

侧群细胞及其在肿瘤干细胞研究中的应用

宋倩 综述, 徐笑红 审校

(浙江省肿瘤医院, 浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室,

浙江 杭州 310022)

摘要:目前应用肿瘤干细胞表面标志鉴定、分选干细胞的方法,已经在多种肿瘤中发现了肿瘤干细胞。而不少肿瘤干细胞表面标志是未知的,因此可以通过初次分离得到干细胞样细胞再鉴定出肿瘤干细胞。侧群细胞是具有干细胞样特性的细胞,它们具有起始肿瘤发生、表达干细胞样基因及耐受化疗药物的特性。文章就侧群细胞的分选方法、特征、在肿瘤干细胞研究中的应用及存在的问题进行综述。

关键词:侧群细胞;肿瘤干细胞;ABC转运蛋白

中图分类号:R73-3 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2015)11-0928-06

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2015.11.B014

Progress on Side Population Cells and Their Application in Cancer Stem Cells' Research

SONG Qian, XU Xiao-hong

(Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang Key Laboratory of Diagnosis & Treatment Technology on Thoracic Cancer(Lung and Esophagus), Hangzhou 310022, China)

Abstract: Cancer stem cells (CSCs) have been found to exist in multiple types of tumor. They are often identified and isolated by the presence of specific surface markers. However, there are still many kinds of CSCs without any markers identified. Side population (SP) cells are one kind of cells sharing CSC characteristic, which play an important role in cancer initiation. They express stem-like genes and are resistant to chemotherapeutic drugs. This review is intended to appraise the sorting method, characteristics, the application in the cancer stem cells' research and the existing problems of SP cells.

Subject words: side population cell; cancer stem cell; ABC transporter protein

尽管实体瘤是单克隆起源,但是大量体内外实验都证实实体瘤是由具有不同增殖、分化、肿瘤起始能力的异源细胞群组成^[1,2]。研究发现,异种移植肿瘤细胞到免疫缺陷小鼠身上,只有小部分细胞具有肿瘤起始能力^[3-7]。因此,有学者提出了肿瘤干细胞假说,即肿瘤中存在一小群具有干细胞特性的细胞^[8-11],与正常干细胞一样也具有自我更新和多向分化的能力。肿瘤难以根治的原因可能正是常规治疗针对的是大部分肿瘤细胞而忽略了肿瘤干细胞。因此鉴别和消灭肿瘤干细胞将会成为有效治疗肿瘤的新方法。尽管目前的研究已经发现了一些肿瘤干细胞标志,如脑胶质肿瘤和结肠癌的肿瘤标志是 CD133^[12-15],乳

腺癌的肿瘤标志是 CD44⁺/CD24⁻/Lin⁻^[8]。但是大部分肿瘤的干细胞标志是未知的,因此不能通过该方法分选获得这些肿瘤的肿瘤干细胞。而且不同的肿瘤具有不同的干细胞标志,普通干细胞的标志并不适用于肿瘤干细胞。研究表明,通过细胞外排 Hoechst33342 荧光染料分选具有干细胞样特性的侧群细胞是初次分离干细胞的常用方法^[16]。

1 侧群细胞概述

1996 年,Goodell 等在用 Hoechst33342 荧光染色对小鼠骨髓造血干细胞进行检测时,发现有极少一部分细胞可以将进入细胞核的荧光染料排出胞外,在荧光显微镜下观察或流式检测时表现为不着色,在流式二维分析点阵图上,这一小群细胞呈彗星

通讯作者:徐笑红,主任,主任技师;浙江省肿瘤医院检验科,浙江省杭州市拱墅区半山桥广济路 38 号(310022);E-mail: zjhxxh@163.com

收稿日期:2014-11-02; **修回日期:**2015-01-27

状分布在细胞主群一侧,他们将这群细胞命名为侧群(side population,SP)细胞,将这种表型命名为 SP 表型^[17]。已有报道显示^[16,18,19],SP 细胞具有多向分化、自我更新、高致瘤性及耐药性,这些特征与肿瘤干细胞特征非常相似,因此近年来 SP 细胞逐渐成为肿瘤干细胞研究的切入点。

Hoechst33342 是一种核酸结合染料,优先与 DNA 小沟中的 A-T 碱基对结合,在紫外光激发下可发出蓝色和红色两种荧光^[20]。实验中检测蓝色荧光(424/44nm BP)和红色荧光(620nm LP)来分析 SP 细胞,同时可在两变量散点图中观察到 SP 细胞。

最初在乳腺癌细胞系 MCF-7 中发现 SP 表型是由 ABC 转运蛋白家族介导的,其中一个主要的介导分子为 ABCG2(或 BCRP1),后续研究表明它可将多种化疗药物和外源性化学物质转运到胞外^[21]。ABC 转运蛋白活性可被 ABC 转运蛋白抑制剂或者钙离子通路阻滞剂所抑制,从而减少 SP 表型^[22]。Zhou 等^[23]报道了 ABCG2 基因剔除小鼠骨髓中 SP 细胞减少,这表明 ABCG2 与 SP 表型的形成密切相关。此外,SP 细胞也表达其它的 ABC 转运蛋白,如 ABCB1、ABCC1、ABCA2,提示这些分子也有可能是形成 SP 表型的原因。有研究报道在体外培养的小鼠骨髓细胞中以逆转录病毒载体逆转录表达 ABCB1 和 ABCG2 基因后,SP 细胞分别增加了 3.6%^[24]和 62.5%^[25],表明 ABCB1 也与 SP 表型的形成有关。ABC 家族成员参与 SP 细胞外排 Hoechst33342 染料是 SP 表型形成的部分机制,然而更完善的机制还有待进一步研究。

随着研究的深入,逐渐发现 SP 细胞存在于人和动物的许多重要组织器官,如表皮、肺、肝、心脏、脑、乳腺和骨骼肌等均有广泛分布^[26-34]。SP 细胞在不同成体组织的含量不相同,骨髓中的 SP 细胞占骨髓总有核细胞量的 0.79%;骨骼肌、肝、肾、心脏和小肠中 SP 细胞含量较高,占细胞总数的 3.1%~9.1%;而脑组织中 SP 细胞的含量最高,达到了 15.1%^[35]。

2 SP 细胞与肿瘤

目前已经在大量的肿瘤细胞系中检测到 SP 细胞,SP 细胞占总细胞含量的 0~20%^[36-44]。根据肿瘤

干细胞假说,有报道推测肿瘤细胞系中的 SP 细胞比例与该细胞系的致瘤性和侵袭性相关。但到目前为止,还没有证明这种相关性。此外,一些细胞系虽不存在 SP 细胞但依然具有致瘤性,故肿瘤细胞致瘤并不完全依赖于 SP 细胞。

但无论在何种情况下,SP 细胞有助于维护这些细胞系的致瘤潜能^[21,36-41]。例如,在 C6 胶质瘤细胞系中,只有 SP 细胞能再生形成 SP 和非 SP 细胞,表明只有 SP 细胞具有自我更新和重获原始细胞表型的能力。此外,SP 细胞能在体外适当的培养条件下分化为神经元细胞和胶质细胞,提示 C6 中的 SP 细胞是典型的干细胞样细胞,即肿瘤干细胞^[37]。乳腺癌 MCF-7 细胞系中也可以观察到类似的现象^[21]。许多肿瘤细胞系含有 SP 细胞,且细胞克隆实验证实 SP 细胞具有更强的自我更新能力。这些实验结果表明这些细胞系的 SP 细胞具有干细胞样的特征。综上所述,SP 细胞有类似干细胞的特性。

目前大量的研究是在肿瘤细胞系中展开的,但也有些实验对原代肿瘤进行了检测。例如有报道已经对原发性神经母细胞瘤^[42]、卵巢癌的腹水^[43]、大部分的间质肿瘤^[44]进行了检测。实验结果发现在原代间质肿瘤中,肿瘤的分级和 SP 细胞的比例关系存在相关性^[44]。因此,在这些肿瘤中 SP 细胞可能是一个潜在的肿瘤预后指标。

值得一提的是,原发性间质肿瘤存在 SP 细胞,包括原发性骨肉瘤,但骨肉瘤细胞系 SaOS 和 U2OS 却不含 SP 细胞^[42]。可能是因为细胞系并不能完全代表体内肿瘤真实的特性。体外细胞培养的条件与体内肿瘤的环境不同,这会对 SP 检测产生影响。研究发现胶质瘤细胞系 C6 在含有特定生长因子、成纤维细胞生长因子(FGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)或不含血清的培养液体外培养一段时间后,检测发现这些因素均能提高 SP 细胞比例^[37]。此外,骨肉瘤的标志性特征是在同种肿瘤细胞系和不同种骨肉瘤细胞系均有异质均相核型^[45]。这也许可以解释为何原发肿瘤存在 SP 细胞,而缺乏此特征的细胞系不存在 SP 细胞。

2.1 细胞表面标志

目前,大量关于小鼠组织中 SP 细胞表面标志的研究显示这些 SP 细胞均表达 Sca-1 和 CD34。但关于肿瘤组织 SP 细胞表面标志的研究较少,有研究

结果显示从神经母细胞瘤中分选得到的 SP 细胞相对于非 SP 细胞 C-kit/CD117 的表达上调,而 AC133/CD71 和 CD56 的表达下调。SP 细胞表型与神经嵴干细胞的细胞表型是一致的,由此推测从这些肿瘤中分选得到的 SP 细胞是具有干细胞样特性的^[42]。

2.2 致瘤能力

裸鼠成瘤实验是检测细胞起始肿瘤发生能力的金标准。这些异种移植实验中,大多数人类细胞不会诱导肿瘤增长。一方面可能是因为鼠的微环境只能捕获一小部分潜在的肿瘤起始细胞。然而,另一种可能性就是肿瘤干细胞假说,即肿瘤中只有少数细胞具有自我更新、多向分化和促进肿瘤生长的能力。

从肝癌^[40]、肺癌^[38]、胃癌^[39]和鼻咽癌^[41]细胞系中分选到的 SP 细胞相对于非 SP 细胞,异种移植到免疫缺陷小鼠 NOD / SCID 上起始肿瘤发生的能力更强。这与原代间质瘤中的实验结果是一致的。然而,原代间质瘤中分选得到非 SP 细胞移植到免疫缺陷小鼠 NOD / SCID 上能形成肿瘤,但是只有 SP 细胞通过连续异种移植后能起始肿瘤发生。而非 SP 细胞移植形成的肿瘤相较于 SP 细胞形成的肿瘤 DNA 含量更高。原代卵巢癌也有相似的结果^[44]。上述实验结果表明非 SP 细胞可能含有部分瞬时扩增的细胞通过快速增殖来形成肿瘤。然而,这些细胞不具有自我更新的能力,因此连续异种移植后不能起始肿瘤发生。而且原代间质瘤中分选到的非 SP 细胞只能分裂产生非 SP 细胞,因此不能重新形成肿瘤表型^[44]。因此,只有 SP 细胞具有与肿瘤干细胞相似的自我更新和多向分化的能力。

2.3 表达干细胞样基因

相较于非 SP 细胞,SP 细胞中参与调节干细胞功能的基因上调。利用微阵列分析和 RT-PCR 实验验证发现,从乳腺癌 MCF-7 细胞系^[21]、肝癌细胞系^[40]、胃肠癌细胞系^[39]和甲状腺癌细胞系^[36]中分选得到的 SP 细胞相较于非 SP 细胞的 ABCG2 的表达上调。除此之外,结肠癌和乳腺癌细胞系中分选到的 SP 细胞相较于非 SP 细胞,参与 Wnt / β -catenin 信号通路的基因上调^[39]。已有研究报道 Wnt / β -catenin 信号通路基因在肝癌中上调并参与肝癌干细胞的自我更新,由此推测该通路在 SP 细胞中发挥了类似的作用^[46]。最新的研究报道从 MCF-7 乳腺癌细胞系分选的 SP 细胞相比于非 SP 细胞,参与细胞周期调控的

基因如 *EXT1*、*INHBA* 和 *CCNT2* 及参与 PI3K/Akt 通路的相关基因均上调。有趣的是,用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理细胞后 SP 细胞的比例呈现下降的现象,而且 SP 细胞体外集落形成和体内肿瘤形成的能力均降低^[47]。这提示进一步研究 SP 细胞中的信号通路有助于寻找到有效的肿瘤治疗新策略。此外,SP 细胞相较于非 SP 细胞更多是停留在 G₁/G₀ 期,处于相对静止的状态。然而,这些实验大部分是在经过体外长期培养的细胞系中进行的,需要更多关于原发肿瘤的研究来支持这些结果。

最近的研究发现在乳腺癌和结肠癌中有小部分信号通路经常被破坏,大部分信号通路偶尔被破坏^[48]。鉴于这些研究结果,如果 SP 细胞相对于非 SP 细胞被破坏的信号通路不同,推测可能是影响两群细胞具有不同起始肿瘤发生能力的原因。

2.4 耐 药

研究证实 SP 细胞和肿瘤干细胞相较于普通肿瘤细胞更耐受化疗药物。最初是在神经母细胞瘤中发现 SP 细胞对米托蒽醌耐受^[42]。接着又有学者报道卵巢癌的 SP 细胞对阿霉素不敏感^[43]。恶性胶质瘤细胞系和原代胶质母细胞瘤的 SP 细胞对替莫唑胺产生耐受^[48]。此外,CD133⁺的细胞相较于 CD133⁻细胞对替莫唑胺、卡铂、紫杉醇、足叶乙甙均不敏感^[50]。肿瘤干细胞和 SP 细胞产生耐受的机制一方面是细胞抗凋亡的特性,另一方面是细胞含有 ABC 转运蛋白。

肿瘤经化疗治愈后,时常会出现肿瘤复发的情况,可能是肿瘤干细胞通过外排化疗药物引起复发的。已经研究发现的一个机制是,ABC 转运蛋白能外排亲脂性化疗药物如阿霉素类药物^[51]。从小鼠组织,肿瘤细胞系和原代肿瘤中分选到的 SP 细胞与非 SP 细胞相比,ABC 转运蛋白的表达量均上调^[21,36,39,40]。这些蛋白可能是导致 SP 细胞具有强致瘤性的原因,因此这些蛋白可能是一个理想的肿瘤治疗靶点。不幸的是,迄今为止并没有研究发现 ABC 转运蛋白和起始肿瘤发生存在相关性。事实上,ABCG2 阳性的 MCF-7 细胞相比于 ABCG2 阴性细胞并没有表现出强致瘤性^[21]。另外,微阵列分析超过 500 个软组织肉瘤并没有发现 ABCG1 转运蛋白与肿瘤的分级相关^[52]。然而,这些数据并没有完全排除两者的相关性。不同类型的肿瘤中具有不同的肿瘤干细胞标志物,转运蛋白的表达和功能也不同。例如 *ABCB1a/b*/

ABCG2 3 个基因敲除小鼠的骨髓中仍然存在 SP 细胞^[25]。因此,在任何肿瘤中都可能由多个 ABC 转运蛋白参与 SP 表型的形成。在这些对化疗耐受的肿瘤中,ABC 转运蛋白的表达与 SP 细胞的比例是强相关的,而这些转运蛋白可能是理想的治疗靶点。

3 存在的问题

目前已有专家质疑用 Hoechst 染料来分离干细胞样细胞。首先,Hoechst 与 DNA 结合进行染色具有细胞毒性。因此,有学者认为 SP 细胞不是干细胞样细胞,而是能够逃避 Hoechst 杀伤作用的小部分细胞。同时,外排染料是一个动态的过程,染色的时间、染料浓度和细胞浓度对 SP 细胞比例都会产生影响。此外,流式细胞仪门控检测方法用于分离 SP 细胞缺少门控划分的一致性^[53]。综上所述,SP 和非 SP 细胞的分选受多方面因素的影响。

关于用 Hoechst 染料来分离肿瘤起始细胞的研究正在试图解决这些问题。例如,原发性间质瘤分选到的非 SP 细胞在初次移植能形成肿瘤,然而,再次移植非 SP 细胞就不能形成肿瘤,这可能是由于非 SP 细胞不具有自我更新能力。但有研究报道了初次移植 Hoechst 染料处理过的非 SP 细胞依然能形成肿瘤^[44]。另外也有报道关于乳腺癌 MCF-7 细胞中分选到的非 SP 细胞,以 Hoechst 染色阳性和阴性两个实验组进行实验,发现两组细胞体内致瘤性和体外克隆形成的能力是相似的。综上所述,染料产生的细胞毒性并不会引起具有干细胞样特性的 SP 细胞增多。

在实验中运用 ABC 转运蛋白的抑制剂如维拉帕米作为阳性对照,但是这种方法并不能得到理想的结果,因为有部分阳性的细胞不在 SP 门内。而且 SP 门划分方法不同会导致不同的干细胞样潜能。坐标中低象限的细胞相较于高象限的细胞具有更强的干细胞样潜能^[53]。综上可知,严格的 SP 门划分方法将有助于分选到真正的 SP 细胞。但各种干细胞分选方法均有优缺点,因此多种方法联合使用来分选干细胞有助于得到真正的干细胞。

4 展 望

在正常组织中,干细胞负责修复受损组织,因此

干细胞具有一些特性。从理论上讲,从组织中分离得到干细胞很简单。而不同类型的肿瘤和不同亚类的肿瘤均具有不同的干细胞标志,因此需要依赖干细胞标志来分选得到不同肿瘤的干细胞。例如使用染料外排法从小鼠骨髓中获得干细胞是非常有效的。该方法也在不同的肿瘤细胞系和原代肿瘤中得到了验证。在缺失肿瘤干细胞标志的情况下,SP 表型可以被作为肿瘤干细胞的标志。例如 SP 细胞具有强致瘤性,这些细胞可能表达新的肿瘤起始细胞抗原。因此可以通过 SP 细胞表面的抗原制作识别肿瘤干细胞标志的抗体。而相对于肿瘤球形成实验,SP 方法特异性更强。

有意思的是分级较高的肿瘤具有更多 SP 细胞^[44]。例如含有更多 SP 细胞的肿瘤对化疗药物更加耐受。因此根据肿瘤患者是否含有 SP 细胞,进行选择治疗将有助于提高治疗效率和改善患者预后。同时减少肿瘤病人体内的 SP 细胞数量也是一个潜在的治疗方法。在间质肿瘤,具有侵袭性的纤维瘤使用干扰素后 SP 细胞增多,这表明化学试剂会影响 SP 细胞的数目^[54]。因此可以联合常规化疗药进行治疗能减少肿瘤发生细胞进而阻止肿瘤复发。

参考文献:

- [1] Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors[J]. Ann Rev Med, 1979, 30: 135-143.
- [2] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors [J]. Science, 1985, 227 (4687): 642-645.
- [3] Heppner GH. Tumor heterogeneity [J]. Cancer Res, 1984, 44(6): 2259-2265.
- [4] Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells[J]. Science, 1977, 197(4302): 461-463.
- [5] Bergsagel DE, Valeriote FA. Growth characteristics of a mouse plasma cell tumor [J]. Cancer Res, 1968, 28(11): 2187-2196.
- [6] Bruce WR, Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo[J]. Nature, 1963, 199: 79-80.
- [7] Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications [J]. Science, 1982, 217 (4564): 998-1003.
- [8] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospec-

- tive identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7):3983–3988.
- [9] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414 (6859):105–111.
- [10] Lobo NA, Shimono Y, Qian D, et al. The biology of cancer stem cells [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23:675–699.
- [11] Pardoll R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3 (12):895–902.
- [12] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445(7123):106–110.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432 (7015):396–401.
- [16] Wu CP, Zhou L, Xie M, et al. Identification of cancer stem-like side population cells in purified primary cultured human laryngeal squamous cell carcinoma epithelia [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e65750.
- [17] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(4):1797–1806.
- [18] He K, Xu T, Xu Y, et al. Cancer cells acquire a drug resistant, highly tumorigenic, cancer stem-like phenotype through modulation of the PI3K/Akt/beta-catenin/CBP pathway [J]. *Int J Cancer*, 2013, 134(1):43–54.
- [19] Teshima K, Nara M, Watanabe A, et al. Dysregulation of BMI1 and microRNA-16 collaborate to enhance an anti-apoptotic potential in the side population of refractory mantle cell lymphoma [J]. *Oncogene*, 2013, 33(17):2191–2203.
- [20] Simpson C, Pearce DJ, Bonnet D, et al. Out of the blue: a comparison of Hoechst side population (SP) analysis of murine bone marrow using 325, 363 and 407 nm excitation sources [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 310(1–2):171–181.
- [21] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (14):6207–6219.
- [22] Unno K, Jain M, Liao R. Cardiac side population cells: moving toward the center stage in cardiac regeneration [J]. *Circ Res*, 2012, 110(10):1355–1363.
- [23] Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, et al. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(19):12339–12344.
- [24] Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1):3–12.
- [25] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype [J]. *Nat Med*, 2001, 7(9):1028–1034.
- [26] Kim M, Morshead CM. Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis [J]. *J Neurosci*, 2003, 23 (33):10703–10709.
- [27] Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, et al. Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis [J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (4):965–974.
- [28] Majka SM, Beutzi MA, Hagen M, et al. Identification of novel resident pulmonary stem cells: form and function of the lung side population [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(8):1073–1081.
- [29] Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart [J]. *Dev Biol*, 2004, 265(1):262–275.
- [30] Shimano K, Satake M, Okaya A, et al. Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1 [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(1):3–9.
- [31] Behbod F, Xian W, Shaw CA, et al. Transcriptional profiling of mammary gland side population cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4):1065–1074.
- [32] Summer R, Kotton DN, Sun X, et al. Side population cells and Bcrp1 expression in lung [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(1):L97–104.
- [33] Yano S, Ito Y, Fujimoto M, et al. Characterization and lo-

- p>calization of side population cells in mouse skin [J].
- Stem Cells*
- , 2005, 23(6):834–841.
- [34] Uezumi A, Ojima K, Fukada S, et al. Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(3):864–873.
- [35] Asakura A, Rudnicki MA. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation[J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(11):1339–1345.
- [36] 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.
- [37] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(3):781–786.
- [38] 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.
- [39] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3):506–513.
- [40] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties[J]. *Hepatology*, 2006, 44(1):240–251.
- [41] Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8):3716–3724.
- [42] Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(39):14228–14233.
- [43] Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian inhibiting substance responsiveness [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(30):11154–11159.
- [44] Wu C, Wei Q, Utomo V, et al. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17):8216–8222.
- [45] Hiddemann W, Roessner A, Wormann B, et al. Tumor heterogeneity in osteosarcoma as identified by flow cytometry [J]. *Cancer*, 1987, 59(2):324–328.
- [46] Willert K, Brown JD, Danenberg E, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors[J]. *Nature*, 2003, 423(6938):448–452.
- [47] Zhou J, Wulfschlegel J, Zhang H, et al. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(41):16158–16163.
- [48] Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers [J]. *Science*, 2007, 318(5853):1108–1113.
- [49] Chua C, Zaiden N, Chong KH, et al. Characterization of a side population of astrocytoma cells in response to temozolomide[J]. *J Neurosurg*, 2008, 109(5):856–866.
- [50] Lim R, Knight B, Patel K, et al. Antiproliferative effects of interferon alpha on hepatic progenitor cells in vitro and in vivo[J]. *Hepatology*, 2006, 43(5):1074–1083.
- [51] Doyle L, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) [J]. *Oncogene*, 2003, 22(47):7340–7358.
- [52] Wunder JS, Healey JH, Davis AM, et al. A comparison of staging systems for localized extremity soft tissue sarcoma [J]. *Cancer*, 2000, 88(12):2721–2730.
- [53] Montanaro F, Liadaki K, Schiend J, et al. Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 298(1):144–154.
- [54] Tjandra SS, Hsu C, Goh YI, et al. IFN-beta signaling positively regulates tumorigenesis in aggressive fibromatosis, potentially by modulating mesenchymal progenitors [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(15):7124–7131.