

食管肿瘤干细胞抗辐射特性的实验研究

邱 琪,孙苏平*,汪建林,于静萍,孙志强

(南京医科大学附属常州第二人民医院放射肿瘤科,江苏 常州 213003)

[摘要] 目的:探讨食管肿瘤干细胞的抗辐射特性。方法:采用无血清培养基培养人食管癌细胞 ECA109,分离食管肿瘤干细胞,MTT 法检测不同浓度环氧化酶-2 选择性抑制剂 NS398(2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$)对细胞增殖的抑制作用,克隆形成实验检测亲本细胞和细胞球的增敏效应,成球实验分析 NS398 联合 X 线照射对细胞成球能力的影响,Western blot 检测细胞 β -catenin 蛋白的表达水平。结果:NS398 对亲本细胞和细胞球的增殖抑制作用均具有时间、浓度依赖性。20 $\mu\text{mol/L}$ NS398 作用后,亲本细胞 D_0 、 D_q 和 SF_2 值均减小($P < 0.05$),放射增敏比(sensitization enhancement ratio, SER)为 1.17;20 $\mu\text{mol/L}$ NS398 作用后,细胞球 D_0 、 SF_2 减小($P < 0.05$),SER 为 1.12。照射使 ECA109 细胞成球率增加($P < 0.05$)。NS398 联合 X 线照射组与单纯照射组相比,细胞成球率显著降低($t = 7.01, P < 0.01$),亲本细胞和细胞球 β -catenin 的表达水平均降低($t = 10.15, P < 0.01$; $t = 3.225, P < 0.05$)。结论:细胞球的增敏效应小于亲本细胞,具有抗辐射特性,其机制可能与抑制细胞 β -catenin 蛋白表达有关。

[关键词] 食管癌;肿瘤干细胞;细胞球;NS398;抗辐射特性

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)03-326-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20150306

Radioresistance of esophageal cancer stem cells

Qiu Qi, Sun Suping*, Wang Jianlin, Yu Jingping, Sun Zhiqiang

(Department of Radiation Oncology, Changzhou Second Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the radioresistance of esophageal cancer stem cells. **Methods:** The ECA109 cells were cultured in serum-free medium to enrich esophageal stem-like cells. MTT assay was performed to detect the multiplication capacity of cancer cells treated with different concentrations of cyclooxygenase-2 (COX-2) selective inhibitor NS398 (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 and 80.0 $\mu\text{mol/L}$). Sensitization effects of parental cells and spheroid cells were evaluated by clone formation assay. Sphere-forming assay was aimed to analyze the effect of NS398 combined with X-ray radiation on cell spheres formation. Western blot was performed to determine the expression level of β -catenin. **Results:** NS398 inhibited the proliferations of parental cells and spheroid cells in a time-and concentration-dependent way. After treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ NS398, D_0 , D_q and SF_2 values of parental cells were all decreased ($P < 0.05$), and the sensitization enhancement ratio (SER) was 1.17. D_0 and SF_2 values of spheroid cells were decreased ($P < 0.05$), and the SER was 1.12. Formation rate of the cell spheres was increased after irradiation ($P < 0.05$). Compared with the radiation alone group, the formation rate of the cell spheres and β -catenin expression of parental cells and spheroid cells were decreased in the combination group ($t = 7.01, P < 0.01$; $t = 10.15, P < 0.01$; $t = 3.225, P < 0.05$). **Conclusion:** The sensitization effect of spheroid cells is less than parental cells, which indicates that spheroid cells has the radioresistance. It may be correlated with the inhibition of the expression level of β -catenin.

[Key words] esophageal cancer; cancer stem cells; cell spheres; NS398; radioresistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03): 326-331]

[基金项目] 江苏省卫生厅指导性科研项目(Z201220);常州市卫生局重大项目(ZD201105);常州市科技支撑社会发展项目(CE20125021)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: ssp56@126.com

食管癌是我国常见恶性肿瘤之一,主要组织学类型是食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC),对放射治疗有较强的敏感性。根治性放疗是晚期食管癌的重要治疗方法,然而临床上 70% 的患者放疗后出现局部残留或复发,肿瘤

细胞的辐射抵抗被认为是主要原因之一。有研究发现实体肿瘤的肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs)引起放疗或化疗抵抗,导致治疗失败^[1]。如何提高食管癌的放射敏感性以及改善临床疗效成为食管癌放射治疗的关键问题。本研究采用无血清培养基 (serum-free medium, SFM)富集食管肿瘤干细胞 (esophageal cancer stem cells, ECSCs),并探索 ECSCs 的抗辐射特性。

1 材料和方法

1.1 材料

人食管癌细胞株 ECA109 购自上海生物细胞库。RPMI-1640 培养基、胎牛血清和胰酶购自美国 Gibco 公司;表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 均购于美国 PeproTech 公司;神经营养因子 B27 购自美国 Invitrogen 公司;四甲基偶氮唑盐 (MTT)、DMSO 购自美国 Sigma 公司;环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 抑制剂 NS398 购自美国 Cayman 公司;鼠抗 β -catenin 单克隆抗体、鼠抗 β -actin 单克隆抗体均购自美国 Santa cruz 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自上海碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

食管癌细胞株 ECA109 的培养和传代用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中常规培养,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 成球培养

无血清培养基由 RPMI-1640 (1:1)、B27 (1:50)、EGF (20 ng/ml)、bFGF (20 ng/ml)、胰岛素 5 μ g/ml、转铁蛋白 10 μ g/ml、0.5% BSA 组成。取对数生长期的 ECA109 细胞制成单细胞悬液,用无血清培养基重悬以 2 \times 10⁵ 个/孔接种于低黏附 6 孔培养板,培养 2~3 d 后收集细胞球吹打为单细胞悬液,重悬于无血清培养基,按 1:2 的比例传代。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖能力

取处于对数生长期的贴壁细胞和培养 3 代以上的细胞球,消化后吹打成单细胞悬液,调整细胞密度为 4 \times 10⁴ 个/ml,按每孔 200 μ l 接种 96 孔板,并设置一空白孔,只加培养基。待细胞完全贴壁后吸尽培养基,分别给予 NS398 浓度为 0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 μ mol/L 的培养基。在 37℃、5% CO₂ 条件下培养,分别于 24、48 及 72 h 后用酶标仪测定

490 nm 处的吸光度值,每次检测取各孔的平均值,并计算细胞生长抑制率。生长抑制率 (%) = (对照组吸光度值 - 实验组吸光度值) / 对照组吸光度值 \times 100%,实验重复 3 次。

1.2.4 克隆形成实验

将 ECA109 贴壁细胞和细胞球用胰酶消化后,稀释和调整细胞悬液浓度,以不同细胞密度 (2 \times 10²、5 \times 10²、1 \times 10³、2 \times 10³、5 \times 10³、1 \times 10⁴ 个/孔) 均匀接种于 6 孔板中,分为实验组和对照组,每组设 3 个平行样本。待细胞完全贴壁后,实验组加入含 20.0 μ mol/L NS398 的培养基,对照组不予处理。24 h 后按不同接种细胞浓度分别予以不同照射剂量 0、2、4、6、8、10 Gy。照射方法:室温下采用西门子 Primus-H 型医用直线加速器照射,6MV-X 线,射野大小为 30 cm \times 30 cm,剂量率 1 Gy/min,源距细胞生长面 100 cm。照射后更换培养基,继续培养 14 d,可见细胞形成克隆,弃培养基,用 4% 的甲醇固定 15 min 后,结晶紫染色 20 min,冲洗干燥后计数 >50 个细胞的克隆数。应用 Graphpad prism 5 Demo 软件,以单击多靶模型 $S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线,计算相应放射增敏参数 D_0 、 D_q 、 SF_2 和放射增敏比 (sensitization enhancement ratio, SER),实验重复 3 次。

1.2.5 细胞成球能力

取对数生长期的 ECA109 细胞制成单细胞悬液,用无血清培养基重悬,以 1 \times 10⁴ 个/孔接种于低黏附 6 孔板,分为空白对照组、4Gy 照射组、20.0 μ mol/L NS398 组、20.0 μ mol/L NS398+4Gy 照射组 (照射前 30 min 加入 20.0 μ mol/L NS398),每组设 3 个平行样本,培养 1 周后计数细胞成球囊数量,实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测 β -catenin 的表达

胰酶消化离心收集待测细胞,RIPA 缓冲液裂解细胞,冰上孵育 20 min,离心收集蛋白样品,BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白样品上样于 8% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳,4℃转膜约 90 min,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入相应的特异性一抗 (β -catenin 1:300 稀释; β -actin 1:1 000 稀释) 4℃摇床过夜, TBST 洗膜 3 次,加入 HRP 偶联的二抗 (1:1 000 稀释) 室温摇床孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次。采用显色试剂盒显色反应,于暗室内进行曝光、显影、定影,胶片扫描后采用 Image J 分析软件进行半定量分析,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

实验结果采用 SPSS18.0 统计软件检验分析,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测 NS398 对 ECA109 亲本细胞和细胞球增殖的影响

NS398 对亲本细胞和细胞球的增殖抑制作用均具有时间、浓度依赖性,随 NS398 浓度的增高和

时间的延长,细胞生长抑制作用均逐渐增强。作用 24 h 后亲本细胞在 NS398 浓度为 10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞球在 NS398 浓度为 20.0、40.0、80.0 $\mu\text{mol/L}$ 时具有显著增殖抑制现象,与 0 $\mu\text{mol/L}$ NS398 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 NS398 对 ECA109 细胞的增殖抑制作用

Table 1 Proliferation inhibition of NS398 on ECA109 cells

组别	NS398 ($\mu\text{mol/L}$)	24 h		48 h		72 h	
		D(490 nm)	抑制率(%)	D(490 nm)	抑制率(%)	D(490 nm)	抑制率(%)
亲本细胞	0	0.545 \pm 0.021	-	0.640 \pm 0.053	-	0.778 \pm 0.046	-
	2.5	0.532 \pm 0.019	2.30	0.611 \pm 0.030	4.49	0.743 \pm 0.033	4.57
	5.0	0.523 \pm 0.035	4.08	0.580 \pm 0.039*	9.41	0.632 \pm 0.036*	18.83
	10.0	0.465 \pm 0.025*	14.60	0.517 \pm 0.027*	19.19	0.551 \pm 0.055*	29.17
	20.0	0.428 \pm 0.039*	21.37	0.446 \pm 0.035*	30.35	0.480 \pm 0.040*	38.40
	40.0	0.366 \pm 0.042*	32.89	0.354 \pm 0.034*	44.71	0.380 \pm 0.036*	51.14
	80.0	0.313 \pm 0.036*	42.62	0.300 \pm 0.031*	53.11	0.314 \pm 0.026*	59.61
细胞球	0	0.572 \pm 0.015	-	0.751 \pm 0.029	-	0.914 \pm 0.037	-
	2.5	0.561 \pm 0.020	1.96	0.735 \pm 0.039	2.09	0.901 \pm 0.032	1.43
	5.0	0.555 \pm 0.033	3.05	0.722 \pm 0.033	3.85	0.875 \pm 0.032*	4.24
	10.0	0.544 \pm 0.038	4.99	0.672 \pm 0.035*	10.47	0.752 \pm 0.048*	17.69
	20.0	0.500 \pm 0.026*	12.70	0.603 \pm 0.049*	19.66	0.682 \pm 0.044*	25.37
	40.0	0.460 \pm 0.025*	19.57	0.561 \pm 0.030*	25.33	0.594 \pm 0.034*	35.01
	80.0	0.394 \pm 0.026*	31.17	0.452 \pm 0.047*	39.85	0.525 \pm 0.048*	42.53

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, * $P < 0.05$ 。

2.2 NS398 联合 X 线照射对 ECA109 亲本细胞和细胞球存活分数的影响

NS398 联合 X 线照射对 ECA109 亲本细胞和细胞球的存活分数影响见图 1。采用单击多靶模型拟合后获得 D_0 、 D_q 和 SF_2 等参数。由表 2 可见,细胞球的 D_0 、 D_q 和 SF_2 均大于亲本细胞 ($t = 11.188, P < 0.01; t = 4.166, P < 0.05; t = 4.11, P < 0.05$)。20.0 $\mu\text{mol/L}$ NS398 联合照射组与单纯照射组相比,亲本细胞的 D_0 、 D_q 和 SF_2 值均减小 ($t = 3.32, t = 3.37, t = 3.33, P$ 均 < 0.05), 细胞球 D_0 、 SF_2 减小 ($t = 3.23, t = 3.18, P$ 均 < 0.05)。在 D_0 照射剂量时,细胞球的放射增敏比小于亲本细胞。

2.3 NS398 联合 X 线照射对成球能力的影响

ECA109 细胞经过 4 Gy 照射后成球率增加 ($t =$

3.08, $P < 0.05$), 20.0 $\mu\text{mol/L}$ NS398 单独作用时,成球率无明显改变, 20.0 $\mu\text{mol/L}$ NS398 联合照射组与单纯照射组比,成球率显著降低 ($t = 7.01, P < 0.01$, 图 2)。

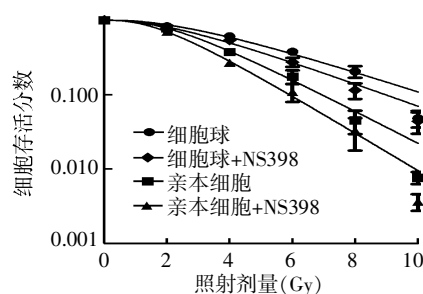


图 1 ECA109 细胞存活曲线

Figure 1 The survival curve of ECA109 cells

表 2 ECA109 细胞放射增敏参数及增敏比

Table 2 Radiosensitization parameters and SER of ECA109 cells

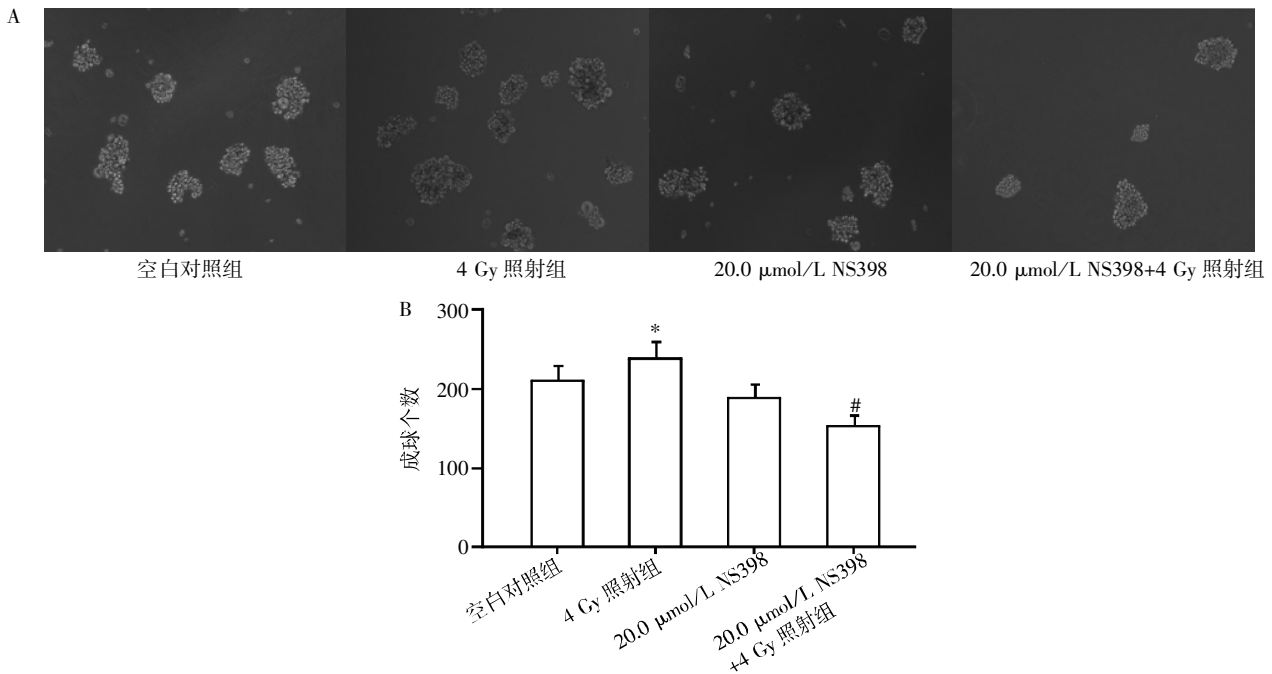
组别	D_0	D_q	SF_2	SER_{D_0}
亲本细胞组	2.00 \pm 0.10	2.40 \pm 0.15	0.78 \pm 0.03	-
亲本细胞+NS398 组	1.72 \pm 0.11*	2.00 \pm 0.14*	0.70 \pm 0.03*	1.17 \pm 0.04
细胞球组	3.15 \pm 0.15**	3.12 \pm 0.26*	0.87 \pm 0.02*	-
细胞球+NS398 组	2.82 \pm 0.10#	2.55 \pm 0.30	0.81 \pm 0.03#	1.12 \pm 0.05

与亲本细胞组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与细胞球组比较, # $P < 0.05$ 。

2.4 NS398 联合 X 线照射对食管癌 ECA109 亲本细胞和细胞球 β -catenin 表达的影响

细胞球的 β -catenin 蛋白表达水平较亲本细胞显著升高 ($t = 7.50, P < 0.01$, 图 3A), 20.0 $\mu\text{mol/L}$

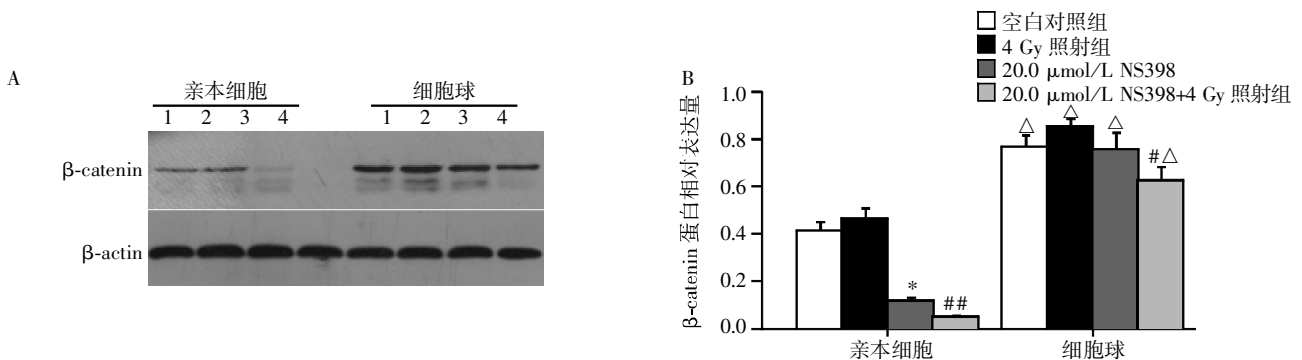
NS398 联合 4 Gy 照射组与 4 Gy 照射组相比, 亲本细胞 β -catenin 表达水平显著降低 ($t = 10.15, P < 0.01$), 细胞球 β -catenin 蛋白表达水平亦降低 ($t = 3.225, P < 0.05$, 图 3B)。



A: 各组细胞成球能力镜下观察; B: 各组成球个数统计分析。与空白对照组比, * $P < 0.05$; 与 4Gy 照射组比, # $P < 0.01$ 。

图 2 NS398 联合 X 线对 ECA109 细胞成球能力的影响($\times 100$)

Figure 2 Influence of NS398 combined with X-ray radiation on cell sphere formation of ECA109 cells($\times 100$)



A: 各组 β -catenin Western bolt 检测结果。1: 空白对照组; 2: 4 Gy 照射组; 3: 20.0 $\mu\text{mol/L}$ NS398 组; 4: 20.0 $\mu\text{mol/L}$ NS398+4 Gy 照射组。B: 各组 β -catenin 蛋白表达量相对定量分析。与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与 4 Gy 照射组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 细胞球与亲本细胞比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 3 NS398 及 X 线照射对细胞 β -catenin 蛋白表达的影响

Figure 3 Influence of NS398 combined with X-ray radiation on β -catenin expression

3 讨论

食管癌是我国高发的恶性肿瘤之一, 放射治疗是目前食管癌的治疗方法之一, 然而由于肿瘤组织的辐射抵抗导致放射治疗失败, 使肿瘤复发、远处转移甚至继发性肿瘤的产生。近年来研究发现, 肿瘤干细胞是导致实体肿瘤组织辐射抵抗的主要原因, 照射后肿瘤组织中大部分细胞凋亡, 只有一小部分

残存肿瘤干细胞再增殖^[2]。Bao 等^[3]认为肿瘤干细胞具有更强的 DNA 损伤检验点和损伤修复能力, 照射后能及时修复断裂的 DNA, 使肿瘤细胞再增殖, 从而导致肿瘤组织的辐射抵抗。Wang 等^[4]发现照射可诱导乳腺癌干细胞的产生, 在杀死普通肿瘤细胞的同时也促进了肿瘤转移, 可能与 NF- κ B 介导的分子途径有关。Smit 等^[5]发现食管癌组织中部分细胞表现出与干细胞相似的特性, 具有侵袭扩散的潜能和

抗辐射特性。

无血清培养法是利用肿瘤干细胞能够在无血清培养基中悬浮生长并形成干细胞球,而普通的肿瘤细胞则无法耐受这种无血清的培养条件,利用这种特性富集肿瘤干细胞。在早期,无血清培养基富集分离肿瘤干细胞的方法已应用于脑胶质瘤和乳腺癌^[6-7]。Okumura等^[8]应用低亲和性神经营养受体(p75 neurotrophin receptor, P75NTR)为表面标记对人食管鳞状上皮细胞进行了分选,并证明正常食管上皮细胞中的P75NTR阳性细胞具有增殖、自我更新及多向分化能力,经鉴定为食管上皮干细胞。自此,P75NTR被认为是食管肿瘤干细胞分离鉴定的一项基本标准。Huang等^[9]将食管癌细胞株ECA109培养于无血清培养基中,富集食管肿瘤干细胞,检测P75NTR阳性细胞的比例为68.3%,远高于贴壁肿瘤细胞。在本实验的前期研究中已成功运用无血清培养基分离出食管癌KYSE150、TE1的肿瘤干细胞,并证实其具有更强的自我更新、扩增和迁移能力,高表达干细胞表面标记分子CD44、CD271(P75NTR),经鉴定具有肿瘤干细胞特性^[10]。本实验中亲本细胞为贴壁的肿瘤细胞,细胞球则能在无血清培养基中形成干细胞球悬浮生长并稳定传代,维持其未分化潜能,表现出较强的自我更新和增殖能力。

COX-2在许多恶性肿瘤中处于高表达水平,Kase等^[11]发现COX-2参与食管肿瘤细胞的增殖、逃避凋亡及肿瘤血管的生成。NS398可通过抑制COX、NF- κ B、AKT等多种分子途径增强肿瘤细胞的放射敏感性,使肿瘤细胞发生凋亡^[12-13]。本研究采用MTT法分析NS398对食管癌ECA109细胞球的增殖抑制作用,发现NS398浓度分别为10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,亲本细胞和细胞球的增殖开始受到明显抑制,差异具有统计学意义,表明肿瘤干细胞具有一定的耐药性。克隆形成实验是目前用于检测肿瘤细胞放射敏感性的重要方法,辐射干预下细胞克隆增殖能力的强弱反映了细胞的放射敏感性。本研究采用低浓度20.0 $\mu\text{mol/L}$ NS398研究细胞的增敏效应,避免对细胞产生较大毒性。实验发现照射后细胞球的存活分数大于亲本细胞,细胞存活分数随放射剂量的增高呈指数性降低,NS398对亲本细胞和细胞球的SER₀分别为1.17、1.12。成球实验即采用无血清培养法检测细胞经过照射以及NS398处理后的成球能力,实验显示照射后细胞成球能力增强,NS398联合X线照射后ECA109细胞成球能力降低。以上结

果表明细胞球的增敏效应不如亲本细胞明显,具有较强的抗辐射特性。

β -catenin是Wnt信号通路中的重要枢纽分子,超表达的 β -catenin导致体内外干细胞的自我更新,与干细胞残存以及肿瘤的形成密切相关^[14]。目前认为Wnt/ β -catenin分子途径在食管癌的辐射抵抗中发挥重要作用,通过上调 β -catenin水平诱导COX高表达,而抑制 β -catenin的表达则可以逆转其辐射抵抗^[15]。Che等^[16]通过分次照射获得具有抗辐射特性的食管肿瘤干细胞(Eca109R50Gy),发现NS398能通过抑制Wnt/ β -catenin分子途径增强食管肿瘤干细胞的放射敏感性。本研究发现细胞球的 β -catenin表达量明显高于亲本细胞,照射后表达量增加,单独用药后亲本细胞表达量即明显下降,而细胞球表达量未见明显改变,NS398联合照射后,细胞球 β -catenin的表达量才表现出明显下降,结果表明食管肿瘤干细胞的辐射抵抗机制可能与 β -catenin蛋白的表达量有关。

本研究采用无血清培养法分选食管肿瘤干细胞,方法简便易行,并探讨肿瘤干细胞和普通肿瘤细胞抗辐射特性的差异,发现肿瘤干细胞具有较强的抗辐射特性,其机制可能是通过调控Wnt/ β -catenin分子途径发挥作用。近年研究显示肿瘤干细胞辐射抵抗可能与缺氧微环境^[17]、高效的DNA损伤修复能力^[18]、较高的自由基清除水平^[18]、多种信号分子途径^[18]有关,但其机制较为复杂尚不能完全阐明,所以需要更深入的研究,才能为临床治疗模式提供更好的理论依据。

[参考文献]

- [1] Malik B, Nie D. Cancer stem cells and resistance to chemo and radio therapy [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2012, 4(1): 2142-2149
- [2] Brunner TB, Kunz-Schughart LA, Grosse-Gehling P, et al. Cancer stem cells as a predictive factor in radiotherapy [J]. Semin Radiat Oncol, 2012, 22(2): 151-174
- [3] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response [J]. Nature, 2006, 444(7120): 756-760
- [4] Wang Y, Li W, Patel SS, et al. Blocking the formation of radiation-induced breast cancer stem cells [J]. Oncotarget, 2014, 5(11): 3743-3755
- [5] Smit JK, Faber H, Niemantsverdriet M, et al. Prediction of response to radiotherapy in the treatment of esophageal cancer using stem cell markers [J]. Radiother Oncol, 2013, 107(3): 434-441

- [6] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13): 5506-5511
- [7] 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
- [8] Okumura T, Shimada Y, Imamura M, et al. Neurotrophin receptor p75(NTR) characterizes human esophageal keratinocyte stem cells *in vitro*[J]. *Oncogene*, 2003, 22(26): 4017-4026
- [9] Huang SD, Yuan Y, Liu XH, et al. Self-renewal and chemotherapy resistance of p75NTR positive cells in esophageal squamous cell carcinomas[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:9
- [10] 汪建林, 孙志强, 于静萍, 等. 食管癌细胞株中肿瘤干细胞样细胞培养分离及生物学鉴定[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(10): 1362-1367
- [11] Kase S, Osaki M, Honjo S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 is correlated with high intratumoral microvessel density and low apoptotic index in human esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Virchows Arch*, 2003, 442(2): 129-135
- [12] Che SM, Zhang XZ, Hou L, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 enhances radiosensitivity of radioresistant esophageal cancer cells by inhibiting AKT activation and inducing apoptosis[J]. *Cancer Invest*, 2010, 28(7): 679-688
- [13] Wen B, Deutsch E, Eschwege P, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 enhances antitumor effect of irradiation on hormone refractory human prostate carcinoma cells[J]. *J Urol*, 2003, 170(5): 2036-2039
- [14] Zhang X, Komaki R, Wang L, et al. Treatment of radioresistant stem-like esophageal cancer cells by an apoptotic gene-armed, telomerase-specific oncolytic adenovirus[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2813-2823
- [15] Li HZ, Gao XS, Xiong W, et al. Identification of differentially expressed genes related to radioresistance of human esophageal cancer cells[J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(10): 882-888
- [16] Che SM, Zhang XZ, Liu XL, et al. The radiosensitization effect of NS398 on esophageal cancer stem cell-like radioresistant cells[J]. *Dis Esophagus*, 2011, 24(4): 265-273
- [17] Peitzsch C, Perrin R, Hill RP, et al. Hypoxia as a biomarker for radioresistant cancer stem cells[J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(8): 636-652
- [18] Ogawa K, Yoshioka Y, Isohashi F, et al. Radiotherapy targeting cancer stem cells: current views and future perspectives[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(3): 747-754

[收稿日期] 2014-09-15

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每3位分成1组,组间留空隙(约为一个汉字的1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如453 000 000可写成45 300万或4.53亿或4亿5 300万,但不能写成4亿5千3百万;三千元写成3 000元或0.3万元,但不能写成3千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如10%~20%, $(2\sim6)\times 10^3$ 或 $2\times 10^3\sim 6\times 10^3$,30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)