



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.011
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.011
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(2):219-224.

· 基础研究 ·

胆管癌干细胞的分离、培养及鉴定

王晓博¹, 邓小峰¹, 朱建伟¹, 刘志鹏¹, 马望², 耿艺维², 熊力¹, 文字¹, 苗雄鹰¹

(1. 中南大学湘雅二医院 普通外科, 湖南 长沙 410011; 2. 郑州大学第一附属医院 肿瘤科, 河南 郑州 450000)

摘要

目的: 从人胆管癌细胞系 QBC-939 中分离具有干细胞特征的肿瘤细胞, 为后续胆管癌干细胞的研究提供材料。

方法: 用无血清培养法及流式细胞分选法从 QBC-939 细胞中分离得到具有干细胞特征的 CD133⁺EpCAM^{high} 干细胞样细胞, 继续在无血清培养基中培养, 观察其成球能力, 并比较 CD133⁺EpCAM^{high} 干细胞样细胞与 QBC-939 细胞单克隆形成率、耐药性, 增殖能力, 干细胞相关核转录因子 OCT-4、Bmi-1、E-cadherin 蛋白表达情况, 以及 BALB/c 小鼠皮下移植后的成瘤能力。

结果: 在无血清培养基中, CD133⁺EpCAM^{high} 干细胞样细胞具有较强的成球能力。与 QBC-939 细胞比较, CD133⁺EpCAM^{high} 干细胞样细胞克隆形成率、洛铂耐药性、增殖明显增加; 干细胞相关核转录因子 OCT-4、Bmi-1 表达明显增加, 而 E-cadherin 表达明显降低; 皮下移植瘤形成率明显增加。以上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

结论: 从人胆管癌 QBC-939 细胞中分离的干细胞样细胞具有肿瘤干细胞特性, 可用于胆管癌干细胞的研究。

关键词

胆管肿瘤; 肿瘤干细胞; 肿瘤干细胞测定
中图分类号: R735.8

Isolation, cultivation and identification of cholangiocarcinoma stem cells

WANG Xiaobo¹, DENG Xiaofeng¹, ZHU Jianwei¹, LIU Zhipeng¹, MA Wang², GENG Yiwei², XIONG Li¹, WEN Yu¹, MIAO Xiongying¹

(1. Department of General Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China; 2. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract

Objective: To isolate from human cholangiocarcinoma QBC-939 cells, the tumor cells with stem cell properties and provide material for subsequent investigations on cholangiocarcinoma stem cells.

Methods: By means of serum-free culture and fluorescence-activated cell sorting, the CD133⁺EpCAM^{high} stem cell-like cells with stem cell properties were isolated from QBC-939 cells, and were continuously cultured in the serum-free medium for observing their sphere forming ability. Then, the colony formation rate, drug resistance and cell proliferation ability, and the expressions of stem cell-associated nuclear transcription factors that included

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81372628)。

收稿日期: 2015-12-15; 修订日期: 2016-01-16。

作者简介: 王晓博, 中南大学湘雅二医院硕士研究生, 主要从事普外科肿瘤方面的研究。

通信作者: 苗雄鹰, Email: 362802445@qq.com

OCT-4, Bmi-1 and E-cadherin, as well as the tumor formation ability after subcutaneous implantation in BALB/c mice were compared between CD133⁺EpCAM^{high} stem cell-like cells and QBC-939 cells.

Results: CD133⁺EpCAM^{high} stem cell-like cells showed a relatively strong sphere forming ability in the serum-free medium. In CD133⁺EpCAM^{high} stem cell-like cells compared with QBC-939 cells, the colony formation rate, resistance to lobaplatin, and proliferative ability were significantly increased; the OCT-4 and Bmi-1 protein expressions were up-regulated, while the E-cadherin protein expression was down-regulated; the rate of subcutaneous xenograft formation was significantly increased. All the differences had statistical significance (all $P < 0.05$).

Conclusion: The stem cell-like cells derived from cholangiocarcinoma QBC-939 cells possess stem cell properties, and can be used for cholangiocarcinoma stem cell research.

Key words

Bile Duct Neoplasms; Neoplastic Stem Cells; Tumor Stem Cell Assay

CLC number: R735.8

胆管癌是源自胆管上皮的恶性肿瘤^[1], 由于早期症状不典型, 因此早期诊断的误诊率很高, 导致手术切除率低且预后较差^[2]。肿瘤干细胞是肿瘤组织内能够自我更新并有能力再生肿瘤的一小部分细胞, 具有干细胞的自我更新和分化特性, 本课题立足于肿瘤干细胞学说, 通过无血清培养法及流式细胞分选法分离具有干细胞特性的胆管癌干细胞, 并验证其干细胞的生物学特性, 为将来针对胆管癌干细胞靶向治疗提供理论基础和研究模型。

1 材料与方法

1.1 材料

胆管癌细胞株QBC-939为本实验室保存, DMEM培养基、DMEM/F12培养基、胰蛋白酶、双抗和PBS缓冲液购自Hyclone公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 二甲基亚砜(DMSO)购自sigma公司, 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、干细胞培养添加剂B27购自Sigma公司, 超低黏附6孔板购自Corning公司, PE-anti CD133购自Miltenyi公司, FITC-anti ESA购自Biolegend公司。

1.2 细胞培养

1.2.1 普通细胞培养 使用10%胎牛血清+89.5%DMEM+0.5%双抗构成完全培养基, 细胞培养在37℃、100%湿度、5%(体积分数)的CO₂培养箱中培养胆管癌细胞株QBC-939, 待细胞密度达到80%时, 用胰酶消化, 1:3传代。

1.2.2 无血清培养法悬浮培养 使用DMEM/F12+EGF(20 ng/mL)+bFGF(20 ng/mL)+4%B27配成无血清培养基, 取对数生长期的胆管癌QBC-939细胞, 加入适量胰酶消化, 机械吹打成单细胞悬液后, 经细胞计数板计数后, 加入无血清培养基, 调整细胞密度为 5×10^3 /mL, 接种于超低黏附6孔板, 每孔2 mL(即每孔 10^4 个细胞), 使用倒置显微镜每日观察细胞变化, 在400倍条件下进行拍照, 每2~3天加入无血清培养基500 μL, 10 d后, 收集克隆细胞球, 将克隆细胞球吹散, 再置入超低黏附6孔板中继续传代培养扩增。

1.3 胆管癌干细胞分离

收集无血清培养的克隆细胞球, 1 000 r/min × 5 min离心, 倒掉上清液, 加入5 mL缓冲液, 吹打后再次离心, 倒掉上清液, 加入1 mL胰酶, 吹打成单细胞悬液, 加入完全培养基终止消化, 再次离心, 倒掉上清液, 加入3 mL缓冲液, 吹打均匀后再次离心, 倒掉上清液, 加入100 μL缓冲液, 吹打均匀, 加入10 μL PE-anti CD133和5 μL FITC-anti ESA, 冰上孵育20 min, 同时每种荧光抗体做荧光对照, 上机做流式细胞分选, 分选出CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞。

1.4 胆管癌干细胞培养

将分选的CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞吹打均匀, 使用细胞计数板进行细胞计数, 计数后以 10^4 个细胞接种在超低黏附6孔板上, 每孔加入2 mL无血清培养基, 置入37℃, 5% CO₂, 100%湿度条件下培养, 每2~3天加入无血清培养基500 μL, 10 d后, 收集克隆细胞球, 将克隆细胞球吹散, 再置入超低黏附6孔板中继续传代培养扩增。

1.5 胆管癌干细胞鉴定

1.5.1 单克隆形成率 将处于对数生长期的胆管癌 QBC-939 细胞和 CD133⁺EpCAM^{high} 干细胞样细胞消化,离心,加入 3 mL PBS 清洗,用无血清培养基重悬,使用细胞计数板计数后,加入 96 孔板中,每孔 1 个细胞,200 μ L 无血清培养基,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 100% 湿度条件下培养,隔天观察并记录肿瘤细胞球形成数目,观察肿瘤细胞球形成率,连续观察 1 周。

1.5.2 生长曲线 将处于对数生长期的胆管癌 QBC-939 细胞和 CD133⁺EpCAM^{high} 干细胞样细胞消化成单细胞悬液后使用细胞计数板进行计数,将细胞悬浮与普通完全培养基(10% 胎牛血清 +89.5% DMEM+0.5% 双抗)中,接种于 96 孔板中,每孔 200 μ L, 1 000 个细胞,分为 5 组,每组 4 个复孔,采用 MTT 比色法,逐日检测一组细胞吸光值。每孔加入 MTT 20 μ L,置于培养箱内孵育 4 h, 4 h 后,小心吸去孔内培养基,加入 100 μ L 二甲基亚砜(DMSO),置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD490 nm 处测量各孔的吸光值。

1.5.3 耐药实验 将处于对数生长期的胆管癌 QBC-939 细胞和 CD133⁺EpCAM^{high} 干细胞样细胞消化成单细胞悬液后使用细胞计数板进行计数,将细胞悬浮于普通完全培养基(10% 胎牛血清 +89.5% DMEM+0.5% 双抗)中,接种于 96 孔板中,每孔 200 μ L, 10⁴ 个细胞,分为 6 组,每组 4 个复孔,培养箱中培养 24 h 后,分别加入 0、5、10、20、40、80 μ g/mL 洛铂,置于培养箱中培养 96 h,采用 MTT 比色法检测各组吸光值。

1.5.4 蛋白质表达检测 裂解细胞后提取收集蛋白,按照 BCA 蛋白定量试剂盒(Wellbio)使用说明操作,测定蛋白浓度,取各组蛋白 50 μ g,计算各个样品所需取样量,分离蛋白后,电转移

至聚偏二氟乙烯膜上,用 1 \times TBST 配制 5% 脱脂奶封闭,室温放置 1 h,加入一抗 OCT-4 (1:500 稀释)、Bmi-1 (1:500 稀释)、E-cadherin (1:1 000 稀释)及 β -actin (1:4 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤后,加入稀释后的二抗与膜共同孵育 45~60 min。孵育结束, 1 \times TBST 洗 3 次,使用 ECL 化学发光液(Thermo)与膜孵育 3 min,在暗盒内与 X 胶片曝光数秒至数分钟,显影冲洗。

1.5.5 动物体内成瘤试验 将处于对数生长期的胆管癌 QBC-939 细胞和 CD133⁺EpCAM^{high} 干细胞样细胞消化成单细胞悬液后使用细胞计数板进行计数,用 PBS 洗 2 次后, PBS 重悬,将待测细胞收集后调整至所需浓度,选取 4~5 周龄的 BALB/c 雌性小鼠 30 只,随机分为 6 组,每组 5 只,于腹壁皮下注射细胞悬液 100 μ L,细胞数量分别为 10³、10⁴、10⁵ 个,将小鼠饲养在 25 $^{\circ}$ C 恒温无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)屏障系统内,连续观察 8 周,比较两组小鼠肿瘤形成率。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。所有实验均重复 3 次,试验结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用两样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD133⁺EpCAM^{high} 干细胞样细胞生长情况

将分离的细胞接种后,在无血清培养基中培养到第 10 天,可观察到数十个细胞组成的细胞,细胞之间紧密连接。表明干细胞样细胞可以在无血清的培养基中悬浮生长,并随着时间延长,细胞球逐渐增大,细胞数目逐渐增多(图 1)。

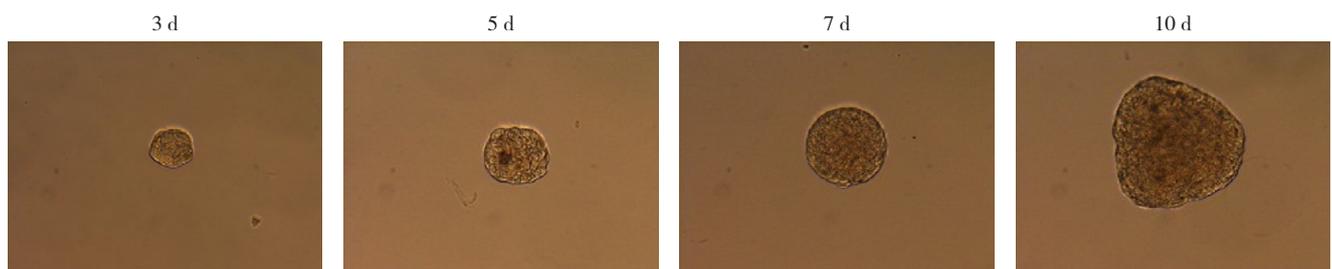


图 1 细胞成球实验 ($\times 400$)
Figure 1 Cell sphere forming assay ($\times 400$)

2.2 胆管癌细胞单克隆形成率

通过1周观察,胆管癌QBC-939细胞有9个孔(接种52个孔)、10个孔(接种54个)、9个孔(接种53个孔)形成细胞球,单克隆形成率分别为17.3%、18.5%、16.8%;而CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞有39个孔(接种54个孔)、38个孔(接种50个孔)、42个孔(接种57个孔)形成细胞球,单克隆形成率分别为72.2%、76.0%、73.7%;CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞单克隆形成率较QBC-939细胞明显增高($P<0.05$)。

2.3 生长曲线比较

通过测定每组细胞吸光值,CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞与胆管癌QBC-939细胞比较,吸光值增加($P<0.05$),说明将两种细胞培养相同的时间,干细胞样细胞数目明显增多,提示干细胞样细胞增殖速率快,同样符合干细胞特性(图2)。

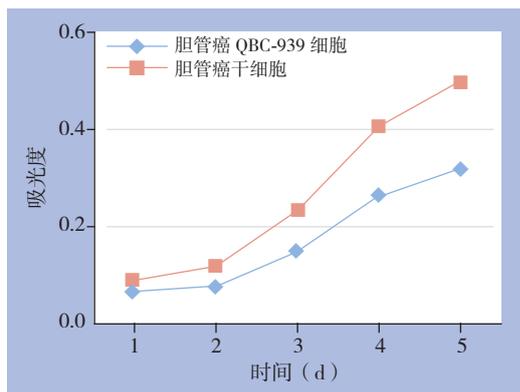


图2 细胞生长曲线

Figure 2 Cell growth curves

2.4 耐药实验

通过对比各组细胞吸光值,可见当加入洛铂浓度相同时(洛铂浓度小于40 $\mu\text{g}/\text{mL}$),CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞的吸光值明显高于胆管癌QBC-939细胞($P<0.05$)(图3),即干细胞样细胞存活数目高于普通细胞,CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞较胆管癌QBC-939细胞更耐药,符合干细胞耐药特性。

2.5 干细胞相关蛋白表达分析

Western blot法检测结果显示,CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞表达干细胞相关核转录因子OCT-4约为QBC-939细胞的1.62倍,Bmi-1约为2.4倍,而E-cadherin含量较低,约为0.51倍(图4)。

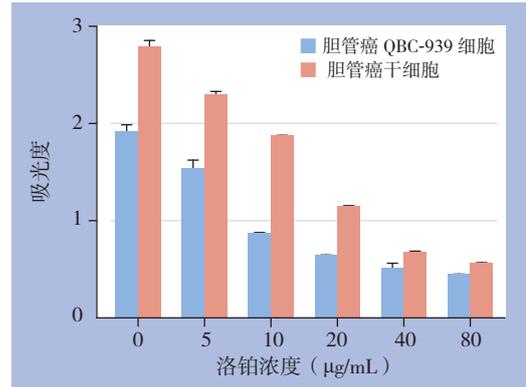


图3 细胞耐药试验

Figure 3 Drug resistance assay

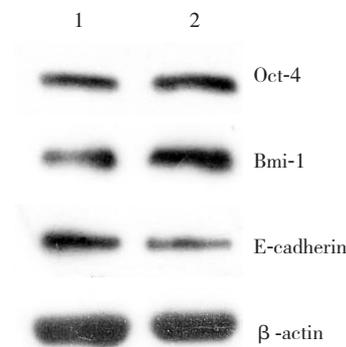


图4 Western blot 检测干细胞相关蛋白表达 1: QBC-939 细胞; 2: CD133⁺EpCAM^{high} 干细胞样细胞

Figure 4 Western blot analysis for expressions of the stem cell-associated proteins 1: QBC-939 cells; 2: CD133⁺EpCAM^{high} stem cell-like cells

2.6 致瘤性分析

将接种了肿瘤细胞的BALB/c雌性小鼠连续培养8周后,比较两组小鼠成瘤率显示,胆管癌QBC-939细胞在 10^3 个细胞时无法成瘤,而CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞在 10^3 个细胞时培养4周即有1只小鼠成瘤, 10^5 个细胞时成瘤率100%,可见CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞在小鼠体内成瘤率明显强于胆管癌QBC-939细胞($P<0.05$)(表1)。

表1 皮下移植瘤形成能力比较[n(%)]

组别	2周	4周	8周
QBC-939 细胞			
10^3 组	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
10^4 组	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)
10^5 组	0 (0.0)	2 (40.0)	3 (60.0)
CD133 ⁺ EpCAM ^{high} 干细胞样细胞			
10^3 组	0 (0.0)	1 (20.0)	2 (40.0)
10^4 组	0 (0.0)	2 (40.0)	4 (80.0)
10^5 组	1 (20.0)	5 (100.0)	5 (100.0)

3 讨论

胆管癌在胆道系统恶性肿瘤中占据首位,因早期症状不典型,导致误诊率很高,手术切除率低,术后易复发,患者5年生存率低,预后较差^[2]。肿瘤干细胞是肿瘤组织内具有自我更新和分化特性^[3]的一小部分细胞,所占比例非常小,一般只占细胞总数的0.01%~2%^[4],拥有与肿瘤和干细胞相关的信号传导通路。肿瘤干细胞理论认为,肿瘤干细胞比例与肿瘤恶性程度成正相关^[5],肿瘤复发、难以根治的主要原因是肿瘤的多耐药性^[6],已有研究^[7]证明,肿瘤干细胞具有化疗抗性,只有杀死全部的肿瘤干细胞,肿瘤才能被治愈。因此,针对干细胞的靶向治疗同传统抗癌疗法相结合的治疗方案可能可以有效控制癌症复发。

目前研究者常利用肿瘤干细胞表面特异性标记物来分离肿瘤干细胞^[8],主要包括流式细胞分选法(fluorescence-activated cell sorting, FACS)和免疫磁珠分选法(magnetic-activated cell sorting, MACS),另外还有一些其他方法,包括旁群细胞(side population, SP)分选法、无血清培养基(serum-free medium, SFM)分选法等,但其获得的肿瘤干细胞纯度、应用范围不如上述两种方法。迄今为止,已有多种肿瘤干细胞被从肿瘤组织或肿瘤细胞株分离获得, Sell等^[9]于1989年在化学诱导肝癌大鼠模型上提出了胆管癌干细胞的存在,有研究^[10]证明了肝干细胞/祖细胞自我更新机制的紊乱是胆管细胞癌发生的一个早期事件。然而,这些仍不足以解释胆管癌干细胞在胆管癌的发病机制中所起的作用。本研究中,利用干细胞特异性表面标记物EpCAM^[11-12]和CD133^[13-14],通过无血清培养法结合流式细胞分选法从胆管癌细胞系QBC-939中分离获得了CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞,结合了干细胞分离的两种方法,提高了干细胞纯度。

在单克隆形成试验中,胆管癌细胞系QBC-939和分离的CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞均可以形成肿瘤细胞球,但CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞的单克隆形成率明显高于胆管癌细胞系QBC-939,这证实这些细胞具有自我更新能力。通过比较两种细胞生长曲线,不难发现CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞繁殖速率较胆管癌细胞系QBC-939明显增快,符合干细胞一般特性。

肿瘤干细胞具有化疗抗性^[7],肿瘤干细胞能

表达ATP结合框转运体(ATP-binding cassette transporter, ABC),使其能泵出抗肿瘤药物和毒性物质;肿瘤干细胞类似正常干细胞的活跃的DNA修复能力以及抗凋亡能力同样有助于肿瘤在化疗中存活^[15],在耐药性试验中,CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞对化疗药的抵抗力明显强于胆管癌细胞系QBC-939,同样符合干细胞一般特性。

OCT-4是一种干细胞相关核转录因子^[16],在干细胞维持自我更新和全能性分化中起关键作用^[17]。Bmi-1在维持肿瘤干细胞的功能、更新中有重要作用,在肿瘤形成、复发及转移中具有决定性作用^[18-19]。E-cadherin是介导上皮黏附、阻止肿瘤细胞脱离原发灶,从而抑制肿瘤转移的关键分子,是经典Wnt通路的关键因子,CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞中OCT-4、Bmi-1表达高,E-cadherin表达低,且动物体内致瘤性明显高于普通胆管癌细胞,这表明CD133⁺EpCAM^{high}干细胞样细胞侵袭能力强,具有干细胞特性^[20-21]。

总之,胆管癌细胞系QBC-939中有一小部分肿瘤细胞,能够在无血清培养基中存活,并具有较强自我更新能力、繁殖能力和耐药性,且高表达干细胞相关蛋白,通过无血清培养和流式细胞分选法可以将这部分具有干细胞特性的胆管癌细胞分离出来,为后续肿瘤干细胞研究及靶向治疗奠定了基础。

参考文献

- [1] 李勇, 毕涛, 郝翠萍, 等. 胆管癌危险因素及其治疗研究进展[J]. 肝胆胰外科杂志, 2014, 26(2):166-169.
Li Y, Bi T, Hao CP, et al. Advance of Cholangiocarcinoma in Risk Factor and Treatment[J]. Journal of Hepatopancreatobiliary Surgery, 2014, 26(2):166-169.
- [2] 韩大力, 王克山, 于甬华. 胆管癌的诊断与治疗研究进展[J]. 山东医药, 2013, 53(42):100-103.
Han DL, Wang KS, Yu YH, et al. Advance of Cholangiocarcinoma in Diagnosis and Treatment[J]. Shandong Medical Journal, 2013, 53(42):100-103.
- [3] 宋凯, 杨硕菲, 吴俊华, 等. 肝癌干细胞的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(36):3704-3710.
Song K, Yang S F, Wu J H, et al. Advances in research on liver cancer stem cells[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(36):3704-3710.
- [4] 宋东颖, 王毅, 孙岚, 等. 肿瘤干细胞理论及肿瘤干细胞分离和鉴

- 定研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(5):674-679.
- Song DY, Wang Y, Sun L, et al. Progress in tumor-stem cell theory and tumor stem cells isolation and identification[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2012, 26(5):674-679.
- [5] Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer[J]. J Clin Invest, 2004, 113(2):160-168.
- [6] 尤琪, 陈晨, 张苑珑, 等. 肿瘤干细胞研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2009, 36(3):228-230.
- You Q, Chen C, Zhang YL, et al. Research Development on Tumor Stem Cells[J]. Journal Of International Obstetrics And Gynecology, 2009, 36(3):228-230.
- [7] 储亮, 黄强, 董军, 等. 肿瘤干细胞的耐药性及其治疗策略[J]. 中国新药与临床杂志, 2006, 25(11):868-872.
- Chu L, Huang Q, Dong J, et al. Drug resistance of tumor stem cells and strategy of therapy[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2006, 25(11):868-872.
- [8] 王瑞海. 肿瘤干细胞的分离培养及生物学特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(27):5087-5090.
- Wang RH. Isolation, culture and biological characteristics of cancer stem cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(27):5087-5090.
- [9] Sell S, Dunsford HA. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma[J]. Am J Pathol, 1989, 134(6):1347-1363.
- [10] Chiba T, Zheng YW, Kita K, et al. Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation[J]. Gastroenterology, 2007, 133(3):937-950.
- [11] 张丽, 张声. EpCAM的表达与肿瘤的发生和发展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31(4):323-327.
- Zhang L, Zhang S. EpCAM in the pathogenesis and development of tumors[J]. Journal of International Pathology and Clinical Medicine, 2011, 31(4):323-327.
- [12] Yamashita T, Budhu A, Forgues M, et al. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2007, 67(22):10831-10839.
- [13] Zhu Z, Hao X, Yan M, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2010, 126(9):2067-2078.
- [14] Fan L, He F, Liu H, et al. CD133: a potential indicator for differentiation and prognosis of human cholangiocarcinoma[J]. BMC Cancer, 2011, 11:320. doi: 10.1186/1471-2407-11-320.
- [15] 李媛, 周建伟, 李惠良. 克服肿瘤干细胞耐药性的策略和思路[J]. 医学与哲学: 临床决策论坛版, 2011, 32(3):31-33.
- Li Y, Zhou JW, Li HL. Strategies to Overcome Drug Resistance of Cancer Stem Cells[J]. Medical and Philosophy, 2011, 32(3):31-33.
- [16] Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, et al. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4[J]. Cell Res, 2002, 12(5/6):321-329.
- [17] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells[J]. Cell, 2005, 122(6):947-956.
- [18] Wu Z, Min L, Chen D, et al. Overexpression of BMI-1 promotes cell growth and resistance to cisplatin treatment in osteosarcoma[J]. PLoS ONE, 2011, 6(2):e14648. doi: 10.1371/journal.pone.0014648.
- [19] 王攀, 赵会传, 曾同祥. Bmi-1基因在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(7):1217-1219.
- Wang P, Zhao HC, Zeng TX. Advances in the Studies on Relationship between Bmi-1 Gene and Caners[J]. Medical Recapitulate, 2015, 21(7):1217-1219.
- [20] 尹文琤, 李鸿雁, 马力文. E-cadherin、 β -catenin和MMP-7在胆管癌中的表达及意义[J]. 癌症进展, 2012, 10(6):620-626.
- Yin WZ, Li HY, Ma LW. Expression of E-cadherin, p-eatenin, M M P-7 and their Significances in Cholangiocarcinoma[J]. Oncology Progress, 2012, 10(6):620-626.
- [21] 邓小峰, 王晓博, 熊力, 等. 胆管癌干细胞研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(2): 265-269.
- DENG Xiaofeng, WANG Xiaobo, XIONG Li, et al. Research advances in cholangiocarcinoma stem cells[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(2): 265-269.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 王晓博, 邓小峰, 朱建伟, 等. 胆管癌干细胞的分离、培养及鉴定[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(2):219-224. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.011

Cite this article as: Wang XB, Deng XF, Zhu JW, et al. Isolation, cultivation and identification of cholangiocarcinoma stem cells[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(2):219-224. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.011