

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.12.008

淫羊藿苷通过增强 Fas-FasL 表达活性诱导裸鼠食管癌细胞凋亡*

纪昕¹,王崇¹,李洁²,岳晓乐¹,张艳华³,李永军^{1△}

(1. 河北医科大学第二医院检验科, 石家庄 050000; 2. 河北医科大学第四医院科研中心, 石家庄 050011; 3. 河北省辛集市第一医院检验科 052300)

[摘要] **目的** 探讨淫羊藿苷(icariin, ICA)对裸鼠体内食管癌移植瘤生长的抑制作用,并初步探讨其机制。**方法** 应用 MTT 方法和 Giemsa 染色法检测和观察 ICA 对食管癌细胞 Eca-109 和 TE-13 的体外抑制作用。构建裸鼠的食管癌细胞移植性肿瘤模型,分为 3 组,每组 6 只。实验组每只裸鼠腹腔注射 50 mg/kg ICA,对照组注射相同体积的生理盐水,阳性对照组腹腔注射 2 mg/kg 顺铂,每 2 天 1 次,共 14 d,每 3 天测量肿瘤体积,实验结束后称量肿瘤质量;TUNEL 染色法观察各组裸鼠肿瘤组织的组织形态变化和凋亡情况;免疫组织化学法对肿瘤组织中 Fas 和 FasL 蛋白的表达变化进行分析。ELISA 法检测外周血中 FasL 和 IFN- γ 的水平。**结果** ICA 体外对食管癌细胞 Eca-109 和 TE-13 的增殖无明显的抑制作用。实验组和阳性对照组裸鼠肿瘤平均体积和质量与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。TUNEL 染色法结果显示,实验组裸鼠的肿瘤组织发生了明显的凋亡,凋亡细胞的数量较对照明显增加($P < 0.05$)。免疫组织化学实验结果表明,与对照组相比,实验组裸鼠肿瘤组织中 Fas, FasL 的表达明显增加($P < 0.05$)。ELISA 实验结果显示,实验组裸鼠外周血中 FasL 和 IFN- γ 的水平较对照明显增高($P < 0.05$)。**结论** ICA 体外对食管癌细胞无明显增殖抑制作用,但是通过 Fas 的表达、FasL 和 IFN- γ 的分泌在体内诱导食管癌细胞凋亡,从而发挥抗食管癌的作用。

[关键词] 淫羊藿苷;食管肿瘤;Fas-FasL;细胞凋亡**[中图分类号]** R735.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)12-1608-04

Icariin induces apoptosis of esophageal cancer cell through enhancing Fas-FasL expression activity*

Ji Xin¹, Wang Chong¹, Li Jie², Yue Xiaole¹, Zhang Yanhua³, Li Yongjun^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China; 2. Scientific Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Xinji Municipal First Hospital, Xinji, Hebei 052300, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect of icariin(ICA) on the xenograft tumors growth of esophageal carcinoma and to preliminarily investigate its mechanism. **Methods** The MTT assay and Giemsa staining were applied to detect and observe the in vitro inhibitory effect of ICA on esophagus cancer cell lines Eca-109 and TE-13. The xenograft tumor model of nude mouse esophagus cancer cell was constructed and divided into 3 groups, 6 cases in each group. Each mouse in the experimental group was intraperitoneally injected by ICA 50 mg/kg; while the control group was injected by the same volume of normal saline and the positive control group was injected by cis-platinum 2 mg/kg, once every 2 days, a total of 14 days. The tumor volume was measured once per 3 d. After experiment, the tumor weight was measured; the TUNEL staining was used to observe the morphological changes and cell apoptosis of tumor tissue in each group. The changes of Fas and FasL protein expression in tumor tissues were analyzed by immunohistochemistry. The FasL and IFN- γ levels in peripheral blood were tested by the ELISA assay. **Results** ICA exerted no obvious inhibitory effect on the proliferation of Eca-109 and TE-13 cell in vitro. The average volume and weight of xenografts tumor had statistical difference between the experimental group and the positive control group ($P < 0.05$). The TUNEL staining results showed that the tumor tissues had obvious apoptosis, the number of apoptosis cells was significantly increased compared with the control group($P < 0.05$). The immunohistochemistry experimental results showed that the expression of Fas and FasL was significantly increased($P < 0.05$). The ELISA experimental results demonstrated that the FasL and IFN- γ levels of peripheral blood in the experimental group were significantly increased($P < 0.05$). **Conclusion** ICA had no obvious inhibitory effect on esophageal cancer cell proliferation in vitro, but could induce in vivo apoptosis through the Fas expression and secretion of FasL and IFN- γ , thus plays the role of anti-esophageal cancer.

[Key words] icariin; esophageal neoplasms; Fas-FasL; apoptosis

食管癌是危害我国民众健康最为严重的恶性肿瘤之一,依据 2014 年世界卫生组织最新统计结果,食管癌发病率在我国恶性肿瘤中居第 5 位,病死率居第 4 位。2014 年中国死于食管癌的人数约为 197 400 例,超过全世界食管癌总死亡人数的

一半^[1]。放射治疗与化学治疗对某些患者确实有效,也挽救了部分患者的生命,但有明显的毒副作用,长期服用易造成患者免疫系统、消化系统和其他重要器官的严重损害,导致患者承受巨大的痛苦,生存质量下降^[2]。因此,寻找能够协同或者代

* 基金项目:河北省中医药管理局科研计划课题(2015124)。 作者简介:纪昕(1980—),主管检验师,硕士,主要从事临床生物化学和免疫学检验研究。 △ 通讯作者, E-mail: lyjj221@sina.com。

替放射治疗与化学治疗,确保治疗效果,同时减低毒副作用的药物是科研工作者长期而艰巨的任务。近年来,植物制剂及其衍生物的应用在癌症治疗中发挥巨大作用^[3-9]。淫羊藿为补益类中药,具有温肾壮阳,强筋骨,祛风湿的功能,体内外研究发现,淫羊藿的主体成分淫羊藿苷(icariin, ICA)具有良好的抗肿瘤和免疫调节活性^[10-13]。本研究通过构建裸鼠食管癌移植瘤模型,并以生理盐水和 ICA 分别处理裸鼠,监测肿瘤的成瘤情况和生长状况,并在肿瘤组织中检测相关蛋白的表达水平,探讨 ICA 对食管癌细胞的增殖和凋亡的影响,以期探索将 ICA 作为抗食管癌药物的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验材料 ICA 购自美国 Sigma 公司,生产批号:MK-BR8091V,纯度大于 96%,胎牛血清和 RPMI1640 培养基购自 Gibco-BRL 公司,MTT 和 TUNEL 染色试剂盒购自美国 Promega 公司,Giemsa 染色试剂盒购自 Baso 公司,二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司,IFN- γ 和 FasL 的 ELISA 试剂盒购自伊莱瑞特(Elabscience)生物科技有限公司,兔抗鼠 Fas、FasL 一抗体购自 Santa Cruz 公司,SP 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.2 实验动物及分组 BALB/c 型裸鼠,18 只,5~6 周龄,体质量(20.2 \pm 0.7)g,雄性,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,在河北医科大学第四医院动物实验中心饲养,实验动物使用许可证号 SYXK(冀)2013-0051。动物实验研究经动物管理使用委员会和伦理委员会批准。实验组裸鼠每只腹腔注射浓度 10 mg/mL ICA 100 μ L,给药剂量为 50 mg/kg,对照组注射相同体积的生理盐水,阳性对照组腹腔注射顺铂(2 mg/kg),每 2 天 1 次,共 14 d,每 3 天测量肿瘤体积,实验结束后称量肿瘤质量。按公式计算肿瘤体积:肿瘤体积=(1/2 \times 长 \times 宽²)。25 d 后处死裸鼠并称量肿瘤质量。

1.3 细胞培养 食管癌细胞系 TE-13、Eca-109 细胞由上海科学院细胞生物研究所提供。所有细胞系培养于 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,含 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。以 0.25%的胰蛋白酶消化细胞并传代,每 1~2 天换液 1 次,取对数生长期的细胞用于实验。

1.4 细胞活力检测

1.4.1 应用 MTT 方法检测 10、50、100 mg/mL ICA 对食管癌细胞 Eca-109 和 TE-13 增殖能力的影响 于 96 孔板中加入 1×10^4 细胞并培养 48 h,每孔加 10 mg/mL MTT 10 μ L 并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h,然后移除上清液,加入 150 μ L DMSO 并于室温轻轻摇晃 15~20 min。用全自动定量酶标仪在波长 492 nm 处测定吸光度(A),以上实验结果重复 3 遍。ICA 对食管癌细胞增殖的作用以细胞增长抑制率表示,用公式表示:抑制率=[(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值] \times 100%。

1.4.2 应用 Giemsa 染色法观察 100 mg/mL ICA 对食管癌细胞 Eca-109 和 TE-13 的体外抑制作用 分别制备对照组和实验组肿瘤细胞涂片,干燥后于涂片上滴加 A 溶液 0.5~0.8 mL,染液覆盖整个涂片染色 1 min,滴加 B 溶液于 A 溶液上,滴加量约为 A 溶液 2 倍,以洗耳球吹匀后染色 5~10 min,蒸馏水冲洗、干燥后显微镜观察细胞。

1.5 裸鼠种植性肿瘤模型的建立、治疗及标本处理 于 BALB/c 型裸鼠右侧肩胛下注射 0.1 mL TE-13 细胞(含 2×10^6 个细胞),当肿瘤体积增长到约 50 mm³,裸鼠被分为 3 组,每组 6 只。

1.6 TUNEL 染色法检测细胞凋亡 裸鼠移植瘤石蜡切片 5 μ m,二甲苯脱蜡,PBS 冲洗,胰蛋白酶消化,PBS 冲洗;加 TUNEL 反应液 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,PBS 冲洗;加过氧化物酶抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 冲洗;滴加二氨基联苯胺(DAB),室温孵育 10~30 min,PBS 冲洗;封片、烘干,光镜下观察细胞核中有棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。

1.7 免疫组织化学检测组织 Fas、FasL 蛋白表达水平 将裸鼠移植瘤制成石蜡切片,按免疫组织化学试剂盒说明书所述方法检测 Fas、FasL 蛋白的表达情况。FasL 抗体按 1:100 稀释,生物素化山羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(三抗)为试剂盒中的原液。DAB 试剂显色后,用苏木素对比染色,中性树脂封片,光镜下观察结果。

1.8 ELISA 方法检测外周血 FasL 和 IFN- γ 表达水平 通过摘眼球法取各组小鼠外周血液,凝集离心后取血清 100 μ L,用 ELISA 试剂盒测定 FasL 和 IFN- γ 水平,操作步骤按产品说明书进行,在酶标测试仪上测定 570 nm 处 A 值。根据标准曲线计算出外周血液中 FasL、IFN- γ 的水平。

1.9 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICA 对食管癌细胞增殖的抑制作用 不同浓度的 ICA 处理食管癌细胞 TE-13 和 Eca-109 48 h 后,用 MTT 实验检测细胞的活性,研究结果显示无毒剂量的 10、50、100 mg/mL ICA 对食管癌细胞系 TE-13、Eca-109 细胞的增殖无明显影响,见图 1;且细胞形态未发生明显的改变。

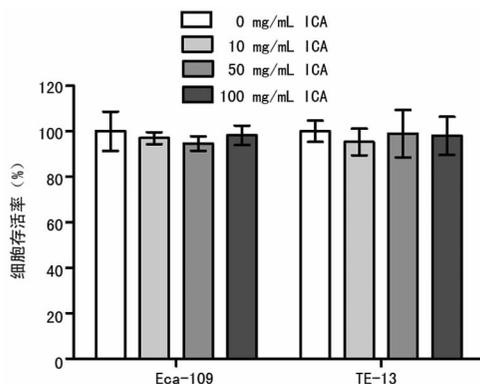
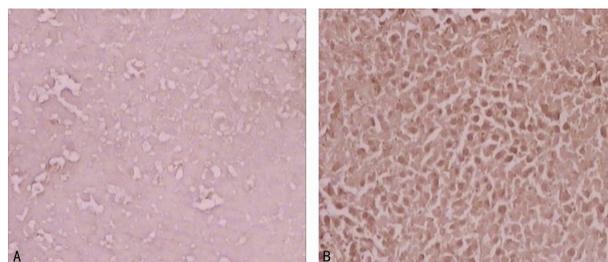


图 1 ICA 对食管癌细胞增殖抑制作用



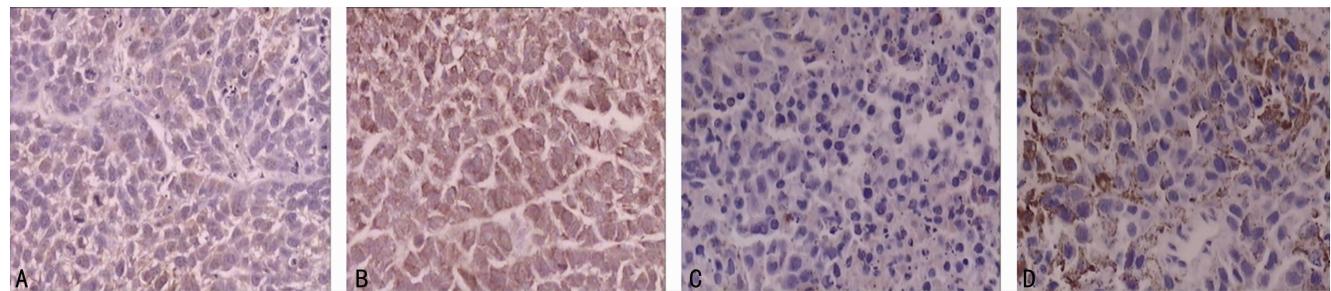
A: 对照组; B: 实验组。

图 2 TUNEL 染色显示荷瘤裸鼠移植瘤的凋亡情况($\times 200$)

2.2 ICA 体内抑制肿瘤的形成 ICA 能明显抑制食管癌细胞在体内的生长,见图 2。肿瘤细胞接种 11 d 后,对照组裸鼠的肿瘤体积开始增加,生长速度较快,而实验组裸鼠肿瘤体积增长缓慢。实验结束后,实验组裸鼠的肿瘤平均体积和质量为(0.55 \pm 0.12)cm³、(0.32 \pm 0.09)mg,小于对照组的(0.91 \pm

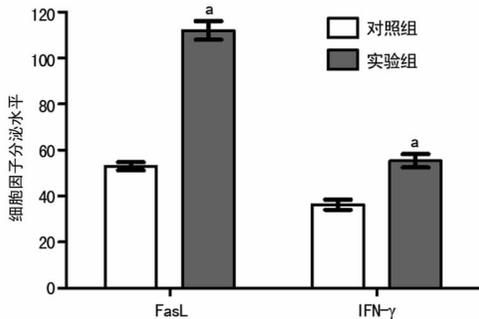
0.35)cm³、(1.56±0.15)mg, 差异有统计学意义($P<0.05$), 阳性对照组的(0.42±0.13)cm³、(0.26±0.06)mg, 与对照组相比差异也有统计学意义($P<0.05$), 实验组和阳性对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 ICA 促进体内肿瘤细胞凋亡 对两组荷瘤裸鼠的肿瘤组织进行 TUNEL 染色。研究结果显示, 对照组裸鼠肿瘤组织内细胞核蓝染, 少见阳性凋亡细胞, 实验组小鼠肿瘤组织内可见阳性凋亡细胞, 且细胞数量明显高于对照组。见图 2。



A: 对照组 Fas; B: 实验组 Fas; C: 对照组 FasL; D: 实验组 FasL。

图 3 裸鼠移植瘤组织中 Fas 和 FasL 蛋白的表达水平(免疫组织化学×200)



^a: $P<0.05$, 与对照组比较。

图 4 荷瘤裸鼠外周血中 IFN-γ 和 FasL 的分泌水平

3 讨论

淫羊藿来源于小檗科多年生植物淫羊藿属的多种植物, 为传统的补虚壮阳中药。近年研究表明, 从淫羊藿中分离的黄酮类化合物 ICA 具有刺激机体免疫系统和刺激骨髓 DNA 合成的, 增加外周血白细胞数量、骨髓造血干细胞中粒单系祖细胞数量等的功能, 增强机体免疫功能。有文献报道, 100 mg/mL ICA 能够诱导肝癌 HepG2. 2. 15 细胞分化凋亡, 抑制肝癌细胞和 HeLa 细胞的生长^[14], 中剂量 ICA 可以促进 H22 肝癌移植瘤小鼠细胞凋亡^[15]。本实验进一步研究了 ICA 在体内外对食管癌细胞的抑制作用, 结果显示用 10、50、100 mg/mL 浓度 ICA 体外处理食管癌细胞 48 h 后, 对细胞的增殖无显著影响, 分析原因可能由于浓度较小未对食管癌细胞产生影响, 但分别用生理盐水和 ICA 处理小鼠 25 d 后, 实验组裸鼠肿瘤的平均体积和质量显著降低; 进行肿瘤组织的 TUNEL 染色, 结果显示 ICA 可明显诱导肿瘤组织内的细胞发生凋亡, ICA (50 mg/kg) 可明显降低裸鼠体内的肿瘤负荷。

凋亡的发生与基因表达、蛋白质合成和细胞内 Ca²⁺ 浓度的增高等多种生物行为有关, 有不同的信号传导系统介导和参与, 其中 Fas-FasL 可直接启动细胞凋亡的信号途径, 是介导细胞凋亡最为重要的跨膜蛋白分子^[16-17]。正常情况下, 肿瘤细胞表达 Fas, T 淋巴细胞在肿瘤抗原刺激和辅助性 T 淋巴细胞作用下活化、增殖, 表达 FasL, 两者结合后, 带有死亡结构域的 Fas 相关蛋白 FADD 可以激活 Caspase 基因, 继而激活下游半

2.4 ICA 体内调控肿瘤组织 Fas 和 FasL 蛋白的表达 对两组荷瘤裸鼠肿瘤组织进行免疫组织化学染色。Fas 蛋白和 FasL 蛋白阳性染色定位于食管癌细胞的细胞质, 呈棕黄色颗粒状分布。与对照组相比, ICA 能够升高 Fas 蛋白的表达水平, 同时升高 FasL 的表达水平。见图 3。

2.5 ICA 对裸鼠体内血清 FasL 和 IFN-γ 分泌的影响 与对照组比较, 实验组小鼠外周血 FasL 和 IFN-γ 水平显著增加, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 4。

胱氨酸蛋白酶超家族系列成员, 级联反应促使 Fas 蛋白所在细胞发生凋亡就可能诱导肿瘤细胞凋亡。但是由于肿瘤细胞不表达、低表达或表达无功能的 Fas^[18], 亦或由于肿瘤细胞编码的 Caspase 基因发生点突变, 信号传导机制产生缺陷, 不能继续向下传递凋亡信号, 肿瘤细胞不发生凋亡就可能导杀伤机制不能正常进行。IFN-γ 是一种由激活免疫细胞分泌的细胞因子, 具有直接抗肿瘤活性, 或通过激活巨噬细胞产生细胞毒作用。I 型、II 型干扰素都具有调节和增强肿瘤细胞对 Fas 介导的细胞凋亡的敏感作用。干扰素通过调节 Fas-FasL 信号通路诱导细胞凋亡是近年来肿瘤免疫学研究热点之一, IFN-γ 可以通过干扰素受体上调肿瘤细胞的 Fas 水平和淋巴细胞的 FasL 水平或影响 Fas 介导肿瘤细胞凋亡敏感性加强该肿瘤免疫途径, 其可能机制是 IFN-γ 通过调控抗凋亡基因 bcl-2 家族、白细胞介素 1β 相关酶 ICE 基因、Caspase 家族等相关基因而发挥作用。在本研究中, ICA 可提升外周血中 FasL 和 IFN-γ 的分泌, 并升高肿瘤组织内 Fas 和 FasL 的表达水平, 这可能是 ICA 发挥抗肿瘤作用的重要机制之一。

迄今为止, 恶性肿瘤的治疗多为手术切除为主, 放射治疗、化学治疗为辅的传统方法, 手术可以遏制肿瘤的继续发展, 但容易引起并发症, 如出血、术后感染、切口粘连等, 且术后的复发率也较高。而放射治疗和化学治疗在杀死癌细胞的同时也不可避免地损伤正常细胞, 毒副作用往往很大, 而 ICA 是在中医配方中广泛出现的补益类中药, 将可能成为一种潜在的安全的抗癌药物。但是 ICA 抗肿瘤机制还需要进一步研究和探讨, 解决此问题将有助于进一步研究 ICA 的功能和作用机制, 为 ICA 用于肿瘤的治疗提供理论基础。

参考文献

- [1] Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 349(23): 2241-2252.
- [2] Hou J, Liao LD, Xie YM, et al. DACT2 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2013, 6(8): 791-800.

- [3] Mawhinney MR, Glasgow RE. Current treatment options for the management of esophageal cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2012, 4: 367-377.
- [4] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [5] Zhao L, Yan X, Shi J, et al. Ethanol extract of *Forsythia suspensa* root induces apoptosis of esophageal carcinoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 871-880.
- [6] Liu GX, Wang TT, Hu WJ, et al. Anticancer effect of ethanol extract of *Fructus Forsythiae* on primary cancer cells isolated from ascites and pleural fluids [J]. *Practical Geriatrics*, 2009, 23(5): 359-363.
- [7] 王彩霞, 殷海涛, 刘宝瑞. 连翘三萜类化合物对前列腺癌 PC-3 细胞增殖抑制及放疗敏感性的 [J]. *山东医药*, 2011, 51(45): 25-27.
- [8] 雷秋香, 赵连梅, 颜晰, 等. 连翘叶乙醇提取物对人食管癌细胞增殖抑制作用的研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(4): 394-399.
- [9] 颜晰, 赵连梅, 孙佳玮, 等. 连翘提取物体外抗肿瘤活性的初步研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2012, 24(1): 20-24.
- [10] Li X, Sun J, Hu S, et al. Icariin induced B16 melanoma tumor cells apoptosis, suppressed tumor growth and metastasis [J]. *Iran J Public Health*, 2014, 43(6): 847-848.
- [11] Wang Z, Ding L, Zhang S, et al. Effects of icariin on the regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1 β -stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1720-1726.
- [12] 赵连梅, 纪昕, 潘晓明, 等. 淫羊藿苷 (ICA) 对化疗后免疫抑制小鼠的免疫促进作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 25(12): 1092-1095.
- [13] 赵连梅, 纪昕, 单保恩, 等. 淫羊藿苷对化疗后小鼠骨髓和细胞免疫抑制作用的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(10): 976-979.
- [14] 王谦, 张玲, 毛海婷, 等. 中药淫羊藿苷逆转肝癌 HepG2. 2. 15 细胞恶性表型及诱导分化研究 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(19): 2087-2092.
- [15] 李翠玲, 张玲, 顾洪涛, 等. 淫羊藿苷体内抑瘤作用及其机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(2): 137-142.
- [16] Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, et al. NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(30): 30931-30937.
- [17] Reichmann E. The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression [J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(4): 309-315.
- [18] Elnemr A, Ohta T, Yachie A, et al. Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway [J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(2): 311-316.

(收稿日期: 2015-11-18 修回日期: 2015-12-28)

(上接第 1607 页)

参考文献

- [1] Toru H, Susumu I, Hiroaki N. Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(1): 289-296.
- [2] Velasco-Velázquez M, Homsí N, Fuente DM, et al. Breast cancer stem cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(4): 573-577.
- [3] Gorospe M, Abdelmohsen K. MicroRegulators come of age in senescence [J]. *Trends Genet*, 2011, 27(6): 233-241.
- [4] Ouzounova M, Vuong T, Ancy PB, et al. MicroRNA miR-30 family regulates non-attachment growth of breast cancer cells [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 139.
- [5] Walia V, Elble CR. Enrichment for breast cancer cells with stem/progenitor properties by differential adhesion [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(8): 1175-1182.
- [6] 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.
- [7] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(1): 45-55.
- [8] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1302-1313.
- [9] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 555-567.
- [10] Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(12): 4234-4241.
- [11] Polytaichou C, Iliopoulos D, Struhl K. An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(36): 14470-14475.
- [12] Tian LL, Li MH, Ge JC, et al. miR-203 is downregulated in laryngeal squamous cell carcinoma and can suppress proliferation and induce apoptosis of tumours [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(6): 5953-5963.
- [13] Chen JW, Wang M, Guo MZ, et al. miR-127 regulates cell proliferation and senescence by targeting BCL6 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80266.

(收稿日期: 2015-11-18 修回日期: 2015-12-24)