

前列腺癌干细胞分离方法研究进展

郝玉美 贺欣 宋娜玲

【摘要】 前列腺癌是男性泌尿系统中常见的恶性肿瘤, 极易发展为激素难治性前列腺癌而难以治愈。近年来的研究认为前列腺癌干细胞是前列腺癌发生、发展、转移和复发的根源, 针对前列腺癌干细胞的靶向治疗可能是根治前列腺癌的有效途径, 但这些细胞所占比例极小, 几乎难以检测到, 目前的研究难点就在于前列腺癌干细胞的分离技术效率较低。故拟深入研究前列腺癌干细胞的功能, 首先必须有效地分离前列腺癌干细胞。该文就目前前列腺癌干细胞的几种主要分离方法的研究进展及存在的问题进行综述, 包括基于前列腺癌干细胞表面标志物的荧光激活细胞分选法、磁性激活细胞分选法和基于前列腺癌干细胞生物特性的侧群细胞筛选法、体外无血清聚球筛选法。

【关键词】 前列腺癌; 前列腺癌干细胞; 分离

Advanced research on separating prostate cancer stem cells HAO Yu-mei, HE Xin, SONG Na-ling. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: SONG Na-ling, Email: nalingsong@sina.com

【Abstract】 Prostate cancer is a common malignant tumor in male urinary system, and may easily develop into the hormone refractory prostate cancer which can hardly be cured. Recent studies had found that the prostate cancer stem cells may be the source of the prostate cancer's occurrence, development, metastasis and recurrence. The therapy targeting the prostate cancer stem cells may be the effective way to cure prostate cancer. But these cells is too low to be detected. The difficulty lies in the low separation efficiency of prostate cancer stem cell, so the effectively separating prostate cancer stem cells occupied the main position for the more in-depth research of prostate cancer stem cells. This paper reviews the research progress and existing problems on the several main separating methods of prostate cancer stem cells, includes the fluorescence activated cells sorting and magnetic activated cells sorting based on prostate cancer stem cell surface markers, the side-population sorting and serum-free medium sphere forming sorting based on prostate cancer stem cell's biology.

【Key words】 Prostate cancer; Prostate cancer stem cells; Separating

1 前列腺癌干细胞及其来源

长期研究发现, 原发性前列腺癌患者 10 年内的复发率高达 30%^[1]。雄激素全阻断治疗是目前针对中晚期前列腺癌的主要治疗方法, 但由此而导致的雄激素非依赖细胞的出现成为前列腺癌治疗的主要挑战之一^[2]。近年来的研究结果表明, 癌干细胞是肿瘤细胞的来源, 具有自我更新能力, 有能力

形成异质性肿瘤^[3], 在肿瘤的起始与形成中起着关键作用。癌干细胞很可能表达抗凋亡与抗药基因, 使其不受传统治疗方法的影响^[4-5], 从而引起肿瘤的复发与转移, 为了彻底根除肿瘤, 就必须靶向治疗癌干细胞。

目前关于哪种前列腺细胞是前列腺癌的细胞起源尚未明确, 主要存在两种观点: 一种认为腺分泌性上皮细胞是前列腺癌的细胞起源; 另一种认为基底上皮细胞是前列腺癌的细胞起源。腺分泌性上皮细胞表达细胞因子 8 和 18、雄激素受体 (androgen receptor, AR)、前列腺特异性抗原、前列腺酸性磷酸酶 (prostatic acid phosphatase, PAP) 与 15-脂氧合酶 2, 具有雄激素依赖性, 需要雄激素维持其生

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.05.011

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81272511); 中国医学科学院放射医学研究所探索基金(ST1313)

作者单位: 300192 天津, 北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室

通信作者: 宋娜玲 (Email: nalingsong@sina.com)

长。而基底上皮细胞则在组织学上较腺分泌性上皮细胞更深一层,表达细胞因子5、CD44、Bcl-2(一种细胞凋亡相关蛋白)、P63、端粒酶、谷胱甘肽巯基转移酶k,是雄激素非依赖性细胞,能在雄激素剥夺情况下生长^[6]。目前普遍认为,基底上皮细胞是前列腺癌上皮细胞的起源,从人前列腺癌组织样本的基底细胞中能成功分离出CD44⁺α2β1⁺CD133⁺细胞;鼠Lin⁻Sca-1⁺CD49f⁺(其中, Lin、Sca-1、CD49f均是细胞表面标志物)型基底细胞移植后能形成腺分泌性上皮细胞;取自人良性前列腺组织的基底细胞还可在免疫缺陷鼠体内形成前列腺癌^[7]。Goldstein等^[8]从人良性前列腺组织中分离出基底细胞与分泌细胞,用肿瘤基因转变它们,将这些细胞移植到小鼠体内,发现是基底细胞而非分泌细胞产生了与人体前列腺肿瘤极相似的前列腺肿瘤。此外,目前普遍认为前列腺癌的产生、复发与转移的根源是前列腺癌干细胞,所以前列腺癌干细胞也很可能位于基底上皮细胞内。雄激素会引起敏感细胞的凋亡,但却能提高一小部分细胞的抵抗性,即基底细胞中的前列腺癌干细胞^[9]。以上研究表明,前列腺癌干细胞在前列腺癌中起着关键作用,必须有效地分离前列腺癌干细胞才能对其展开更深入的研究。

2 前列腺癌干细胞的特性及分离

基于正常干细胞与癌干细胞的相似性,人们认为是正常前列腺干细胞的致癌性转化产生了前列腺癌干细胞,两者具有生物相似性,还可能共表达某些标志物,人们常利用这些标志物来分离前列腺干细胞和前列腺癌干细胞。但目前的迫切任务还是如何有效地分离前列腺癌干细胞。首先需要明确癌干细胞与正常干细胞的区别,正常干细胞的数量是恒定的,只有在组织受损时才会增多;而癌干细胞则随肿瘤的生长而增多,癌干细胞具有自我更新能力,且能产生异质性瘤细胞群体,具有更高的成瘤性。此外,癌干细胞分裂缓慢、生长周期长,这些特性使其能够逃避化疗的刺激,引起癌症的复发与转移。更重要的是,癌干细胞能够将药物泵出胞外,使其免受传统药物治疗的影响^[10]。正常前列腺干细胞被认为是AR型,能够产生前列腺上皮细胞系。与其相似,前列腺癌干细胞也不表达AR,然而它们能够在体内重建AR⁺肿瘤细胞群体,所以癌

干细胞能在雄激素剥夺环境下继续扩张,并使其具有对传统治疗的抵抗性及复发的能力。目前促进基底上皮细胞和分泌性上皮细胞AR表达的信号通路尚未明确^[9]。前列腺癌干细胞特异性标志物也尚未明确,但前列腺癌干细胞表面表达的CD44、CD133、α2α6整合素、c-met(一种具有受体酪氨酸激酶活性的蛋白)、CD166、乙醛脱氢酶1等与癌干细胞增殖、成瘤、侵袭和转移相关的标志物可能更多些。目前分离前列腺癌干细胞的方法主要有两大类,分别是基于前列腺癌干细胞的表面标志物和癌干细胞的生物学特性进行分选,所采用的细胞系多为PC3、LNCaP和DU145等。

2.1 基于前列腺癌干细胞表面标志物进行分选

2.1.1 荧光激活细胞分选(fluorescence activated cells sorting, FACS)

FACS又称流式细胞分选,是以目的细胞的特异性标志物为基础,用带荧光标记的特异抗体孵育细胞后上机检测,荧光经流式细胞仪激光激发来分选带荧光标记的目的细胞的方法。在过去的40年中,流式细胞术一直在多重细胞群体中个别类型细胞的高分辨率分选实验中居于领导地位,其分辨率高,极具应用价值,可通过细胞表面的标志物进行分选,也可根据胞内化合物进行分选^[11]。但由于目前前列腺癌干细胞的特异性标志物尚未明确,研究者们主要通过前列腺干细胞的标志物来分离前列腺癌干细胞,并通过将较小数量的细胞移植到有免疫功能的动物模型体内,通过观察其成瘤性来分析其干细胞特性^[12-14]。目前常用的标志物包括CD44、Sca-1、CD133、ATP结合转运蛋白G超家族成员2(ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)和整合素等^[9],其中,CD44、整合素α2β1及CD133是目前应用最广的。Patrawala等^[15]采用FACS技术从多种前列腺癌细胞系中分离了CD44⁺和CD44⁻细胞,并比较了它们在体内外的成瘤性,发现CD44⁺细胞具有高增殖、高克隆、高成瘤和高转移特性,且CD44⁺细胞拥有干细胞的本质属性,CD44⁺细胞中干细胞基因(如Oct-3/4、B细胞特异性莫洛尼鼠白血病病毒整合位点基因、β-连环蛋白基因和精胺氧化酶基因)的mRNA呈高水平表达,CD44⁺细胞可以产生CD44⁻细胞,AR⁻的CD44⁺细胞可以分化成AR⁺肿瘤细胞,且CD44⁺细胞呈不对称分裂,该研究证明CD44⁺细胞可能为前列腺癌干细

胞。此外, 还有研究表明, 以 CD44⁺α2β1^{hi}CD133⁺ 为标志物从人前列腺癌活检组织中分离出的基底癌干细胞, 可以在体外自我更新, 在分化条件下培养时还发现其可产生 AR⁺PAP⁺CK18⁺(其中, CK18 为细胞角蛋白 18)腺上皮细胞, 表明它们可能为原始的细胞群体^[10]。通过 α2β1^{hi}/CD133⁺富集的亚细胞群具有高增殖潜力, 拥有体外高克隆形成能力, 在免疫缺陷鼠体内还可重建功能性前列腺腺体, 并可分化为可表达 AR、前列腺特异性抗原的腺上皮细胞。最近, Lin⁻Sca-1⁺CD133⁺CD44⁺CD117⁺也被研究者用来纯化鼠前列腺干细胞, 将纯化的干细胞进行体内移植后会重建功能性前列腺组织。此外, Trop2⁺CD44⁺CD49f⁺(其中, Trop2 为一种细胞表面糖蛋白)也被用来鉴定基底干细胞, 此类细胞具有前列腺悬浮细胞球高形成能力及组织再生能力。也有学者利用乙醛脱氢酶 1 活性来分离前列腺干细胞^[3]。Jiao 等^[16]最近研究发现 CD166 在前列腺癌中高表达, 尤其是在激素难治性前列腺癌中, 其富集的 Lin⁻Sca-1⁺CD49f^{hi}CD166^{hi} 细胞群具有更强的悬浮细胞球形成能力, 表明 CD166 为前列腺癌干细胞标志物, 且还极可能为前列腺癌干细胞的特异性标志物, 可用于分离及鉴定前列腺癌干细胞。流式分选具有高速度、高灵敏度、高精度、高纯度及多参数等优点, 且分选较为简捷, 在前列腺癌干细胞分选方面有着巨大潜力, 但由于其是基于前列腺癌干细胞标志物而进行的分选, 故目前还需在前列腺癌干细胞特异性标志物方面展开更深入的研究, 以加快 FACS 富集前列腺癌干细胞的步伐。

2.1.2 磁性激活细胞分选(magnetic activated cells sorting, MACS)

MACS 又称免疫磁珠分选, 是基于细胞表面抗原能与连接有磁珠的特异性单抗相结合的原理, 在外加磁场中, 通过抗体与磁珠相连的细胞被吸附而滞留在磁场中, 无该特异性表面抗原的细胞由于不能与连接着磁珠的特异性单抗结合而没有磁性, 不能在磁场中停留, 从而使细胞得以分离, 获取所需目的细胞。Sheng 等^[17]通过 CD133⁺/CD44⁺ MACS 技术对 PC-3 细胞进行分选后发现, CD133⁺和 CD44⁺细胞分别占到了 99.09%和 99.88%, 而分离前其比例仅为 0.51%和 0.31%, 其又用无血清培养基 (serum free medium, SFM)法培养 CD133⁺/CD44⁺细胞, 发现细胞并不会凋亡, 而会形成可折射光、紧

密的悬浮细胞球, 经流式细胞分析发现, CD133⁺和 CD44⁺细胞分别占到了 84.8%和 99.82%, 与 MACS 所分离细胞的比例相近, 且 CD44⁺细胞比例几乎相等。研究者通过蛋白质印迹分析发现, 经转化生长因子 β 诱导分化的悬浮细胞球和 CD133⁺/CD44⁺细胞能够表达 PAP 和 AR, 而未经诱导的对照组则无 PAP 和 AR 表达。研究证明 MACS 和 SFM 可有效分离前列腺癌干细胞, 并可为该方面研究提供稳定的前列腺癌干细胞来源。此外, Castellón 等^[18]以前列腺癌患者的临床活组织为标本, 并以 CD133⁺/CD44⁺/ABCG2⁺/CD24⁻为标志物经 MACS 也分选到了前列腺癌干细胞, 且研究证明前列腺癌干细胞标志物的表达与前列腺癌患者的病理分期和癌症转移相关。MACS 技术是德国美天旎生物技术有限公司的专利产品, 该方法操作简便, 25~30 min 内即可完成, 特异度高, 且操作过程中无污染, 对细胞伤害小, 得到的细胞的生物学活性和功能不受影响, 可用于后续实验^[9]。FACS 和 MACS 两种方法的分离效率几乎相同, 但由于 FACS 的强剪切力、强激光损伤及高压等物理性过程会对细胞产生一定损伤, 不利于细胞的后续培养^[20]。故如果前列腺癌干细胞特异性标志物能够明确, 则 MACS 可谓具有极大的优越性, 可有效分离前列腺癌干细胞。

2.2 基于前列腺癌干细胞生物学特性进行分选

2.2.1 Side population(SP)细胞分选

最新研究发现, 根据干细胞的侧群特性也可富集前列腺癌干细胞, 癌干细胞表面的 ATP 结合盒转运子超家族(尤其是 ABCG2)能将结合 DNA 的 Hoechst 33342 荧光染料泵出胞外, 据此再与 FACS 技术联合可分离前列腺癌干细胞, 癌干细胞的这一特性使其具有抗药性。罗勇等^[21]通过 CD133⁺CD44⁺表型行 FACS 及 SP Hoechst 染料实验同时分离 Du145、IA8、LNCaP、TSU-Pr 及 PC-3 等 5 种前列腺癌细胞中的癌干细胞, 并对其增殖潜力及成瘤能力进行测定, 结果发现 CD133⁺CD44⁺在 5 种前列腺癌细胞中所占比例均很小, 而 SP 细胞在 Du145、IA8、LNCaP、TSU-Pr 中所占比例很高, 但在 PC-3 中未检测到, LNCaP/SP 比 LNCaP/NSP(其中, NSP 为 non-side population)细胞高表达整合素 α2、Nanog(一种胚胎干细胞关键蛋白)、CD44、OCT4(一种干细胞相关蛋白)及 ABCG2, 更具侵袭力及增殖力, 表

明 SP 细胞分选比目前所采用的 CD133⁺CD44⁺流式分选更适于富集前列腺癌干细胞,且 LNCaP/SP 细胞可能为前列腺癌干细胞群体的典型代表。殷波等^[22]通过 SP 细胞分选技术从 DU145 细胞中分离出了 1.1% 的 SP 细胞,将其培养于 SFM 中时会成簇生长,经 RT-PCR 检测这些 SP 细胞发现其较母系 DU145 细胞高表达 ABCG2,表明这些细胞具有干细胞特性。Chen 等^[23]利用干细胞 SP 特性经 FACS 分别从 TSU、PC3、LNCaP 中提取到 1.6%、0.8%、0.6% 的 SP 细胞,并对 TSU/SP 细胞进一步分析发现,TSU/SP 细胞较 TSU/NSP 细胞具有更强的克隆形成能力,且能形成更坚固、更紧密的单克隆细胞群体,相反,TSU/NSP 细胞形成的克隆群体则更小更分散,表明 SP 细胞在肿瘤的自我更新及增殖中起着关键作用,可能是前列腺癌干细胞。他们随后又进行了 SP 细胞鼠内移植成瘤实验,发现仅需 1×10^4 个 SP 细胞即可在鼠体内成瘤,而 NSP 细胞则需 5×10^6 个细胞,且 SP 细胞所形成的肿瘤更大,以上结果均表明 SP 细胞具有很强的成瘤能力,保留了前列腺癌干细胞的相关特性。但是,Platet 等^[24]发现取自大鼠 C6 脑胶质瘤细胞的 SP 细胞可以产生 NSP 细胞,相反 NSP 细胞也可以产生 SP 细胞,且 NSP 细胞拥有与 SP 细胞相同的成瘤性,因此在很多肿瘤中可以通过 SP 细胞分选来分离癌干细胞,但需注意的是 SP 细胞内包含干细胞,但 SP 细胞并不等同于干细胞,干细胞也可能存在于 NSP 细胞中。目前,SP 细胞分选是筛选肿瘤干细胞常用的方法,但该方法也有局限性,Hoechst33342 是一种 DNA 合成抑制剂,存在细胞毒性,且此方法并不稳定,很多因素会对 SP 细胞的分离鉴定产生影响,但当无法确定前列腺癌干细胞的表面特异性标志物时,它仍然是前列腺癌干细胞分离的有效方法之一,且比较实用,可用来分离前列腺癌干细胞并对其进行更深入的研究,此外,探讨其他更有效的分离方法也极为重要^[25]。

2.2.2 体外 SFM 悬浮细胞聚球分选

目前还有人采用体外 SFM 悬浮细胞聚球法来富集前列腺癌干细胞,此方法并不需要以前列腺癌干细胞标志物为基础,SFM 可以使癌干细胞保持在未分化状态,使其在 SFM 中呈悬浮细胞聚球生长,据此来分离前列腺癌干细胞。Fan 等^[26]认为流式细胞分选及 SP 细胞分选技术所分离的癌干细胞

数量极少,阻碍了前列腺癌干细胞的分离纯化,而获得足够数量的前列腺癌干细胞是前列腺癌干细胞靶向治疗的关键,他们通过体外 SFM 悬浮细胞聚球法培养人前列腺癌细胞系 PC3 和 LNCaP,并利用 SP 细胞分选技术、药敏实验和前列腺癌干细胞分子标志物分析来鉴定其干细胞特性。结果发现 PC3 悬浮细胞聚球中 CD44⁺/CD133⁺细胞的数量是黏附 PC3 细胞中 CD44⁺/CD133⁺细胞的 18 倍 (13.94% vs. 0.77%),SP 细胞数占到 3.1%,但黏附细胞中未检测到 SP 细胞,悬浮细胞球的抗铂化合物能力明显高于黏附细胞,而 LNCaP 在同样的培养环境下不能形成悬浮细胞球,表明此法可用于富集前列腺癌干细胞。Zhang 等^[27]通过悬浮细胞球培养法培养人前列腺癌细胞系 LNCaP、22RV1、DU145 和 PC3,发现悬浮细胞球的自我更新能力、抗药性和肿瘤形成能力均高于黏附细胞,此外,这些细胞的干细胞基因 Gli1(一种 Hedgehog 信号通路下游转录因子)、ABCG2、B 细胞特异性莫洛尼鼠白血病毒整合位点 1 基因还呈高水平表达。张波等^[28]和李奎庆等^[29]用 SFM(成分为 DMEM/F12 培养基+20 g/L 表皮生长因子+0.05 g/L 胰岛素+4 g/L 牛血清白蛋白+2% B27)培养人前列腺癌细胞系 PC3 和 LNCaP,发现其在 5~10 d 内可形成悬浮细胞球,且能传代,表明这些细胞具有自我更新及无限增殖能力,经流式鉴定其中含有较低比例(0.5%~15%)的 CD44⁺/CD133⁺及 SP 细胞,且当用 SFM 与含血清培养基(serum-supplied medium, SSM)交替培养时,可实现其与贴壁细胞的相互转化,表明这些细胞具有分化能力,但李奎庆等^[29]的研究表明,SSM 培养 LNCaP 和 PC3 时也可形成悬浮细胞球,与 SFM 间差异无统计学意义,且采用 SSM 法的周期更短,能更有效地分离癌干细胞,SSM 法是否也可用来分离前列腺癌干细胞还需进一步研究。以上结果均表明,悬浮细胞球培养法可以有效地分离前列腺癌干细胞,与目前常用的免疫磁珠分选等方法相比,不仅花费少,且技术简便,肿瘤干细胞的富集率高而且稳定,这将为前列腺癌干细胞的生物学特性研究与前列腺癌新治疗策略的开发提供极大便利。

3 小结与展望

综上,目前前列腺癌干细胞的分离与鉴定尚处于细胞水平,且由于前列腺癌干细胞特异性标志物

尚未明确, FACS 和 MACS 技术主要通过可能为前列腺癌干细胞特异性标志物的前列腺干细胞表面标志物进行分选, 此外, 由于不同类型前列腺癌的癌干细胞标志物可能存在差异, FACS 和 MACS 技术还尚未成熟, 故 SP 细胞分选及 SFM 悬浮细胞聚球分选在前列腺癌干细胞分离领域得到了广泛推广及研究, 而这两种方法虽未采用 FACS 和 MACS 技术, 但最终均需根据前列腺癌干细胞的标志物及其特性来进行结果鉴定。此外, 通过各方法所富集的亚细胞群是否能代表人体内的前列腺癌干细胞还有以下 3 点需考虑: ①由初始癌细胞而非癌细胞系富集的癌干细胞才最能代表前列腺癌干细胞, 然而由于技术及临床等的限制, 很难得到初始癌细胞; ②体外培养的细胞并非在体内环境下成长, 在长期培养过程中, 很可能发生了基因突变; ③体外培养的细胞很可能失去了其原始分化潜能, 不能很好地代表初始前列腺癌干细胞^[7]。所以对初始癌细胞的干细胞分选很重要, 由于前列腺癌干细胞特异性标志物的不确定性, 不能有效地分离前列腺癌干细胞, 为前列腺癌干细胞的研究及药物筛选带来了很大困难, 阻碍了现代肿瘤学的发展。故要想有效富集前列腺癌干细胞, 还需加快其标志物方面研究工作的步伐, 将前列腺癌干细胞分选与其特异性标志物的研究相结合, 将为有效分离前列腺癌干细胞带来极大便利, 也将为根治前列腺癌提供更好的研究平台。

参 考 文 献

- [1] Boorjian SA, Karnes RJ, Viterbo R, et al. Long-term survival after radical prostatectomy versus external-beam radiotherapy for patients with high-risk prostate cancer. *Cancer*, 2011, 117(13): 2883-2891.
- [2] Rajasekhar VK, Studer L, Gerald W, et al. Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF-kappa B signalling. *Nat Commun*, 2011, 2: 162.
- [3] Kasper S. Identification, characterization, and biological relevance of prostate cancer stem cells from clinical specimens. *Urol Oncol*, 2009, 27(3): 301-303.
- [4] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111.
- [5] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9339-9344.
- [6] Patrawala L, Calhoun-Davis T, Schneider-Broussard R, et al. Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: the CD44⁺α2β1⁺ cell population is enriched in tumor-initiating cells. *Cancer Res*, 2007, 67(14): 6796-6805.
- [7] Yu C, Yao Z, Jiang Y, et al. Prostate cancer stem cell biology. *Minerva Urol Nefrol*, 2012, 64(1): 19-33.
- [8] Goldstein AS, Huang J, Guo C, et al. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science*, 2010, 329(5991): 568-571.
- [9] Wang W, Eddy R, Condeelis J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(6): 429-440.
- [10] Wang G, Wang Z, Sarkar FH, et al. Targeting prostate cancer stem cells for cancer therapy. *Discov Med*, 2012, 13(69): 135-142.
- [11] O'Donnell EA, Ernst DN, Hingorani R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. *Immune Netw*, 2013, 13(2): 43-54.
- [12] Sidani M, Wessels D, Mouneimne G, et al. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *J Cell Biol*, 2007, 179(4): 777-791.
- [13] Maitland NJ, Collins AT. Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol*, 2008, 26(17): 2862-2870.
- [14] Liu T, Xu F, Du X, et al. Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinoma-initiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1. *Mol Cell Biochem*, 2010, 340(1-2): 265-273.
- [15] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Highly purified CD44⁺ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene*, 2006, 25(12): 1696-1708.
- [16] Jiao J, Hindoyan A, Wang S, et al. Identification of CD166 as a surface marker for enriching prostate stem/progenitor and cancer initiating cells. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42564[2013-06-08]. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0042564>.
- [17] Sheng X, Li Z, Wang DL, et al. Isolation and enrichment of PC-3 prostate cancer stem-like cells using MACS and serum-free medium. *Oncol Lett*, 2013, 5(3): 787-792.
- [18] Castellón EA, Valenzuela R, Lillo J, et al. Molecular signature of cancer stem cells isolated from prostate carcinoma and expression of stem markers in different Gleason grades and metastasis. *Biol Res*, 2012, 45(3): 297-305.
- [19] 耿珊, 张琛, 刘俊, 等. 免疫磁性活化细胞分选方法优化及纯化后细胞的生物学特性检测. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(7): 752-754.
- [20] Schriebl K, Satianegara G, Hwang A, et al. Selective removal of undifferentiated human embryonic stem cells using magnetic activated cell sorting followed by a cytotoxic antibody. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(9-10): 899-909.
- [21] 罗勇, 崔新浩, 姜永光, 等. 细胞株源人前列腺肿瘤干细胞的分选与鉴定. *中国男科学杂志*, 2012, 18(12): 1062-1068.
- [22] 殷波, 刘岗, 张辉, 等. 人前列腺癌细胞系 DU145 中肿瘤干细胞

- calcification by electron beam computed tomography predicts silent myocardial ischemia. *Circulation*, 2000, 101(3): 244–251.
- [35] Schenker MP, Dorbala S, Hong EC, et al. Interrelation of coronary calcification, myocardial ischemia, and outcomes in patients with intermediate likelihood of coronary artery disease: a combined positron emission tomography/computed tomography study. *Circulation*, 2008, 117(13): 1693–1700.
- [36] Uebles C, Becker A, Griesshammer I, et al. Stable coronary artery disease: prognostic value of myocardial perfusion SPECT in relation to coronary calcium scoring-long-term follow-up. *Radiology*, 2009, 252(3): 682–690.
- [37] Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, et al. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography) developed in collaboration with the Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention and the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(3): 378–402.
- [38] Chang SM, Nabi F, Xu J, et al. The coronary artery calcium score and stress myocardial perfusion imaging provide independent and complementary prediction of cardiac risk. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(20): 1872–1882.
- [39] Schepis T, Gaemperli O, Koepfli P, et al. Added value of coronary artery calcium score as an adjunct to gated SPECT for the evaluation of coronary artery disease in an intermediate-risk population. *J Nucl Med*, 2007, 48(9): 1424–1430.
- [40] Berman DS, Wong ND, Gransar H, et al. Relationship between stress-induced myocardial ischemia and atherosclerosis measured by coronary calcium tomography. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44(4): 923–930.
- [41] Haberl R, Becker A, Leber A, et al. Correlation of coronary calcification and angiographically documented stenoses in patients with suspected coronary artery disease: results of 1,764 patients. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37(2): 451–457.
- [42] Rosman J, Shapiro M, Pandey A, et al. Lack of correlation between coronary artery calcium and myocardial perfusion imaging. *J Nucl Cardiol*, 2006, 13(3): 333–337.
- [43] Wu MT, Yang P, Huang YL, et al. Coronary arterial calcification on low-dose ungated MDCT for lung cancer screening: concordance study with dedicated cardiac CT. *AJR Am J Roentgenol*, 2008, 190(4): 923–928.
- [44] Jacobs PC, Isgum I, Gondrie MJ, et al. Coronary artery calcification scoring in low-dose ungated CT screening for lung cancer: interscan agreement. *AJR Am J Roentgenol*, 2010, 194(5): 1244–1249.
- [45] Einstein AJ, Johnson LL, Bokhari S, et al. Agreement of visual estimation of coronary artery calcium from low-dose CT attenuation correction scans in hybrid PET/CT and SPECT/CT with standard Agatston score. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56(23): 1914–1921.
- [46] Mylonas I, Kazmi M, Fuller L, et al. Measuring coronary artery calcification using positron emission tomography-computed tomography attenuation correction images. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 2012, 13(9): 786–792.

(收稿日期: 2012-10-29)

(上接第 300 页)

- 样侧群细胞的分离. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(6): 1110–1112.
- [23] Chen Y, Zhao J, Luo Y, et al. Isolation and identification of cancer stem-like cells from side population of human prostate cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2012, 32(5): 697–703.
- [24] Platet N, Mayol JF, Berger F, et al. Fluctuation of the SP/non-SP phenotype in the C6 glioma cell line. *FEBS Lett*, 2007, 581(7): 1435–1440.
- [25] 钟永, 张叔人. 侧群细胞与肿瘤干细胞研究进展. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(24): 1914–1918.
- [26] Fan X, Liu S, Su F, et al. Effective enrichment of prostate cancer stem cells from spheres in a suspension culture system. *Urol Oncol*, 2012, 30(3): 314–318.
- [27] Zhang L, Jiao M, Li L, et al. Tumorspheres derived from prostate cancer cells possess chemoresistant and cancer stem cell properties. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(4): 675–686.
- [28] 张波, 范新兰, 林天歆, 等. 人 PC-3 细胞系中前列腺癌干细胞的富集与鉴定. *中山大学学报: 医学科学版*, 2010, 31(6): 878–883.
- [29] 李奎庆, 许可慰, 周邦奋, 等. 前列腺癌干细胞分离方法的对比及筛选. *中国组织工程研究*, 2012, 16(6): 1011–1014.

(收稿日期: 2013-06-08)