

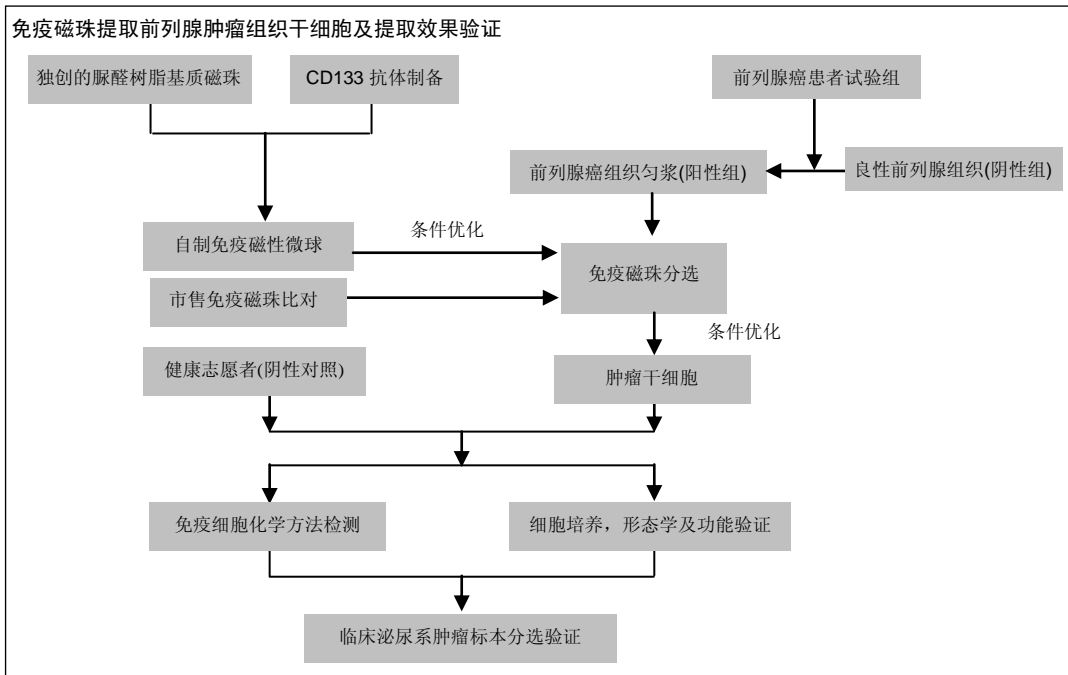
自制免疫磁珠在前列腺肿瘤组织干细胞提取中的应用

龚锐¹, 李胜英², 霍志霞³, 丁浩⁴, 孙二琳⁴(¹天津医科大学第二医院药学部, 天津市 300211; ²天津市儿童医院检验科, 天津市 300070; ³天津大学药物科学与技术学院, 天津市 300050; ⁴天津医科大学第二医院泌尿外科, 天津市泌尿外科研究所, 天津市 300211)

引用本文: 龚锐, 李胜英, 霍志霞, 丁浩, 孙二琳. 自制免疫磁珠在前列腺肿瘤组织干细胞提取中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(1):36-41.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.007 ORCID: 0000-0001-9268-1357(龚锐)

文章快速阅读:



龚锐, 女, 1975年生, 山东省掖县人, 硕士, 主管药师, 主要从事药物分析方面的研究。

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2016)01-00036-06
稿件接受: 2015-10-26
http://www.crter.org

文题释义:

免疫磁珠细胞分选技术: 免疫磁珠细胞分选方法可以在几分钟内从复杂的细胞混合物中分离出很高纯度的目的细胞。免疫磁珠的体积很小, 不会对细胞造成机械性压力, 且孵育时间短、操作过程快, 阳性分选出的细胞可立即用于分析和随后的实验。

肿瘤干细胞的分选: 肿瘤干细胞在肿瘤组织中只占 0.02%-0.1%, 但其具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞, 分选高纯度的肿瘤干细胞在肿瘤组织的生长、转移和复发研究中具有重要意义。

摘要

背景: 有效分离干细胞是前列腺癌发生发展研究的基础, 目前的主流方法是免疫磁珠分选。

目的: 应用自制的免疫磁珠分选前列腺肿瘤组织中的 CD133⁺/CD44⁺细胞, 并进一步培养和传代进行免疫学鉴定, 以确定免疫磁珠分选效果。

方法: 应用独创的磁珠制备免疫磁珠, 分选肿瘤组织中细胞膜表达 CD133 和 CD44 的细胞。观察分选细胞无血清培养成球情况, 及传代后其在形态学、增殖能力方面与标准肿瘤细胞株的差异, 并用免疫荧光法检测其特异性抗体的表达。

结果与结论: 制备的免疫磁珠粒径小、分选效果佳。分选的细胞成球效果好, 培养传代后的细胞依旧明显表达 CD133 和 CD44 抗原。分选的细胞非诱导培养后可见多种形态, 生长旺盛。转化生长因子 β 诱导培养后细胞形态较单一且生长缓慢。两组细胞与标准肿瘤细胞株培养后的增殖情况差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。结果表明应用自制免疫磁珠从肿瘤细胞中分选的 CD133⁺/CD44⁺细胞经过初步形态及功能鉴定具有干细胞特性, 可为前列腺癌干细胞的提取及进一步培养研究奠定基础。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 免疫磁珠细胞分选; CD133; CD44

主题词:

肿瘤干细胞; 免疫磁化分离; 抗原, CD44; 组织工程

基金资助:

天津市卫生和计划生育委员会科技基金(2014KZ093)

Gong Rui¹, Li Sheng-ying², Huo Zhi-xia³, Ding Hao⁴, Sun Er-lin⁴
 (1)Pharmaceutical Department, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; (2)Clinical Laboratory, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300070, China; (3)School of Pharmacology Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300050, China; (4)Department of Urology, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China)

Gong Rui, Master, Pharmacist in charge, Pharmaceutical Department, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

Subject headings: Neoplastic Stem Cells; Immunomagnetic Separation; Antigens, CD44; Tissue Engineering
Funding: the Science and Technology Fund of Tianjin Public Health Bureau, No. 2014KZ093

Extraction of prostate cancer stem cells using self-designed magnetic beads

Abstract

BACKGROUND: Effective sorting of prostate cancer stem cells is the basis of experimental studies in prostate cancer developing. The most common sorting method is magnetic-activated cell sorting.

OBJECTIVE: To separate CD133⁺/CD44⁺ cells in prostate cancer tissues using self-designed magnetic beads followed by culture, passage and immunological identification.

METHODS: Self-designed magnetic microspheres were applied to establish immunomagnetic beads to sort CD133⁺/CD44⁺ cells in prostate cancer tissues. The sorted cells were cultured in serum-free medium. The sphere formation, cell morphology, and proliferation ability after cell passage were statistically compared between the sorted cells and the normal tumor cell lines. Immunofluorescence detection was performed to detect the expression of specific antibodies.

RESULTS AND CONCLUSION: Self-designed immunomagnetic beads had small diameter and a high-sorting effect. The sorted cells possessed a high capacity of microsphere formation. After cell culture and passage, the cells highly expressed CD133 and CD44 antigens. The sorted cells with no induction had varying shapes and grew vigorously. After induction with transforming growth factor- β , the cultured cells were noted to have a single shape and grow slowly. The cell proliferation ability of sorted cells in these two groups differed significantly from that of the normal cancer cell lines (both $P < 0.05$). In conclusion, the CD133⁺/CD44⁺ cells sorted from prostate tumor cells possessed cell morphology and function characteristics of stem cells which can provide a basis for extraction and culture of prostate cancer stem cells.

Cite this article: Gong R, Li SY, Huo ZX, Ding H, Sun EL. Extraction of prostate cancer stem cells using self-designed magnetic beads. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):36-41.

0 引言 Introduction

前列腺癌干细胞是前列腺癌的起始细胞,不仅可以分化成前列腺癌细胞,还具有自我更新能力。前列腺癌细胞来源于正常干细胞,而正常的干细胞分化为基底上皮细胞与管腔上皮细胞。少量管腔上皮(Luminal)型干细胞即可对小鼠致癌^[1]。管腔上皮特异性(Luminal-specific)启动子目前受瞩目的有probasin及PSA(prostate-specific antigen)^[2]。基底上皮干细胞Trop2和CD49高表达也已经证实与前列腺致癌性相关^[3-4]。体外实验证明只有表达正常前列腺干细胞标志($\alpha 2\beta 1$ /CD133/CD44)的癌细胞在体外具有自我更新能力,约占0.1%的前列腺癌细胞表现出这种表型,且与前列腺癌分级没有相关性。同时前列腺癌干细胞也表达CKs 5/14, p63, AMACR或TMPRSS2-ERG fusion gene等多个标志物^[5]。

有效分离前列腺癌干细胞是研究的基础,目前的主流方法是以免疫磁珠分选(magnetic bead cell sorting, MACS)和流式分选(FACS)为主。免疫磁珠分选技术已用于胶质母细胞瘤、胰腺癌、直肠癌等肿瘤干细胞的分选^[6-8]。

实验拟采用自主研发的纳米级磁珠结合公认的前列腺癌干细胞标记物CD133及CD44双阳性分选前列腺肿瘤组织中的目的细胞^[9-10],观察MACS分选干细胞的可靠性和有效性,并为进一步探索干细胞的生物学特性研究奠定基础,为干细胞靶向治疗研究提供来源。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年6月至2015年4月在天津医科大学第二医院、天津市泌尿研究所实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 肿瘤组织 临床手术获得Gleason 7-8级患者的前列腺癌组织,取材部位为基底细胞富集区域(苏木精-伊红染色切片定位)。

1.3.2 实验试剂和仪器 人前列腺癌PC-3细胞株(天津市泌尿研究所传代培养细胞库); DMEM/F12(美国Invitrogen公司); 胎牛血清(Gibco公司); 0.25%胰蛋白酶、PBS、 β -巯基乙醇(天津盛鑫源伟业); 人表皮生长因子、人碱性成纤维生长因子、人白血病抑制因子(美国PeproTech公司); CD133/CD44磁珠分选试剂盒(自主研发),磁珠分选架(天津大学Baseline); 单克隆抗体、PE标记CD133荧光抗体和FITC标记的CD44荧光抗体(德国美天旎公司); FITC标记的兔抗鼠荧光二抗(美国PeproTech公司); 全自动荧光酶标仪(奥地利TECAN公司); SIGMA 500/VP高分辨率场发射扫描电镜(德国ZEISS公司); IX73倒置荧光显微镜(日本Olympus公司); 凝胶成像仪(美国Bio-RAD公司)。

1.4 方法

1.4.1 脲醛树脂基质免疫磁珠的制备 取脲醛树脂复合磁性微球进行表面修饰,得到表面含有羧酸钠的磁球,用0.5 mol/L盐酸与上述反应产物在室温下机械搅拌1 h,即得到羧基脲醛树脂磁性微球。向磁性微球悬液中加入丙烯醛,经电子加速器照射使微球表面形成一层活性膜后,分别与CD44 antibodies, human (clone: DB105)及CD133/1 (AC133) antibodies, human (clone: AC133)共同孵育15 h再以MPC磁力架回收磁珠,即为免疫磁珠。经过优化实验,最终制备的免疫磁珠质量浓度为1 g/L,结合的单抗为20 μ g。

免疫荧光验证: 将包被了CD44/CD133单抗的免疫磁珠用0.01 mol/L PBS(pH=7.4)洗涤直至上清中的蛋白浓度为0, 取2份样品分别加入含5%BSA的PBS和5%脱脂奶粉的PBS, 其体积为原磁珠体积的2倍, 37 °C温箱孵育1 h, 在外加磁场作用下进行磁性分离后, 用0.01 mol/L PBS(pH=7.4)洗涤3-5次进行封闭。分别加入相同量的二抗(PE标记的兔抗鼠IgG), 在37 °C温箱内避光湿孵30 min, 用PBS洗涤3-5次后, 共聚焦显微镜成像。

1.4.2 肿瘤组织处理 取Gleason 7-8级患者的前列腺癌组织, 取材部位为基底细胞富集区域(苏木精-伊红染色切片定位), 按Olumi等^[11]方法处理肿瘤组织, 培养板预孵小牛血清, 孵箱内烘干备用。手术切除的癌组织于含500 U/mL青霉素, 500 U/mL链霉素的D-Hank's中浸泡10 min, D-Hank's漂洗后用眼科剪剪至2 mm²大小, 0.125%胰蛋白酶消化15 min, 过200 μm不锈钢筛网, 离心, 洗涤。在含有青霉素、链霉素的RPMI1640培养液中加入0.5 g/L两性霉素B, 0.1 g/L庆大霉素, 25 mmol/L HEPES, 体积分数为10%胎牛血清, 225 U/mL胶原酶和125 U/mL透明质酸酶, 37 °C培养16-18 h。培养过程中始终轻柔振荡, 视培养情况半量换液。将上述方法获得的单细胞悬液放入含体积分数为5%胎牛血清及1 nmol/L睾酮的RPMI1640培养液中即可持续传代培养。

1.4.3 双阳性抗体免疫磁珠分选 显微镜下确定细胞数, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 。300×g离心10 min, 重悬于500 μL PBS中, 加入FcR 100 μL, 然后添加CD133免疫磁珠100 μL, 4 °C避光孵育30 min, 300×g离心10 min, 重悬于500 μL缓冲液。安置磁力架和分离柱(自制, 注册商标: 中国天津大学baseline), 冲洗3遍, 将细胞于分离柱中缓慢下流, 冲洗3遍, 移开磁力架, 快速用缓冲液冲洗得到CD133⁺细胞。将CD133⁺细胞用含体积分数为10%胎牛血清及0.1 mmol/L β-巯基乙醇的DMEM/F12培养16-20 h。用上述方法继续进行CD44免疫磁珠分选, 得到CD133⁺/CD44⁺细胞。

1.4.4 serum-free culture(SFM)培养及荧光检测 将分选后得到的CD133⁺/CD44⁺细胞用添加了20 μg/L表皮细胞生长因子(EGF)、20 μg/L成纤维细胞生长因子(bFGF)、20 μg/L白细胞抑制因子(LIF)的DMEM/F12培养基培养, 每三四天换液1次, 培养八九天后重悬, 置于共聚焦培养皿过夜。室温下40 g/L多聚甲醛固定20 min, PBS清洗3次, BSA封闭30 min, 分别加CD133/1 (AC133)-PE及CD44-FITC, human各染色20 min, DAPI染色10 min, 甘油封固后荧光显微镜下观察。

1.4.5 诱导分化后细胞增殖能力检测 取CD133⁺/CD44⁺细胞以200 μL的PBS重悬至 2×10^3 , 诱导分化组(组1)用含有体积分数为1%胎牛血清、5 μg/L转化生长因子β的DMEM/F12培养, 非诱导组(组2)则用含有体积分数为1%胎牛血清的DMEM/F12培养, 对照组(组3)

为标准PC3细胞系(天津医科大学泌尿研究所提供), 用含体积分数为1%胎牛血清的DMEM/F12培养。细胞接种于96孔板, 每组各接种21孔, 空白培养基调零, 置于孵箱内培养7 d。每天3组内随机各取3孔添加5 g/L的MTT (20 μL/孔), 继续培养4 h, 加二甲亚砷200 μL振荡混匀后使用酶标仪在570 nm波长处检测吸光度值, 取平均值, 描绘生长曲线, 据Patterson公式 $TD = T \times \lg 2 / \lg (N_t / N_0)$ 计算倍增时间(TD: 倍增时间, T: 培养天数, N₀: 初始细胞数, N_t: T天后细胞数)。

1.5 主要观察指标 ①各组在不同时间点细胞的数量(以吸光度值衡量), 细胞的生长状态及成球状态。②目的细胞培养前后荧光染色情况。

1.6 统计学分析 采用SPSS 18.0统计软件对数据进行处理。CD133⁺/CD44⁺诱导前后组与前列腺癌标准细胞系组比较采用配对样本t检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧), $P \leq 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 免疫磁珠的表征 经电镜观察, 所制备的免疫磁珠微球粒径小, 平均直径大约200 nm, 因而悬浮稳定性好。比表面积大, 偶联配基容量相对较高, 因而容量相对较少, 表面光滑。高倍数电镜下可见微球表面具有丰富的可利用官能团(图1), 可结合大量单抗抗体, 增强分选效果。免疫荧光电镜下可见结合的单抗密度高, 分布均匀(图2)。

2.2 免疫磁珠细胞分选 处理后的肿瘤组织经CD133免疫磁珠初次分选, 可见大量的细胞中只有0.5%左右的细胞表面表达CD133, 因此可被磁珠吸附, 而不表达CD133的细胞则不能结合免疫磁珠(图3)。经CD133与CD44免疫磁珠双分选后非目的细胞已基本筛除。目的细胞占0.1%左右, 其表面被免疫磁珠包裹, 细胞形态完整(图4)。

2.3 SFM培养类干细胞球 分选的CD133⁺/CD44⁺细胞数量较少, 增殖周期28-30 h, 一般需要1周左右才可以形成小的干细胞球。将免疫磁珠分选的CD133⁺/CD44⁺细胞经连续9 d的SFM培养, 可形成细胞球。球体较为紧密, 周围未见明显的细胞碎片或者死细胞(图5), 表明CD133⁺/CD44⁺细胞在SFM加生长因子的条件下具有类干细胞的成球能力, 而且细胞成球效果更好。

2.4 细胞倍增时间 诱导分化组(组1)、非诱导组(组2)、对照组(组3)培养第7天时细胞数分别是 4.1×10^3 、 3.5×10^5 、 4×10^4 个, 倍增时间分别为185.28、28.58、38.06 h, 诱导分化组为转化生长因子β抑制的CD133⁺/CD44⁺细胞组, 7 d培养未能发生倍增。非诱导组为非抑制细胞在2 d内发生了倍增, 经7 d培养, 细胞活率维持在95%以上。非诱导组较对照组即PC3对照细胞倍增时间缩短了1 d左右(图6)。诱导分化组与对照组经t检验比较, 差异有显著性意义($t = 39.8$, $P = 0.001$); 非诱导组与对照组经t检验比较, 差异有显著性意义($t = 11.4$, $P = 0.008$)。

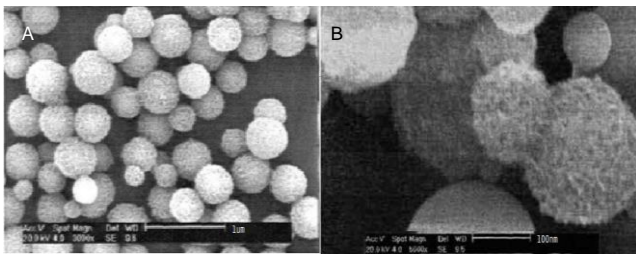


图1 免疫荧光磁珠电镜成像图

Figure 1 Photomicrography of magnetic beads by electron microscopy

图注: 图中A为低倍电镜下(10 000倍)的磁珠, 可见粒径较均匀, 表面光滑; B为高倍电镜下(100 000倍)的磁珠, 可见表面有丰富的结合位点, 可结合较多的目的抗体。

2.5 细胞增殖情况 非诱导组CD133⁺/CD44⁺细胞在培养初呈悬浮状态, 圆形体积较小, 4 d后出现少量贴壁。在7 d后部分贴壁, 共聚焦培养皿培养, 荧光染色可见多种形态, 生长旺盛(图7)。诱导组CD133⁺/CD44⁺细胞几乎很少贴壁, 共聚焦培养皿培养, 荧光染色形态较单一, 主要是梭形, 生长缓慢(图8)。对CD133⁺/CD44⁺细胞进行双重免疫荧光检测, 可见CD133/1(AC133)-PE孵育的细胞发红色荧光(图7A, 图8A), CD44-FITC抗体孵育的细胞发绿色荧光(图7B, 图8B), 证实了SFM培养后的CD133⁺/CD44⁺细胞依旧明显表达CD133和CD44。

3 讨论 Discussion

2005年底Cancer Research杂志正式报告了Collins从人前列腺癌组织中成功分离出前列腺癌干细胞^[12], 确认了其独特的细胞表面抗原表型为CD44⁺/α2β1^{high}/CD133⁺, 从而前列腺癌干细胞学说逐渐走进人们的视线。关于前列腺癌干细胞的分化模型目前仍存在争议, 主流观点认为前列腺癌干细胞位于基底细胞层中^[13-15], 有干细胞特性的基底细胞产生中间型前驱细胞, 这种细胞再产生大量终末分化的分泌细胞^[16]。根据干细胞假说, 传统治疗对干细胞无效, 只有分化了的肿瘤细胞才有可能被消除。干细胞有可能介导肿瘤的复发、转移及无限增殖, 只有针对干细胞才是有效的治疗^[17]。

磁珠分选技术是利用干细胞表面的标记物特异性分选细胞的技术, 纳米免疫磁珠利用干细胞表面标记进行高特异性的细胞分选使得捕获前列腺组织中的微量肿瘤干细胞成为可能。CD133和CD44被认为是前列腺癌干细胞的表面标记物^[18], 受到了广泛研究。已有一些报道通过它们来分离鉴定前列腺癌干细胞。随着研究的深入, 目前在该领域现有一些新的标志物被发现, 比如α2, α6, β1整合素, C-met, 乙醛脱氢酶1, ABCG2, CD166, SOX2和EZH2等^[19-22]。

随着抗体技术的发展, 免疫磁珠富集技术已成为细胞分选和蛋白质组学研究的重要技术支持。免疫磁珠富集法

可以降低原有检测手段的检测限, 在大量细胞中筛选出微量的目的细胞。实验所用的免疫磁珠的体积极小, 不会对细胞造成机械性压力, 而且孵育时间短, 操作过程快。磁珠分散性好, 可以形成一个稳定的胶体液, 它们在磁场中既不沉淀又不凝聚。磁珠的组成成分可被生物降解, 且不会激活细胞或影响细胞的功能和活力, 细胞的生理功能也不变, 因此磁珠即使去除不完全分选出的细胞也可立即用于分析和随后的培养。课题组的前期研究利用自制的磁珠有效的进行了生物分离^[23], 此次研究将磁珠与特异性单克隆抗体结合, 尝试从前列腺肿瘤组织中分选高纯度的CD133⁺/CD44⁺细胞, 进而检验分选后前列腺癌细胞的生物学特性。

Patrawala等^[24]证实前列腺癌CD44⁺细胞具有类干细胞特性如致瘤性、潜在转移性、克隆形成能力。Vander Griend等^[25]证实CD133⁺细胞群在培养过程中依旧表现出干细胞的某些特性如自我更新能力和多向分化能力。此次研究用自制的免疫磁珠成功从前列腺组织细胞匀浆中分选出CD133⁺/CD44⁺细胞, 在其后的细胞培养中, 细胞成球良好, 细胞增殖能力强, 有极好的回收率和存活率。

研究发现, 在肿瘤组织细胞中CD133⁺/CD44⁺细胞计数比例基本保持在0.5%左右, 而这符合干细胞比例。免疫荧光检测结果也足以说明实验获得了高纯度的CD133⁺/CD44⁺细胞。CD133⁺/CD44⁺细胞在随后的连续性传代培养后依旧保持有干细胞的一些特性。如实验中采用转化生长因子β诱导分化CD133⁺/CD44⁺细胞, 通过诱导和非诱导细胞组对比可知, 两组不但在倍增时间上存在显著差异, 且在形态学上也有明显的差异, 表明诱导后细胞已经部分或者全部成为了其他成熟亚型的细胞, 而形态学上的多样性证明CD133⁺/CD44⁺细胞具有多向分化潜能。

在增殖实验中, 分选的CD133⁺/CD44⁺细胞比PC3肿瘤细胞增殖能力显著增强, 经过转化生长因子β诱导分化后处于某一分化成熟的CD133⁺/CD44⁺细胞则增殖能力明显减弱, 表明CD133⁺/CD44⁺大部分细胞处于分化成熟状态, 故具有较强的增殖能力, 这也进一步说明了CD133⁺/CD44⁺细胞极有可能是癌症的种子干细胞, 可使肿瘤分化扩增。实验结果显示: ①MACS分选的CD133⁺/CD44⁺细胞比例约为0.5%, 代表了极小群细胞。②CD133⁺/CD44⁺细胞具有较强的成球能力且具有多向分化潜能。③CD133⁺/CD44⁺细胞具有较强的增殖潜能, 转化生长因子β和低血清能诱导肿瘤干细胞分化, 从而抑制其致瘤力^[26]。有理由推断通过MACS分选的CD133⁺/CD44⁺细胞是前列腺癌干细胞。

自Mickey等^[27]建立第一株前列腺癌细胞系以来, 目前已建立有十多株细胞系。2003年日本的Okada等^[28]新建了一个前列腺小细胞癌细胞系SO-MI。用MACS从肿瘤组织中分选出CD133⁺/CD44⁺细胞, 可以获得足量的前列腺癌干细胞, 为前列腺癌干细胞的进一步研究提供细胞资源。前列腺癌干细胞增殖速度快、致瘤性强, 具有多向分化潜能,

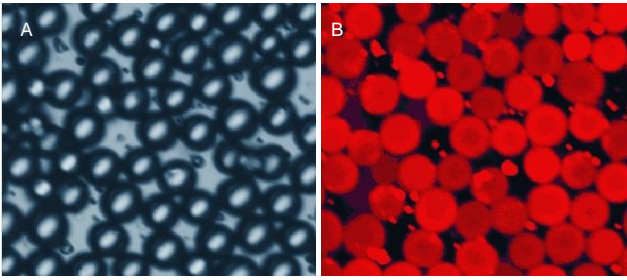


图2 免疫荧光磁珠在荧光显微镜下成像($\times 8\ 000$)
Figure 2 Photomicrograph of immunomagnetic beads by fluorescent electron microscope ($\times 8\ 000$)
图注: 图中 A 为普通光源; B 为荧光光源。

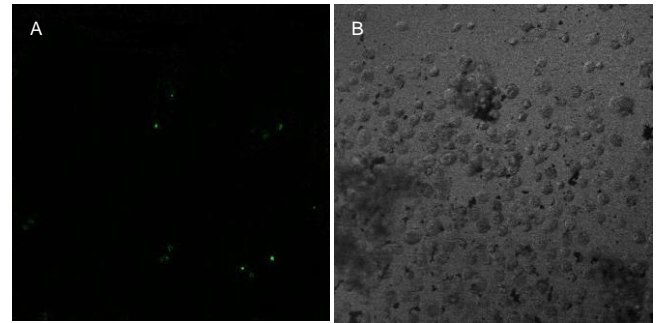


图3 经 CD133 免疫磁珠分选的肿瘤组织细胞与 FITC 二抗结合后荧光图($\times 400$)
Figure 3 Fluorescent photomicrography of tumor tissue cells binding to FITC second antibody after CD133 magnetic bead cell sorting ($\times 400$)
图注: 在较多的肿瘤细胞(图 B)中, CD133 免疫磁珠分选时可以特异性结合表面具有 CD133 抗原的目的细胞(图 A 中绿色荧光为免疫磁珠结合的目的细胞), 从而可以精确的分选出目的细胞。

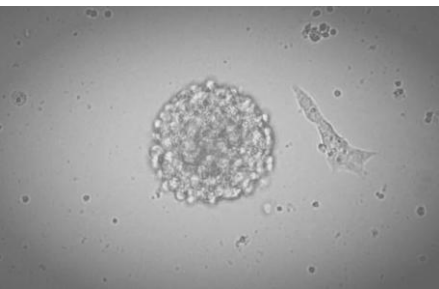


图5 细胞成球实验($\times 400$)
Figure 5 Sphere-forming assay ($\times 400$)
图注: 分选的目的细胞培养后具有良好的成球形, 具有干细胞特性。

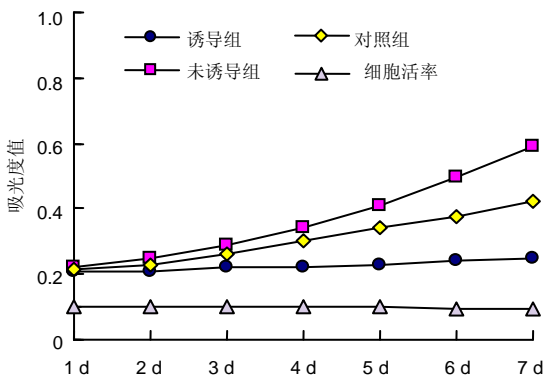


图6 细胞倍增时间曲线
Figure 6 Curve of cell proliferation
图注: 诱导组为诱导后的 CD133⁺/CD44⁺细胞; 未诱导组为未诱导的 CD133⁺/CD44⁺细胞; 对照组即 PC-3 细胞。细胞活率为未诱导的 CD133⁺/CD44⁺细胞活率。

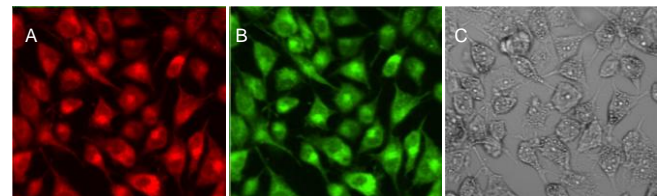


图7 非诱导组 CD133⁺/CD44⁺双重免疫荧光图($\times 400$)
Figure 7 CD133⁺/CD44⁺ dual immunofluorescent photomicrograph in the non-induction group ($\times 400$)
图注: 图 A 为 CD133 染色荧光; B 为 CD44 染色荧光; C 为普通光源。

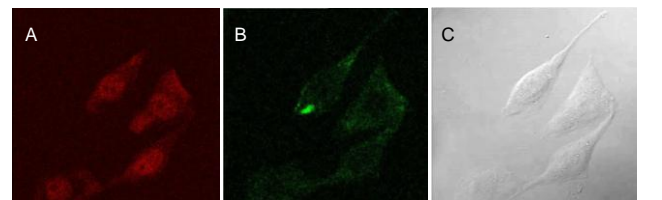


图8 诱导组 CD133⁺/CD44⁺双重免疫荧光图($\times 400$)
Figure 8 CD133⁺/CD44⁺ dual immunofluorescent photomicrograph in the induction group ($\times 400$)
图注: 图中 A 为 CD133 染色荧光; B 为 CD44 染色荧光; C 为普通光源。

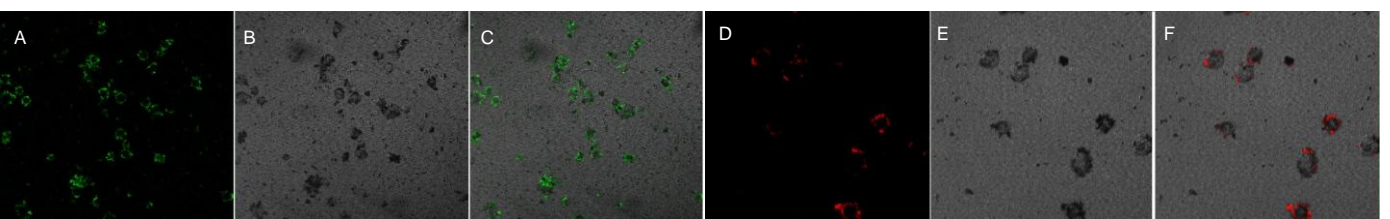


图4 目的细胞被免疫磁珠捕获荧光图($\times 400$)
Figure 4 Fluorescent photomicrography revealing the capture of target cells by immunomagnetic beads ($\times 400$)
图注: 图中 A 为 CD133 磁珠与 FITC 二抗结合; B 为普通光源细胞; C 为 A 与 B 融合图; D 为 CD44 磁珠与 PE 二抗结合; E 为普通光源细胞; F 为 D 与 E 融合图。

较肿瘤组织细胞更具有建立细胞系的优势,可在一个地区的细胞株建立中进行尝试。肿瘤干细胞在肿瘤的生成、发展、复发、转移、耐药等方面起着重要的作用。只有分化了的肿瘤细胞才有可能被消除,因而针对干细胞才是有效的治疗,溯其根源,彻底消除处于静止期的干细胞才是治疗的根本。目前前列腺癌干细胞的研究处于初级阶段,如果能详尽阐明前列腺癌干细胞的具体作用机制,对于未来肿瘤的治疗及预后等策略的建立和改进将起到积极的作用。

作者贡献: 实验设计为龚锐, 实验实施为龚锐、李胜英、霍志霞、丁浩, 实验评估为孙二琳, 资料收集为龚锐、李胜英。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 取材来源于研究所处理制备后的悬浮细胞, 不涉及医学伦理范畴。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Wang X, Kruihof-de Julio M, Economides KD, et al. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature*. 2009;461(7263):495-500.
- [2] Iwata T, Schultz D, Hicks J, et al. MYC overexpression induces prostatic intraepithelial neoplasia and loss of Nkx3.1 in mouse luminal epithelial cells. *PLoS One*. 2010;5(2):e9427.
- [3] Goldstein AS, Huang J, Guo C, et al. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science*. 2010;329(5991):568-571.
- [4] Lawson DA, Zong Y, Memarzadeh S, et al. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(6):2610-2615.
- [5] Maitland NJ, Frame FM, Polson ES, et al. Prostate cancer stem cells: do they have a basal or luminal phenotype. *Horm Cancer*. 2011;2(1):47-61.
- [6] Choy W, Nagasawa DT, Trang A, et al. CD133 as a marker for regulation and potential for targeted therapies in glioblastoma multiforme. *Neurosurg Clin N Am*. 2012;23(3):391-405.
- [7] Lee HJ, You DD, Choi DW, et al. Significance of CD133 as a cancer stem cell markers focusing on the tumorigenicity of pancreatic cancer cell lines. *J Korean Surg Soc*. 2011;81(4):263-270.
- [8] Wang C, Xie J, Guo J, et al. Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2012;28(4):1301-1308.
- [9] Vander Griend DJ, Karthaus WL, Dalrymple S, et al. The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells. *Cancer Res*. 2008;68(23):9703-9711.
- [10] Korski K, Malicka-Durczak A, Bręborowicz J. Expression of stem cell marker CD44 in prostate cancer biopsies predicts cancer grade in radical prostatectomy specimens. *Pol J Pathol*. 2014;65(4):291-295.
- [11] Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 1999;59(19):5002-5011.
- [12] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005;65(23):10946-10951.
- [13] Taylor RA, Toivanen R, Frydenberg M, et al. Human epithelial basal cells are cells of origin of prostate cancer, independent of CD133 status. *Stem Cells*. 2012;30(6):1087-1096.
- [14] Goldstein AS, Huang J, Guo C, et al. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science*. 2010;329(5991):568-571.
- [15] Maitland NJ, Frame FM, Polson ES, et al. Prostate cancer stem cells: do they have a basal or luminal phenotype. *Horm Cancer*. 2011;2(1):47-61.
- [16] Lawson DA, Zong Y, Memarzadeh S, et al. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(6):2610-2615.
- [17] Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007;58:267-284.
- [18] Morgan TM, Lange PH, Vessella RL. Detection and characterization of circulating and disseminated prostate cancer cells. *Front Biosci*. 2007;12:3000-3009.
- [19] Perner S, Hofer MD, Kim R, et al. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol*. 2007;38(5):696-701.
- [20] Reynolds MA, Kastury K, Groskopf J, et al. Molecular markers for prostate cancer. *Cancer Lett*. 2007;249(1):5-13.
- [21] Reynolds MA. Molecular alterations in prostate cancer. *Cancer Lett*. 2008;271(1):13-24.
- [22] Bickers B, Aukim-Hastie C. New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer--the post PSA era. *Anticancer Res*. 2009;29(8):3289-3298.
- [23] Gong R, Li S. Extraction of human genomic DNA from whole blood using a magnetic microsphere method. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:3781-3789.
- [24] 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.
- [25] Vander Griend DJ, Karthaus WL, Dalrymple S, et al. The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells. *Cancer Res*. 2008;68(23):9703-9711.
- [26] Tang B, Yoo N, Vu M, et al. Transforming growth factor-beta can suppress tumorigenesis through effects on the putative cancer stem or early progenitor cell and committed progeny in a breast cancer xenograft model. *Cancer Res*. 2007;67(18):8643-8652.
- [27] Mickey DD, Stone KR, Wunderli H, et al. Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res*. 1977;37(11):4049-4058.
- [28] Okada H, Shirakawa T, Miyake H, et al. Establishment of a prostatic small-cell carcinoma cell line (SO-MI). *Prostate*. 2003;56(3):231-238.