

· 论 著 ·

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞源 exosomes 对血管内皮细胞 EGFR 表达的影响*

谢莹珊, 沈 宜[△], 隆 霜, 范维柯, 姜 蓉, 陈 黎

(重庆医科大学干细胞与组织工程研究室 400016)

摘要:目的 研究人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞源 exosomes 介导表皮生长因子受体(EGFR)对人脐静脉内皮细胞株(HUVECs) EGFR 表达影响,探讨肿瘤组织血管内皮细胞异常表达 EGFR 的机制。**方法** 超速离心及密度梯度离心法提取 MDA-MB-231 细胞源 exosomes;免疫细胞化学法检测 MDA-MB-231 细胞 EGFR 的表达;Western blot 法检测 MDA-MB-231 细胞、exosomes 及 HUVECs EGFR 蛋白表达;免疫细胞化学法检测 HUVECs 与 exosomes 共培养 24 h 后 EGFR 的表达;RT-PCR 法检测 MDA-MB-231 细胞与实验组 HUVECs 细胞 EGFR mRNA 的表达。**结果** EGFR 在 MDA-MB-231 细胞中呈高表达,MDA-MB-231 细胞及 exosomes 可见相对分子质量为 170×10^3 的 EGFR 蛋白呈阳性反应带,HUVECs 呈阴性反应带;HUVECs 与 exosomes 共培养 24 h 后,镜下可见实验组部分 HUVECs 细胞质有淡黄色或棕黄色颗粒,EGFR 阳性表达率为 $(21.4 \pm 3.1)\%$,与对照组(无 EGFR 蛋白表达)比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。MDA-MB-231 细胞 EGFR mRNA 表达阳性,而实验组 HUVECs EGFR mRNA 表达阴性。**结论** MDA-MB-231 细胞源 exosomes 携带癌基因 EGFR,并能介导其向周围血管内皮细胞转移,这可能是肿瘤内皮细胞异常表达 EGFR 的一种方式。

关键词:乳腺肿瘤;内皮细胞;表皮生长因子;脐静脉

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.26.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)26-2694-04

Effect of exosomes derived from breast cancer cell line MDA-MB-231 on EGFR expression in HUVECs*

Xie Yingshan, Shen Yi[△], Long Shuang, Fan Weike, Jiang Rong, Chen Li

(Department of Pathophysiology, Institute of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of exosomes derived from breast cancer cell line MDA-MB-231 on epidermal growth factor receptor(EGFR) expression in human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) and to research the possible manner of abnormal expression EGFR of tumor endothelial cell. **Methods** Exosomes were purified by serial ultracentrifugation and sugar density ultracentrifugation. The expression of EGFR in MDA-MB-231 was detected by immunocytochemistry and Western blotting. The expression of EGFR in exosomes and HUVECs was detected by Western blotting. The expression of EGFR in HUVECs with exosomes co-cultured 24 h was detected by immunocytochemistry. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of EGFR in MDA-MB-231 and experimental group. **Results** MDA-MB-231 cells expressed high level of EGFR. In the results of Western blotting, the positive reaction band was found in 170 kD which coincided with the molecular weight of EGFR in MDA-MB-231 and exosomes, and negative reaction in HUVECs. When co-cultured with HUVECs and exosomes for 24 h, the result of immunocytochemistry showed that the part of the experimental group was found straw color or brown madder particle in HUVECs cytoplasm, the ratio of positive expression was $21.4 \pm 3.1\%$. There was significant increase compared with the control group($P < 0.01$). RT-PCR exhibited positive of EGFR mRNA in MDA-MB-231, and negative in the experimental group of HUVECs. **Conclusion** Exosomes derive from MDA-MB-231 cell lines with oncogene EGFR cargo, and could mediate the cargo to endothelial cell. It may be the possible manner of abnormal expression EGFR in tumor endothelial cells.

Key words: breast neoplasms; endothelial cells; epidermal growth factor; umbilical veins

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,近年来中国乳腺癌发病率呈快速上升趋势。乳腺癌的转移是影响生存期的主要因素之一。肿瘤内血管新生是一种病理性血管生长,与肿瘤的生长、侵袭和转移密切相关。肿瘤内血管新生不仅为原发肿瘤生长所必须,也是肿瘤细胞向远处转移的必备条件之一。血管内皮细胞是肿瘤血管新生的重要效应细胞,对肿瘤血管内皮细胞生长机制的研究虽已进行多年,但对肿瘤细胞与周围血管内皮细胞之间有怎样联系、对肿瘤血管内皮细胞的病理性生长的分子机制目前还不清楚。深入研究其分子机制,有助于寻找有

效的靶点,特异抑制肿瘤血管内皮细胞生长,对提高乳腺癌治疗效果有重大意义。

目前对细胞分泌 exosomes 研究显示,exosomes 能将其携带的蛋白质、mRNA 及 miRNA 选择性地递送至受体细胞,在细胞间传递信息,在炎症、妊娠、病原微生物传播中发挥生物学作用。有研究发现肿瘤组织中血管内皮细胞往往表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)高表达^[1-3]。本研究通过体外共培养人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cell, HUVECs)与人乳腺癌细胞株 MDA-MB-

* 基金项目:重庆市渝中区科委资助项目(2009)。 △ 通讯作者, Tel:15608313439; E-mail:shenyicq@163.com。

231 源 exosomes, 探讨乳腺癌细胞 MDA-MB-231 源 exosomes 对血管内皮细胞 EGFR 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 HUVECs 与人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 由本研究室提供, 复苏后使用。RPMI1640 培养基、DMEM 高糖、新生牛血清购自美国 Gibco 公司, 重水购自青岛腾龙微波科技有限公司, 分析纯蔗糖购自上海生工生物有限公司, 链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (SABC) 试剂盒、DAB 酶底物显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 二辛可酸 (BCA) 蛋白定量试剂盒、预染蛋白标准品、Western blot 试剂盒、ECL 试剂盒、增强型化学发光试剂盒购自南京碧云天公司, 兔抗人 EGFR 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz, 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜) 购自美国 Millipore 公司, EGFR 及 GAPDH 特异性引物购自成都天泰公司, RNAiso™ Plus 总 RNA 提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒、PCR 扩增试剂盒购自日本 Takara 公司, DNA Marker、Gold view 核酸染料购自北京天根公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231 细胞系与 HUVECs 细胞系分别置于含 10% 新生牛血清 RPMI1640 与 DMEM 培养基中培养, 37 °C、5% CO₂ 培育箱内孵育, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。收集培养 2 d 肿瘤细胞上清液共 200 mL, -20 °C 保存。

1.2.2 exosomes 制备及蛋白定量 参照文献[4]采用超速离心及密度梯度离心法提取 MDA-MB-231 细胞 exosomes (此法为本实验室常规提取 exosomes 的方法, 前期实验中已成功鉴定), 0.22 μm 滤膜过滤分装, -80 °C 保存。BCA 蛋白定量法测定 exosomes 样品总蛋白量, 步骤按照产品说明书进行。

1.2.3 免疫细胞化学法检测 MDA-MB-231 细胞 EGFR 表达 取 5×10^4 /mL 对数生长期细胞悬液进行爬片, 每孔 2 mL, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 使细胞铺满约 80% 时进行免疫细胞化学染色测定。吸弃培养液, 室温下 PBS 洗 2 次, 每次 2 min; 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶, 室温下放置 15 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min; 滴加 5% 牛血清清蛋白封闭液, 室温 20 min; 吸弃多余液体, 不洗; 滴加 1:40 稀释的兔抗人 EGFR 一抗, 37 °C 孵育 1 h; PBS 洗 3 次, 每次 2 min; 滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 20 min; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加试剂 SABC, 37 °C 孵育 20 min; PBS 洗 4 次, 每次 5 min; DAB 显色: 取 1 mL 蒸馏水, 加 A、B、C 试剂各一滴, 混合后加至玻片, 室温显色, 显微镜下控制反应时间; 苏木素复染 2 min, 自来水冲洗 10 min。脱水, 透明, 封片。显微镜下观察, 照相。

1.2.4 Western blot 法检测 MDA-MB-231 细胞、exosomes 及 HUVECs EGFR 蛋白表达 取对数生长期细胞, PBS 洗 3 次, 每瓶细胞各加入 200 μL RIPA 细胞裂解液和 2 μL 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 置冰上充分裂解, 将裂解物移至不同离心管 (EP) 中, 4 °C, 12 000 g 离心 30 min, 收集上清液, BCA 法蛋白定量。exosomes 经超声破碎后 BCA 法测蛋白浓度, 各取 40 μg 上样于 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE); 蛋白质通过湿转法转至 PVDF 膜上, 用含 8% 脱脂牛奶的 TBST 溶液室温封闭 2 h, 加入兔抗人 EGFR 一抗 (1:200), 4 °C 过夜; 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (1:2 000), 室温下结合 1 h; TBST 充分洗涤 3 次, 加入 ECL 显影剂, 显影定影后于凝胶成像系统曝光, 观察结果。

1.2.5 HUVECs 与 exosomes 共培养体系 常规传代 HUVECs 细胞, 待细胞贴壁后弃上清液, 加入含终浓度为 200 μg/mL 的 exosomes 新鲜培养液 (实验组), 同时设置细胞无 exosomes 处理 (对照组), 继续置培养箱培养 24 h 即可做进一步检测。

1.2.6 免疫细胞化学法检测实验组 HUVECs EGFR 的表达 方法同 1.2.3。结果根据显微镜下细胞着色的数目评分, 进行半定量计数以评价 EGFR 蛋白的表达。在高倍镜下随机选取 5 个视野, 计算染色阳性的细胞占所计数细胞的百分比, 取各视野区的平均值作为终值。

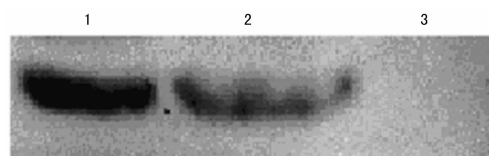
1.2.7 RT-PCR 法检测 MDA-MB-231 细胞与实验组 HUVECs 细胞 EGFR mRNA 的表达 常规消化细胞, 离心后弃上清液, 用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 细胞计数, 分别收集 1×10^7 个 MDA-MB-231 细胞和 HUVECs 细胞, 分别加入 1 mL 的 RNAiso™ plus 提取总 RNA。按逆转录试剂盒合成 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。EGFR 上游引物序列: 5'-CAA AGT GCC TAT CAA GTG G-3', 下游引物序列: 5'-GAA TTG TTG CTG GTT GCA-3', 扩增片段长度为 513 bp; GAPDH 上游引物序列: 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3', 下游引物序列: 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3', 扩增片段长度为 258 bp。EGFR 逆转录反应条件 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。PCR 反应条件为 94 °C 5 min, 循环 1 次; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 5 min 结束 PCR 反应。各取 5 μL 产物与 1 μL 6× 上样缓冲液混匀后进行琼脂糖凝胶电泳, 100 V 恒压电泳 30 min。电泳结束后取出琼脂糖, 紫外分析仪下观察结果, 凝胶成像系统成像, 使用 Quantity One 软件进行分析。

1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件做数据处理, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫细胞化学法检测 MDA-MB-231 细胞 EGFR 表达 MDA-MB-231 细胞的细胞质和细胞膜均呈现棕黄色颗粒均匀分布, 为 EGFR 蛋白阳性表达, 见封 2 图 1。

2.2 Western blot 法检测 MDA-MB-231 细胞、exosomes 及 HUVECs EGFR 蛋白表达 EGFR 相对分子质量为 170×10^3 , PVDF 膜经化学发光后可见 MDA-MB-231 细胞及 exosomes 的 EGFR 蛋白呈阳性反应带, HUVECs 呈阴性反应带, 见图 2。



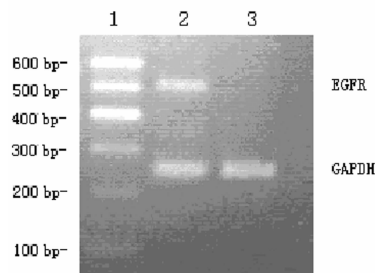
1: MDA-MB-231 细胞; 2: MDA-MB-231 细胞源 exosomes; 3: HUVECs。

图 2 MDA-MB-231 细胞、exosomes 及 HUVECs EGFR 蛋白的表达

2.3 免疫细胞化学法检测 HUVECs EGFR 的表达 实验组 HUVECs 与 exosomes 混合培养 24 h 后, 镜下可见部分 HUVECs 细胞质有淡黄色或棕黄色颗粒, EGFR 阳性表达率为 $(21.4 \pm 3.1)\%$, 与对照组 (无 EGFR 蛋白表达) 比较, 差异有

统计学意义($P < 0.01$),见插 I 图 3。

2.4 RT-PCR 法检测 MDA-MB-231 细胞与实验组 HUVECs 细胞 EGFR mRNA 的表达 MDA-MB-231 细胞在 513 bp 处可见一条明显的扩增条带,而实验组 HUVECs 细胞未见 EGFR 513 bp 的扩增产物,见图 4。



1:DNA 标记物;2:MDA-MB-231 细胞;3:实验组 HUVECs 细胞。

图 4 MDA-MB-231 细胞与实验组 HUVECs 细胞 EGFR mRNA 的表达

3 讨 论

EGFR 或 HER-1/erbB1 是首先发现的 HER/erbB 家族跨膜受体酪氨酸激酶成员,该家族成员还包括 HER-2/erbB2、HER-3/erbB3、HER-4/erbB4,有高度同源的酪氨酸序列和相似的结构特征^[5]。EGFR 基因位于 7P11-13,编码蛋白相对分子质量为 170×10^3 ,是一种跨膜分布的细胞表面传感器。EGFR 在非活性状态下是单体,与配体结合后形成同源或异源二聚体,细胞内区的酪氨酸激酶活化,酪氨酸残基位点发生自身磷酸化,进而激活 Ras-Raf-MAPK、PI3K/AKT、JAK/STAT 等多条信号转导途径^[6],将信号由细胞质转到细胞核内,启动 DNA 复制、引起细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进肿瘤浸润和转移等。

EGFR 表达异常主要表现为 EGFR 过表达和(或)突变,研究发现,EGFR 在多种肿瘤中有不同程度的表达,头颈部鳞癌中表达率为 90%~100%,肺癌中表达率为 40%~80%,肾癌中表达率为 50%~90%,结直肠癌中表达率为 25%~77%,卵巢癌中表达率为 25%~70%,前列腺癌中表达率为 39%~47%,神经胶质瘤中表达率为 40%~63%,乳腺癌中表达率为 14%~90%^[7]。EGFR 的过表达和(或)突变与肿瘤细胞增殖、新生血管形成、侵袭、转移、抗凋亡及对放疗耐受等密切相关。

有研究表明,人体正常血管内皮细胞不表达 EGFR,表皮生长因子(EGF)对体外培养的 HUVECs 增殖迁移没有影响,而当 HUVECs 与高表达 EGFR 的人表皮鳞状细胞癌 A431 细胞混合培养后,EGF 的刺激可提高 HUVECs 的迁移能力,并且在 EGF 的刺激下,A431 细胞通过旁分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和 IL-8 这两种正向调节血管生成因子来刺激内皮细胞增殖^[8]。另一体外研究发现当肿瘤细胞分泌大量转化生长因子(TGF)- α 和 EGF 时会发生肿瘤血管生成作用,此时在血管内皮细胞上可发现正常时并不表达的 EGFR^[9],但是肿瘤血管内皮细胞异常表达 EGFR 的机制仍不十分清楚。

exosomes 是由细胞内多泡体(multivesicular body,MVB)与质膜融合后释放到细胞外的一种直径为 30~100 nm 的膜性小囊泡。当细胞经内吞途径将外来内吞物质转变成早期核内体(early endosome,EEs)时,其内可包含外来抗原物质,随后 EEs 的膜囊内陷、突入,形成多个囊泡状结构,并选择性接受细

胞质内的蛋白成分及脂类,此时的 EEs 被称为晚期核内体(late endosomes,LEs),即多泡体(MVB),囊泡状结构称为 exosomes。MVB 移向质膜并与质膜融合后将 exosomes 释放至细胞外。exosomes 通常是从细胞培养的上清液或肿瘤组织的各种渗出液中分离,在电镜下显示为脂质双分子的扁平或球形小体,可以悬浮于蔗糖密度梯度溶液中,因此,通过超速离心及蔗糖密度梯度离心即可将其他杂质与 exosomes 分离开,本课题组在前期实验中采用此法分离并已成功鉴定肿瘤细胞来源的 exosomes^[4]。exosomes 主要是由蛋白质和脂质构成,目前通过蛋白质组学方法对不同细胞来源的 exosomes 的研究发现,不同来源的 exosomes 中蛋白质不同,主要分为普通蛋白质和细胞特异性蛋白质^[10]。其中特异性蛋白质牵涉到来源细胞的功能,而 exosomes 的功能亦取决于来源细胞^[11]。在本实验中,用 Western blot 法检测高表达 EGFR 的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞来源的 exosomes 也同时表达 EGFR。exosomes 被释放至细胞外后选择性地与受体细胞结合。目前 exosomes 与受体细胞结合的方式仍不十分清楚,国外研究者提出 3 种假设^[12-14]:(1)exosomes 的膜蛋白与细胞表面的特异性受体结合从而激活细胞内信号;exosomes 膜蛋白被蛋白酶水解后的蛋白片段亦可作为可溶性配体与受体细胞表面的受体结合。(2)与受体细胞膜直接融合并将内容物释放至受体细胞的细胞液中,蛋白质组学研究发现 exosomes 含有大量的促融合蛋白——CD9^[15]。与受体细胞膜融合后可改变受体细胞的膜蛋白表达和脂质成分,从而影响和改变其生物学功能,释放内容物(如蛋白、mRNA 或 miRNA)至受体细胞,可激活多种细胞信号。(3)被受体细胞内吞并再次释放至邻近细胞发挥其生物学效应。

细胞间的相互作用在肿瘤进展、血管生成和侵袭中起至关重要的作用^[16]。为了探讨 exosomes 在肿瘤微环境中的作用,在实验中将 MDA-MB-231 细胞来源的 exosomes 与 HUVECs 共培养,观察 exosomes 携带的 EGFR 在二者之间的传递。结果发现,浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 exosomes 与 HUVECs 共培养 24 h 后,免疫细胞化学显示部分 HUVECs 细胞胞质有淡黄色或棕黄色颗粒,EGFR 阳性表达率为 $(21.4 \pm 3.1)\%$ 。提示原本不表达 EGFR 的正常 HUVECs 已经开始异常表达 EGFR。随后,采用 RT-PCR 法分别检测 MDA-MB-231 细胞与 HUVECs EGFR 的 mRNA 表达,结果发现 MDA-MB-231 细胞的 EGFR mRNA 表达为阳性,经 exosomes 处理 24 h 后 HUVECs 的 EGFR mRNA 表达仍然为阴性,进一步证实 EGFR 是由 exosomes 介导传递至 HUVECs,而不是其内源性基因表达。

综上所述,本研究结果显示 MDA-MB-231 细胞源 exosomes 携带癌基因 EGFR,并可介导其向周围血管内皮细胞转移,这可能是乳腺癌组织中血管内皮细胞异常表达 EGFR 的一种方式,将为今后的乳腺癌生物诊断和治疗提供新的靶点。

参考文献:

- [1] De Luca A, Carotenuto A, Rachiglio A, et al. The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment[J]. J Cell Physiol, 2008, 214(3): 559-567.
- [2] Kuwai T, Nakamura T, Sasaki T, et al. Phosphorylated epidermal growth factor receptor on tumor-associated en-

- endothelial cells is a primary target for therapy with tyrosine kinase inhibitors[J]. *Neoplasia*, 2008, 10(5): 489-500.
- [3] Amin DN, Hida K, Bielenberg DR, et al. Tumor endothelial cells expression epidermal growth factor receptor (EGFR) but not erbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4): 2173-2180.
 - [4] 李静, 沈宜, 汤为学, 等. 小鼠肝癌细胞 H22 源 exosomes 的制备及其免疫相关蛋白的初步研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2007, 15(6): 437-440.
 - [5] Wells A. EGF receptor[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(6): 637-643.
 - [6] Klapper LN, Kirschbanm MH, Sela M, et al. Biochemical and clinical implications of the Erb/HER signaling network of growth factor receptors[J]. *Adv Cancer Res*, 2000(77): 25-79.
 - [7] Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, et al. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation[J]. *Dig Liver Dis*, 2009, 41(12): 875-880.
 - [8] Hirata A, Ogawa S, Kometani T, et al. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase[J]. *Cancer Res*, 2002(62): 2554-2560.
 - [9] Sasaki T, Kitadai Y, Nakamura T, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation on tumor-associated endothelial cells leads to treatment of orthotopic human colon cancer in nude mice[J]. *Neoplasia*, 2007, 9(12): 1066-1077.
 - [10] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosome: composition, biogenesis and function[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(8): 569-579.
 - [11] Jeffrey SS, Sanchita B. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology[J]. *Traffic*, 2008, 9(6): 871-881.
 - [12] Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more[J]. *Trends Biol*, 2008, 19(2): 43-51.
 - [13] Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4): 575-581.
 - [14] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication[J]. *J Proteomics*, 2010, 73(10): 1907-1920.
 - [15] Thery C, Regnault A, Garin J, et al. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73[J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(3): 599-610.
 - [16] Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(13): 2014-2018.

(收稿日期: 2012-01-11 修回日期: 2012-04-17)

(上接第 2693 页)

是较为理想和实用的胰腺癌动物模型, 该造模方法为后续进行胰腺癌发病机制及治疗研究等实验提供了良好的平台。

参考文献:

- [1] 卫金歧, 边壮, 叶丽华, 等. 胰腺癌高危评分模型在胰腺癌诊断方面的临床应用价值[J]. *中国综合临床*, 2010, 26(4): 366-368.
- [2] 石卫东. 人胰腺癌 SW1990 细胞高肝转移细胞系的建立及中药干预研究[D]. 上海: 复旦大学, 2007.
- [3] 吴介恒, 刘梦娜, 黄莎圆子, 等. 胰腺癌动物模型制作方法的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2011, 32(2): 115-117.
- [4] 吴细丕, 钱林法. 实验动物与肿瘤研究[M]. 北京: 中国医药出版社, 2000: 190-199.
- [5] 吴深保, 周国雄, 黄介飞. 实验性胰腺癌动物模型研究进展[J]. *胰腺病学*, 2005, 5(3): 187-189.
- [6] Clapper ML, Wood M, Leahy K, et al. Chemopreventive activity of oltipraz against N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(BOP)-induced ductal pancreatic carcinoma development and effects on survival of Syrian golden hamsters[J]. *Carcinogenesis*, 1995, 16(9): 2159-2165.
- [7] Hashitani S, Urade M, Zushi Y, et al. Establishment of nude mouse transplantable model of a human adenoid cystic carcinoma of the oral floor showing metastasis to the lymph node and lung[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(1): 67-72.
- [8] 张朝阳, 张曙光, 于振海, 等. 大鼠胰腺癌模型制备的实验研究[J]. *中国现代普通外科进展*, 2005, 8(2): 102-103.
- [9] 王平, 李玉明. 血清 CA19-9、CA24-2、CEA 联合检测在胰腺癌诊断中的价值[J]. *南通医学院学报*, 1997, 17(4): 488-489.
- [10] 夏吉荣, 黄天禄, 马志如, 等. 血清 CA242 测定的临床应用评价[J]. *中国肿瘤临床*, 1997, 24(1): 40-42.
- [11] 蒋晓婷. 血清肿瘤标志物联合检测在胰腺癌诊治中的意义[J]. *中国实验诊断学*, 2002, 6(5): 342-344.
- [12] 张中海. 病理切片制作过程中常见问题及原因探析[J]. *吉林医学*, 2011, 32(27): 5761.
- [13] 袁文丹, 刘巍, 崔勇, 等. 17 β -雌二醇对大鼠腹腔巨噬细胞免疫活性影响[J]. *大众科学: 济宁医学院学报*, 2007, 30(4): 296-298.
- [14] 谭玉珍. 实用细胞培养技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 39.
- [15] 吴介恒, 刘梦娜, 黄莎圆子, 等. 细胞培养中霉菌感染应对措施[J]. *吉林医药学院学报*, 2011, 32(1): 30.

(收稿日期: 2012-01-09 修回日期: 2012-04-22)