

甲状腺癌中类干细胞的侧群细胞的分离及鉴定

张菀姣¹, 兰 玲², 郑旭琴¹, 武晓泓¹, 徐宽枫¹, 蒋 琳¹, 唐 伟¹, 崔 岱^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029; ²北京积水潭医院内分泌科, 北京 100035)

[摘要] **目的:**研究不同甲状腺肿瘤细胞中是否存在具备干细胞特性的侧群(side population, SP)细胞,同时比较侧群细胞和非侧群(non-SP)细胞生长、成瘤及侵袭性的差异。**方法:**以多种人甲状腺未分化癌细胞株为对象,利用干细胞高表达 ABCG2 转运体,可将荧光染料 Hoechst 泵出胞外的特性,运用双波长流式细胞仪从不同的甲状腺肿瘤细胞株中分选出具有干细胞特性的侧群细胞,进而通过半定量 PCR 及免疫荧光染色比较侧群和非侧群细胞的干细胞标志 OCT4 及肿瘤耐药基因 ABCG2、MDR1 表达的情况,采用克隆形成率及细胞侵袭迁移实验比较两组细胞群的克隆形成能力和侵袭转移能力。**结果:**人甲状腺未分化癌细胞株中存在具有干细胞特性的侧群细胞,该群细胞高表达干细胞标志 OCT4 及肿瘤耐药基因 ABCG2 和 MDR1;同时在体外培养中,此侧群细胞可产生侧群细胞和非侧群细胞;侧群细胞比非侧群细胞具有更强的体外克隆形成能力和侵袭转移能力。**结论:**甲状腺肿瘤细胞中存在具有干细胞特性的侧群细胞,此群细胞可生成普通的瘤体细胞,提示该群细胞可能是肿瘤耐药和复发的根源。

[关键词] 肿瘤干细胞; 甲状腺; 侧群细胞; ABC 转运体

[中图分类号] Q813; R736.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-585-07

Isolation and characterization of a stem-like side population in thyroid cancer cell lines

ZHANG Wan-jiao¹, LAN Ling², ZHENG Xu-qin¹, WU Xiao-hong¹, XU Kuan-feng¹, JIANG Ling¹, TANG Wei¹, CUI Dai^{1*}

(¹Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Endocrinology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the presence of cancer stem-like cells (side population, SP) in thyroid cancer and compare the growth pattern, clonogenicity and invasive potential between cancer SP and non-SP cells. **Methods:** Three different human anaplastic thyroid cancer cell lines (including HTh74, SW1736, and C643) were stained with Hoechst 33342 and sorted for a small fraction of SP by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The gene expression of stem cell marker-Oct4 (octamer-binding transcription factor 4) and genes related to cancer resistance and relapse-ABCG2 (ATP-binding cassette superfamily G member 2) and MDR1 (multidrug resistance 1) in SP and non-SP cells was compared by performing RT-PCR and immunofluorescent staining. Colony formation assay was performed to evaluate the self-renewal potential of SP cells, and cell invasive potential was measured by using the Matrigel invasion assay. **Results:** Cancer SP cells possessed some intrinsic stem cell properties as they preferentially expressed stem cell marker Oct4 and ABC transporter genes-ABCG2 and MDR1, and can generate both SP and non-SP cells *in vitro*. Colony formation analysis and Matrigel invasion assay revealed that these cancer SP cells were more clonogenic and displayed higher invasive potential than non-SP cells. **Conclusion:** These findings suggest that the SP in thyroid cancer cell lines is enriched with stem-like cancer cells that may be the source of tumor drug resistance and recurrence.

[Key words] cancer stem cells; thyroid; side population; ABC transporter

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 585-591]

[基金项目] 国家自然科学基金(30800416), 江苏省自然科学基金(BK2008469)

*通讯作者, E-mail: cuidai@gmail.com

甲状腺肿瘤是内分泌系统最常见的肿瘤,其中的未分化癌恶性程度高,生长迅速,易发生早期转移。常规手术、放射性碘及促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)抑制治疗疗效不佳,患者

中位生存期仅3~6个月。当前肿瘤干细胞的研究已成为肿瘤发病机制的研究热点,目前已证实在血液系统恶性肿瘤和部分实体瘤中有肿瘤干细胞存在,并认为其与肿瘤的耐药及复发关系密切^[1-4]。在甲状腺领域的研究发现,人甲状腺细胞中存在内胚层来源的多能干细胞亚群^[5]。Lan等^[6]研究发现,从人甲状腺原代培养细胞分离得到的甲状腺干细胞,在体外经TSH诱导可以分化为甲状腺细胞并可摄碘,进一步证实了甲状腺干细胞的存在。2007年,Mitsutake等^[7]利用肿瘤干细胞可表达ABCG2转运体,从而将Hoechst染料从细胞内泵出的特性,用流式细胞荧光激活分选(fluorescent activated cell sorting, FACS)技术成功地从甲状腺肿瘤细胞株中分离出侧群(side population, SP)细胞群,并提出这些细胞群显示出诸多干细胞的特性。本研究以多种人甲状腺未分化癌细胞株为研究对象,运用FACS技术从中分选SP细胞,并利用RT-PCR、免疫荧光染色、克隆形成试验及细胞侵袭迁移实验,对分选出的SP细胞特性进行鉴定,探索在人甲状腺未分化癌中是否存在具有干细胞特性的SP细胞,为甲状腺未分化癌的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人甲状腺未分化癌细胞株HTh74、SW1736、C643由德国柏林洪堡大学夏洛特医学院Derwahl教授惠赠。

细胞培养用DMEM和F12培养基;非必需氨基酸及胎牛血清购自美国Gibco公司;Hoechst荧光染料及ABCG2拮抗剂维拉帕米购自美国Sigma公司;ABCG2抗体(clone BXP21)及TRITC标记的荧光二抗购自美国Santa Cruz公司;RNA提取用Tripure和RT-PCR试剂盒购自美国Promega公司;各引物序列由上海博亚生物工程公司合成。细胞侵袭试验用Matrigel购自美国Sigma公司,Transwell小室购自美国BD公司。双波长流式细胞仪为美国BD公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

C643和SW1736细胞采用DMEM培养基进行培养,HTh74细胞采用Ham F12培养基进行培养。

1.2.2 双波长流式细胞仪分选甲状腺肿瘤细胞中的SP细胞

待各肿瘤细胞生长至对数生长期,收集消化

细胞于各自培养液中(含2%胎牛血清),调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,37℃水浴箱中预热10 min后,加入Hoechst33342染料(终浓度5 μg/ml),吹打混匀后避光置于37℃水浴箱中孵育120 min,每30 min晃动1次离心管。对照组于此步骤中同时加入ABCG2转运体拮抗剂维拉帕米(终浓度为50 μmol/L)孵育。孵育完成后将细胞重悬于4℃HBSS溶液(含2%胎牛血清及10 mmol/L HEPES),30 μm尼龙膜过滤以制备单细胞悬液,流式细胞仪分选前加入碘化丙啶(终浓度2 μg/ml)以排除死亡细胞对实验的影响。以350 nm μV激发光源、610 nm双色短通反射滤镜、450 nm和675 nm边缘长通滤片分别检测散射光蓝光及红光部分,线性模式采集信号,将细胞中荧光信号分为两个部分,以Hoechst红点为x轴,Hoechst蓝点为y轴作二维散点图,将低Hoechst红点及低Hoechst蓝点且对照组缺失的区域设定为SP细胞的“门”,分别分选出SP及非侧群(non-SP)细胞。

1.2.3 免疫荧光染色

HTh74细胞与Hoechst染料共孵育后,重悬于200 μl PBS中,置冰上与ABCG2抗体(1:100倍稀释)共育30 min后,再与TRITC标记的荧光二抗(1:100倍稀释)避光孵育30 min,细胞洗涤2次后,吸取细胞于荧光显微镜下观察。

1.2.4 半定量RT-PCR检测HTh74 SP和non-SP细胞干细胞标志OCT4,肿瘤耐药基因ABCG2、MDR1,甲状腺球蛋白(Tg)和钠碘转运体(NIS)基因表达

经FACS分选的SP和non-SP细胞,常规方法抽提、定量细胞RNA,采用RT-PCR方法半定量测定两组细胞上述基因mRNA表达量的差异,选择β-actin为内参照。各引物序列如下β-actin(产物为280 bp)上游:5'-TCAAACATGATCTGGGTCAT-3',下游:5'-CCCAGGCACCAGGGCGTGAT-3';OCT4(产物为216 bp)上游:5'-GACAACAATGAGAACCTTC-AGGAG-3',下游:5'-CTGGCGCCGGTTACAGAACA-3';ABCG2(产物为379 bp)上游:5'-AGTTC-CATGGCACTGGCCATA-3',下游:5'-TCAGGTAG-GCAATTGTGAGG-3';MDR1(产物为253 bp)上游:5'-GCCTGGCAGCTGGAAGACAAATAC-3',下游:5'-ATGGCCAAAATCACAAGGGTTAGE-3';Tg(产物为280 bp)上游:5'-AGTCCTAAGTCCCCTGATGC-3',下游:5'-CAAAGGGAGACGTCGAGTGT-3';NIS(产物为299 bp)上游:5'-TCTCTCAGTCAACGCCTCT-3',下游:5'-ATCCAGGATGGCCACTTCTT-3'。运用图像

分析系统对 RT-PCR 结果进行扫描分析,采用被测条带与内参照灰度比值表示其表达量。

1.2.5 平皿克隆形成试验

将分选的 SP 及 non-SP 细胞悬液按每皿含 200 个细胞接种于培养皿中(直径 60 mm)。在 37℃、5% CO₂ 环境下培养。分别在培养的第 3 天和第 7 天予以甲醇固定,姬姆萨染液染色后显微镜下计数,计算克隆形成率(CFE),CFE=克隆数/接种细胞数 × 100%。

1.2.6 Transwell 小室体外侵袭试验

在 6 孔培养板中放入细胞侵袭小室 Transwell (内置聚碳酸酯微孔滤膜),将 Matrigel 以无血清 DMEM 培养基按 1:20 稀释后,取 100 μl 包被 Transwell 小室底部,并在下室内加入 600 μl 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。分别将分选获得的 SP 和 non-SP 细胞(约 1 × 10⁴ 个)悬液接种于上室,每组细胞设 3 个复孔,37℃ 分别培养 24、48 及 72 h 后,取出 Transwell 小室,PBS 淋洗,以棉签擦拭微孔膜上层,将已经侵入并贴附于微孔膜下层的细胞在 2% 多聚甲醛中固定 30 min,苏木素染色后进行细胞计数,对比 SP 和 non-SP 细胞侵袭能力的变化,实验

重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计分析软件,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行成组 *t* 检验进行统计分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同甲状腺未分化癌中 SP 细胞的分选

3 株不同的甲状腺未分化癌细胞株中均有少量的 SP 群细胞存在。其中 C643 中 SP 比例为 0.5%, HTh74 和 SW1736 中 SP 比例分别为 0.8% 和 0.4% (图 1)。各组细胞中同时加入 ABCG2 转运蛋白拮抗剂维拉帕米后,SP 比例明显下降:C643 0.01%、HTh74 0.02%、SW1736 0.01% (图 1),提示该 SP 细胞主要是通过 ABCG2 转运蛋白发挥将 Hoechst 染料泵出胞外的作用。

2.2 HTh74 细胞与 Hoechst 共育后的 ABCG2 免疫荧光染色

HTh74 细胞与 Hoechst 染料共育后,再与 ABCG2 抗体及 TRITC 标记的荧光二抗孵育后显微镜下观察,可见 Hoechst 染料淡染的细胞(图 2A)

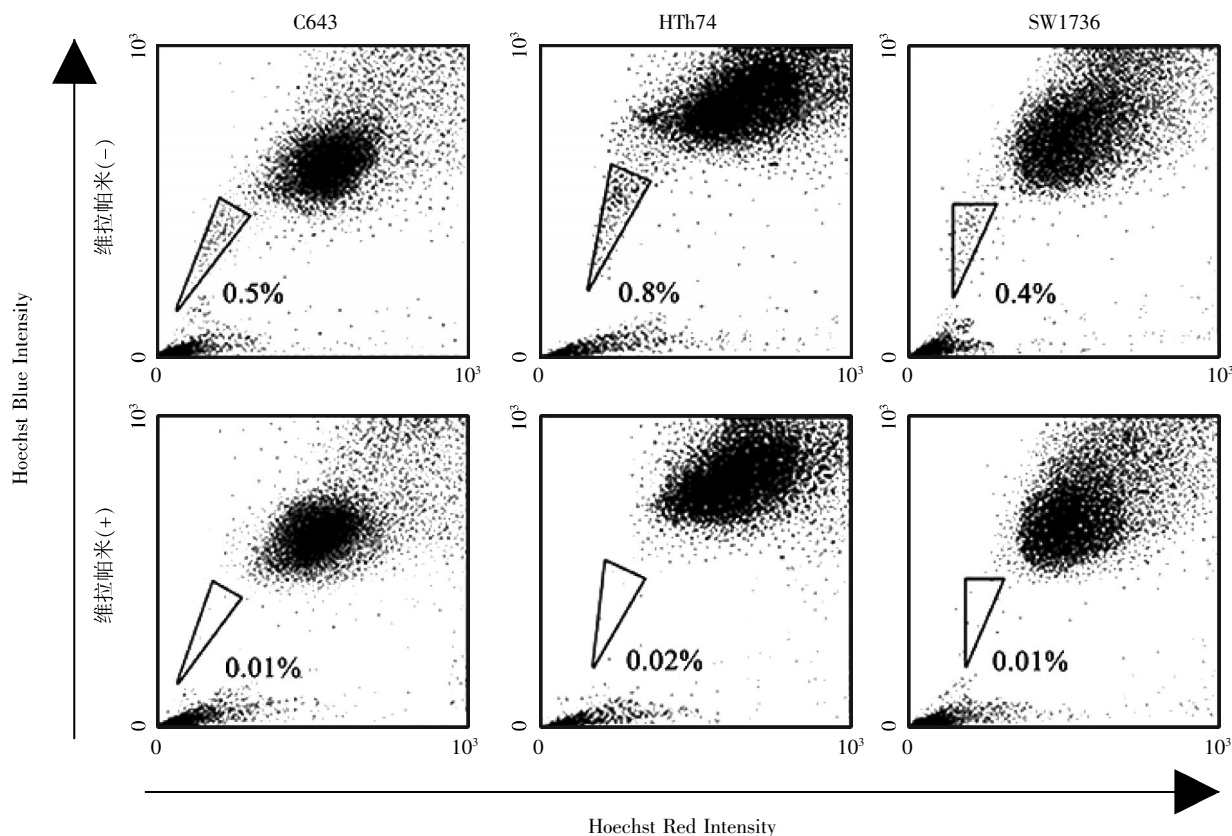


图 1 甲状腺未分化癌细胞株 C643、HTh74、SW1736 中 SP 细胞的检测
Figure 1 Identification of SP cells in human anaplastic thyroid cancer cell lines

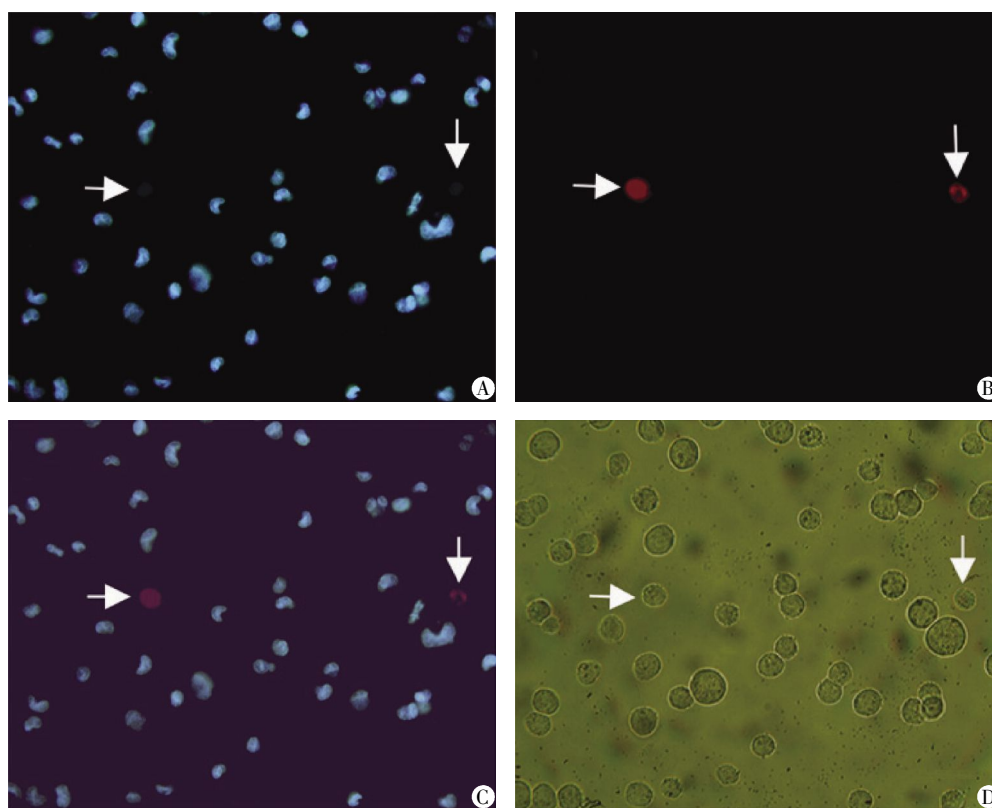
ABCG2 免疫染色阳性 (图 2B), 图 2C 为同时显示 Hoechst 低着色细胞和 ABCG2 阳性细胞的融合图像 (箭头所示), 图 2D 显示光镜下的细胞形态, ABCG2 阳性的细胞在光镜下体积较小。

2.3 HTh74 中 SP 和 non-SP 细胞 ABCG2、OCT4、MDR1、Tg 及 NIS 基因 mRNA 的表达

SP 细胞高表达与肿瘤耐药相关的 ABCG2 及 MDR1 基因, 同时高表达干细胞标志 OCT4, 不表达甲状腺特异性基因 Tg 及 NIS。non-SP 细胞不表达 ABCG2、MDR1 及 OCT4, 低表达 Tg 及 NIS 基因 (图 3)。

2.4 HTh74 中 SP 和 non-SP 细胞更新能力的比较

经 FACS 分选后, 分别培养 HTh74 细胞中的 SP 和 non-SP 细胞各 2 周, 再次分别对这两组细胞进行 SP 的 FACS 分选, 结果显示 SP 细胞可再形成 SP 和 non-SP 细胞, 而 non-SP 细胞不能产生 SP 细胞, 只能形成 non-SP 细胞 (图 4), 提示只有 SP 细胞才具有干细胞的不对称分裂特性, 可自我复制 (产生 SP 细胞) 并同时产生分化了的肿瘤细胞 (non-SP 细胞)。将分选后的 HTh74 SP 细胞置于无血清的培养液中培养, 每 2 周进行重复分选。系列分选结果提示肿瘤 SP 细胞的数量保持恒定 (图 5)。



A: 与 Hoechst 共育的细胞; B: 细胞经 Hoechst 共育后的 ABCG2 免疫荧光染色; C: 图 A 与 B 的融合图像; D: 光镜下细胞形态表现。箭头示染色阳性细胞, 4 张图均为同一视野。

图 2 HTh74 细胞与 Hoechst 共育后的 ABCG2 免疫荧光染色 ($\times 200$)

Figure 2 ABCG2 immunofluorescence staining of HTh74 cells with Hoechst co-culture ($\times 200$)

2.5 HTh74 中 SP 和 non-SP 细胞克隆形成能力的比较

分选后 5 d SP 细胞的 CFE 为 $(16.50 \pm 4.09)\%$, non-SP 细胞的 CFE 为 $(0.83 \pm 0.58)\%$, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。分选后 10 d SP 细胞的 CFE 为 $(22.50 \pm 6.38)\%$, non-SP 细胞的 CFE 为 $(1.33 \pm 0.76)\%$, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 6)。提示 SP 细胞形成克隆生长的能力明显强于 non-SP 细胞。

2.6 HTh74 中 SP 和 non-SP 细胞侵袭能力的比较

FACS 分选后, 应用体外侵袭试验模型 Transwell 小室对 SP 和 non-SP 细胞侵袭转移能力的变化进行比较分析。结果显示 SP 细胞和 non-SP 细胞穿透 Transwell 小室的细胞数均呈时间依赖性的增加; SP 细胞侵袭转移能力明显强于 non-SP 细胞。SP 和 non-SP 细胞每高倍镜视野下 ($\times 200$) 平均穿透小室数分别为 24 h: (62 ± 8) 个 vs (11 ± 2) 个; 48 h: (178 ± 21) 个 vs (27 ± 5) 个; 72 h: $(306 \pm$

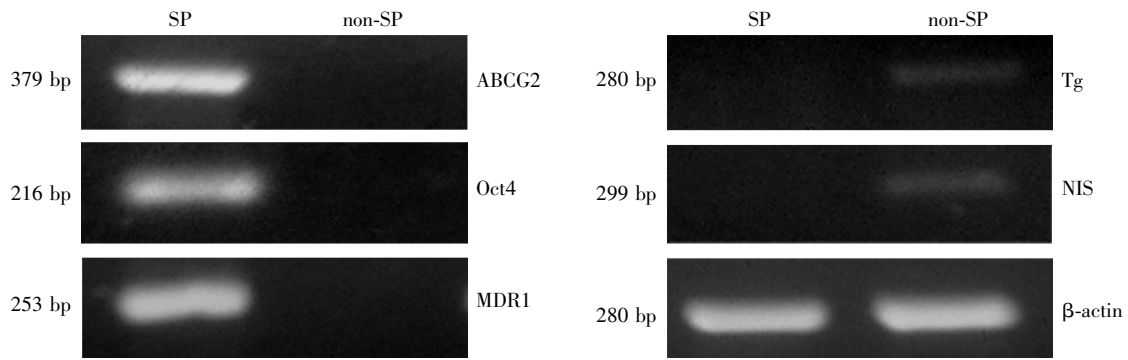


图 3 SP 细胞中干细胞及 ABC 转运体基因的表达

Figure 3 Expression of stem cell marker and ABC transporter genes in side population cells

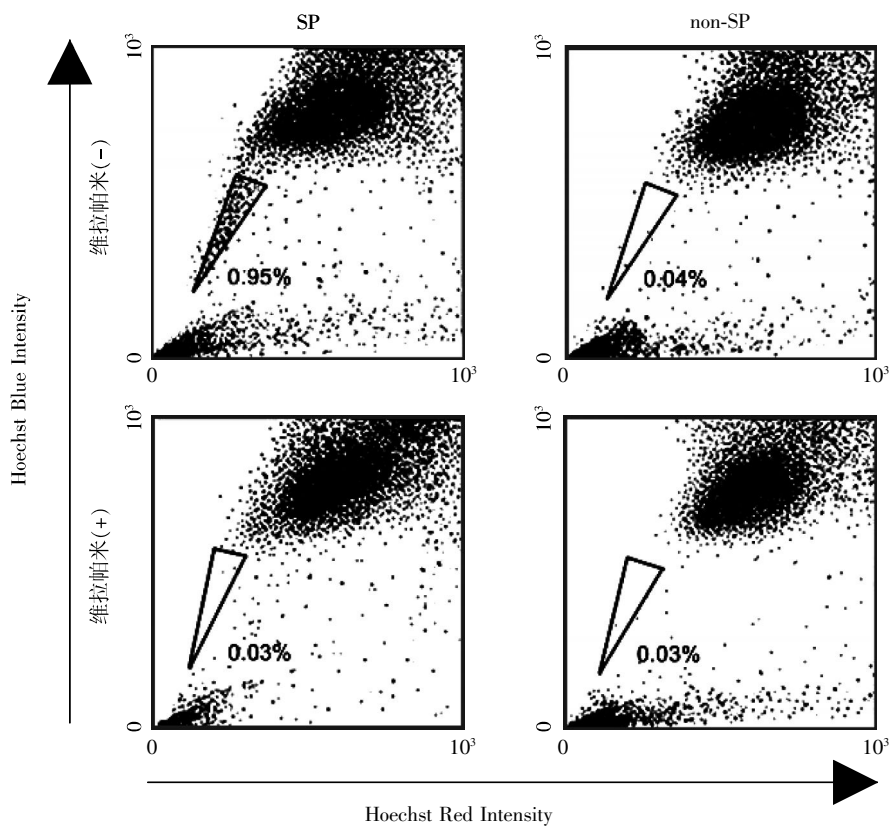


图 4 SP 和 non-SP 细胞培养 2 周后细胞自我更新能力分析

Figure 4 Analysis of self-renewal capacity in SP and non-SP cells after 2 weeks

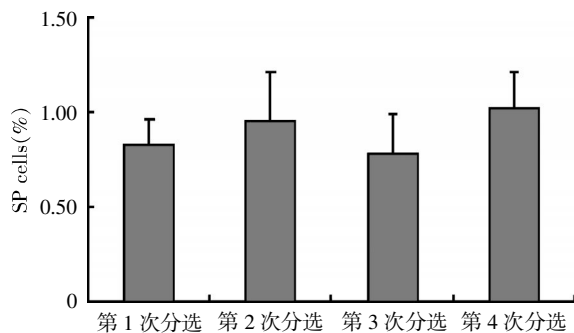


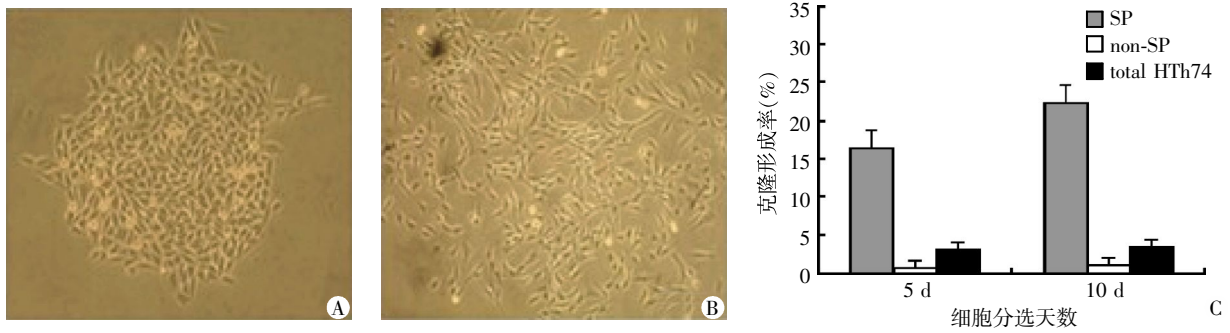
图 5 SP 细胞的系列分选

Figure 5 Serial sorting of SP cells

56)个 *vs* (41 ± 14)个(图 7)。

3 讨论

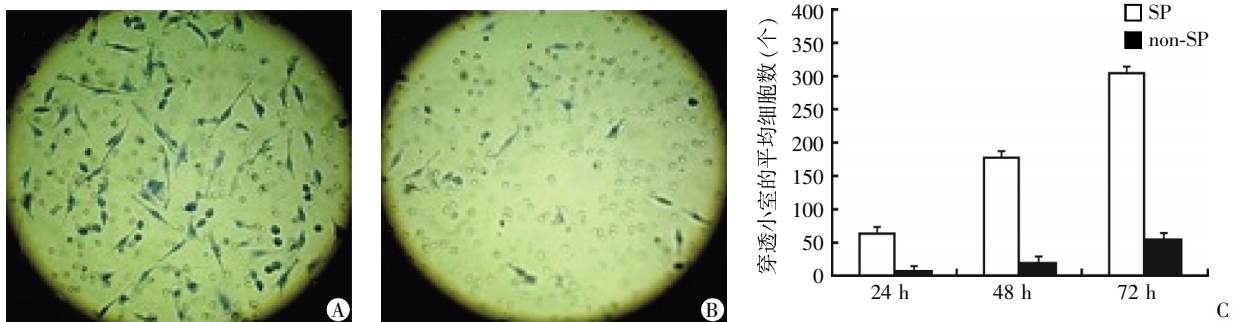
自 Makino 等在 1959 年首次提出肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 假说后, CSC 的研究有了很大的发展。其理论认为, 肿瘤组织包含了数量极少的 CSC 和形成瘤体的普通肿瘤细胞, 其中普通肿瘤细胞都是由 CSC 不断自我复制、分化而形成, CSC 在肿瘤的形成和发展中起着关键的作用^[8]。目前 CSC 已被证实存在于白血病^[1]、乳腺癌^[2]、神经系统



A:SP 细胞克隆生长形态($\times 200$);B:non-SP 细胞克隆生长形态($\times 200$);C:SP 和 non-SP 细胞及总 HTh74 细胞的克隆形成率比较。

图 6 SP 与 non-SP 细胞克隆能力分析

Figure 6 Analysis of in vitro colony formation of SP and non-SP cells



A:24 h 后穿透小室的 SP 细胞($\times 200$);B:24 h 后穿透小室的 non-SP 细胞($\times 200$);C:SP 和 non-SP 侵袭能力的比较。

图 7 SP 与 non-SP 细胞侵袭能力分析

Figure 7 Analysis of invasive potential of SP and non-SP cells

肿瘤^[3]和结肠癌^[4]等各种实体瘤中。

目前分离肿瘤干细胞首选方法是利用正常干细胞及组织特异标志进行免疫学分选。但对于缺乏表面特异性分子标志的肿瘤干细胞,可利用干细胞高表达 ABCG2 转运体,从而将荧光染料 Hoechst 泵出胞外的特性,进而运用 FACS 技术分离出此群淡染细胞(SP 细胞)^[9]。目前已在肺癌^[10]、肾癌^[11]、子宫内膜癌^[12]和胃肠道肿瘤^[13]等多种肿瘤组织和细胞系中分离出了 SP 细胞。本研究发现在 3 种不同的人甲状腺未分化癌细胞系中均含有少量的 SP 细胞,其数量与各种正常组织中干细胞或前体细胞的数量比例相似。免疫荧光染色结果显示在 HTh74 细胞系中,ABCG2 染色阳性细胞 Hoechst 不着色或低染,有力地证明了甲状腺未分化癌细胞株中确实存在 SP 细胞,而这一特殊细胞群可作为以后研究肿瘤干细胞在甲状腺未分化癌中发病机制的对象或模型。

近年来大量研究显示 SP 细胞群高表达干细胞相关基因(OCT4、SOX2、ZFX)、ABC 转运体基因(ABCG2、ABCA5)、Wnt 信号通路相关基因(FZD10、PTGS2、KLF5)与 Notch 信号通路相关基因^[10]。OCT4

基因是 Pit-Oct-Unc(POU)转录因子家族中的一员,作为胚胎干细胞的特异性基因,对于维持胚胎干细胞的多潜能性和自我更新具有极其重要的作用;ABCG2 表达于造血干细胞、nestin(+)胰岛前体细胞、肝脏卵圆细胞、神经干细胞等,被认为是一个广泛表达的干细胞标志物。同时 ABCG2 和 MDR1 同属于 ATP-binding cassette transporter(ABC)转运家族,分别负责细胞内营养物质、代谢废物、天然毒物以及化学药物的运输。目前有系列研究证实在肿瘤组织中有 ABC 转运体的高表达,该转运体的高表达可促使肿瘤细胞将化疗药物泵出胞外,导致肿瘤耐药^[14-15]。本研究发现在 HTh74 细胞中,SP 细胞高表达干细胞基因 OCT4 及肿瘤耐药相关基因 ABCG2 及 MDR1,而不表达甲状腺特异性基因 NIS、Tg,提示 SP 细胞具有干细胞特性,且在肿瘤组织中 SP 细胞可能是肿瘤耐药、复发的根源。

大量研究发现肿瘤细胞中仅有一小部分细胞即肿瘤干细胞可以在体内或者体外形成克隆^[4,16]。本研究中,HTh74 SP 细胞经 FACS 分选后可再形成 SP 和 non-SP 细胞,并且经过系列分选后培养的 SP 数量保持恒定,而 non-SP 细胞只能进行自我复制,

不能产生 SP 细胞,提示 SP 具有干细胞的不对称分裂性和自我更新能力,同时,体外克隆形成能力比较显示无论在第 3 天还是第 7 天,SP 细胞的克隆形成率均明显高于 non-SP 细胞。

越来越多的证据表明,肿瘤干细胞不仅启动了肿瘤的形成,还参与了肿瘤的转移过程^[17]。本研究显示,在细胞体外侵袭实验中 SP 细胞的侵袭能力显著高于 non-SP 细胞,进一步证实了肿瘤干细胞具有更高的侵袭转移能力,亦是肿瘤远处转移的根源。

综上所述,本研究采用了 FACS 分选方法从不同甲状腺未分化癌细胞株中成功分选出 SP 细胞,该侧群细胞高表达干细胞标志及肿瘤耐药相关基因,同时在体外有更强的增殖侵袭转移能力,提示 SP 细胞可能是肿瘤耐药复发转移的根源,进一步验证了“肿瘤干细胞”理论,为今后甲状腺未分化癌的治疗提供了新的方向。

[参考文献]

- [1] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-737
- [2] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-3988
- [3] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821-5828
- [4] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. *Nature*, 2007, 445(7123): 111-115
- [5] Thomas T, Nowka K, Lan L, et al. Expression of endoderm stem cell markers: evidence for the presence of adult stem cells in human thyroid glands [J]. *Thyroid*, 2007, 16(6): 537-544
- [6] Lan L, Cui D, Nowka K, et al. Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(9): 3681-3688
- [7] Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, et al. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(4): 1797-1803
- [8] Prrez-Caw M, Cobaleda C, Gonzrlez-Herrero I, et al. Cancer induction by restriction oneogene expression to the stem cell compartment [J]. *EMBO*, 2009, 28(1): 8-20
- [9] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo* [J]. *Exp Med*, 1996, 183(4): 1797-1806
- [10] Ho MM, Ng AV, Lam S, et al. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 4827-4833
- [11] Addla SK, Brownl MD, Hart CA, et al. Characterization of the Hoechst33342 side population from normal and malignant human renal epithelial cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295(3): 680-687
- [12] Friel AM, Sargent PA, Patnaude C, et al. Functional analyses of the cancer stem cell-like properties of human endometrial tumor initiating cells [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(2): 242-249
- [13] Huang D, Gao Q, Guo L, et al. Isolation and identification of cancer stem-like cells in esophageal carcinoma cell lines [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(3): 465-473
- [14] Zheng X, Cui D, Xu S, et al. Doxorubicin fails to eradicate cancer stem cells derived from anaplastic thyroid carcinoma cells: characterization of resistant cells [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(2): 307-315
- [15] Chauhan PS, Bhushan B, Singh LC, et al. Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: response to induction chemotherapy [J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 92(1): 44-49
- [16] Zhu W, Hai T, Ye L, et al. Medullary thyroid carcinoma cell lines contain a self-renewing CD133⁺ population that is dependent on ret proto-oncogene activity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(1): 439-444
- [17] Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, et al. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(8): 2803-2808

[收稿日期] 2011-12-17