

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.16.004

NAC-1 在膀胱癌中的表达及其与血管生成的相关性研究 *

颜志锋 刘 雷 夏进业 黄 程 陈 方[△]

(中南大学湘雅三医院泌尿外科 湖南 长沙 410013)

摘要 目的:检测 NAC-1 在膀胱癌及癌旁组织中的表达,及其与膀胱癌临床病理的相关性研究,并进一步探讨其与血管生成的关系,为阐明膀胱癌的发生发展机制提供基础。**方法:**采用免疫组化法检测 88 例膀胱癌和 30 例癌旁组织石蜡块中 NAC-1 的表达情况,用 si-RNA 干扰技术下调膀胱癌细胞系 T-24 中 NAC-1 的表达,然后通过 qRT-PCR 方法检测干扰组及对照组中促血管生成因子(VEGF、bFGF、EGFR)的表达。**结果:**膀胱癌组织和癌旁组织中 NAC-1 的阳性表达率分别为 79.54 %和 13.33 %,膀胱癌组织显著高于癌旁组织($P<0.01$); NAC-1 表达与膀胱癌的肿瘤级别、肌肉浸润程度及淋巴结转移显著相关($P<0.05$),在高级别、肌肉浸润及淋巴结转移的膀胱癌中呈现高表达,细胞实验发现 NAC-1 下调能够抑制促血管生成因子(VEGF、bFGF、EGFR)的表达。**结论:**NAC-1 作为肿瘤相关基因在膀胱癌中高表达,并与膀胱癌的临床病理密切相关,其能调节促血管生长因子,可能会在肿瘤的血管生成及转移中具有重要的作用。

关键词:膀胱癌;NAC-1;VEGF;bFGF;EGFR

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)16-3012-04

The Expression of NAC-1 in Bladder Cancer and the Correlation with the Angiogenesis*

YAN Zhi-feng, LIU Lei, XIA Jin-ye, HUANG Cheng, CHEN Fang[△]

(Department of Urology, the third Affiliated Hospital of Xiangya Medical School, Central South University, Changsha, Hunan, 410013, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of NAC-1 gene in human Bladder cancer and corresponding non-tumor tissues, and explore the correlation between the expression of NAC-1 gene and the bladder cancer clinical pathology and angiogenesis, With the purpose of providing a basis for elucidating the pathogenesis of bladder cancer. **Methods:** The expressions of NAC-1 in 88 cases of Bladder cancer and 30 cases of adjacent tissues were studied by using immunohistochemical method. And qRT-PCR was used to detect the expression of angiogenesis factor (VEGF, bFGF, EGFR) after Si-RNA interfered NAC-1 of T-24 bladder cancer cell line. **Results:** The positive expression rate of NAC-1 in bladder cancer and adjacent tissues were 79.54 % and 13.33 % respectively ($P<0.01$); the expression of NAC -1 gene was significantly related to the TMN stage, myometrial invasion degree and lymphatic metastasis of bladder cancer ($p<0.05$); Cell experiments showed that down-regulation of NAC-1 inhibited the expression of pro-angiogenic factors(VEGF, bFGF, EGFR). **Conclusions:** NAC-1, as a tumor associated gene, is highly expressed in bladder cancer and is closely related to the clinical pathology of bladder cancer. Furthermore, NAC-1 can regulate pro-angiogenic growth factors, which plays an important role in the study of the proliferation and metastasis of bladder cancer.

Key words: Bladder carcinoma; NAC-1; VEGF; bFGF; EGFR

Chinese Library Classification(CLC): R737.14 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)16-3012-04

前言

膀胱癌发病率在全世界所有恶性肿瘤中排在第十一位,而在男性肿瘤中则排名上升到了第七位^[1]。在欧美发达国家中,其总体发病率居男性所有恶性肿瘤的第四位,排在前列腺癌、肺癌和结肠癌之后^[2,3]。在中国,根据 2015 年赫捷院士和陈万青教授在临床肿瘤学杂志上发表的“中国肿瘤统计,2015 显示:在国内,膀胱癌的发病率和死亡率均位于泌尿系恶性肿瘤第一位

^[4]。随着人口老龄化、环境污染和吸烟等致癌因素的影响,膀胱尿路上皮癌的发病率及死亡率不断升高。尤其是肌层浸润性膀胱癌行根治术后,患者的生活质量严重受影响,并且膀胱癌进展是其预后不良的重要因素。已有研究发现存在不少分子生物学标志物对膀胱癌的早期诊断有一定的帮助,其中也不乏与肿瘤复发、进展以及转移相关的分子生物学标志物。但膀胱癌具体的发病分子机制仍然没有完全阐明,然而,与众多恶性肿瘤一样,膀胱癌也是一多种因素共同作用结果。到目前为止,膀胱

* 基金项目:中南大学研究生自主创新课题基金项目(2016zzts573)

作者简介:颜志锋(1988-),硕士研究生,主要研究方向:泌尿外科, E-mail:746748281@qq.com

△ 通讯作者:陈方(1986-),硕士研究生,主要研究方向:泌尿外科, E-mail: 42454482@qq.com, 电话:13647370024

(收稿日期:2017-01-03 接受日期:2017-01-24)

癌的预后判断主要依靠组织病理学结果,仍未有特异性的分子生物标志物用来指导临床工作,而 NAC-1 作为一个肿瘤相关的癌基因在很多肿瘤的多个生物学过程中发挥重要作用。目前 NAC-1 在膀胱癌中的表达及作用未见报道,本研究拟通过免疫组织化学和 qRT-PCR 的方法检测 NAC-1 在膀胱癌中的表达及其与血管生成的关系研究,讨论其与膀胱癌的临床病理关系,进一步揭示其调节膀胱癌机制,为膀胱癌的发生发展、进展、转移机制以及靶向治疗等方面提供更多的线索^[5]。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 组织标本 纳入本研究的 88 例均来自中南大学湘雅三医院泌尿外科、中南大学湘雅医院泌尿外科 2010 年 06 月至 2014 年 08 月收治的、经过筛选后进行膀胱癌根治术的膀胱癌患者,其中男性 60 例,女性 28 例;年龄 42-77 岁,中位年龄 62.2 岁。本次所有参组患者术前都没有接受任何针对膀胱癌的治疗(放疗、化疗、免疫治疗等),所有标本的获取及实验目的均经过患者的知情同意。所有标本术后病理均为膀胱癌,病理分级:高级别(G3)38 例,中级别(G2)13 例,低级别(G1)37 例。病理分级参照 2004 年 WHO 膀胱癌病理组织学分级标准进行。另取膀胱癌旁组织 30 例,病理学检查证实无癌细胞。

1.1.2 细胞系 膀胱癌 T-24 细胞系来自中山大学肿瘤防治中心。

1.2 试剂与方法

1.2.1 主要试剂 抗体 NAC-1 购自 Abcam 公司,货号为 Anti-NAC-1 antibody ab29047。工作浓度为 1:100;即用型 Ultra Sensitive TMS-P 超敏试剂盒(兔)及 DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2.2 免疫组织化学染色 所有膀胱癌组织及癌旁组织石蜡切片均用 60℃ 烤片 30 min,常规脱蜡水化,用 0.01 M 柠檬酸缓冲液高压修复抗原,其中柠檬酸缓冲液 pH 定于 6.0,冷却到室温;用 3% H₂O₂ 甲醛封闭内源性过氧化物酶,室温静置 10 min;滴加正常非免疫动物血清,室温静置 10 min;除去血清,滴加一抗:NAC-1(1:100),置于 4℃ 冰箱过夜;滴加生物素标记的羊抗兔 IgG,室温孵育 10 min;滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,室温孵育 10 min;DAB 显色 5 min,蒸馏水洗终止显色;苏木素复染、水洗、分化后充分水洗反蓝;常规脱水透明,中性树胶封片,每次处置后均用 0.1% Tween-20PBS 洗 3 次,每次 5 min。

1.2.3 免疫组化结果判定 IHC 实验评判标准:以胞质或者胞核着色反应:不着色为阴性(-);着浅棕色为弱阳性(+);着棕色为阳性(++);着棕褐色为强阳性(+++),依照阳性细胞数量可分为:(-)指细胞无着色,(+)指阳性细胞数在 25%以下,(++)指阳性细胞数在 25%-49%之间,(+++指阳性细胞数在 50%以上。最后根据两者的结果进行综合评判得出定性半定量的染色强度结果^[6],至少随机观察 5-10 个 HPF,取其均值。结果判断在双盲下进行,每张切片有两位病理医师分别计数。

1.2.4 T-24 细胞培养 膀胱癌细胞株 T-24 采用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液、100 units/mL 青霉素及 100 mg/mL 链霉素于 37℃,5%CO₂ 进行培养。待细胞密度达 80%~90%后,无菌条件下用 0.25%的胰酶消化传代。

1.2.5 Si-RNA 干扰 NAC-1 干扰序列:5'-UGAUGUACACG UGGUGCCUGUCACCA-3',5'-CAGCAGAUCCUCAGCUUC UGCUACA-3',NC 序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCA CGUT T-3',由吉凯基因公司合成,转染试剂 si-RNA-mate 由吉凯基因公司购,转染前取 180 μL 预热的 RPMI 1640 培养基于无菌无酶的 EP 管中,将管中加入 8 μL 干扰序列,然后充分混匀,保证转染后干扰序列浓度为 80 nmol/mL。然后加入转染试剂 (siRNA-mate)更换培养基为不含双抗的血清培养基 1.8 mL,转染后 48 h 提取总 RNA 进一步分析。

1.2.6 qRT-PCR 检测 膀胱癌 T-24 细胞系中 NAC-1 对促血管生成因子(VEGF、bFGF、EGFR)的表达。Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,以 DEPC 水作为空白对照,根据紫外分光光度计测出 RNA 的浓度^[7],取 1 μL 总 RNA 应用试剂盒逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增条件:65℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 15 sec,60℃ 退火 50 sec,进行 40 个循环,置 4℃ 保存。引物由上海生工生物公司合成,NAC-1:上游引物:5'-AAGCTGAGGATCTGCTGGAA-3';下游引物:5'-CCAGAC ACTGCAGATGGAGA-3';VEGF:上游引物:5'-CTACCTCCA CCATGCCAAGT-3'下游引物:5'-GCAGTAGCTGCGCTGAT AGA-3';bFGF:上游引物:5'-TGCTGGCTTCTAAGTGT G-3'下游引物:5'-CAGCTCTTAGCAGACATT-3';EGFR:上游引物:5'-GGCCGACAGCTATGAGATGCA-3'下游引物:5'-A CCG-GCAGGATGTGGAGA-3'GAPDH - 上游引物 5'-CTCCTCCAC CTTTGACGCTG-3';下游引物 5'-CATACCAGGAAATGAGCT TGACAA-3',采用 siRNA 干扰技术抑制 NAC-1 的表达,siRNA 干扰后 24 h 提取 mRNA。然后用 qRT-PCR 检测干扰组及对照组 mRNA 的表达水平,结果分析:采用 2^{-ΔΔCt} 法分析。假设目的基因和参照基因扩增效率都接近 100%而且相对偏差不超过 5%,设 NAC-1 siRNA 干扰组为 Si,设阴性对照组为 NC。 $\Delta Ct(NC) = \text{目的基因 } CT(NC) \text{ 均数} - \text{参照基因 } CT(NC) \text{ 均数}$; $\Delta Ct(Si) = \text{目的基因 } CT(Si) \text{ 均数} - \text{参照基因 } CT(Si) \text{ 均数}$;目的基因的相对表达量为 $= 2^{-\Delta Ct}$;干扰组中目的基因表达量与正常组织中目的基因表达量的差异为 $= 2^{-\Delta Ct(Si) / 2^{-\Delta Ct(NC)}}$ 。

1.2.7 统计学方法 用统计软件 SPSS 19.0 进行分析,计数资料的比较采用卡方检验、Fisher 确切概率法;等级相关分析用 Spearman 相关。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NAC-1 在膀胱癌较癌旁组织中高表达

NAC-1 阳性着色定位于细胞核及细胞浆,均成片状或者弥漫状分布;在 88 例膀胱癌标本中,NAC-1 的阳性表达率为 79.54%(70/88);在 40 例膀胱癌旁组织标本中,NAC-1 阳性表达率只有 13.33%(4/30),显著要低于膀胱癌组织($P < 0.05$),见表 1、图 1。

2.2 NAC-1 在膀胱尿路上皮癌中的表达情况与临床病理参数的相关性

88 例膀胱癌组织中,79.54%(70/88)的膀胱癌组织存在 NAC-1 的表达。我们将这 88 例膀胱尿路上皮癌的病例分成两组:低表达组(0 或者 1+)及高表达组(2+ 或者 3+)。采用卡方检验分析表明:NAC-1 表达与膀胱癌病理分级,肌肉浸润以及淋

表 1 膀胱癌组织与癌旁组织中 NAC-1 表达的比较
Table1 Comparison of NAC-1 expression in bladder cancer tissues and para-carcinoma tissues

Groups	n	Immunointensity,n (%)		Positive ratio
		0 or 1+	2+ or 3+	
Bladder cancer	88	18	70	79.54
Para-carcinoma tissues	30	26	4	13.33

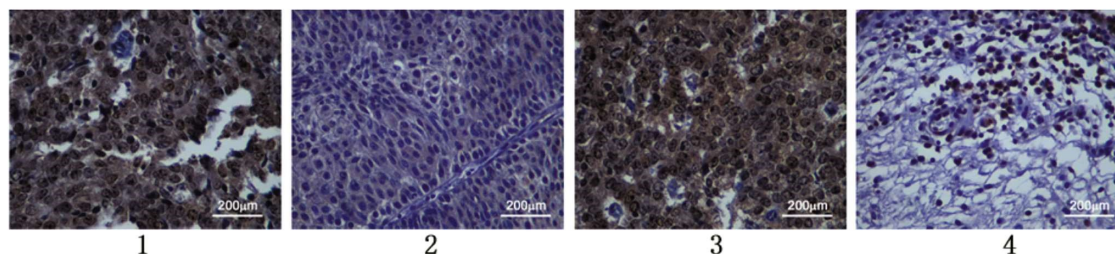


图 1 NAC-1 在膀胱癌和癌旁组织中的表达 (× 400)

1 膀胱癌组织 2 癌旁组织 3 高级别膀胱癌组织 4 低级别癌旁组织

Fig.1 NAC-1 expression in bladder cancer tissues and para-carcinoma tissues (× 400)

1 Bladder cancer tissues 2Para-carcinoma tissues 3 Advanced bladder cancer tissues 4 Low grade para-carcinoma tissues

巴结转移显著相关($P<0.05$),在高级别、肌肉浸润及淋巴结转移的膀胱癌中呈现高表达,其与膀胱癌患者的性别、年龄无明

显相关性($P>0.05$),见图 1,表 2。

表 2 NAC-1 与膀胱癌的临床病理因素的相关性

Table 2 Correlation between NAC-1 and the clinical pathological factors of the bladder cancer

Factors	Case no.	Immunointensity,n (%)		P-value
		0 or 1+	2+ or 3+	
Grade				
G1	37	20(54)	17(46)	0.006
G2 or G3	51	13(25)	38(75)	
Patients' age				
<60 y	56	24(42)	32(58)	0.170
≥ 60 y	32	9(28)	23(72)	
Gender				
Male	60	20(34)	40(66)	0.237
Female	28	13(46)	15(54)	
Lymphatic metastasis				
No	52	26(50)	26(50)	0.004
Yes	36	7(19)	29(81)	
Muscle violation				
No	39	9(23)	30(77)	0.008
Yes	49	24(49)	25(51)	

2.3 NAC-1 下调抑制促血管生成相关因子的表达

为了进一步研究 NAC-1 与膀胱癌血管生成的相关性,阐明 NAC-1 调节促血管生成因子(VEGF、bFGF、EGFR)的机制,本实验采用 si-RNA 干扰 NAC-1 的表达,然后通过 qRT-PCR 方法对促血管生成因子(VEGF、bFGF、EGFR)相关基因的 mRNA 水平进行定量分析。在 T-24 细胞中,发现 NAC-1 下调能够明显抑制促血管生成因子(VEGF、bFGF、EGFR)的表达(图 2)。

3 讨论

BTB/POZ 家族成员基因介导肿瘤发生发展的报道越来越多。这个家族的蛋白被发现参与很多生物过程,如:转录调节、细胞增殖、凋亡、细胞形态、离子通道组装及蛋白降解^[8,9]。NAC-1 作为 BTB/POZ 家族成员,首次被证实并克隆是在用可卡因治疗大鼠的伏核^[10]。这个伏核是控制前脑控制奖励刺激系

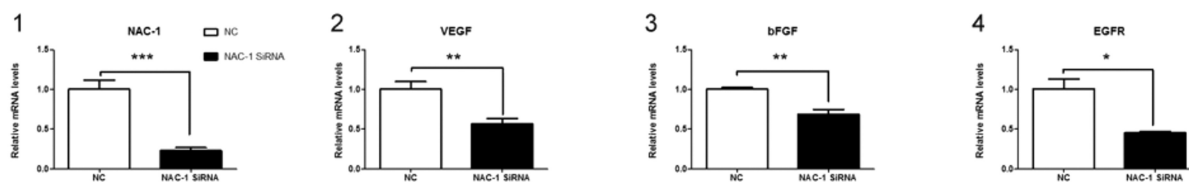


图2 沉默 NAC-1 后,qRT-PCR 检测 T-24 细胞中促血管生成相关因子 mRNA 表达变化

1 检测 NAC-1 敲除效率 2,3,4 显示 VEGF, bFGF, EGFR 在空白组和 si-RNA 组的 mRNA 表达水平

Fig.2. After silencing NAC-1, The expression of Pro-angiogenic factor mRNA in T-24 cells by qRT-PCR

1 Detection of NAC-1 knockout efficiency 2,3,4 Shows the mRNA expression level of VEGF, bFGF, EGFR in blank group and si-RNA group

统的特殊结构^[10-12]。既往研究发现 NAC-1 是肿瘤相关基因,因为在多种肿瘤中高表达,如:卵巢癌、子宫内膜癌等,并发现其与卵巢癌的进展及复发密切相关^[10]。并且发现其与卵巢癌的增殖转移相关^[13]。除此之外,有研究表明:子宫内膜癌中高表达 NAC-1 与患者的生存时间、病理分级及放疗后不良预后相关^[14-16]。NAC-1 能够通过调节 HMGB-1 而增强卵巢癌细胞的自噬的过程,从而引起卵巢癌对顺铂的耐药^[17],当然 NAC-1 功能失调能够激活细胞衰老抑制肿瘤细胞增生及癌变^[18]。尽管如此,膀胱癌中关于 NAC-1 与肿瘤的研究并未见报道,因此有关 NAC-1 的调控研究可能为膀胱癌的增殖转移机制提供新方向,为膀胱癌的治疗提供新靶点。

本研究通过免疫组化方法发现膀胱癌组织 NAC-1 的阳性表达率显著高于癌旁组织,说明 NAC-1 可能与膀胱癌的发生相关,这与既往 NAC-1 在卵巢癌中的研究结果是一致的;NAC-1 在高级别的膀胱癌中高表达且与肌肉侵犯及其淋巴结转移显著相关。提示 NAC-1 可能成为膀胱癌进展的生物学标志物,并可能为膀胱癌的治疗提供新的靶点。

众所周知,肿瘤的生长所需的营养主要靠丰富的血供,而肿瘤血管生成过程中,某些促血管生成因子起了非常重要的作用,血管生成因子 VEGF、bFGF 能加速血管内皮细胞有丝分裂的进程,诱导新血管生成,被认为是促进肿瘤血管生成的最强细胞因子^[19-21];EGFR 的过表达除了促进了肿瘤血管的生成外,还有助于肿瘤增殖^[22];本实验采用 si-RNA 干扰技术抑制 NAC-1 表达,发现 NAC-1 siRNA 能够明显下调促血管生成因子(VEGF、bFGF、EGFR)的表达,由此可知 NAC-1 与膀胱癌的生长有关。综合既往 NAC-1 在子宫内膜癌^[19-21]中的研究结果,考虑 NAC-1 可能作为判断膀胱癌生长、浸润及转移能力的重要指标。本次的细胞实验及组织实验进一步说明在膀胱癌中 NAC-1 的表达可促进膀胱癌的发生发展。

综上所述,NAC-1 的高表达在膀胱癌的生长过程中可能起了重要作用,同时可能导致膀胱癌的预后不良有关,如果将 NAC-1 的表达和膀胱癌发生发展的具体机制进一步研究清楚,NAC-1 可作为膀胱癌预防、治疗和预后评估的参考指标。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29
- [3] Siegel R L, Fedewa S A, Miller K D, et al. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(6): 457-480
- [4] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J].

CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108

- [5] Allchorne P, Lamb B W, Kinsella J, et al. Initial experience of intravesical gemcitabine for patients with high-risk superficial transitional cell carcinoma of the bladder following BCG failure[J]. Urol Nurs, 2014, 34(2): 95-99
- [6] Reiser-Erkan C, Erkan M, Pan Z, et al. Hypoxia-inducible proto-oncogene Pim-1 is a prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(9): 1352-1359
- [7] Xu X F, Li J, Cao Y X, et al. Differential Expression of Long Noncoding RNAs in Human Cumulus Cells Related to Embryo Developmental Potential: A Microarray Analysis [J]. Reprod Sci, 2015, 22(6): 672-678
- [8] Cha X Y, Pierce R C, Kalivas P W, et al. NAC-1, a rat brain mRNA, is increased in the nucleus accumbens three weeks after chronic cocaine self-administration[J]. J Neurosci, 1997, 17(18): 6864-6871
- [9] Roitman M F, Wheeler R A, Carelli R M. Nucleus accumbens neurons are innately tuned for rewarding and aversive taste stimuli, encode their predictors, and are linked to motor output [J]. Neuron, 2005, 45 (4): 587-597
- [10] Koob G F. Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis [J]. Neuron, 1996, 16(5): 893-896
- [11] Kalivas P W, Duffy P, Mackler S A. Interrupted expression of NAC-1 augments the behavioral responses to cocaine [J]. Synapse, 1999, 33 (2): 153-159
- [12] Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, et al. The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins[J]. Cell Growth Differ, 1995, 6(9): 1193-1198
- [13] Nakayama K, Nakayama N, Miyazaki K. Development of a novel ovarian cancer molecular target therapy against cancer-related transcriptional factor, NAC1 [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2013, 39(1): 18-25
- [14] Nakayama K, Nakayama N, Davidson B, et al. A BTB/POZ protein, NAC-1, is related to tumor recurrence and is essential for tumor growth and survival [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(49): 18739-18744
- [15] Ishikawa M, Nakayama K, Yeasmin S, et al. NAC1, a potential stem cell pluripotency factor expression in normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma [J]. Int J Oncol, 2010, 36(5): 1097-1103
- [16] Yeasmin S, Nakayama K, Ishibashi M, et al. Expression of the bric-a-brac tramtrack broad complex protein NAC-1 in cervical carcinomas seems to correlate with poorer prognosis [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(6): 1686-1691

(下转第 3038 页)

结果表明 CD166 基因的表达与 NSCLC 患者的年龄和性别无显著相关性,而与肿瘤 TNM 分期、肿瘤转移以及肿瘤分型存在显著相关性,该结果暗示 CD166 可能与肺癌肿瘤发张有关系;另外为了验证 CD166+ 细胞是否具有肿瘤干细胞的特性,我们将流式细胞仪分离出的 CD166+ 和 CD166- 细胞分别进行了肿瘤细胞成球试验、平板集落试验,并将两种细胞注射到小鼠体内,观察体内肿瘤形成能力的差异。细胞成球实验和平板集落试验结果表明 CD166+ 细胞的克隆形成能力显著的高于 CD166- 细胞,体内移植瘤试验表明 CD166+ 细胞在裸鼠体内肿瘤形成能力要显著高于 CD166- 细胞,提示 CD166 与肺癌的发生发展密切相关。

总之,本研究成功分离出了 CD166 阳性表达的肿瘤细胞,并证明其具有肿瘤干细胞的特征,为寻求新的、有效的非小细胞肺癌治疗方法奠定了一定的基础。但目前 CD166 对于肿瘤干细胞的调控机制尚不明确,是否存在其他因子对非小细胞肺癌的发生和发展进行调控仍需要进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Fong D, Yeh A, Naftalovich R, et al. Curcumin inhibits the side population (SP) phenotype of the rat C6 glioma cell line: towards targeting of cancer stem cells with phytochemicals [J]. *Cancer Lett*, 2010, 293(1): 65
- [2] Bora-Singhal N, Nguyen J, Schaal C, et al. YAP1 regulates OCT4 activity and SOX2 expression to facilitate self-renewal and vascular mimicry of stem-like cells[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6): 1705-1718
- [3] Karachaliou N, Rosell R, Viteri S. The role of SOX2 in small cell lung cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2013, 2(3): 172-179
- [4] Zhang DG, Jiang AG, Lu HY, et al. Isolation, cultivation and identification of human lung adenocarcinoma stem cells [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(1): 47-54
- [5] Honing J, Pavlov KV, Mul VE, et al. CD44, SHH and SOX2 as novel biomarkers in esophageal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy[J]. *Radiother Oncol*, 2015, 117(1): 152-158
- [6] Hayashi S, Fujita K, Matsumoto S et al. Isolation and identification of cancer stem cells from a side population of a humanhepatoblastoma cell line, HuH-6 clone-5[J]. *PediatrSurgInt*, 2011, 27 (1): 9
- [7] Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 41-50
- [8] Naik R, Han S, Lee K. Chemical biology approach for the development of hypoxia inducible factor (HIF) inhibitor LW6 as a potential anticancer agent[J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(9): 1563-1574
- [9] Li S, Li Q. Cancer stem cells and tumor metastasis [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(6): 1806-1812
- [10] Zhang H, Yang N, Sun B, et al. CD133 positive cells isolated from A549 cell line exhibited high liver metastatic potential [J]. *Neoplasma*, 2014, 61(2): 153-160
- [11] Lu C, Xu F, Gu J, et al. Clinical and biological significance of stem-like CD133+ CXCR4+ cells in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2015, 150(2): 386-395
- [12] Singh S, Bora-Singhal N, Kroeger J, et al. β -Arrestin-1 and Mcl-1 modulate self-renewal growth of cancer stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer[J]. *PLOS One*, 2013, 8(2): e55982
- [13] Wang JL, Yu JP, Sun ZQ, et al. Radiobiological characteristics of cancer stem cells from esophageal cancer cell lines [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(48): 18296-18305
- [14] Na L, Yu Y, Miao D, et al. GFP stable transfection facilitated the characterization of lung cancer stem cells [J]. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(12): 1079-1088
- [15] Zhao C, Setrerrahmane S, Xu H. Enrichment and characterization of cancer stem cells from a human non-small cell lung cancer cell line [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(4): 2126-2132
- [16] Okudela K, Woo T, Mitsui H. Downregulation of ALDH1A1 expression in non-small cell lung carcinomas its clinicopathologic and biological significance[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(1): 1-12
- [17] Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: Impact, heterogeneity and uncertainty[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 283-296
- [18] Krut FA, Schuringa. Apoptosis and cancer stem cells: implications for apoptosis targeted therapy [J]. *BiochemPharmacol*, 2010, 80(4): 423-430
- [19] Groenendijk FH, Mellema WW, Eline VDB, et al. Sorafenib synergizes with metformin in NSCLC through AMPK pathway activation[J]. *Int J Cancer*, 2014, 136(6): 1434-1444
- [20] Giuffrida D, Rogers IM. Targeting cancer stem cell lines as a new treatment of human cancer [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2010, 5(3): 205-218
- [21] Ma X, Duan Y, Tschudy-Seney B, et al. Highly efficient differentiation of functional hepatocytes from human induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2: 409-419
- [17] Zhang Y, Cheng Y, Ren X, et al. NAC1 modulates sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by altering the HMGB1-mediated autophagic response[J]. *Oncogene*, 2012, 31(8): 1055-1064
- [18] Zhang Y, Cheng Y, Ren X, et al. Dysfunction of nucleus accumbens-1 activates cellular senescence and inhibits tumor cell proliferation and oncogenesis[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 4262-4275
- [19] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases[J]. *J Biochem*, 2013, 153(1): 13-19
- [20] Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis [J]. *J Intern Med*, 2013, 273(2): 114-127
- [21] Przybylski M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis[J]. *J Wound Care*, 2009, 18(12): 516-519
- [22] Ahdi K S, Farajnia S, Ghiamirad M, et al. Development and evaluation of a single domain antibody against human epidermal growth factor receptor (EGFR)[J]. *Protein Expr Purif*, 2016, 120: 59-64

(上接第 3015 页)