFM 中,5 ~ 7 h 后仍可形成悬浮细胞球,形态与原代相同。经过连续 2 次传代后,每代的悬浮细胞球形成效率基本保持稳定,与原代无明显差异($P < 0.05$,图 2),提示 PC-3 悬浮成球细胞具有自我更新能力。血清能促使细胞分化,在 SFM 中滴加 FBS 至浓度为 10%,24 h 后 PC-3 悬浮细胞球开始变小,单细胞增多,底部边缘细胞从细胞球中爬出、贴壁生长。以后每 2 ~ 3 d 滴加一次 FBS,7 d 左右时细胞球完全消失,均为单细胞,且多为贴壁生长,形态与在 SSM 中常规贴壁培养的 PC-3 细胞无明显差异,显示出 PC-3 悬浮成球细胞具有分化潜能。

2.3 PC-3 悬浮成球细胞在 SSM 和 SFM 两种培养液中其生长方式可以出现交替转换

将悬浮细胞球吹散、重悬为单细胞悬液后接种于 SSM 中,12 h 后 PC-3 成球细胞平贴培养瓶

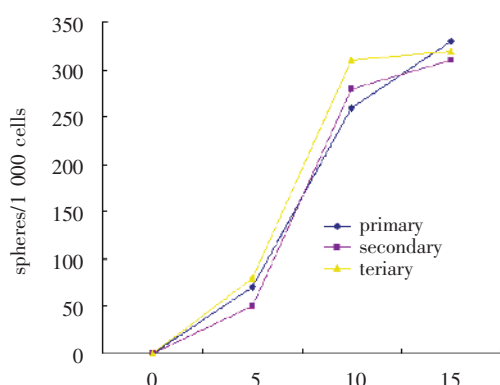


图 2 PC-3 悬浮成球细胞可以在体外连续、稳定地传代
Fig.2 PC-3 sphere-forming cells could be propagated serially and stably in vitro

After 2 consecutive propagations, the proportions of floating cell spheres remained stable, and there was no significant difference between any two of the generations ($P > 0.05$).

底贴壁生长并逐渐形成单细胞层,细胞异质性明显,显微镜下形态与常规培养的 PC-3 单层贴壁细胞无明显差异。胰蛋白酶消化,重悬为单细胞悬液后,重新培养于 SFM 中,5 d 左右仍可形成形态与原代细胞球相同的悬浮细胞球。重复以上过程,相同现象可以完全复制出现,而且这种转换能力并不会随着传代而减弱。

2.4 PC-3 悬浮成球细胞中富集了 CD44⁺ CD133⁺ 细胞

采用 FACS 分别对 PC-3 悬浮成球细胞和 PC-3 单层贴壁细胞进行 CD44 和 CD133 双标分选,结果显示悬浮成球细胞中 CD44⁺ CD133⁺ 细胞的比率为 13.94%,是单层贴壁细胞(0.77%)的 18.1 倍,两者间差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。

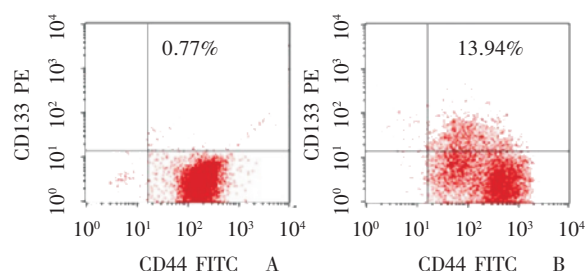


图 3 PC-3 悬浮成球细胞中 CD44⁺ CD133⁺ 细胞的比例显著高于 PC-3 单层贴壁细胞

Fig.3 The proportion of CD44⁺ CD133⁺ cells was significantly higher in PC-3 floating sphere-forming cells than in PC-3 adherent cells.

A: PC-3 monolayer cell; B: PC-3 ball cell; $P < 0.05$

2.5 PC-3 悬浮成球细胞中富集了 SP 细胞

FACS 双波长分析显示,PC-3 悬浮成球细胞中 SP 细胞比率为 $(3.1 \pm 1.2)\%$,且保持相对稳定。而在 PC-3 单层贴壁细胞中则未检出 SP 细胞(0.0%),两者间差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 4)。

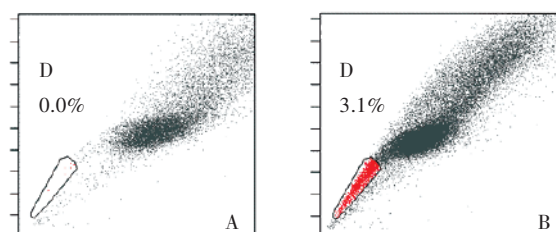


图 4 PC-3 悬浮成球细胞中 SP 细胞比例显著高于单层贴壁细胞

Fig.4 The proportion of SP cells was significantly higher in PC-3 floating sphere-forming cells than in PC-3 adherent cells

A: PC-3 monolayer cell; B: PC-3 ball cell; $P < 0.05$

3 讨 论

前列腺癌是一种严重威胁男性健康的恶性肿瘤,发病率居欧美国家男性恶性肿瘤的第 1 位,死亡率仅次于肺癌居第 2 位^[6],虽然亚洲的发病率和死亡率最低,但是近 20 年也在逐年上升^[7-8]。随着 PSA 检测等筛查手段的普及,前列腺癌的早期诊断率明显增加,经手术切除、放疗或内分泌治疗后,多数患者早期都可以获得较好疗效,但是却仍然无法阻止前列腺癌的进展,几乎所有患者最终都将进展为雄激素抵抗型前列腺癌(castrate refractory prostate cancer, CRPC),发生复发、转移而预后不佳,迄今仍无有效治疗方法。

近年提出的肿瘤干细胞理论突破了以往把肿瘤视为均一整体的研究思路,认为:①肿瘤细胞存在异质性,其中一小群具有自我更新、无限增殖和多向分化潜能的肿瘤细胞即肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)是肿瘤形成的起始细胞并维持肿瘤的生长;②肿瘤干细胞对化疗药物和放疗均不敏感,可能是肿瘤转移、复发的根源^[9]。所以,现有治疗方法虽然可以杀灭大部分前列腺癌细胞,但

却不能有效杀灭前列腺癌干细胞,因而并不能完全阻止前列腺癌的复发和转移。

肿瘤干细胞理论为前列腺癌发病机制和靶向治疗的研究开辟了崭新的方向,迅速成为研究热点。但是由于肿瘤干细胞在全体肿瘤细胞中所占的比例十分稀少^[4],极难获得,因此深入开展相关研究的首要前提和困难就是如何分离、鉴定、富集和纯化前列腺癌干细胞。在本研究中,我们采用体外无血清悬浮聚球法培养人雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞株,成功富集了前列腺癌干细胞,并且方法简便、高效而且实用性强。

3.1 PC-3 悬浮成球细胞具有肿瘤干细胞特性

无血清悬浮培养作为一种体外富集干细胞的手段最早用于神经干细胞的培养,并很快被推广至乳腺癌、脑肿瘤、黑色素瘤等肿瘤研究中用于富集肿瘤干细胞^[10-11],为研究 CSC 的生物学行为及调控机制提供了一个便利手段。研究发现,前列腺癌细胞在无血清悬浮培养体系内也可以形成前列腺癌细胞球^[12]。

肿瘤干细胞最主要的生物学特征是具有自我更新、无限增殖和多向分化潜能,同时还具有很强的微环境依赖性。在本研究中,我们将 PC-3 细胞置于体外无血清悬浮系统内培养,发现其中一小部分细胞可以存活并增殖形成悬浮细胞球,并且可以连续、稳定地传代,产生与亲代完全相同的子代细胞球,提示悬浮成球细胞不仅具有强增殖性,而且具有自我更新能力。向 SFM 中加入 FBS 后,悬浮细胞球可以逐渐缩小、消失并完全分化成为单层贴壁细胞,形态与常规在 SSM 中贴壁培养的 PC-3 细胞完全相同,提示悬浮成球细胞具有分化潜能及微环境依赖性。置于 SSM 和 SFM 两种培养液中交替培养,PC-3 悬浮成球细胞与单层贴壁细胞之间可以发生交替转换,而且这种生长形式的相互转换并不会随着传代而减弱,从而进一步证明了 PC-3 悬浮成球细胞具有多向分化潜能和微环境依赖性,并且保持了相对稳定的遗传特性。由此可见,通过悬浮聚球法培养并获得的成球细胞具有自我更新、无限增殖、多向分化潜能以及微环

境依赖性肿瘤干细胞特性,属于肿瘤干细胞样细胞群。

3.2 PC-3 悬浮成球细胞中含有高比率的属于前列腺癌干细胞表型的 CD44⁺ CD133⁺ 细胞

Collins 等^[4]应用免疫磁珠分选技术和胶原黏附法从原代培养的转移性前列腺癌细胞中分离到高纯度的 CD44⁺ CD133⁺ 整合素 $\alpha 2\beta 1^{\text{high}}$ 细胞,并且通过体外克隆形成、流式细胞学分析和免疫荧光技术等证实这些细胞具有克隆形成、多向分化、自我更新和强增殖能力,即干细胞特性,认为 CD44 和 CD133 可以作为前列腺癌干细胞的标志物。在本研究中,我们通过流式细胞仪对 PC-3 悬浮成球细胞进行 FACS 分选,发现成球细胞中具有 CD44⁺ CD133⁺ 表型的细胞比例高达 13.94%,是 PC-3 单层贴壁细胞的 18.1 倍 ($P < 0.05$),提示 PC-3 悬浮成球细胞中富集了前列腺癌干细胞。

3.3 PC-3 悬浮成球细胞中含有高比率的 SP 细胞

近年来在多种成体组织、胚胎甚至肿瘤细胞中都发现有 SP 细胞存在,并且同源性高、具有自我更新和多向分化潜能,在体内能够分化产生不同组织类型的细胞,因此很多学者认为 SP 细胞中富含干细胞^[13]。作为一种不需要细胞表面标记物而分离干细胞的方法,SP 分析是目前分离和鉴定肿瘤干细胞的主要方法之一^[14]。而 Oates 等^[15]通过 SP 分析从前列腺癌原代培养细胞中分选出了 SP 细胞,发现这些 SP 细胞的 G0 期细胞比率、增殖能力和克隆形成能力均明显高于未分选的总体细胞,提示 SP 细胞是前列腺癌干细胞样的细胞群,证明通过 SP 分选可以富集前列腺癌干细胞样的细胞。在本研究中,PC-3 悬浮成球细胞中 SP 细胞比例达 3.1%,远远高于单层贴壁细胞 (0.0%, $P < 0.05$),同样证明了通过悬浮聚球法培养从 PC-3 细胞系中获得的悬浮成球细胞富集了前列腺癌干细胞。

综上所述,采用无血清培养液悬浮聚球法培养 PC-3 细胞系可以有效获得富集了前列腺癌干细胞的悬浮成球细胞,与目前常用的免疫磁珠分选等方法相比,不仅花费少,而且具有技术简便、肿

瘤干细胞富集率高而稳定等优点,为进一步深入研究前列腺癌干细胞的生物学特性及前列腺癌靶向治疗等奠定了基础,具有广泛的应用前景和研究价值。

参考文献:

- [1] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2006, 66(19): 9339-9344.
- [2] Li X, Lewis MT, Huang J, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy [J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(9): 672-679.
- [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] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 10946-10951.
- [5] Dey D, Saxena M, Paranjape AN, et al. Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture [J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5329.
- [6] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- [7] 上海市疾病预防控制中心.2006年上海市市区恶性肿瘤发病率[J]. 肿瘤,2009,29(9):918-923.
- [8] Ito K, Kakehi Y, Naito S, et al. Japanese Urological Association guidelines on prostate-specific antigen-

based screening for prostate cancer and the ongoing cluster cohort study in Japan [J]. Int J Urol, 2008, 15(9): 763-768.

- [9] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Miki J, Furusato B, Li H, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens [J]. Cancer Res, 2007, 67(7): 3153-3161.
- [13] Challen GA, Little MH. A side order of stem cells; the SP phenotype [J]. Stem Cells, 2006, 24(1): 3-12.
- [14] Brown MD, Gilmore PE, Hart CA, et al. Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations [J]. Prostate, 2007, 67(13): 1384-1396.
- [15] Oates JE, Grey BR, Addla SK, et al. Hoechst 33342 side population identification is a conserved and unified mechanism in urological cancers [J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(10): 1515-1522.

(编辑 徐杰)