

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.03.001

· 基础研究 ·

片仔癀对人卵巢癌 OVCAR-3 细胞增殖、凋亡及周期的影响 *

何 凡^{1#} 巫慧妮^{2#} 成建定^{1△} 刘双高^{3△} 吴尚英² 胡晓芃⁴ 李丹诺⁴ 赵 莹⁵

(1 中山大学中山医学院法医学系 广东 广州 510080; 2 中山大学公共卫生学院预防医学系 广东 广州 510080;

3 军区总医院附属 157 医院综合内科 广东 广州 510510; 4 中山大学光华口腔医学院 广东 广州 510000;

5 第四军医大学口腔医学院 急诊与综合临床科 陕西 西安 710000)

摘要 目的:研究片仔癀对人卵巢癌细胞株 OVCAR-3 增殖抑制作用,及其对细胞周期、细胞凋亡的影响。**方法:**采用 MTT 法观察片仔癀对人卵巢癌细胞株 OVCAR-3 细胞的增殖抑制率,流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期,western-blot 检测相关蛋白的表达。**结果:**片仔癀以剂量依赖式抑制人卵巢癌细胞株 OVCAR-3 细胞增殖,片仔癀 250、500、1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作用于 OVCAR-3 细胞 24 h 后,其早期凋亡率分别为 6.6%、30.9%、43.2%,而对照组为 0%,其诱导凋亡作用呈现剂量依赖性;细胞积聚在 G0/G1 期,同时 S 期细胞比例减少;Akt、PARP、CDK6 表达下调。**结论:**片仔癀可以抑制 OVCAR-3 细胞增殖及诱导细胞凋亡作用,并能阻滞细胞于 G0/G1 期,有望成为卵巢癌治疗药。

关键词:片仔癀;卵巢癌;细胞周期**中图分类号:**R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)03-401-04

Effects of Pien Tze Huang for Proliferation, Apoptosis and Cycle of Human Ovarian Cancer Cell OVCAR-3*

HE Fan^{1#}, WU Hui-ni^{2#}, CHENG Jian-ding^{1△}, LIU Shuang-gao^{3△}, WU Shang-ying², HU Xiao-peng⁴, LI Dan-nuo⁴, ZHAO Ying⁵

(1 Department of Forensic Medicine, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510080, China;

2 Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510080, China;

3 Internal Medicine Department of Guangzhou Military Command affiliated 157 Hospital, Guangzhou, Guangdong, 510510, China;

4 Guanghua School of stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510000, China; 5 Emergency treatment and comprehensive clinical division, Oral medicine of the fourth military medical university, Xi'an, Shaanxi, 710000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of Pien Tze Huang on the proliferation, apoptosis and cycle of human ovarian cancer cell line OVCAR-3. **Methods:** To observe the effect of Pien Tze Huang on the OVCAR-3 cell proliferation inhibition rate by MTT method, to detect cell apoptosis and cycle by flow cytometry instrument detect the protein expression by western blot. **Results:** Pien Tze Huang in a dose dependent type inhibits the proliferation of human ovarian cancer cell line OVCAR-3 cells, Pien Tze Huang 250, 500, 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ acting on OVCAR-3 cells after 24 h, the early apoptosis rate were 6.6%, 30.9%, 43.2%, and 0% for the control group, the apoptosis is dose dependent; cell accumulation is in G0/G1 period, and the percentage of cells in S phase is decreased; there is a lower expression of Akt, PARP, CDK6. **Conclusion:** Pien Tze Huang can inhibit and induce the apoptosis of OVCAR-3 cell proliferation, and can block the cell in G0/G1 phase, it is expected to become a drug for the treatment of ovarian cancer.

Key words: Pien Tze Huang; Ovarian cancer; Cell cycle**Chinese Library Classification(CLC):** R737.31 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)03-401-04

前言

卵巢癌(ovarian cancer)是死亡率最高的妇科恶性肿瘤,因早期缺乏特异临床表现,大多数患者发现疾病时已进入晚期,其五年生存率较低^[1]。目前卵巢癌的治疗主要靠初次肿瘤细胞

减灭术(OPCS),术后辅以紫杉类和铂类药物联合应用的系统化疗。但由于化疗药物显著的副作用,及肿瘤细胞对化疗药物的耐受现象,化疗往往很难起到理想的效果。

片仔癀是我国传统名贵中成药,在中国和东南亚广泛使用,主要用于急性、慢性肝炎,脓肿、无名肿毒及一切炎症引起

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172901)

作者简介:何凡(1991-),男,本科,主要研究方向:分子药理学和肿瘤表观遗传学,电话:13826064246

巫慧妮(1990-),女,本科,主要研究方向:分子流行病学与分子营养学,电话:13430337601

为共同第一作者

△通讯作者:成建定(1973-),教授,博士,博士生导师,主要研究方向:为分子病理学和细胞电生理学

刘双高(1980-),男,主治医师,主要研究方向:主要从事内科疾病的临床与基础研究

(收稿日期:2013-05-21 接受日期:2013-06-18)

的疼痛、发热等。现已有报道指出片仔癀有抗结直肠癌、肝癌等恶性肿瘤的功效^[2,3]。关于女性生殖道肿瘤还未见有研究报道,且片仔癀的有效成分和抗癌作用机制至今仍不清楚。因此,本实验拟从片仔癀调控 OVCAR-3 的细胞增殖,细胞凋亡和细胞周期等方面探讨片仔癀抗卵巢癌的作用,为其用于肿瘤治疗提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 仪器

流式细胞仪(Becton Dickinson Coltd, 美国);自动酶标仪(Bio-Tek Inc, 美国);CO₂ 培养箱(Thermo, 美国);X-22R 低温离心机(Beckman 公司, 德国)。

1.2 试剂

片仔癀来自漳州片仔癀药业股份有限公司,研磨成粉末于双蒸水中溶解,配制成 50 mg·mL⁻¹ 于 -20 °C 保存,使用时再加入培养基中配成 250 μg·mL⁻¹, 500 μg·mL⁻¹ 及 1000 μg·mL⁻¹ 的浓度。RPMI 1640 培养液(Gibco 公司);MTT (Sigma 公司);Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(Bio Vision Inc, 美国);cycle test TM plus DNA reagent kit (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 美国);其它试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 细胞培养

人卵巢癌细胞系 OVCAR-3 为本实验室常规培养,生长于含 10%小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液中,于 37 °C 恒温、5% CO₂、饱和湿度培养箱中生长。取对数生长期细胞用于本实验。当细胞单层贴壁生长至 80%~90%融合时以 0.25%胰蛋白酶/EDTA 消化按 1:3 传代培养。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期的卵巢癌细胞系 OVCAR-3, 消化并收集细胞。调整细胞密度为 1×10^5 个·mL⁻¹, 接种于 6 孔培养板中,分为不同浓度片仔癀组(终浓度分别为 250、500、1000 μg·mL⁻¹)、空白对照组(直接加等体积的 PBS),每组设 8 个复孔。每孔加入 5 mg·mL⁻¹ 的 MTT 溶液 10 μL, 37 °C 孵育 4h, 吸弃各孔中的液体,加入 DMSO 100 μL/孔。10 min 后于全自动酶标仪 570nm 测定各组吸光度值(即 A 值)。肿瘤细胞存活率计算公式为:存活率(%)=(实验组 OD 值 - 空白组 OD 值)/(实验对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)× 100%。

2.3 流式细胞仪

细胞凋亡:将 1×10^5 个·mL⁻¹ 的 OVCAR-3 细胞接种于 6 孔板中常规培养 24 h 后,不同浓度片仔癀干预 24 h 后,用不含 EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化,调整细胞的密度为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个·mL⁻¹。取 1 mL 细胞用 PBS 离心洗涤, 1000 r·min⁻¹、4 °C 离心 10 min, 共 3 次,弃上清。用 500 μL 的 Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,再加入 5 μL 碘化丙啶(PI),混匀,室温避光反应 15 min,用流式细胞仪检测,并用软件分析结果。

细胞周期:将 1×10^5 个·mL⁻¹ 的 OVCAR-3 细胞接种于 6 孔板中常规培养 24 h 后,用不同浓度的片仔癀给药处理。培养 24 h 后收集细胞,调整细胞浓度至 1×10^6 个·mL⁻¹,用 70%的乙

醇在 4 °C 中过夜固定,经预冷的 PBS 洗 2 次,置于 RNase(8 μg·mL⁻¹)和 PI(10 μg·mL⁻¹)中孵育 30 min。用流式细胞仪检测,并用软件分析 OVCAR-3 的细胞周期。

2.4 Western-blot

检测不同浓度片仔癀处理 OVCAR-3 细胞 24 h 后 AKT、PARP 和 CDK6 蛋白表达的差异。依照 2×10^5 细胞/孔将 OVCAR-3 细胞接种至 6 孔板中,加 2 mL 培养液于每孔中。培养 24 h 后,再用浓度不同的 PZH (250、500、1000 μg·mL⁻¹)处理,处理 24 h 后进行细胞蛋白提取;收集细胞进行离心,用预冷的 PBS 冲洗 3 次;加入 200 μL 的蛋白裂解液冰上裂解 30 min;然后 13000× g 离心 20 min,取上清。Bradford 法检测样品中的蛋白浓度,加 buffer 变性蛋白,15%聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗孵育过夜,PBS 洗 3 次,二抗孵育 1 h,PBS 洗 4 次,显色后进行图像分析。

2.5 统计学处理

所有数据采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,数据用($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 ANOVA 方差分析。P<0.05 具有统计学意义。

3 结果

3.1 PZH 对卵巢癌细胞系 OVCAR-3 的增殖抑制作用

随着药物浓度从 0 升至 250、500、1000 μg·mL⁻¹ OVCAR-3 的细胞存活率从 100%逐渐降至 83%, 70%, 39%, 其差异有统计学意义(P<0.05, 0.011), 如图 1 所示。说明片仔癀可以显著抑制卵巢癌细胞系 OVCAR-3 的增殖。

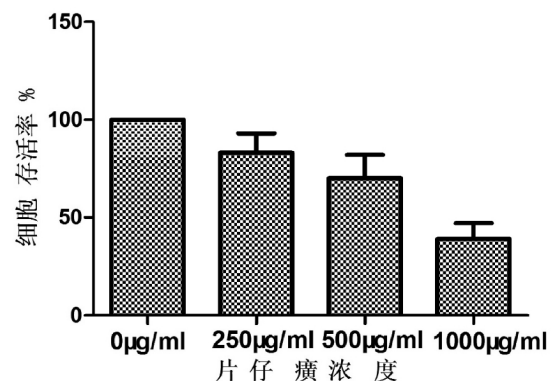


图 1 不同 PZH 浓度处理后 OvcAR-3 存活率

Fig.1 Survival ratio of OvcAR-3 treated by PZH with different concentrations

3.2 流式细胞仪分析 PZH 对肿瘤细胞 OVCAR-3 凋亡的影响

如图 2 所示, OVCAR-3 细胞对照组早期凋亡率为 0%, 而经不同浓度的 PZH(250、500、1000 μg·mL⁻¹)作用 24h 后,随药物浓度的增加,实验组 OVCAR-3 细胞早期凋亡率逐步增加,分别为 6.6%、30.9%、43.2%,说明 PZH 对肿瘤细胞 OVCAR-3 凋亡具有明显的剂量依赖性。

3.3 流式细胞仪分析 PZH 对 OVCAR-3 细胞周期的影响

PZH 作用于 OVCAR-3 细胞 24 h 后,不同周期细胞的百分比用流式细胞仪分析,如表 1 显示。和对照组比较,PZH 作用后的 OVCAR-3 细胞 S 期细胞比例明显减少,对照组 33.34%,

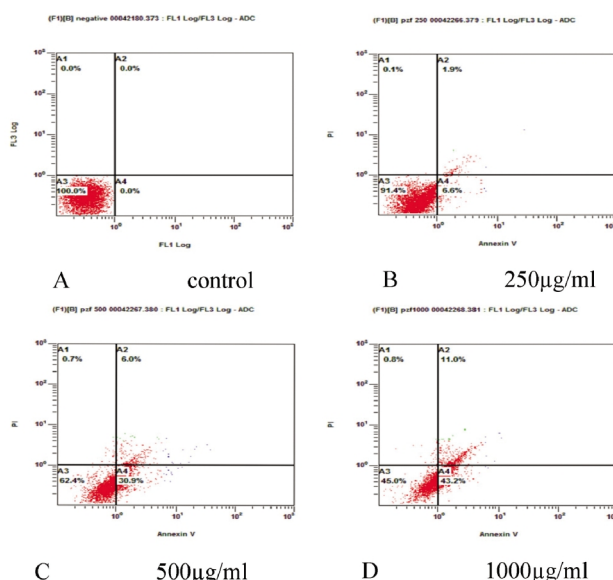


图2 流式细胞仪分析 PZH 对肿瘤细胞 OVCAR-3 凋亡的影响

Fig.2 Effects of PZH on the apoptosis of OVCAR-3 by flow cytometry analysis

PZH250、500、1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作用后分别是 32.058%、30.868%、9.653%，差别有统计学意义 ($P < 0.05, 0.018$)；PZH250、500、1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作用后 G0/G1 期细胞分别是 58.598%、69.132%、80.482%，对照组 58.442%，其差别有统计学意义 ($P < 0.05, 0.042$)。结果提示 PZH 能诱导细胞停滞在 G0/G1 期。

3.4 PZH 对 AKT、PARP、CDK6 的影响

western-blot 结果显示：AKT、PARP、CDK6 的表达随着 PZH 药物浓度的增高而明显下降，如图 3 所示，详细数据见表 1。说明 PZH 能够显著抑制 OVCAR-3 的 AKT、PARP、CDK6 的表达。

表 1 片仔癀对 OVCAR-3 细胞周期分布率的影响

Table 1 Effects of Pientzehuang on cell cycle distribution rate of OVCAR-3

Drug concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Cell cycle distribution		
	%G0/G1	%G2	%S
0	58.442	8.215	33.343
250	58.598	9.344	32.058
500	69.132	0.000	30.868
1000	80.482	9.865	9.653

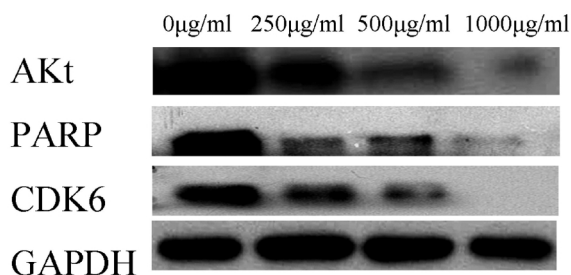


图3 AKT、PARP、CDK6 的表达与 PZH 药物浓度的关系

Fig.3 The relationship between PZH drug concentration and AKT, PARP, CDK6 expressions

4 讨论

中药治疗肿瘤，源于古代中医药经验。中医对肿瘤的病因、病机及治法都有其理论解释，例如曾提出过“结者散之”的论述。中药治疗肿瘤机制包括直接抑制肿瘤细胞生长与增殖^[4]、调节免疫功能^[5]、改变癌基因表达、抑制癌细胞增殖^[6]、诱导肿瘤细胞凋亡^[7]、抑制肿瘤细胞侵袭和转移^[8-10]、调节肿瘤细胞信号通路^[11]、改善血液流变学指标^[12]等。而针对片仔癀，研究表明片仔癀可通过下调 Pim-1 及 Pim-2 mRNA 的表达而诱导结肠癌 HT-29 细胞的凋亡，抑制 HT-29 细胞的增殖起到治疗结肠癌的作用^[13]；降低骨肉瘤 U-2OS 细胞 MMP-9 的表达，降低骨肉瘤细胞在人体的侵袭及迁移^[14]；对中老年肝癌患者缓解症状也具有积极作用，并能直接作用于肿瘤细胞，部分成分还可以增强癌细胞的抗原性，从而增强机体对肿瘤的免疫反应^[15]。

肿瘤的恶性度与肿瘤的增殖、凋亡、周期密切相关，受体酪氨酸激酶 (RTK)- 磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K) 信号通路在调控这些过程中起重要作用^[16]。丝氨酸 / 苏氨酸激酶 Akt，是众多生长因子具有酪氨酸激酶受体 (RTK) 的细胞信号传导通路中最重要的激酶^[17]。Altomare 等^[18]的研究结果表明卵巢癌组织中存在 p- AKT 蛋白的过表达，而 Huang Y 等^[19]认为 p- Akt 蛋白在卵巢浆液性腺癌中的表达远远高于卵巢良性肿瘤，有 Akt 表达的卵巢癌患者的五年生存率只有 15%，而无 Akt 表达的卵巢癌患者的生存率可以达到 80%，所以降低 Akt 的表达对于卵巢癌的预后十分重要。作者在 MTT 试验中观测到随着 PZH 浓度的增高，OVCAR-3 细胞的增殖明显受到抑制；与此同时，在 western blot 中观察到 AKT 随着药物浓度的升高而降低，提示 PZH 可能通过 AKT 的重要路径调控卵巢癌 OVCAR-3 细胞的增殖。二者都在提示着 PZH 可以调控 OVCAR-3 的细胞增殖。

DNA 修复酶——聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP) 在肿瘤的增殖和生长方面起到重要的作用，成为与肿瘤发生密切相关的一种酶。PARP 可被激活的 caspase-3 裂解，失去对损伤 DNA 的修复功能，导致细胞转向凋亡^[20]。10%-15% 的上皮性卵巢癌是由于 BRCA1/2 基因突变导致的隐性遗传性疾病，对抑制 PARP 的药物特别敏感^[21]；Mukhopadhyay A 等^[22]报道，大约 50%-60% 高度恶性的上皮性卵巢癌都有与 DNA 的同源重组修复途径有关的蛋白质功能的丧失，同样对抑制 PARP 的药物敏感。实验中发现 PARP 随着 PZH 浓度的增高而呈下降趋势，说明 PZH 可以在一定程度上抑制 PARP 的表达；另一方面，流式细胞术凋亡结果也显示了 PZH 可以诱导卵巢癌细胞明显的凋亡，药物 24 小时的早期凋亡率发现随着药物浓度的增加，OVCAR-3 细胞早期凋亡率均逐步增加，提示 PZH 有明显的诱导肿瘤细胞凋亡作用。

周期蛋白依赖性激酶 6 (CDK6)，是细胞周期中 G1 期的重要调控分子之一，能够特异性地与周期蛋白 D (Cyclin D) 结合形成复合物。Cyclin D-CDK6 复合物可以使下游分子 Rb 蛋白 (retinoblastoma tumor suppressor protein, Rb) 的丝氨酸或苏氨酸残基发生磷酸化，进而导致 Rb 蛋白和 E2F 的分离，促使细胞完成 DNA 复制，由 G1 期向 S 期转变^[23]。Sawiris 等^[24]通过对卵巢癌基因表达的系列研究观察分析发现 CDK6 在卵巢癌细胞中高表达。本实验中，作者在流式细胞术周期检测中发现 PZH

能够有效地把 OVCAR-3 细胞的细胞周期的抑制作用阻滞于 G1/S,阻止细胞由 G1 期进入 S 期,使其停滞在 G0/G1 期,使得 S 期细胞 DNA 的合成与复制受到抑制和阻断,从而有效地控制肿瘤细胞的生长。在 western blot 中 CDK6 的表达随着 PZH 的浓度升高而降低也和流式细胞仪的细胞周期的结果吻合。

综上所述,片仔癀可以抑制 OVCAR-3 细胞增殖及诱导细胞凋亡作用,并能阻滞细胞于 G0/G1 期,片仔癀有望成为抗卵巢癌药。然而片仔癀抑制肿瘤细胞增殖,诱导其凋亡的具体的机制、细胞通路等,我们将继续深入研究,为其今后用于卵巢癌的治疗提供更多的科学依据。

参考文献(References)

- [1] N. Howlader, A. M. Noone, M. Krapcho, et al. SEER Cancer Statistics Review, National Cancer Institute, Bethesda, Md, USA, 1975/2009, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09
- [2] 陈志鸿, 易红梅, 李红玲, 等. 腹水离心石蜡切片联合免疫组化检测 CA125、CK7、Ki67 对卵巢癌的诊断价值 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(33): 6512-6514
Chen Zhi-hong, Yi Hong-mei, Li Hong-ling, et al. The Diagnostic Value of Ascites Centrifugate Paraffin Section and Immunohistochemical Detection of CA125, CK7 and Ki67 in Ovarian Cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(33): 6512-6514
- [3] 赵乐, 纪新强, 刘静, 等. Nanog 基因在卵巢癌和卵巢肿瘤干细胞中的表达及意义[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(14): 2642-2646
Zhao Yue, Ji Xin-jiang, Liu Jing, et al. Expression and Significance of Nanog Gene in Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Stem Cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(14): 2642-2646
- [4] Oliver Dorigo and Jonathan S, Berek. Personalizing CA125 Levels for Ovarian Cancer Screening [J]. Cancer Prevention Research, 2011, 4: 1356-1359
- [5] Anna H, Woodard, Jing Yu, et al. NY-BR-1 and PAX8 Immunoreactivity in Breast, Gynecologic Tract, and Other CK7+ Carcinomas: Potential Use for Determining Site of Origin [J]. Am J Clin Pathol, 2011, 136: 428-435
- [6] 郑翠娥, 孔雅, 余晓滢, 等. 肺抑制剂对小鼠 Lewis 肺癌 P16, P53, cyclinD1 表达影响的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2008, 15(2): 116-116
Zheng Cui-e, Kong Ya, Yu Xiao-ying, et al. Experimental research of Lung tumor mixture for Lewis lung carcinoma P16, P53, cyclinD1 expression in rats [J]. Chinese Medical Science and Technology, 2008, 15(2): 116-116
- [7] Marion T Weigel, Mitch Dowsett. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction [J]. Cancer, 2010, 17: 245-262
- [8] 陈良良, 梁华, 黄建飞. 丹参对 Lewis 肺癌自发性肺转移的作用及机理研究 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(2): 290-292
Chen Liang-liang, Liang Hua, Huang Jian-fei. The Effects of Danshen on the Growth and Metastasis of Lewis Lung Carcinoma and the Expression of MMP-9, VEGF [J]. Traditional Chinese Medicine, 2008, 26(2): 290-292
- [9] Ignacio Romero and Robert C. Bast, Jr. Minireview: Human Ovarian Cancer: Biology, Current Management, and Paths to Personalizing Therapy [J]. Endocrinology, 2012, 153: 1593-1602
- [10] 武加利, 纪新强, 刘佳, 等. 人卵巢癌干细胞的分离培养和初步鉴定 [J]. 现代妇产科进展, 2010, 19(12): 893-896
Wu Jia-li, Ji Xin-qiang, Liu Jia, et al. Isolation and initial identification of human ovarian cancer stem cells [J]. Prog Obstet Gynecol, 2010, 19(12): 893-896
- [11] Patricia Hartge, James L. Speyer. Finding Ovarian Cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 2012, 104: 82-83
- [12] Cho DS, Choi JB, Kim YS, et al. Heart rate variability in assessment of autonomic dysfunction in patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome [J]. Urology, 2011, 78(6): 1369-1372
- [13] 魏丽慧, 林久茂, 彭军. 片仔癀对人结肠癌细胞增殖的影响 [J]. 福建中医药, 2010, 41(1): 56-57
Wei Li-hui, Lin Jiu-mao, Peng Jun. Effect of Pianzhihuang for Proliferation of Human Colon Cancer Cell [J]. Fujian Chinese Medicine, 2010, 41(1): 56-57
- [14] 张俐, 于波, 林建华. 中药片仔癀胶囊对骨肉瘤 U-20S 细胞诱导凋亡的作用 [J]. 中国骨伤, 2009, 24(4): 511-515
Zhang Li, Yu Bo, Lin Jian-hua. Apoptosis induction of traditional Chinese herb Pianzhihuang in human osteosarcoma U-20S cells [J]. Chinese Orthopaedics, 2009, 24 (4): 511-515
- [15] B.L.K. Coles-Takabe, I. Brain, K.A. Purpura, et al. Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies [J]. Stem Cells, 2008, 26(11): 2938-2944
- [16] A.K. Croker, A.L. Allan. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008, 12(2): 374-390
- [17] Akt signaling pathway. Product Pathways. Cell Signaling Technology, Inc
- [18] H. Korkaya, A. Paulson, E. Charafe-Jauffret, et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/ β -catenin signaling [J]. PloS Biology, 2009, 7(6): e1000121
- [19] Huang Y, Hua K, Zhou X, et al. Activation of the p13K/AKT pathway mediates FSH-stimulated VEGF expression in ovarian serous cyst adenocarcinoma [J]. Cell Res, 2008, 118(7): 780-791
- [20] E.H. Huang, M.J. Hynes, T. Zhang, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumor igenesis [J]. Cancer Research, 2009, 69(8): 3382-3389
- [21] L. Vermeulen, M. Todaro, F. De Sousa Mello, et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(36): 13427-13432
- [22] Mukhopadhyay A, Elattar A, Cerbinskaite A, et al. Development of a functional assay for homologous recombination status in primary cultures of epithelial ovarian tumor and correlation with sensitivity to PARP inhibitors [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(8): 2344-2351
- [23] E. Charafe-Jauffret, C. Ginestier, F. Iovino, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature [J]. Cancer Research, 2009, 69 (4): 1302-1313
- [24] E. Quintana, M. Shackleton, M.S. Sabel, D.R. Fullen, T.M. Johnson, et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells [J]. Nature, 2008, 456: 593-598