

口腔鳞状细胞癌中肿瘤干细胞分离和鉴定的方法研究进展

褚玉新, 胡钦勇, 宋启斌

(武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北 武汉 430060)

摘要: 口腔鳞状细胞癌是最常见的头颈部恶性肿瘤之一, 复发率高, 容易远处转移, 对治疗不敏感, 严重威胁人类健康。当前临床肿瘤免疫治疗不能有效清除缺乏分化抗原表位的肿瘤干细胞, 需要灵敏而又特异的标记物来鉴定肿瘤干细胞。目前, 从口腔鳞状细胞癌组织中分离肿瘤干细胞的方法主要有基于细胞表面标志的分离法和侧群细胞分离法。鉴定口腔鳞状细胞癌中肿瘤干细胞的方法包括体外细胞成球实验和体内致瘤能力的鉴定。对口腔鳞状细胞癌中肿瘤干细胞分离和鉴定方法的研究将为研发抗肿瘤干细胞疫苗提供理论基础和实验依据, 从而为口腔鳞状细胞癌患者开辟新的免疫治疗途径。

关键词: 口腔鳞状细胞癌; 肿瘤干细胞; 免疫治疗

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)02-0135-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.02.B011

Research Progress on Characterization of Cancer Stem Cells in Oral Squamous Cell Carcinoma

CHU Yu-xin, HU Qin-yong, SONG Qi-bin

(Cancer Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: Oral squamous cell cancer(OSCC) is one of the most prevalent head-and-neck carcinomas, with high relapse rates, liability to metastasis, insensitive to therapy, and severely endangers the health of human beings. Current cancer immunotherapy can't eradicate cancer stem cells(CSC) which lack differentiated antigen determinants, requiring sensitive and specific biomarkers to characterize CSC. Current methods for isolating CSC from OSCC include cellular biomarker based isolation and side population techniques. Methods for characterizing CSC from OSCC include sphere formation *in vitro* and tumorigenesis *in vivo*. Characterization of cancer stem cells from oral squamous cell carcinoma provide the rationale to develop "off-the-shelf" anti-CSC vaccine, and will reclaim novel immunotherapies for OSCC patients.

Subject words: oral squamous cell carcinoma; cancer stem cell; immunotherapy

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是常见的头颈部恶性肿瘤之一, 是威胁人类健康的主要疾病之一^[1]。OSCC 每年的新发病人约为 300 373 人, 与之相关的死亡人数为 145 353 人^[2], 在过去的 20 年中, OSCC 的总生存率仅提高了 5%^[3], 其 5 年生存率明显低于其他部位的恶性肿瘤, 如结肠癌、宫颈癌和乳腺癌等^[4-6]。该疾病不良的预后与多种危险因素有关, 包括饮酒、吸烟、咀嚼槟榔和人类乳头

瘤状病毒(HPV)感染等^[7]。目前, 口腔鳞状细胞癌的治疗以传统外科手术为主, 以放射治疗、化学药物治疗为辅的综合治疗为基本原则^[8]。大多数 OSCC 患者发现较晚, 肿瘤复发率高, 容易远处转移, 对治疗不敏感是导致 OSCC 患者生存率较低的最主要原因^[9]。到目前为止, OSCC 仍缺少有效的治疗方法, 因此, 对该疾病的深入研究并寻找新的治疗方法迫在眉睫。

肿瘤干细胞理论的出现为 OSCC 的彻底根治带来了新的希望。在肿瘤组织中存在着一小群干细胞或者祖细胞, 能够自我更新、生长并且产生异质性肿瘤细胞, 维持着肿瘤的发生、发展和转移, 这群细胞

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81070123); 湖北省自然科学基金资助项目(2014CKB493)

通讯作者: 宋启斌, 主任医师, 博士; 武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北省武汉市武昌区张之洞路 9 号(430060); E-mail: qibinsong@163.com

收稿日期: 2017-03-24; **修回日期:** 2017-05-20

就是肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)^[10]。CSC 的主要特征包括:数量很少,具有独特的细胞表面标志^[11],具有极强的自我更新能力,能够复制亲本细胞的表型,能够分化为多种组织细胞,可维持肿瘤的复发和转移^[12]。并且 CSC 对化疗药物有着很强的耐受性,因此,化疗并不能有效的杀伤或清除 CSC^[13]。肿瘤组织中大部分是已分化的肿瘤细胞,它们缺乏自我更新能力,只有有限的增殖能力,致癌性欠强^[14]。单纯手术切除,或者传统的放、化疗等治疗方法只能消除大量已分化的肿瘤细胞,不足以杀灭 CSC,因此不能得到有效持久的抗肿瘤效果^[15]。传统治疗后肿瘤残余灶中的 CSC 仍然可以促进肿瘤的复发、进展和转移^[16]。因此,现今肿瘤治疗的热点是如何有效的靶向杀伤 CSC,而不仅仅是减小肿瘤负荷。

然而,当前的肿瘤免疫治疗仍然主要是针对肿瘤细胞上已分化的抗原,只能杀伤部分已分化的肿瘤细胞,不能有效的清除缺乏这些分化抗原表位的 CSC。CSC 细胞克隆之间可能存在着不同的生物学标志也是靶向杀伤 CSC 的难点^[17]。靶向杀伤 CSC 需要能够敏感而又特异地标记出 CSC 的生物学标记。尽管现今已有越来越多的研究从肿瘤组织中成功地分离出 CSC,如肝癌、乳腺癌、头颈部鳞癌等^[18]。但是,OSCC 中 CSC 的分离和鉴定的方法仍然是研究的重要挑战。

1 口腔鳞状细胞癌中肿瘤干细胞的分离方法

1.1 基于细胞表面标志分离肿瘤干细胞

利用干细胞表面标记进行 CSC 分选的方法主要基于流式细胞仪分选法(fluorescence-activated cell sorting, FACS)和免疫磁珠分选法(magnetic cell sorting, MACS),是利用细胞表面的特殊受体或蛋白,然后结合被荧光素标记的抗体,最后通过流式细胞仪进行分离。分离 CSC 的细胞表面标志主要有以下几种:

1.1.1 ALDH

乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH),是一种四连体蛋白,ALDH1 在干细胞分化的早期视黄醇氧化为视黄酸的过程中起着非常重要的催化作用^[19]。ALDH1 包括 ALDH1A1、ALDH1A2 和 ALDH1A3,主要存在于多种组织细胞的细胞质中,被广泛认为与

肿瘤细胞的致瘤潜能、转移能力和耐药性有着非常密切的关系,并被用作黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、头颈部鳞癌等多种肿瘤中分离 CSC 的一种功能性标志物^[20]。高表达 ALDH1 的细胞群可以通过 ALDH1 抗体和 ALDEFLUOR 实验分离。Li Q 等^[21]发现在 X-vivo20 无血清培养基中,经过一周的时间 ALDH^{high} 肿瘤干细胞就可以形成较大、较多的肿瘤细胞球;但是在相同培养时间及培养环境的条件下,ALDH^{low} 肿瘤细胞只能形成极少的肿瘤细胞集落;在免疫功能正常的 SCC7 小鼠肿瘤模型中,只需 2000 个 ALDH^{high} SCC7 肿瘤细胞就可以皮下成瘤,但是接种 200000 个 ALDH^{low} SCC7 肿瘤细胞后未能形成肉眼可见的肿瘤,类似的情况也出现在 D5 小鼠的模型中。高表达 ALDH 的肿瘤干细胞与头颈部鳞癌起始、复发、转移和耐药性密切相关^[22]。此外,ALDH1 也是干细胞增殖和分化的调节因子,ALDH1 通过活化 Akt 信号通路来增加 Wnt/ β -catenin 的活性,ALDH1 活性增加可导致化疗抵抗^[23]。因此,以 ALDH 为标志能成功地分离和纯化特殊的、具有致瘤性和自我更新能力的 CSC,这为靶向肿瘤干细胞的免疫治疗提供了新的思路。

1.1.2 CD133

CD133,又称为 prominin-1,是一种跨膜蛋白,定位于细胞膜和细胞质,在各种组织的干细胞或者前体细胞中通常都有表达。CD133 最早在 1997 年由 Weigmann 从神经干细胞表面检测到^[24]。CD133 作为一种跨膜糖蛋白,表达于胚胎干细胞和造血干细胞,构成浆膜拓扑结构,维持浆膜稳定的脂质结构^[25]。CD133 最为显著特点是,细胞中 CD133 的表达随着细胞的分化迅速下调,使其成为一个独特的分离和鉴定肿瘤干细胞的分子标志物^[26]。大多数研究是基于 CD133 抗体结合到 CD133 的糖基化表位,从而经流式细胞仪分离 CD133⁺的肿瘤干细胞。尽管在多种实体瘤中,这种蛋白被鉴定为一种 CSC 标记,但是 CD133 在维持 CSC 的特性中没有发挥重要作用。Zhang 等^[27]用 FACS 和 MACS 从口腔鳞状细胞癌的肿瘤组织和细胞系中分离出比例约为 1%~2% 的 CD133⁺细胞亚群,发现这群细胞具有 CSC 的特性,在体外有很强的侵袭性和增殖性,而在动物体内也有很强的成瘤性。此外,还发现 CD133⁺细胞有明显的化疗耐药性。最近,孙艳等^[28]利用 CD133 作为细

胞表面标记,从口腔鳞状细胞癌中成功分离出肿瘤干细胞,并运用免疫组织化学技术检测了各组病理组织中 CD133 表达情况,发现 CD133 可能作为 OSCC 早期治疗干预的靶标,具有重要的临床价值。研究还发现在舌鳞状细胞癌细胞系中分离出来的 CD133⁺细胞群具有明显的侵袭力、迁移能力、和克隆形成能力,在裸鼠体内的致瘤能力也明显强于 CD133⁻细胞^[29]。因此,以 CD133 为细胞表面标记能够有效地从口腔鳞状细胞癌中分离出 CSC。

1.1.3 CD44

CD44 是一种跨膜糖蛋白,属于细胞表面黏附分子(cell adhesion molecules,CAM)家族,又称为淋巴细胞表面的归巢因子。CD44 表达于白细胞,内皮细胞,肝细胞,间充质细胞,可与细胞外基质结合,在细胞分化和迁移中发挥重要作用^[30]。以往人们对很多类型的肿瘤研究显示,CD44 结合于细胞外基质中的透明质酸(HA),可以活化酪氨酸激酶受体,如 EGFR 和 ERBB2,进一步通过活化 MAPK 和 P13/AKT 信号通路,从而增强细胞的增殖能力,促进肿瘤细胞释放到血管而发生转移^[31]。CD44 作为细胞表面的一种跨膜受体,在细胞黏附和迁徙以及细胞间相互作用中发挥重要的功能,CD44 促进淋巴细胞活化、再生、定植、造血和细胞转移,还调节肿瘤干细胞的分化^[32]。CD44 作为头颈部鳞状细胞癌肿瘤干细胞的特异性表面标志物已经得到广泛认可。CD44 可单独或与其它标志物联合来分离 CSC。例如,最近有学者^[33]建立了口腔鳞状细胞癌的原代细胞培养模型,利用 CD44 作为 OSCC 的特异性表面标志物分选舌鳞状细胞癌细胞系 SCC-9 中的 CD44⁺细胞亚群,全面对比 CD44⁺和 CD44⁻肿瘤细胞亚群的生物学特性差异。结果发现,CD44 免疫组化染色在口腔鳞状细胞癌中呈阳性,为从鳞癌组织细胞中直接分选获得肿瘤干细胞提供了实验室依据。同时,该课题组还采用 CD44 免疫荧光抗体标记流式细胞术分选出 CD44⁺的细胞亚群,并检测了各细胞亚群的细胞周期的差异,比较了不同的细胞亚群克隆形成率以及裸鼠体内成瘤率的差异。以及 CD133、Oct-4、BIM-1、ABCG2、Ezrin 基因和蛋白在 CD44⁺和 CD44⁻细胞中表达的差异。结果发现,利用 CD44 为口腔鳞癌肿瘤干细胞的特异性表面标志物从舌鳞癌细胞系 SCC-9 中分选出的 CD44⁺细胞亚群的比例约为 30%,CD44⁺

的 OSCC 亚群细胞具有肿瘤干细胞的特性^[33]。这说明在 SCC-9 舌鳞癌细胞系中 CD44 可以作为分选肿瘤干细胞的特异性表面标志物。这项研究为口腔鳞状细胞癌中肿瘤干细胞的深入研究奠定了基础。

1.2 基于侧群细胞法分离肿瘤干细胞

口腔鳞状细胞癌中的侧群细胞(side population, SP)具有干细胞样生物学特性,且有一些特定的细胞表面标志物表达,可用于肿瘤干细胞的分离和鉴定。侧群细胞法分离肿瘤干细胞是基于 Hoechst 33342 之类的荧光染料染色,然后通过流式细胞仪多通道分选^[34]。侧群细胞由于过表达一些 ABC 转运体的成员,能以很高的效率排出染料或化疗药,导致肿瘤干细胞不着色或化疗耐药^[35]。Haraguchi 等^[36]发现来自各种胃肠道系统肿瘤细胞系中的侧群细胞过表达 ABCG2、ABCB1,和 CEACAM6,导致化疗耐药,显示出肿瘤干细胞的一些特性。国内也有学者^[37]从口腔鳞癌中分离出 SP 细胞,发现 SP 细胞较非 SP 细胞在裸鼠体内的成瘤能力明显增强,口腔鳞癌中分离出的 SP 细胞表面常有高水平的 CD44、ABCG2、MDR1 和 CK19 的表达,有很强的致癌性。最近还有学者^[38]用 Hoechst 33342 染色和流式细胞仪分离鉴定了 OSCC-77 细胞系中的侧群细胞,并进一步研究了侧群细胞和非侧群细胞在化疗耐药性和细胞球形成能力的差异。结果发现,OSCC-77 细胞系中侧群细胞的比率为 3.4%。侧群细胞高度耐药,其自我更新能力和克隆形成效率明显高于非侧群细胞。因此,利用侧群细胞法分离 OSCC 中的肿瘤干细胞是一种切实可行的方法。侧群细胞法的优点为不需要任何特异性的细胞标志就可以从各种肿瘤组织中富集分离 CSC,但是分离得到的细胞群不均一。而且,由于低特异性,分离细胞的低纯度,染料毒性,可操作参数难以控制等原因,使用这个技术很受限。

2 口腔鳞状细胞癌中肿瘤干细胞的鉴定

根据肿瘤干细胞学说,肿瘤干细胞的鉴定包括体外实验和体内实验两个方面。体外实验包括细胞球培养法和克隆形成实验,大都采用添加一些生长因子的无血清培养基培养肿瘤干细胞,通过集落形成实验、细胞周期、基因和表型测定及体外诱导分化等鉴定其生物学特性,并比较肿瘤干细胞与非肿瘤

干细胞之间的差异。体内实验是将获得的肿瘤干细胞与其他表型细胞进行比较,肿瘤干细胞在 NOD/SCID 小鼠体内有强致瘤性,仅需少量细胞即可致瘤,形成的移植瘤灶与原发肿瘤具有相同的形态学特征^[39]。

2.1 肿瘤干细胞体外成球能力的鉴定

肿瘤干细胞在低粘附性的培养皿中经无血清培养后可以形成球状集落,是体外鉴定肿瘤干细胞的常用方法。培养基含一些细胞因子,如表皮生长因子(EGF),基底成纤维细胞生长因子(bFGF)等,在低粘附的条件下肿瘤干细胞能够迅速形成细胞球,而非肿瘤干细胞生长很慢,难以形成大的球状集落,由此可以鉴定肿瘤干细胞在体外的增殖及分化能力^[40]。

2.2 肿瘤干细胞体内致瘤能力的鉴定

肿瘤干细胞鉴定方法中说服力最强的是致瘤能力的鉴定,肿瘤干细胞在免疫缺陷的小鼠体内容易形成肿瘤,较强的致瘤能力也是肿瘤干细胞最明显的特点^[41]。两种免疫缺陷的小鼠模型,包括裸鼠和 NOD/SCID 小鼠,不排斥异种移植物,常用于分析肿瘤干细胞的致瘤能力。把某种类型的若干肿瘤干细胞原位移植到 NOD/SCID 小鼠体内可形成新的肿瘤,并将肿瘤分离成单个细胞后再一次移植到皮下形成瘤体,这种实验方法是鉴定肿瘤干细胞致瘤能力的常用方法^[42]。最近也有学者^[43]用 ALDEFLUOR/ALDH 法从鳞状细胞癌 SCC7 细胞系中分选出 ALDH^{high} 肿瘤干细胞和 ALDH^{low} 非肿瘤干细胞,接种到免疫功能正常的 C3H 小鼠体内。结果发现,ALDH^{high} 肿瘤干细胞在小鼠体内的成瘤能力明显强于 ALDH^{low} 非肿瘤干细胞。因此,肿瘤干细胞在异种移植的动物体内连续成瘤实验是鉴定肿瘤干细胞最为可靠的方法。

总之,肿瘤干细胞分离和鉴定的方法不断发展是肿瘤干细胞理论向临床应用迈出的重要一步。人们对肿瘤干细胞的生物学特性、特异性表面标志物、自我更新和成瘤能力的深入研究将有助于发现用于口腔鳞癌中肿瘤干细胞的分离鉴定的高度特异的分子标记,进一步制备抗肿瘤干细胞疫苗用于口腔鳞癌患者的免疫治疗,从而开辟新的治疗途径。

参考文献:

[1] Tan H, Deng TT, Nie MH. The progress of epithelial-mes-

enchymal transition in oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis [J]. Practical Journal of Clinical Medicine, 2014, 11(3): 39-43. [谭红, 邓婷婷, 聂敏海. 口腔鳞状细胞癌侵袭和转移过程中上皮-间充质细胞转换作用的研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2014, 11(3): 39-43.]

- [2] Zhang SK, Zheng R, Chen Q, et al. Oral cancer incidence and mortality in China, 2011[J]. Chinese journal of cancer research, 2015, 27(1): 44-51.
- [3] Pan H, Gu L, Liu B, et al. Tropomyosin-1 acts as a potential tumor suppressor in human oral squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0168900.
- [4] Chen S, Bu D, Ma Y, et al. H19 Overexpression Induces Resistance to 1,25 (OH)2D3 by Targeting VDR Through miR-675-5p in Colon Cancer Cells[J]. Neoplasia, 2017, 19(3): 226-236.
- [5] de Freitas LM, Serafim RB, de Sousa JF, et al. Photodynamic therapy combined to cisplatin potentiates cell death responses of cervical cancer cells [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 123.
- [6] Sinaei F, Zendehele K, Adili M, et al. Association Between Breast Reconstruction Surgery and Quality of Life in Iranian Breast Cancer Patients [J]. Acta Med Iran, 2017, 55(1): 35-41.
- [7] Singh V, Husain N, Akhtar N, et al. p16 and p53 in HPV Positive versus HPV Negative Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC): Do Pathways Differ? [J]. J Oral Pathol Med, 2017 Feb 10. [Epub ahead of print]
- [8] Hasegawa T, Yanamoto S, Otsuru M, et al. Retrospective study of treatment outcomes after postoperative chemoradiotherapy in Japanese oral squamous cell carcinoma patients with risk factors of recurrence[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2016 Dec 7. [Epub ahead of print]
- [9] Naruse T, Yanamoto S, Okuyama K, et al. Therapeutic implication of mTORC2 in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2017, 65: 23-32.
- [10] Melzer C, von der Ohe J, Lehnert H, et al. Cancer stem cell niche models and contribution by mesenchymal stroma/stem cells[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 28.
- [11] Yue L, Huang ZM, Fong S, et al. Targeting ALDH1 to decrease tumorigenicity, growth and metastasis of human melanoma[J]. Melanoma research, 2015, 25(2): 138-148.
- [12] Quesenberry P. Stem Cell Reviews and Reports; Cancer Stem Cells and Aging Section[J]. Stem Cell Rev, 2017 Feb 10. [Epub ahead of print]
- [13] Fang T, Lv H, Wu F, et al. Musashi 2 contributes to the stemness and chemoresistance of liver cancer stem cells via LIN28A activation[J]. Cancer Lett, 2017, 384: 50-59.
- [14] Liu Y, Bui MM, Xu B. Urothelial Carcinoma With Squamous Differentiation Is Associated With High Tumor Stage and Pelvic Lymph-Node Metastasis [J]. Cancer Control, 2017, 24(1): 78-82.
- [15] Li X, Zhong Y, Lu J, et al. Correction: MtDNA depleted PC3 cells exhibit Warburg effect and cancer stem cell features[J]. Oncotarget, 2017, 8(4): 7208-7213.

- [16] Wang P, Wan WW, Xiong SL, et al. Cancer stem-like cells can be induced through dedifferentiation under hypoxic conditions in glioma, hepatoma and lung cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2017, 3:16105.
- [17] Pan Q, Li Q, Liu S, et al. Concise Review: Targeting Cancer Stem Cells Using Immunologic Approaches [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(7):2085–2092.
- [18] Xia P. Surface markers of cancer stem cells in solid tumors[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2014, 9(2):102–111.
- [19] Holah NS, Aiad HA, Asaad NY, et al. Evaluation of the Role of ALDH1 as Cancer Stem Cell Marker in Colorectal Carcinoma: An Immunohistochemical Study[J]. *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(1):EC17– EC23.
- [20] Xu X, Chai S, Wang P, et al. Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells[J]. *Cancer Lett*, 2015, 369(1):50–57.
- [21] Ning N, Pan Q, Zheng F, et al. Cancer stem cell vaccination confers significant antitumor immunity [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(7):1853–1864.
- [22] Prince ME, Zhou L, Moyer JS, et al. Evaluation of the immunogenicity of ALDH(high) human head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells in vitro [J]. *Oral Oncol*, 2016, 59:30–42.
- [23] Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, et al. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(4):735–746.
- [24] Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, et al. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(23):12425–12430.
- [25] Argaw-Denboba A, Balestrieri E, Serafino A, et al. HERV-K activation is strictly required to sustain CD133 + melanoma cells with stemness features [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1):20.
- [26] Li Z, Yin S, Zhang L, et al. Clinicopathological characteristics and prognostic value of cancer stem cell marker CD133 in breast cancer: a meta-analysis [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10:859–870.
- [27] Zhang Q, Shi S, Yen Y, et al. A subpopulation of CD133 (+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2010, 289(2):151–160.
- [28] Sun Y, Qi JJ, Yuan CQ, et al. The clinical significance of the expression of CD133 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma[J]. *Chinese Journal of Stomatological Research(Electronic Edition)*, 2016, 10(5):322–326. [孙艳, 祁佳佳, 袁昌青, 等. CD133 在口腔扁平苔藓和口腔鳞状细胞癌中的表达及其临床意义 [J]. *中华口腔医学研究杂志: 电子版*, 2016, 10(5):322–326.]
- [29] Sun Y, Han J, Lu Y, et al. Biological characteristics of a cell subpopulation in tongue squamous cell carcinoma[J]. *Oral Dis*, 2012, 18(2):169–177.
- [30] Hu J, Li G, Zhang P, et al. A CD44⁺ subpopulation of breast cancer stem-like cells with enhanced lung metastasis capacity[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3):e2679.
- [31] Wu TF, Chen L, Bu LL, et al. CD44⁺ cancer cell-induced metastasis: A feasible neck metastasis model [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 101:243–250.
- [32] Su W, Foster SC, Xing R, et al. CD44 transmembrane receptor and hyaluronan regulate adult hippocampal neural stem cell quiescence and differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292 (11):4434–4445.
- [33] Wu GM, Hu M, Yuan HY, et al. Primary Culture and identification of oral squamous carcinoma cells and carcinoma-associated fibroblasts in vitro, and their bionomics [J]. *Journal of Oral Science Research*, 2010, 26(5):687–689. [吴国民, 胡敏, 袁红艳, 等. 口腔鳞癌癌细胞和癌相关成纤维细胞的原代培养、鉴定及其生物学特性研究[J]. *口腔医学研究*, 2010, 26(5):687–689.]
- [34] Wang W, Tabu K, Hagiya Y, et al. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:42070.
- [35] Dai Y, Liu S, Zhang WQ, et al. YAP1 regulates ABCG2 and cancer cell side population in human lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3):4096–4109.
- [36] 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.
- [37] Deng RX, Yang M, Xu Q, et al. Clinical significance of SQ-associated molecules in oral squamous cell carcinoma [J]. *China Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2013, 11(3):204–208. [邓荣欣, 严明, 徐骏, 等. 侧群细胞相关分子标志物在口腔鳞癌中的表达及临床意义[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2013, 11(3):204–208.]
- [38] Shang HG, Yu HL, Ma XN, et al. Multidrug resistance and tumor-initiating capacity of oral cancer stem cells [J]. *J BUON*, 2016, 21(2):461–465.
- [39] Wen JB, Zhang H, Wang LP, et al. The research of isolation and evaluation of cancer stem cells in lung cancer[J]. *Chinese clinical Oncology*, 2009, 14 (8):762–784. [文加斌, 张华, 王丽萍, 等. 肺癌肿瘤干细胞分离鉴定及进展[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14(8):762–764.]
- [40] Kamarajan P, Rajendiran TM, Kinchen J, et al. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Metabolism Draws on Glutaminolysis, and Stemness Is Specifically Regulated by Glutaminolysis via Aldehyde Dehydrogenase [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16(3):1315–1326.
- [41] Xia XY, Zheng XL, Ding L, et al. Research progress on the culture, identification and application of lung cancer stem cells[J]. *Carcinogenesis Teratogenesis & Mutagenesis*, 2016, 28(4):321–324. [夏学阳, 郑鑫林, 丁楠, 等. 肺癌干细胞培养、鉴定及其应用的研究进展[J]. *癌变·畸变·突变*, 2016, 28(4):321–324.]
- [42] Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3):283–296.
- [43] Hu Y, Lu L, Xia Y, et al. Therapeutic Efficacy of Cancer Stem Cell Vaccines in the Adjuvant Setting [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(16):4661–4672.