

研究论文

肝癌细胞系中 SP 及 CD133+ 细胞的特性分析

陈侃¹ 田雪君¹ 陈兴华² 贾晓渊¹ 钱程¹ 李恭楚^{1*}¹浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018; ²江西省兴国县中医院, 兴国 342400

摘要 近年的研究表明体外培养的肝癌细胞系中存在着少量具有肝癌干细胞功能的细胞群。有研究指出肝癌干细胞存在于侧群细胞 (side population, SP) 中, 另有研究则发现 CD133+ 细胞是肝癌干细胞的特征。本研究以三种肝癌细胞系 (Hep3B、Huh-7 和 PLC/PRF/5) 为对象, 利用流式细胞术对其中的 SP 细胞与 CD133+ 细胞进行了分析, 并进一步检测了它们的增殖能力、表型及耐药性等特性。结果显示, 肝癌细胞系中存在不同比例的 SP 细胞和 CD133+ 细胞, 且大部分 SP 细胞呈 CD133 阳性表达。表型特征分析显示 SP 细胞表达 CK7 和 CK19, 不表达 AFP, 而 CD133+ 细胞则表达 AFP 和 CK19, 却不表达 CK7。SP 与 CD133+ 细胞都具有较强的增殖能力。另外, 相比于其它细胞, SP 细胞具有最强的化疗药物抗性。结果表明, 肝癌细胞系中 SP 细胞与 CD133+ 细胞整体特征有一定的区别, 提示了它们不同的分化途径。

关键词 肝癌干细胞; SP 细胞; CD133; 肿瘤耐药

近年来的研究证实在一些肿瘤的发生、发展过程中, 干细胞发挥了重要的作用^[1,2], Reya 等^[1]的研究表明, 癌症可以看作是由于干细胞的自我更新能力失调而导致的疾病, 而癌症的难治与否也与残存的干细胞有关, 从而提出了肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 这一概念。目前部分肿瘤干细胞已经被陆续分离和鉴别出来^[3-6], 针对这些肿瘤干细胞进行的细胞学特性研究也正在展开。1996 年 Goodell 等^[7]报道, 经荧光染料 Hoechst33342 标记的小鼠骨髓细胞用流式细胞仪 407 nm 的紫外光源激发后, 大部分细胞可同时发出两种不同的荧光 (Hoechst Red 和 Hoechst Blue), 此外还存在着一小群 Hoechst33342 低染的细胞, 它们被命名为 SP (side population) 细胞, 以区别于主群细胞 (main population, MP)。后来的一些研究^[8,9]表明在肿瘤细胞中也存在着 SP 细胞, 它们带有多药耐药基因 *ABCG2* 和 *ABCG3*, 后者使得 SP 细胞具有可将外来的染料、毒性药物等排出胞外的功能, 从而导致它们不易被 Hoechst33342 着色, 且对化疗药物耐受的特性。这些研究还证实了 SP 细胞具有自我更新和增殖分化的能力, 这种存在于肿瘤组织中的 SP 细胞也被称为肿瘤干细胞。Dick 等^[10]报道从急性髓性白血病样本中分离出了一群 CD34+ CD38-

标记的细胞, 并证实了它们具有白血病干细胞特性。随即, Singh 等^[4]的研究发现从脑肿瘤中分离出的 CD133+ 细胞群可分化为普通肿瘤细胞, 这使得探索细胞表面的分子标记成为肿瘤干细胞研究的新策略。

另有研究表明, 在部分肝癌细胞系中也存在着少量具备肿瘤干细胞特性的细胞。Chiba's 等^[11]指出肝癌细胞系中的 SP 细胞是肿瘤干细胞, 而 Suetsugu 等^[12]却认为 CD133+ 细胞才是肝癌的起始细胞。我们以肝癌细胞系 Hep3B、Huh-7 和 PLC/PRF/5 为研究对象, 对肝癌 SP 细胞与 CD133+ 细胞的特性及两者之间的关系进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

三种肝癌细胞系 (Hep3B、Huh-7 和 PLC/PRF/5) 均由本所保存, 所有细胞均在 5% CO₂, 37°C (培养箱中) 条件下培养, 培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM

收稿日期: 2010-09-10 接受日期: 2010-11-25

国家自然科学基金 (No.30801379), 浙江理工大学科研启动基金 (No.0916819-Y), 浙江省教育厅科研项目 (No.20060593) 和浙江省重中之重学科开放基金 (No.SWYX0812) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 0571-86843187, E-mail: gongchuli@hotmail.com

培养基, 内含青霉素 100 U/ml、链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$ 、谷氨酰胺 2 mmol/L、Hepes 12.5 mmol/L, 消化细胞用 0.25% 的胰蛋白酶(以上均购自 Gibco 公司)。HBSS 液、荧光染料 Hoechst33342、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、抑制剂维拉帕米(Verapamil)、二甲基亚砜(DMSO)、MTT 等试剂购自 Sigma 公司。荧光标记抗体除 PE-CD133 购自 Miltenyi 公司外, 其余均购自 BD 公司; 免疫组化所用抗体 AFP、CK7、CK19 购自北京中杉金桥生物公司; 化疗药物 5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)、阿霉素(adriamycin, ADR)和丝裂霉素(mitomycin, MMC)购自齐鲁制药厂。

1.2 实验方法

1.2.1 流式细胞术 (1)流式细胞术检测肝癌细胞系的 CD133 蛋白表达情况: 将细胞用 PBS 洗两遍, 然后悬浮于 100 μl (约 10^7 个细胞)已在 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷过的含 2% 胎牛血清的 HBSS 液中(该步骤可在细胞 Hoechst 33342 染色后进行), 以 10 $\mu\text{l}/10^7$ 个细胞的浓度加入荧光标记的抗体 PE-CD133 及其同型对照(isotype, mouse anti-IgG1 κ), 然后将细胞放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光孵育 30 min, 上机检测前用 PBS 洗两遍, 同样用 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 PI 染色以区别死细胞, 用 488 nm 波长的光源激发待测细胞, 以检测其 CD133 蛋白表达情况。(2)流式细胞术检测 SP 细胞: 0.25% 胰蛋白酶消化制备单细胞悬液, 并用台盼兰染色进行细胞计数, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热过的含 2% 胎牛血清的 HBSS 液重悬细胞(浓度为 10^6 个/ml), 取 2 ml 细胞悬液放入 50 ml 离心管中, 加入浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 Hoechst33342 染色, 对照管内同时加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Verapamil, 充分混匀, 放入密闭的处于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中孵育 90 min, 每隔 15 min 轻轻摇晃 1 次以防止细胞染色不均匀, 染色结束后离心弃上清, 并用 1 ml 含 2% 胎牛血清的 PBS(预冷)重悬细胞, 上流式细胞仪检测前 5 min 加 PI(浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$)以区别死细胞, 用 407 nm 的紫外光源激发待测细胞, 检测其 SP 细胞含量。

1.2.2 描绘细胞生长曲线 分别取对数生长期的 SP、MP、CD133+ 及 CD133- 细胞接种于 24 孔板中, 平均细胞数为 1×10^4 个/孔, 每类细胞设 5 个平行孔, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下用含 10% 胎牛血清的 DMEM 液培养, 第 2~6 天用 0.25% 胰蛋白酶消化, 台盼兰染色后进行细胞计数, 最后取平均值绘制细胞生长曲线。

1.2.3 免疫组化 将经盐酸处理并高压灭菌过的盖玻片放入六孔板, 流式检测所得 SP 细胞和 CD133+ 细胞直接分选入六孔板培养过夜, 次日取出盖玻片用 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 清洗 2 次, 然后用 30% H_2O_2 封闭其内源性过氧化物酶, 接着用 20% 的山羊血清封闭, 分别加入一抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h, 再次用 PBS 清洗 3 次, 接着加入生物素标记的二抗在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 最后用 DAB 显色。

1.2.4 MTT 法检测细胞对化疗药物的敏感性 将经流式细胞术分选所得的 SP、MP、CD133+ 及 CD133- 细胞分别接种于 96 孔板, 细胞数调整为 1×10^4 个/孔, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 液培养过夜, 次日观察细胞贴壁后, 分别加入不同浓度的药物: 5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)、阿霉素(adriamycin, ADR)和丝裂霉素(mitomycin, MMC), 每种药物浓度设 5 个平行孔, 放入培养箱在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养, 48 h 后弃上清, 分别加入无血清培养基 180 μl 和 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 弃上清, 加入 DMSO 150 μl , 室温振荡 10 min 使其充分溶解, 用酶标仪测 570 nm 处吸光值(OD 值)。用以下公式计算细胞存活率: 细胞存活率=(加药组 OD 值-空白对照组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白对照组 OD 值) \times 100%。

2 结果

2.1 流式细胞术检测细胞表面标记

已有报道表明 CD133+ 细胞为肿瘤/肝癌起始细胞^[4,12]。为此, 我们对三种肝癌细胞表面的 CD133 蛋白表达情况进行了检测, 结果发现, 这三种细胞系中均含有一定比例的 CD133+ 细胞(图 1)。

2.2 流式细胞术检测 SP 细胞含量

为了检测这三种肝癌细胞系中是否含有 SP 细胞, 我们用荧光染料 Hoechst33342 对细胞进行染色, Hoechst33342 经 407 nm 的紫外光源激发后可同时发出两种不同的荧光(Hoechst Red 和 Hoechst Blue)。SP 细胞具备将进入细胞核的化疗药物、荧光染料排出胞外的功能, 呈现 Hoechst33342 低染, 而这一功能可被 Verapamil 抑制。因此, 在流式图上 SP 细胞表现为 Hoechst Red 和 Hoechst Blue 低染, 且在 Verapamil 处理后明显减少的细胞群体。结果显示(图 2), Hep3B 和 Huh-7 细胞系中均含有不同比例的

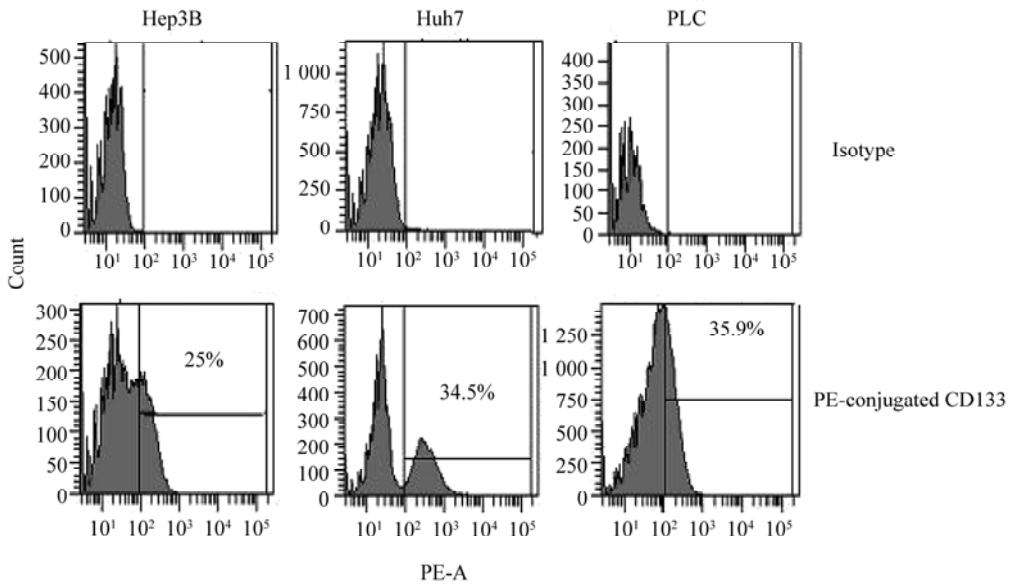


图1 CD133 蛋白在三种肝癌细胞系中的表达情况

Hep3B、Huh-7 和 PLC/PRF/5 三种细胞分别与荧光标记的抗体 PE-CD133 及其同型对照孵育 30 min，用流式细胞术检测这三种细胞 CD133 蛋白的表达情况。

Fig.1 The expression of CD133 marker in cell surface was detected by FACS analysis

Hep3B, Huh-7 and PLC/PRF/5 cells were stained with specific mAb (fluorescence-conjugated anti-CD133), and isotype control-matched mAb for 30 minutes. Shown is a representative from at least three independent experiments.

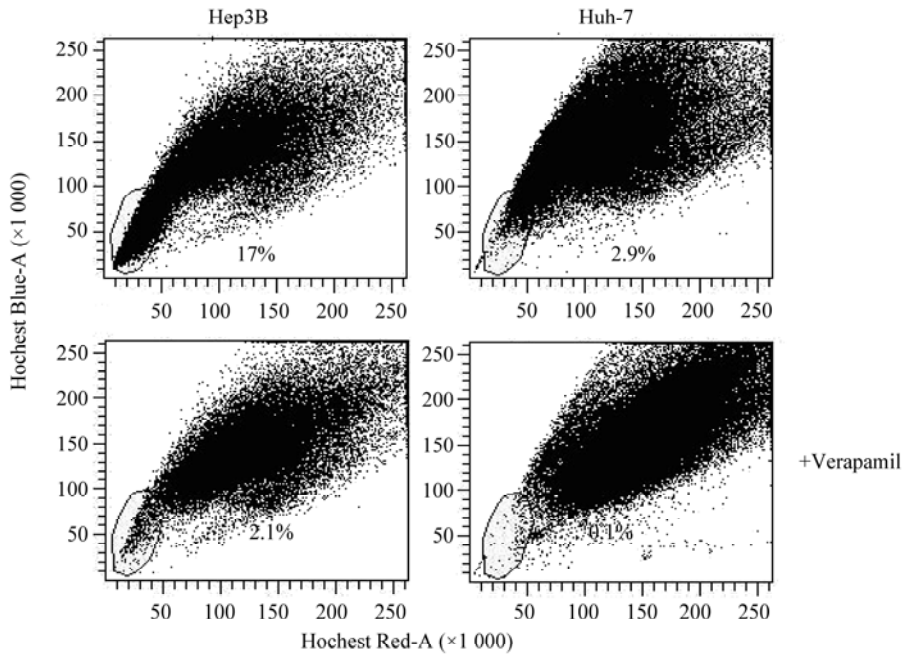


图2 Hep3B、Huh-7 细胞系中含有的 SP 细胞

Hep3B、Huh-7 和 PLC/PRF/5 细胞分别用 Hoechst33342 染色后行流式细胞术检测，发现 Hep3B 和 Huh-7 细胞中分别含有 14.9% 和 2.8% 的 SP 细胞，而 PLC/PRF/5 细胞中无 SP 细胞。

Fig.2 SP cell analysis in Hep3B and Huh-7 cell lines

SP cell in Hep3B and Huh-7 cells were detected in 14.9% and 2.8% respectively. However, SP cells were not detected in PLC/PRF/5 cell line. Shown is a representative from at least three independent experiments.

SP 细胞, 而 PLC/PRF/5 细胞系中不含有 SP 细胞。

在 Hep3B 和 Huh-7 这两种细胞系中, Hep3B 细胞系含有较多的 SP 细胞。对 Hep3B 细胞系中的 SP 细胞进行流式分析, 我们发现, SP 细胞明显较 MP 细胞含有更多的 CD133+ 细胞(图 3)。

2.3 细胞增殖检测

为了比较 SP 和 CD133+ 细胞的增殖情况, 我们将 Hep3B 细胞系用流式细胞术分选出的 SP、MP、CD133+ 和 CD133- 细胞分别收集到 24 孔板中培养, 在第 1~6 天进行细胞计数, 我们的结果显示, CD133+

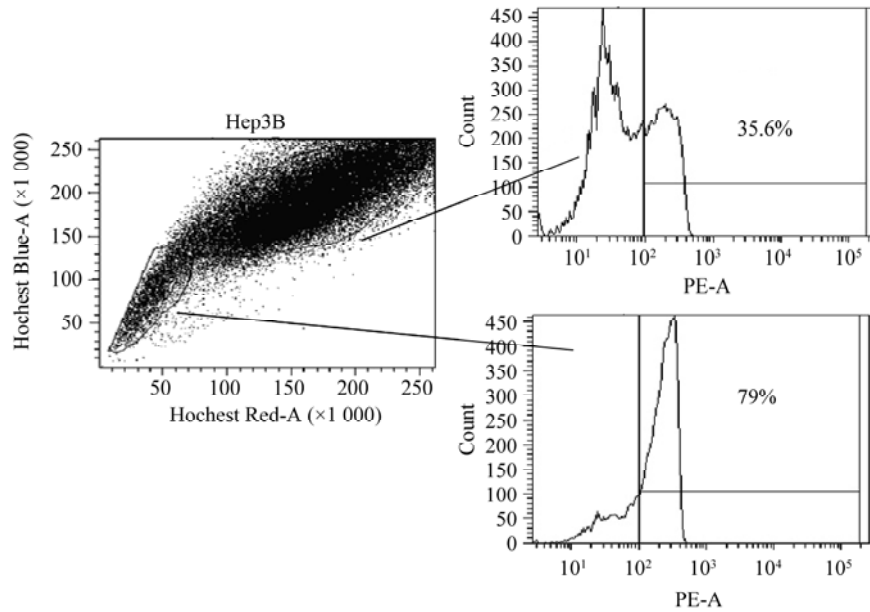


图 3 SP 及 MP 细胞中的 CD133+ 细胞

Hep3B 细胞被 Hoechst33342 染色后再与荧光标记的抗体 PE-CD133 孵育, 流式细胞术检测, 以比较 SP 和 MP 细胞的 CD133 蛋白表达情况。

Fig.3 The percentage of CD133+ cells in SP and MP cells

SP cells and MP cells were further analyzed for CD133 expression. Shown is a representative from at least three independent experiments.

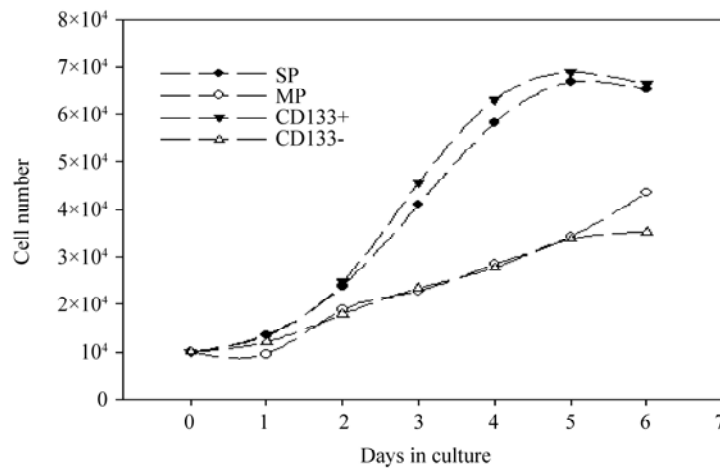


图 4 细胞生长曲线

分选出 Hep3B 细胞系中的 SP、MP、CD133+ 和 CD133- 细胞, 分别接种于 24 孔板(1x10⁴ 个/孔)中, 在第 0~6 天进行细胞计数, 绘制细胞生长曲线。

Fig.4 Cell proliferation curve line of the 4 cells

The proliferation was compared among SP cells, MP cells, CD133 positive and negative cells in Hep3B cell line, cells were sorted by FACS and then planted into 24-well plate, from day 0 to day 6. Cells were then counted. The data are from at least three independent experiments.

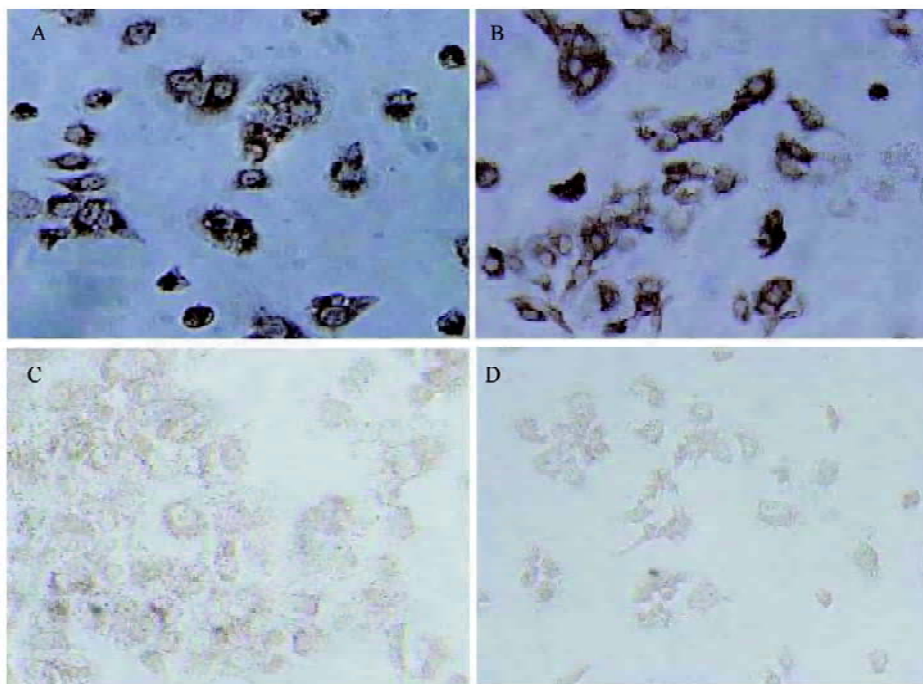


图5 Hep3B细胞系中CD133+细胞各类蛋白表达情况(200×)

分选出的CD133+细胞做成细胞爬片,行免疫组化检测。A:一抗为AFP;B:一抗为CK19;C:一抗为CK7;D:阴性对照。

Fig.5 The expression of AFP, CK19 and CK7 proteins in CD133+ cells of Hep3B cell line (200×)

The sorted CD133+ cells were cultured overnight in chamber slides and then stained with bio-conjugated AFP, CK19 and CK7. A: AFP; B: CK19; C: CK7; D: isotype control. Shown is a representative of two independent experiments.

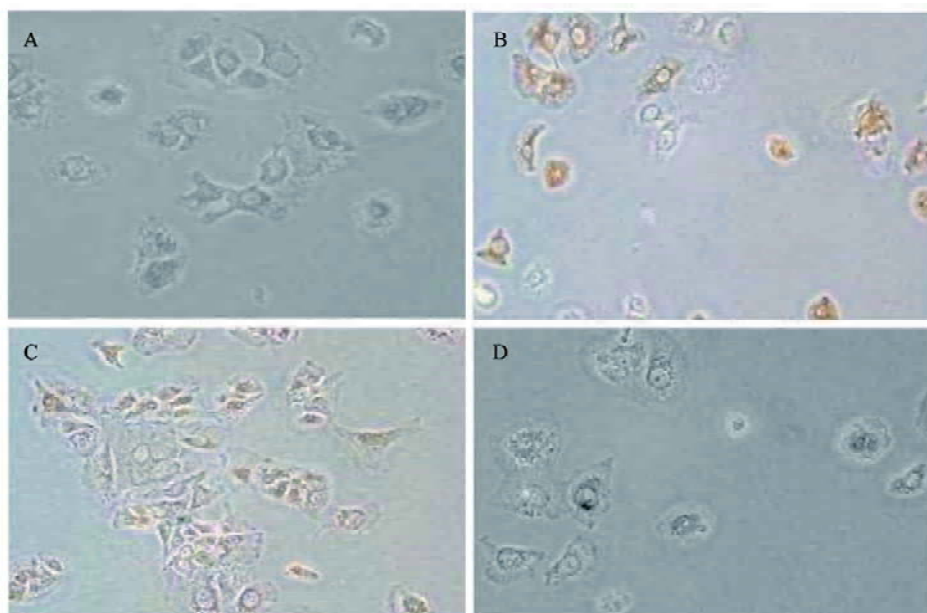


图6 Hep3B细胞系中SP细胞各类蛋白表达情况(200×)

分选出的SP细胞做成细胞爬片,行免疫组化检测。A:一抗为AFP;B:一抗为CK19;C:一抗为CK7;D:阴性对照。

Fig.6 The expression of AFP, CK19 and CK7 proteins in SP cells of Hep3B cell line (200×)

The sorted SP cells were cultured overnight in chamber slides and then stained with bio-conjugated AFP, CK19 and CK7. A: AFP; B: CK19; C: CK7; D: isotype control. Shown is a representative of two independent experiments.

细胞的增殖能力与 SP 细胞接近, 且均强于 MP 和 CD133- 细胞(图 4)。

2.4 免疫组化分析

为进一步检测 SP 细胞和 CD133+ 细胞的关系, 我们以甲胎蛋白(alphafetoprotein, AFP)、细胞角蛋白 7(cytokeratin, CK7)、细胞角蛋白 19(cytokeratin 19, CK19)为一抗^[13,14]作免疫组化检测, 比较这些细胞的 AFP、CK7、CK19 表达情况。结果表明, CD133+ 细胞约 88.0% 呈 AFP 阳性表达, 约 66.2% 呈 CK19 阳性表达, CK7 表达为阴性; 而 SP 细胞呈 AFP 阴性, 约 37.5% 呈 CK19 阳性, 约 36.7% 呈 CK7 阳性(图 5 和图 6)。因 SP 细胞呈 AFP 阴性, 这提示 Hep3B 细胞中 AFP 阳性细胞主要集中于 MP 亚群中。

2.5 对化疗药物的抗性检测

化疗失败的主要原因是肿瘤细胞对药物产生抗性。有研究表明, SP 细胞具有较强的药物外排功能^[8], 从而使得癌细胞产生耐药性。为了解肝癌细胞系中 CD133+ 细胞是否也具备 SP 细胞这种抵御外来化疗药物的能力, 我们分别用三种不同的化疗药作用于 SP、MP、CD133+、CD133- 细胞, 48 h 后 MTT 法检测细胞的药物敏感性。结果显示(图 7), 在这 4 种细胞里, SP 细胞具有较强的药物外排能力, CD133+ 细胞药物外排功能明显弱于 SP 细胞。

3 讨论

我们的研究表明, 肝癌细胞系中存在 CD133+ 细胞(Hep3B、Huh-7 和 PLC/PRF/5), 也含有 SP 细胞(Hep3B、Huh-7), 并且大部分 SP 细胞呈 CD133 阳性表达, 这表示两者之间具有一定的联系。细胞增殖实验揭示了 SP 细胞和 CD133+ 细胞都具有较强的增殖能力, 而且这种能力明显强于和它们相对的 MP 和 CD133- 细胞。

肝脏组织中含有 2 种具多向分化潜能的细胞: 肝干细胞和肝祖细胞, 它们的体积、形态及基因表达特性均不同于成熟的肝细胞。肝干细胞可分化为肝祖细胞, 肝干细胞数目少而稳定, 持续性表达 CK19、EpCAM、CLND-3 等蛋白, 低表达 albumin, 不表达 AFP 和成体肝脏的特异性蛋白。肝祖细胞在胎儿和新生儿期占大多数, 以后随着年龄的增长数目逐渐减少, 它们高表达 AFP, albumin 表达水平有所升高, 可表达 CK19^[14]。对流式分选出 SP 和 CD133+ 细胞作免疫组化检测, 发现 CD133+ 细胞表达 AFP 和 CK19,

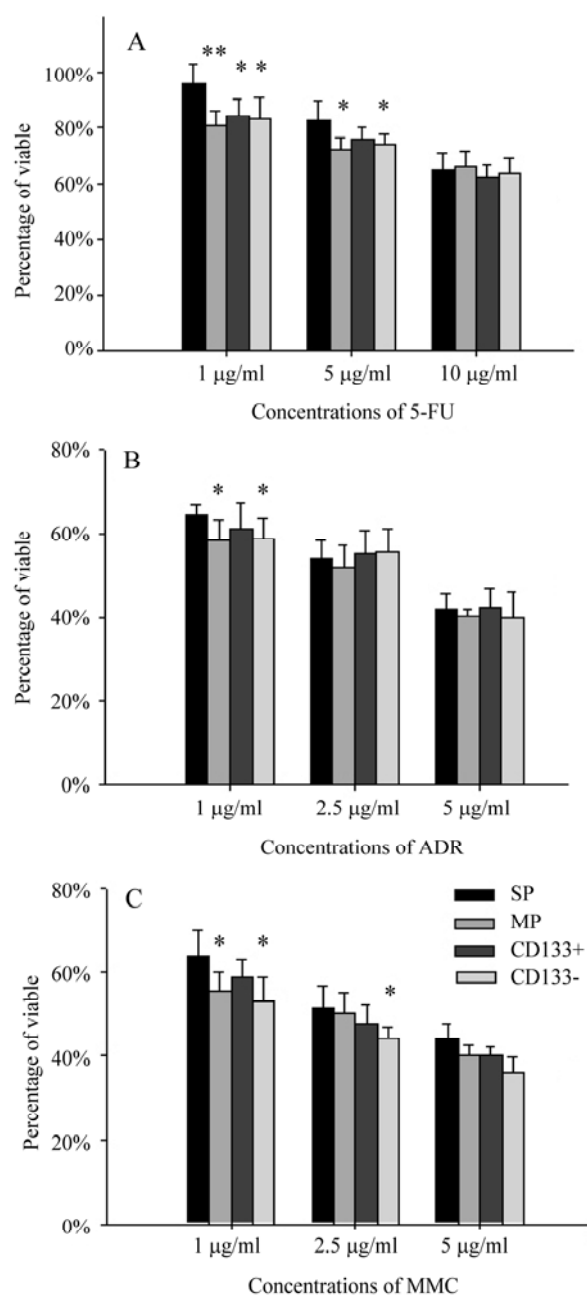


图 7 4 种细胞对化疗药物的抵抗性比较

将分选所得的 SP、MP、CD133+ 及 CD133- 细胞分别接种于 96 孔板(1×10^4 个/孔), 加入不同浓度的药物(5-氟脲嘧啶、阿霉素和丝裂霉素)继续培养 48 h 后做 MTT, 以比较 4 种细胞对化疗药物的耐受情况。实验数据按照 means \pm SD 处理, 重复三次。*** $P \leq 0.01$, ** $P \leq 0.05$ 。

Fig.7 Drug resistance of SP, MP, CD133 positive and negative cells in Hep3B cell line

All of the cells were collected by FACS sorting, and 1×10^4 cells /well were planted in 96-well plate followed by treating with various concentrations of 5-FU, ADR and MMC for 48 hours in 10% FBS/DMEM medium. The data were means \pm SD and came from three independent experiments. *** $P \leq 0.01$ compared with SP cells, and ** $P \leq 0.05$ compared with SP cells.

而不表达CK7,而SP细胞少量表达CK19和CK7,几乎不表达AFP。其中,CK7是与胆管有一定联系的表达特征^[13]。据此我们认为体外培养的肝癌细胞系中SP细胞与CD133+细胞发生了不同的分化事件,而SP细胞呈现与肝干细胞接近的更原始的特征。

肿瘤耐药实验显示,在各细胞亚群中,SP细胞对化疗药物的抗性强于其他细胞(略强于CD133+,但无统计学意义;强于MP和CD133-细胞, $P \leq 0.05$),这与SP细胞具备将染料和毒性物质排出胞外的功能相吻合。另外,肝癌细胞系中细胞亚群的药物抗性差异表明耐药相关基因表达的差异,进一步提示了各细胞亚群不同的分化途径。

综上所述,肝癌细胞系中SP细胞与CD133+细胞虽有交集,且都具备更强的增殖能力,但表型特征与耐药性呈现显著差异。因此我们的结果提示,体外培养的肝癌细胞系中存在特征各异的细胞亚群,其中SP细胞与CD133+细胞可能由不同的分化途径分化而成。

参考文献(References)

- 1 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859): 105-11.
- 2 Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(12): 895-902.
- 3 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(7): 3983-8.
- 4 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63(18): 5821-8.
- 5 Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, *et al.* Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumor than do serum-cultured cell lines. *Cancer cell* 2006; 9(5): 391-403.
- 6 Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 5: 67.
- 7 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med* 1996; 183(4): 1797-806.
- 8 Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, *et al.* A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(39): 14228-33.
- 9 Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small sub-population of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(3): 781-6.
- 10 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3(7): 730-7.
- 11 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44(1): 240-51.
- 12 Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwakl H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351(4): 820-4.
- 13 Fiegel HC, Gluer S, Roth B, Rischewski J, von Schweinitz D, Ure B, *et al.* Stem-like cells in human hepatoblastoma. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(11): 1495-501.
- 14 Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cell* 2006; 24(8): 1852-8.

Characteristics Analysis of SP and CD133+ Cells in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines

Kan Chen¹, Xue-Jun Tian¹, Xing-Hua Chen², Xiao-Yuan Jia¹, Cheng Qian¹, Gong-Chu Li^{1*}

(¹Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²Traditional Chinese Medicine Hospital of Xingguo County, Xingguo 342400, China)

Abstract Recent studies showed that a small population with stem cell functions exists in some cultured liver cancer cell lines. Some studies suggested that hepatocellular carcinoma (HCC) stem cells are enriched in side population(SP), whereas some other studies found that CD133 is a marker for HCC stem cells. By FACS analysis, SP cells and CD133+ cells in three human HCC cell lines (Hep3B、Huh-7 and PLC/PRF/5) were examined. *In vitro* proliferation, phenotypic characteristics, and drug resistance of these cells were further analyzed. Result showed that various levels of SP and CD133+ cells were existed in HCC cell lines, and the majority of SP cells showed CD133+ phenotype. SP cells expressed CK7 and CK19, but not AFP, whereas CD133+ cells expressed AFP and CK19, but not CK7. Both SP and CD133+ cells contained higher proliferation ability than their counterparts. Furthermore, a highest level of drug resistance was observed in SP cells. Those findings supported the conclusion that SP and CD133+ cells showed varied biological characteristics, suggesting that they might be differentiated in diverse pathways.

Key words hepatocellular carcinoma stem cell; side population; CD133; tumor drug resistance

Received: September 10, 2010

Accepted: November 25, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30801379), Science Foundation of Zhejiang Sci-Tech University (No.0916819-Y), Scientific Research Grant of the Educational Department of Zhejiang Province of China (No.20060593) and Open Foundation of Zhejiang Province Most Important Projects (No.SWYX0812)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86843187, E-mail: gongchuli@hotmail.com