

RAAd-p53、E1B⁻-OLV 及紫杉醇对乳腺癌干细胞的作用

马越¹, 张凤春², 王红霞¹, 张雁云³, 叶明¹

(1.上海交通大学医学院仁济医院, 上海 200127; 2.上海交通大学医学院附属苏州九龙医院, 江苏苏州 215021; 3.中国科学院上海生命科学院健康科学中心免疫学联合实验室, 上海 200025)

摘要: [目的] 研究重组 p53 腺病毒(RAd-p53)、E1B 蛋白缺陷型溶瘤腺病毒(E1B⁻-OLV)及化疗药物紫杉醇对乳腺癌干细胞的作用。[方法] 分别用 RAd-p53、E1B⁻-OLV、紫杉醇感染人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞, 并常规培养 MCF-7 细胞。流式细胞仪(FCM)分析 CD44⁺CD24⁻ 细胞的表型比例, 及行微球体培养, 观察微球体大小, 用 FCM 分析微球体 CD44⁺CD24⁻ 细胞的比例。[结果] RAd-p53 感染 MCF-7 细胞的 CD24⁻, CD44⁺, CD44⁺CD24⁻ 比例为 (3.670±0.577)%, (53.300±0.580)%, (0.930±0.116)%(*P*<0.05); E1B⁻-OLV 感染组为 (24±1)%, (60±1)%, (10.670±1.528)%(*P*<0.05); 紫杉醇组为 (14±1)%, (3.670±0.577)%, (2.330±1.528)%(*P*>0.05), 对照组为 (14±1)%, (50±1)%, (2.270±0.643)%. RAd-p53 感染组及 E1B⁻-OLV 感染组的微球体大小与对照相仿, 成球时间早于对照组, 紫杉醇组的微球体小于对照组, 成球时间则晚于对照组。RAd-p53 组微球体中 CD24⁻, CD44⁺, CD44⁺CD24⁻ 的比例为 (3.670±0.577)%, (44.670±0.577)%, (17±1)%(*P*<0.05); E1B⁻-OLV 组为 (24.670±0.577)%, (29.670±1.528)%, (23.5±0.5)%(*P*<0.05); 紫杉醇组为 (77.330±1.528)%, (1.100±0.361)%(*P*<0.05), (19±1)%(*P*>0.05); 对照组为 (11±1)%, (50±1)%, (20.330±1.528)%. [结论] RAd-p53 促进 BCSCs 分化成增殖祖细胞, 减少了 CD44⁺CD24⁻ 细胞比例。E1B⁻-OLV 病毒杀伤 MCF-7 细胞, 加快 BCSCs 自我更新, 促进其分化成干细胞性质的子代。紫杉醇能杀死 MCF-7 细胞, 对 BCSCs 无杀伤或促进其分化作用。

关键词: 溶瘤病毒; 化疗; 乳腺癌干细胞; 微球体; CD44⁺CD24⁻ 细胞

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2013)07-0575-06

doi:10.11735/j.issn1004-0242.2013.07.A013

Role of RAd-p53、E1B⁻-OLV and Paclitaxel on Breast Cancer Stem Cells

MA Yue¹, ZHANG Feng-chun², WANG Hong-xia¹, et al.

(1. Renji Hospital, Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China; 2. Suzhou Kowloon Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Suzhou 215021, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the role of recombinant Ad-p53(RAd-p53), E1B protein-deficient oncolytic adenovirus (E1B⁻-OLV) and chemotherapeutic agent paclitaxel on breast cancer stem cells (BCSCs). [Methods] The human breast cancer cell line MCF-7 was infected by RAd-p53, E1B⁻-OLV and paclitaxel. The MCF-7 cells were cultured routinely. The proportion of CD44⁺CD24⁻ cells were assessed by flow cytometry(FCM) in four groups respectively. Meanwhile, mammosphere was cultured in four groups' cells to observe the sizes of mammospheres. The proportion of CD44⁺CD24⁻ cells in four groups were assessed by FCM. [Results] Proportion of CD24⁻, CD44⁺, CD44⁺CD24⁻ in MCF-7 cells infected by RAd-p53 was (3.670±0.577)%, (53.300±0.580)%, (0.930±0.116)%(*P*<0.05), which was (24±1)%, (60±1)%, (10.670±1.528)%(*P*<0.05) in the E1B⁻-OLV group. In the paclitaxel group, the proportion was (14±1)%, (3.670±0.577)%, (2.330±1.528)%(*P*>0.05). Meanwhile, in the control group, the proportion was (14±1)%, (50±1)%, (2.270±0.643)%. In the RAd-p53 and E1B⁻-OLV groups, the time of mammosphere's formation was earlier than that in control group, the volumes were equal to control group. In the paclitaxel group, the time of mammosphere's formation was later, the volume was smaller than control group. The proportion of CD24⁻, CD44⁺, CD44⁺CD24⁻ in the RAd-p53 group was (3.670±0.577)%, (44.670±0.577)%, (17±1)%(*P*<0.05). In the E1B⁻-OLV group, the proportion was (24.670±0.577)%, (29.670±1.528)%, (23.5±0.5)%(*P*<0.05). In the paclitaxel group, the proportion were (77.330±1.528)%, (1.100±0.361)%(*P*<0.05), (19±1)%(*P*>0.05). Meanwhile, in the control group, the proportion was (11±1)%, (50±1)%, (20.330±1.528)%. [Conclusion] RAd-p53 accelerates the speed of BCSCs differentiation to progenitor cells and decreases the proportion of CD44⁺CD24⁻ cells. E1B⁻-OLV kills MCF-7 cells. It also accelerates the speed of self-renewed and differentiation of the BCSCs into the progeny of stem cell-like properties. Paclitaxel kills MCF-7 cells but have little effect on BCSCs.

Key words: oncolytic virus; chemotherapy; breast cancer stem cells; mammosphere; CD44⁺CD24⁻ cell

收稿日期: 2012-10-05; 修回日期: 2013-01-14

通讯作者: 叶明, E-mail: renjiyeming@gmail.com

乳腺癌是女性癌症死亡的首要原因,占癌症发病率的23%。2008年的统计数据表明,全球138万妇女被确诊为乳腺癌,46万人死于乳腺癌^[1]。2003年,AI-Hajj等^[2]从乳腺癌组织中分离出CD44⁺CD24^{-/lowlin}的乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells,BCSCs),这类细胞与未分化细胞相比,致瘤性增加了50倍。BCSCs具备自我更新、增殖能力和多向分化潜能,其细胞膜上高表达乳腺癌耐药蛋白(BCRPs)类转运蛋白,拮抗肿瘤药,常规的肿瘤治疗对这类细胞无效^[3,4]。

溶瘤治疗原理为通过对自然界存在的一些致病力较弱的病毒进行基因改造制成特殊的溶瘤病毒。利用靶细胞中抑癌基因的失活或缺陷从而选择性地感染肿瘤细胞^[5]。溶瘤腺病毒能杀伤增殖及静止的细胞,这类病毒依靠病毒本身特异性在肿瘤细胞中的复制来杀死并裂解肿瘤细胞,裂解细胞后释放出来的病毒又可以进一步感染周围的肿瘤细胞。溶瘤病毒的杀伤治疗指数是1000/1,即每杀伤1000个瘤细胞会同时杀伤1个正常细胞,而化疗的治疗指数是6/10^[6,7]。我们假设这些病毒能在BCSCs中复制,研究重组p53腺病毒(RAd-p53)、E1B蛋白缺陷型溶瘤腺病毒(E1B-OLV)及紫杉醇对BCSCs的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

细胞株和试剂:人乳腺癌MCF-7细胞株(中国科学院细胞研究所),DMEM-F12培养液(Hyclone公司),B27、EGF(invitrogen公司),CD24及CD44(BD公司),胰岛素(Sigma)。紫杉醇(海口市制药厂有限公司),RAd-p53、E1B-OLV由本实验室与上海生命科学学院健康科学中心免疫学联合实验室共同构建。

器材及仪器:FACS Aria流式细胞仪(Becton Dickinson),离心机(Hitachi),可调式移液仪(芬兰百得公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 MCF-7细胞培养

人乳腺癌细胞系MCF-7用含10%小牛血清,100U/ml青霉素和100U/ml链霉素的DMEM-F12培养液,在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养;用0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化、传代。实验选用对数生长期细胞。

1.2.2 实验分组

①RAd-p53组:培养MCF-7细胞至对数生长期后加入MOI=1 000的RAd-p53,感染2.5h后,吸弃病毒液,再加入含10%小牛血清的DMEM-F12培养液,在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养;②E1B-OLV组:培养MCF-7细胞至对数生长期后加入MOI=1000的E1B-OLV,感染2.5h后,吸弃病毒液,再加入含10%小牛血清的DMEM-F12培养液,在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养;③紫杉醇组:培养MCF-7细胞至对数生长期后加入IC₅₀=2 500μg/L的紫杉醇^[8,9],共培养3d后,吸弃培养液,再加入含10%小牛血清的DMEM-F12培养液,在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养。

1.2.3 微球体培养

4组细胞分别制备单细胞悬液,取2×10⁵个细胞,用含表皮生长因子但不含血清的DMEM-F12培养液,在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养13d,每3~4d半量换液并观察微球体形成状态。定义≥60μm的球体为微球体。

1.2.4 CD44⁺CD24⁻细胞表型流式分析

单细胞悬液1 500rpm、4℃离心6min后加入4℃、含2.5%胎牛血清的PBS重悬,行细胞计数。每个流式管中取2×10⁵个细胞,1 500rpm、4℃离心6min后,分别加入含2.5%胎牛血清的PBS及CD24、CD44。37℃、避光孵育30min后1 500rpm、4℃离心6min,吸弃上清,每管加入400μl含2.5%胎牛血清的PBS,混匀后行流式细胞(flow cytometry,FCM)分析。用FACS Aria的流式细胞分选仪进行检测,Flowjo5.7.2软件分析结果。

1.3 统计学处理

采用SAS6.12软件对实验数据进行分析,实验分别独立重复3次,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAd-p53、E1B-OLV和紫杉醇抑制MCF-7细胞增殖

RAd-p53感染MCF-7细胞组及对照组细胞,显微镜下观察到细胞折光性好,取少量台盼蓝染色计数,细胞生长良好(Figure 1A、1D)。E1B-OLV病毒感染

染 MCF-7 细胞后培养第 4d, 显微镜下观察到大部分细胞折光性差, 胞质萎缩, 取少量台盼蓝染色计数, 60% 细胞凋亡 (Figure 1B)。紫杉醇加入 MCF-7 细胞后培养第 4d, 显微镜下观察到一部分细胞折光性差, 胞质萎缩, 取少量台盼蓝染色计数, 40% 细胞凋亡 (Figure 1C)。

2.2 RAd-p53、E1B-OLV 及紫杉醇对乳腺癌干细胞的影响

流式分析后细胞 $CD24^-$ 、 $CD44^+$ 、 $CD44^+CD24^-$ 含量比例: RAd-p53 组为 $(3.670 \pm 0.577)\%$ ($P < 0.05$), $(53.300 \pm 0.580)\%$ ($P < 0.05$), $(0.930 \pm 0.116)\%$ ($P < 0.05$) (Figure 2A); E1B-OLV 组为 $(24 \pm 1)\%$ ($P < 0.05$), $(60 \pm 1)\%$ ($P < 0.05$), $(10.670 \pm 1.528)\%$ ($P < 0.05$) (Figure 2B); 紫杉醇组为 $(14 \pm 1)\%$ ($P > 0.05$), $(3.670 \pm 0.577)\%$ ($P < 0.05$), $(2.330 \pm 1.528)\%$ ($P > 0.05$) (Figure 2C); 对照组为 $(14 \pm 1)\%$, $(50 \pm 1)\%$, $(2.270 \pm 0.643)\%$ (Figure 2D)。

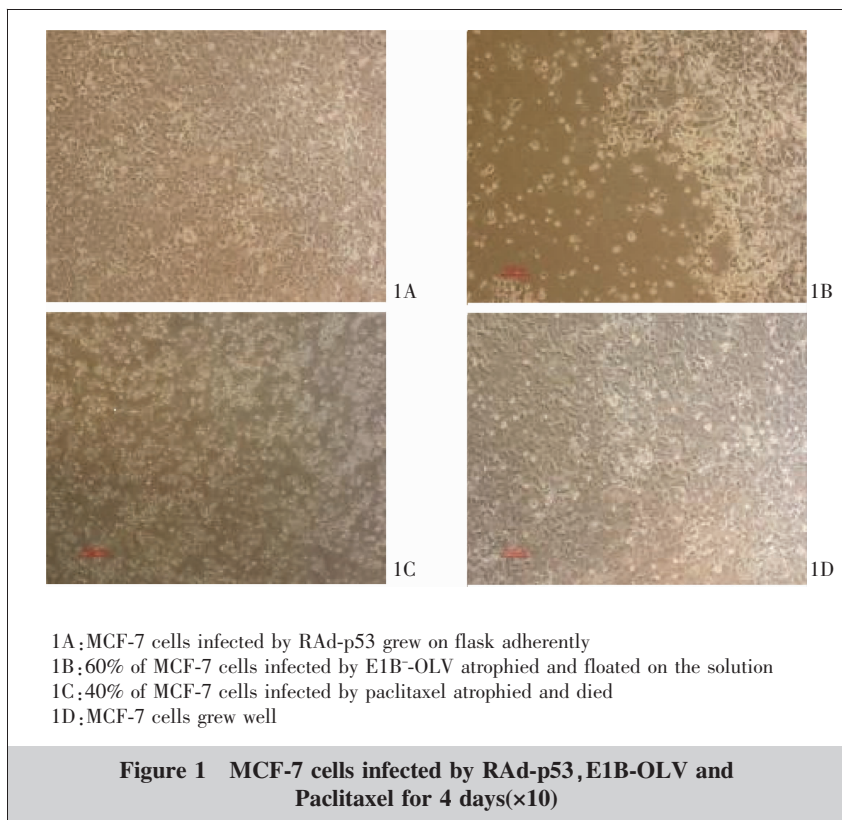
2.3 RAd-p53、E1B-OLV 及紫杉醇对微球体形成及 $CD44^+CD24^-$ 的影响

2.3.1 微球体大小差异

在微球体培养第 4、9d 时, RAd-p53 组最大微球体达 $(126.670 \times 123.33 \pm 2.887 \times 7.638) \mu m$ ($P < 0.05$), $(215 \times 220 \pm 27.84 \times 17.32) \mu m$ ($P > 0.05$) (Figure 3A); E1B-OLV 组为 $(111.67 \times 106.67 \pm 7.638 \times 11.547) \mu m$ ($P < 0.05$), $(153.33 \times 150 \pm 5.774 \times 43.589) \mu m$ ($P > 0.05$) (Figure 3B); 紫杉醇组为 $(56.67 \times 66.67 \pm 5.774 \times 15.275) \mu m$ ($P > 0.05$), $(89.33 \times 83.33 \pm 8.145 \times 15.275) \mu m$ ($P < 0.05$) (Figure 3C); 对照组为 $(78.33 \times 73.33 \pm 7.638 \times 10.408) \mu m$, $(191.67 \times 190 \pm 34.034 \times 26.458) \mu m$ (Figure 3D)。RAd-p53 组及 E1B-OLV 组的细胞在培养第 2d, 形成微球体, 对照组在第 3d, 紫杉醇组则在第 4d 形成微球体。

2.3.2 微球体 $CD44^+CD24^-$ 细胞表型 FCM 分析

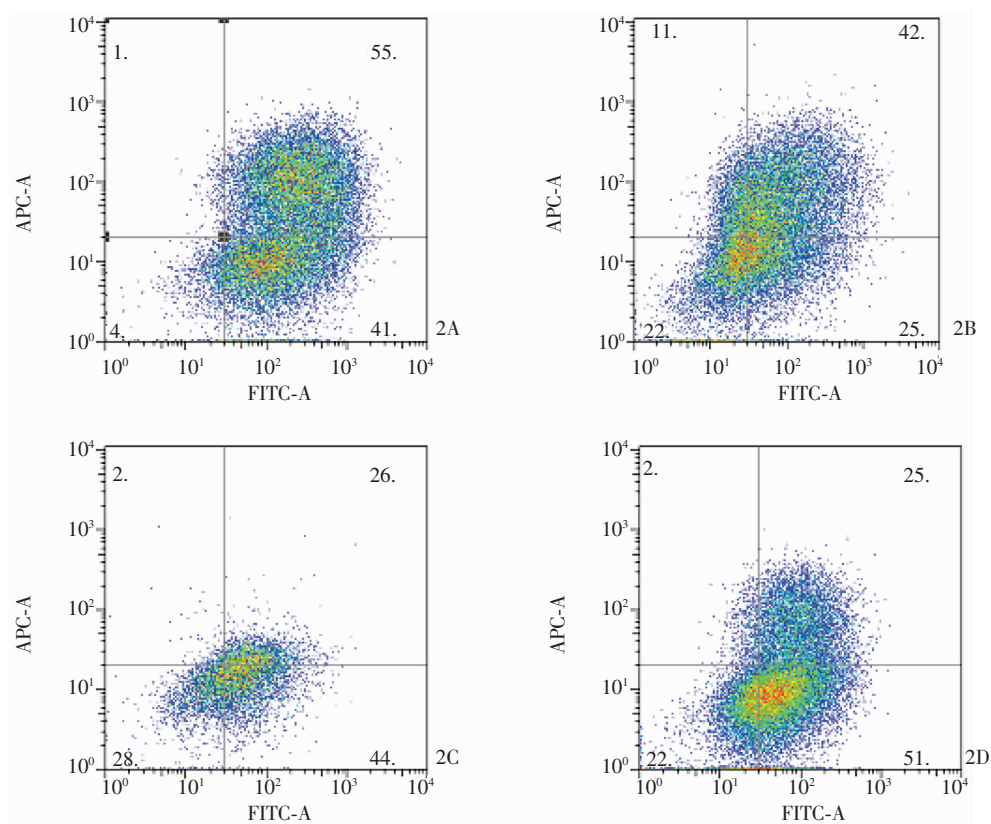
上述 4 组细胞微球体培养后分别行 FCM 分析 $CD24^-$ 、 $CD44^+$ 、 $CD44^+CD24^-$ 比例: RAd-p53 组为 $(3.670 \pm 0.577)\%$ ($P < 0.05$), $(44.670 \pm 0.577)\%$ ($P < 0.05$), $(17 \pm 1)\%$ ($P < 0.05$) (Figure 4A); E1B-OLV 组为 $(24.670$



$\pm 0.577)\%$ ($P < 0.05$), $(29.670 \pm 1.528)\%$ ($P < 0.05$), $(23.5 \pm 0.5)\%$ ($P < 0.05$) (Figure 4B); 紫杉醇组为 $(77.330 \pm 1.528)\%$ ($P < 0.05$), $(1.100 \pm 0.361)\%$ ($P < 0.05$), $(19 \pm 1)\%$ ($P > 0.05$) (Figure 4C); 对照组为 $(11 \pm 1)\%$, $(50 \pm 1)\%$, $(20.330 \pm 1.528)\%$ (Figure 4D)。

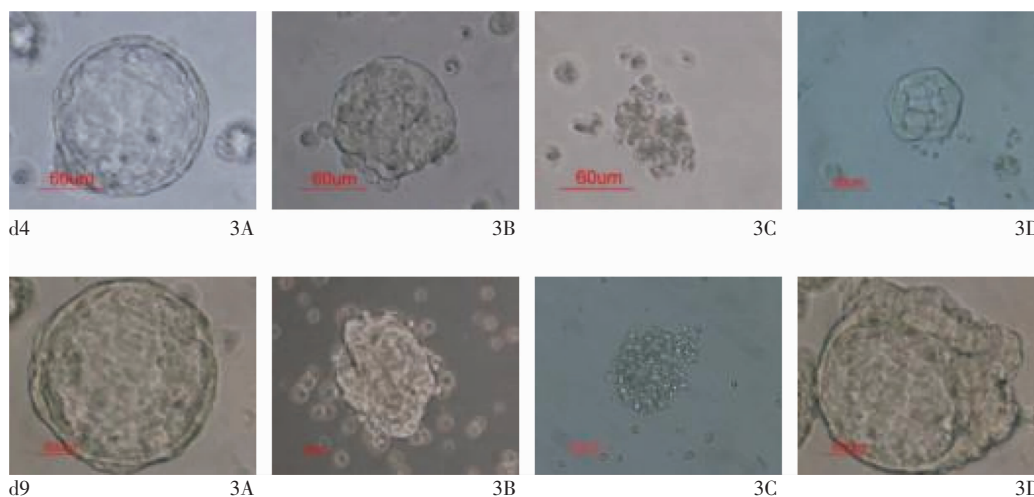
3 讨论

目前, 定义乳腺癌干细胞常用的方法为利用细胞表面标记分选出 $CD44^+CD24^{low}$ 细胞, 分析乳腺癌细胞系, 表明腔细胞系高表达 $CD44^{high}CD24^{low}$ 表型, 基底/间充质细胞系高表达 $CD44^+CD24^{low}$ 表型, 而基底/上皮细胞高表达 $CD44^+CD24^+$ 表型。CD44 是一种归巢细胞黏附分子, 与 BCSCs 的生长密切相关且与乳腺癌患者的预后差相关^[10,11]。MCF-7 细胞株中 $CD44^+CD24^{low}$ 细胞占 1.6%~2.6%^[12,13]。肿瘤干细胞 (CSCs) 被认为是许多肿瘤复发的根源。在其分化过程中, 有对称及不对称分裂。通过对称分裂, 可以产生 2 个 CSCs 的子代, 扩大了 CSCs 的数量; 通过不对称分裂, 产生 1 个有干细胞性质的子代及 1 个能进一步定向分化的增殖祖细胞^[14]。



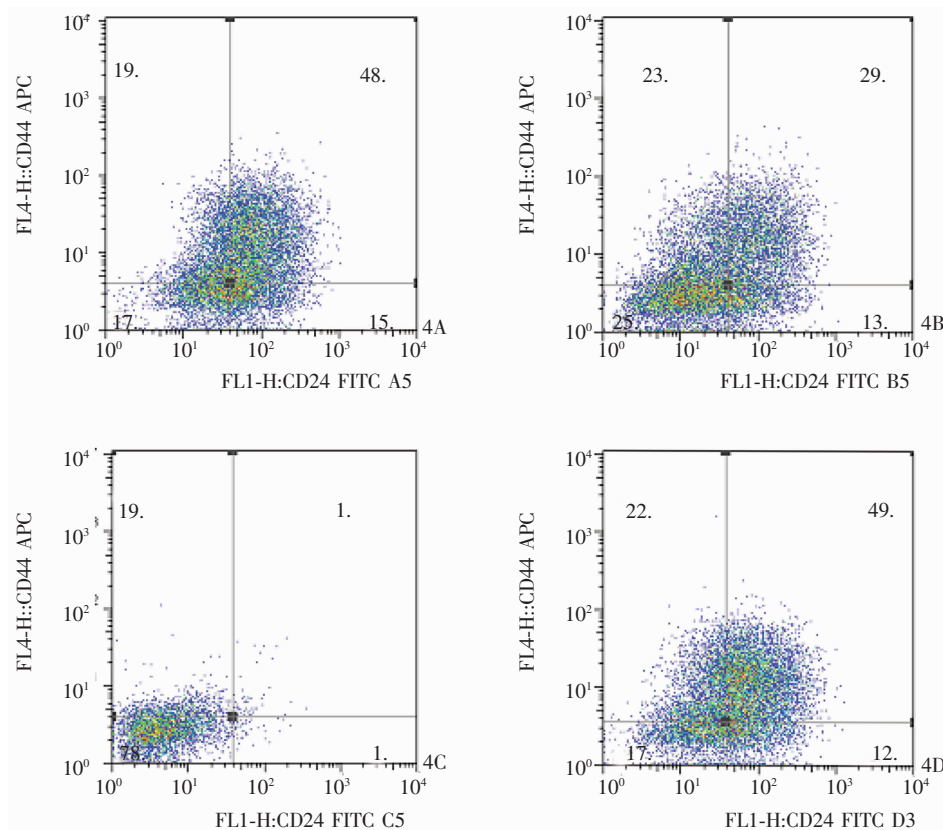
Note: FITC stands for the cells marked by CD24 antibody, APC stands for the cells marked by CD44 antibody. The cells in the upper left of quadrant were considered as CD44⁺/CD24⁻. The proportion of CD44⁺/CD24⁻ cells infected by Rad-p53, E1B-OLV, paclitaxel were 1% (Figure 2A), 11% (Figure 2B), 2% (Figure 2C), 2% (Figure 2D), respectively.

Figure 2 CD44⁺ and CD24⁻ expression of cells derived from different groups by FCM



On day 4 and 9 of cultivation, the maximal volume of mammosphere was 125×130μm, 220×230μm in Rad-p53 infected group (Figure 3A); 105×100μm, 160×200μm in E1B-OLV infected group (Figure 3B); 60×80μm, 95×100μm in paclitaxel infected group (Figure 3C); 85×85μm, 230×220μm in control group (Figure 3D).

Figure 3 Mammosphere cultivation after drug infected



Note: FITC stands for the cells marked by CD24 antibody, APC stands for the cells marked by CD44 antibody. The cells in the upper left of quadrant were considered as CD44⁺CD24⁻. The proportion of CD44⁺CD24⁻ cells infected by RAd-p53, E1B-OLV, paclitaxel were 19% (Figure 4A), 23% (Figure 4B), 19% (Figure 4C), 22% (Figure 4D), respectively.

Figure 4 CD44⁺ and CD24⁻ expression of cells derived from different mammosphere groups by FCM

在无血清的含 bFGF、EGF 的培养液中乳腺癌细胞形成微球体,这种微球体富含 CD44⁺/CD24^{-low} 细胞,不表达分化腔上皮、肌上皮等分化标志物,在分化条件下培养具有多系分化的能力,致瘤性也明显提高^[15,16]。实验中加入两种病毒或紫杉醇的 MCF-7 细胞微球体培养后与培养前比较,CD44⁺CD24⁻ 的比例明显增高。RAd-p53 和 E1B-OLV 组微球体的成球时间较对照组早,说明早期微球体的形成不仅有 BCSCs 的参与,也有分化细胞的参与,随着微球体的培养,BCSCs 富集。

腺病毒基因组编码了许多早期蛋白(E 蛋白),E 蛋白的功能旨在激活细胞周期,使细胞进入 S 期。E1 蛋白使病毒破坏了细胞的基本功能,导致了 E2F 的激活,启动细胞周期;灭活肿瘤抑制因子(如 p53, RB);抑制细胞凋亡;激活 PI-3K/mTOR 途径;增强细

胞对 TNF- α 的敏感性;结合染色质改建因子,调整转录^[17,18]。Eriksson^[19]和 Jiang^[20]构建了嵌合型溶瘤腺病毒 Ad5/3- Δ 24, Ad5-Pk7- Δ 24 和 Δ 24-RGD,分别靶向杀伤乳腺癌干细胞和脑肿瘤干细胞,在体内外实验中均有显著性效果。

本实验中 RAd-p53 病毒感染 MCF-7 细胞后与对照组相比,细胞生长良好,CD44⁺CD24⁻ 细胞比例减少,微球体形成时间更早,大小相仿,微球体 CD44⁺CD24⁻ 细胞比例减少。RAd-p53 利用腺病毒作为载体,把正常的外源性肿瘤抑制基因 p53 导入肿瘤细胞来杀伤肿瘤细胞,抑制肿瘤生长。MCF-7 细胞的 p53 基因为野生型,BCSCs 的 p53 基因为突变型^[5,19],提示 RAd-p53 不能有效地杀伤 MCF-7 细胞,但促进 BCSCs 分化成增殖祖细胞,进一步分化成 MCF-7 细胞。

E1B-OLV 病毒感染 MCF-7 细胞后,60% MCF-7 细胞死亡,与对照组相比,CD44⁺CD24⁻细胞比例增加,微球体形成的时间更早,大小相仿,微球体 CD44⁺CD24⁻细胞比例增加。表明 E1B-OLV 病毒杀伤 MCF-7 细胞,不仅对 BCSCs 没有杀伤作用,反而加快其自我更新,促进其分化成干细胞性质的子代。

紫杉醇感染 MCF-7 细胞后,40% MCF-7 细胞凋亡,与对照组相比,CD44⁺CD24⁻细胞比例相同,微球体形成的时间相仿,体积减小,微球体 CD44⁺CD24⁻细胞比例相同。表明紫杉醇能杀死 MCF-7 细胞,但对 BCSCs 无杀伤或促进其分化作用。

目前肿瘤的治疗方法能杀死增殖的肿瘤细胞,然而对 CSCs 却无效。今后的治疗方法可先杀死增殖的肿瘤细胞,减小肿瘤体积,改善患者的症状,再靶向杀伤 BCSCs 或者促进其分化 BCSCs,从源头上抑制肿瘤的发生及复发^[21]。本实验体现了溶瘤病毒和紫杉醇类化疗药物对于 BCSCs 不同的作用,两种不同靶点的溶瘤病毒对于 BCSCs 作用的不同,为以 BCSCs 为靶点的有效的溶瘤病毒、基因药物或化学药物筛选提供了重要思路。由于本文仅为初步研究,我们将继续深入从信号传导通路及基因网络角度完善研究方法,为乳腺癌的治疗提供科学依据。

参考文献:

- [1] Howell A. The emerging breast cancer epidemic: early diagnosis and treatment [J]. Breast Cancer Res, 2010, 61(2): 69-90.
- [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] Hirose H, Yamamoto H, Miyoshi N, et al. Cancer stem cells in solid tumors [J]. 2010, 37(13): 2809-2812.
- [4] Ablett MP, Singh JK, Clarke RB. Stem cells in breast tumours: are they ready for the clinic? [J]. European Journal of Cancer, 2012, 48(14): 2104-2116.
- [5] Hirai M, Kelsey LS, Maneval DC, et al. Adenovirus p53 purging for human breast cancer stem cell products [J]. Acta Haematol, 1999, 101(2): 97-105.
- [6] Hartkopf AD, Fehm T, Wallwiener D, et al. Oncolytic virotherapy of breast cancer [J]. Gynecol Oncol, 2011, 123(1): 164-171.
- [7] Nguyen NP, Almeida FS, Chi A, et al. Molecular biology of breast cancer stem cells: potential clinical applications [J]. Cancer Treat Rev, 2010, 36(6): 485-491.
- [8] Wang XW, Zhou P. Investigation of growth inhibition of MCF-7 cell line by tamoxifen combined with cisplatin and paclitaxol [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(7): 1308-1310. [王雄文, 周蓓. 三苯氧胺联合顺铂及紫杉醇抑制 MCF-7 细胞增殖的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(7): 1308-1310.]
- [9] Yuan LL. Study of taxol induced apoptosis in breast cancer MCF-7 cells via Fas/FasL pathway [D]. Northeast Agricultural University, 2006. [袁丽丽. 紫杉醇诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的 Fas/FasL 信号通路研究 [D]. 东北农业大学, 2006.]
- [10] Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype [J]. J Clin Pathol, 2011, 64 (11): 937-946.
- [11] Wang Z, Shi Q, Wang Z, et al. Clinicopathologic correlation of cancer stem cell markers CD44, CD24, VEGF and HIF-1a in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study [J]. Pathol Res Pract, 2011, 207(8): 505-513.
- [12] Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24^{high}/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation [J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(24): 1777-1785.
- [13] Bauerschmitz GJ, Rankin T, Kangasniemi L, et al. Tissue-specific promoters active in CD44⁺CD24^{-low} breast cancer cells [J]. Cancer Res, 2008, 68(14): 5533-5539.
- [14] Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy [J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(2): R25.
- [15] 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.
- [16] Harrison H, Farnie G, Howell SJ, et al. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor [J]. Cancer Res, 2010, 70(2): 709-718.
- [17] Ramon A. Cancer selective adenoviruses [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2007, 28 (1): 42-58.
- [18] Loktev VB, Ivan'kina TI, Netesov SV, et al. Oncolytic parvoviruses. a new approaches for cancer therapy [J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2012, (2): 42-47.
- [19] Eriksson M, Guse K, Bauerschmitz G, et al. Oncolytic adenoviruses kill breast cancer initiating CD44⁺CD24^{-low} cells [J]. Molecular Therapy, 2007, 15(12): 2088-2099.
- [20] Jiang H, Gomez-Manzano C, Aoki H, et al. Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: role of autophagic cell death [J]. J Natl Cancer Inst, 2007, 99 (18): 1410-1414.
- [21] Alonso MM, Jiang H, Gomez-Manzano C, et al. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses [J]. Methods Mol Biol, 2012, 797: 111-125.