

· 论 著 ·

# 人皮肤鳞状细胞癌体外三维模型的建立及高侵袭性鳞癌细胞的生物学评价\*

杨晓鲲, 杨亚东, 杨桂红, 唐书谦, 伍津津<sup>△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科, 重庆 400042)

**摘要:**目的 建立人皮肤鳞癌细胞体外三维培养模型, 分离高侵袭性细胞亚群, 并比较其生物学特性。方法 利用复方壳多糖组织工程皮肤, 成功建立人皮肤鳞癌细胞体外三维培养模型, 消化分离得到高侵袭性鳞癌细胞亚群, 比较肉桂醛和干扰素作用后对不同侵袭特性细胞亚群的增殖抑制效果, 同时比较不同侵袭特性细胞亚群在裸鼠中成瘤效果的不同。结果 不同浓度的肉桂醛和干扰素对皮肤鳞癌细胞的增殖抑制差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 不同侵袭特性的皮肤鳞癌细胞亚群之间的增殖抑制差异也有统计学意义( $P < 0.01$ ), 另外, 两种不同侵袭特性的细胞亚群的成瘤特性差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 成功建立人皮肤鳞癌体外三维培养模型, 同时运用此种三维培养模型能够筛选得到侵袭特性更强的细胞亚群。

**关键词:** 三维培养模型; 组织工程皮肤; 癌, 鳞状细胞; 高侵袭性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.29.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)29-3465-03

## The establishment of the three-dimensional culture model of the human skin squamous-celled carcinoma and their biological evaluation of the high-invasive squamous carcinoma cells\*

Yang Xiaokun, Yang Yadong, Yang Guihong, Tang Shuqian, Wu Jinjin<sup>△</sup>

(Department of Dermatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital,

Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

**Abstract: Objective** To establish the three-dimensional culture model of the human skin squamous-celled carcinoma, and isolate the highly invasive cell subsets, and compare their biological characteristics. **Methods** By using the composite chitosan tissue engineering skin, the three-dimensional culture model of the human skin squamous-celled carcinoma was successfully established, through digestion, we divided and got the high-invasive squamous carcinoma cells subsets. After that, the different invasive properties of subpopulations of cells in nude mice tumor effects were compared. **Results** Different concentrations of cinnamaldehyde and interferon on skin squamous-celled carcinoma cell proliferation inhibition had statistical significance ( $P < 0.01$ ), the different invasive characteristics of skin squamous cells carcinoma between subpopulations of cells proliferation inhibition also was statistically significant ( $P < 0.01$ ), and the two different invasive properties of subpopulations of cells in the tumor characteristics also had statistical significance ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** We established the three-dimensional culture model of the human skin squamous-celled carcinoma successfully, by using this model, we could screen the higher invasive cells subsets.

**Key words:** three dimensional culture; tissue engineering skin; carcinoma, squamous cell; high-invasive

人皮肤鳞状细胞癌(the human skin squamous-celled carcinoma, SCC), 是皮肤肿瘤中侵袭性、致死性较强的一类, 对其研究一直都是热点。以往研究者借助普通的二维细胞培养和鳞癌动物模型进行研究, 本试验中, 通过建立 SCC 三维培养模型, 并进一步筛选出具有更高侵袭性的 SCC 细胞亚群, 并比较两种细胞亚群之间的生物学特性, 为临床治疗 SCC 提供重要的理论和实验依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 1~3 个月雄性裸鼠 40 只, 由第三军医大学大坪医院动物实验所提供。

**1.1.2 细胞和试剂** 人表皮鳞癌细胞株 A-431 细胞株 (TCHu188, 上海细胞生物研究所), 人源角质形成细胞 (KC 细

胞) 和成纤维细胞 (FB 细胞) 为本实验室常规冻存备用, 鼠尾胶原按本科方法制备<sup>[1]</sup>; 肉桂醛 (Sigma 公司); 注射用重组人干扰素  $\alpha 1b$  (IFN $\alpha 1b$ ) (赛若金, 每支 1 mL : 30  $\mu$ g, 国药准字 S10960059, 深圳科兴生物工程有限公司); 层粘连蛋白, 普通和高糖 DMEM 培养基 (Hyclone 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT 粉)、表皮生长因子、壳多糖、硫酸软骨素 C、透明质酸 (均为 SIGMA 产品), HEPES (美国 KAI 生物医学科学公司), 胶原酶 D (德国宝灵曼公司); 胰蛋白酶 (中国科学院新疆化学研究所)。

**1.1.3 主要仪器设备** 超净工作台 (苏净集团苏州安泰空气技术有限公司), 二氧化碳孵箱 TC2323 型 (SHEL LAB 公司), HY-4 调速多用振荡器 (江苏金坛市中大仪器厂); 酶标仪 (Bio-tek ELx800, USA); 细胞计数仪 (HK97CASY-TT)。

\* 基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2012AA020504-4); 国家自然科学基金资助项目 (31170924)。作者简介: 杨晓鲲 (1978~), 硕士, 主治医师, 现就职于成都军区总医院, 目前为第三军医大学大坪医院博士研究生, 主要从事皮肤病与性病学的研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel: (023)68757591, E-mail: wjjj@163.com。

## 1.2 方法

**1.2.1 A431 细胞及相关细胞的培养和传代** 向 A431 细胞的培养瓶中加入 2 mL 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 清洗 2 次, 倒掉培养基, 加入 0.25% 胰酶 4℃ 冷消化 30 min, 后轻轻拍打培养瓶壁, 加入 1 mL 胎牛血清终止消化后按 1:2~1:4 传代扩增, 以此获得的 A431 细胞记为 I 组。KC 细胞和 FB 细胞从临床健康成人包皮标本获取, 并常规培养、传代。

**1.2.2 建立 A431 鳞癌细胞三维培养模型** 参照以往研究<sup>[1]</sup> 在 6 孔培养板上制作组织工程凝胶, 将 FB  $1.5 \times 10^5$  个细胞/孔混入凝胶中, 待凝胶凝固后, 再按照 A431  $0.5 \times 10^5$  个细胞/孔、KC  $2 \times 10^5$  个细胞/孔的比例加入凝胶中, 进行 A431 三维培养模型的建立, 分为 A、B、C、D 组 (分别对应 5、7、10、14 d), 各重复 2 组 (一组观察鳞癌细胞浸润情况, 另一组消化提取细胞)。为改善培养环境, 利用振荡器进行振荡培养; 并在 5、7、10、14 d 取出标本, 甲醛液固定, 常规 HE 染色, 镜下观察 A431 细胞浸润情况。之后将 D 组表皮层中细胞去除, 加入 2% 胶原酶 D 消化, 获得浸入真皮层的 A431 细胞, 培养传代后, 再次按前述各细胞数量接种于组织工程凝胶中, 并分为 a、b、c、d 组, 可再次重复 2 组, 以获取侵袭特性更强的鳞癌细胞, 并将此 A431 细胞记为 II 组 (普通培养 A431 细胞为 I 组)。

**1.2.3 肉桂醛溶液、IFN $\alpha$ 1b 溶液及 0.5% MTT 液的配制** 肉桂醛溶液配制以 0.2% 二甲基亚砜溶液作为溶剂, 将肉桂醛溶液和高糖无血清 DMEM 培养基经过避光振荡 5 min, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 分别配制成 100  $\mu$ L 的 100、200、400  $\mu$ mol/L 3 种浓度, 于 4℃ 保存备用。IFN $\alpha$ 1b 溶液配制: 30  $\mu$ g/mL IFN $\alpha$ 1b 用无血清 DMEM 作为稀释剂, 分别稀释成 3、2、1  $\mu$ g/mL 浓度并置于 4℃ 保存备用。0.5% MTT 液配制: 将 50 mg MTT 混合于 10 mL 的 0.01M 磷酸盐缓冲液中, 振摇、溶解, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 并于 4℃ 保存备用。

**1.2.4 MTT 法测定 A431 细胞增殖** 取对数期生长的 A431 细胞, 无菌 PBS 洗涤 3 次后 0.25% 胰酶消化, 观察细胞收缩变圆后终止消化。1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入完全培养基重悬, 细胞计数仪计数, 按  $2 \times 10^4$  个细胞/100 微升接

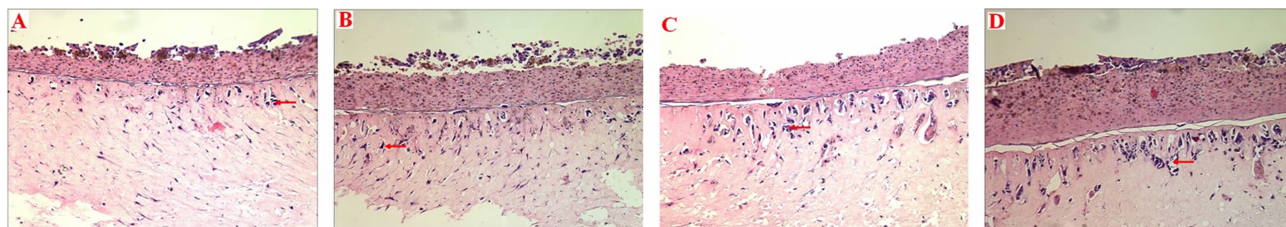
种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 置入 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。待细胞贴壁后分别加入肉桂醛 0、100、200、400  $\mu$ mol/L (对应配制好的肉桂醛溶液加入量分别为 0.0、12.5、25.0、50.0  $\mu$ L)。每组 5 复孔 ( $n=5$ ), 置入孵箱继续培养。分别在培养 24、48 和 72 h 后每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20  $\mu$ L, 继续培养 4 h, 每孔加入二甲基亚砜 150  $\mu$ L, 避光振荡 10 min, 酶标仪 490 nm 处测量光密度值。

**1.2.5 裸鼠成瘤模型的建立及不同侵袭性 A431 细胞成瘤活性的比较** 按接种 A431 细胞的不同分为 I、II 组, 并按照接种后裸鼠生长时间分为 3、4、5、6 周组, 每组 5 只, 胰蛋白酶消化后制成细胞悬液, 用无血清培养液洗涤 3 次, 3 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液。加 PBS 液稀释, 制成单细胞悬液用于细胞计数, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$  /mL, 裸鼠背部皮肤用 75% 乙醇进行消毒, 以 1 mL 注射器吸取 0.1 mL 细胞悬液, 数量为  $2 \times 10^6$  个, 注射入裸鼠背部皮下组织, 注射完毕后观察裸鼠, 无异样反应, 继续放于无菌饲养房内饲养, 并观察肿瘤生长情况, 并在一定时间内脱颈法处死裸鼠, 留取肿瘤标本, 后用体积公式:  $V=0.5 \times a \times b^2$ , ( $a$  为长径,  $b$  为短径) 计算肿瘤体积。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 细胞增殖抑制率等采用  $\chi^2$  检验, 组间比较采用  $t$  检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ , 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 A431 鳞癌细胞三维培养模型的建立** 由图 1 可观察到, 作者建立的组织工程皮肤表皮分化明显, 形成较之普通传统培养形式不同的三维立体结构, 以标志性的基底膜为界, 上为组织工程皮肤表皮部分, 而下为组织工程的真皮凝胶部分, 并且从三维培养的第 5 天开始, 组织工程皮肤真皮凝胶层中可见到核异型性明显的肿瘤细胞浸润, 并且随着时间的延长, 浸润入真皮层内的细胞数量明显增加, 同时肿瘤浸润的广度和深度都有所增加, 到第 14 天时达到高峰。结果提示鳞癌细胞三维培养模型建立成功。



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组。

图 1 各组 A431 鳞癌细胞组织学观察 (HE $\times$ 10)

表 1 不同浓度肉桂醛对 I 组、II 组 A431 细胞增殖的抑制率 (% ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=20$ )

浓度 ( $\mu$ mol/L)	24 h		48 h		72 h	
	I 组	II 组	I 组	II 组	I 组	II 组
0	0	0	0	0	0	0
100	13.15 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	18.53 $\pm$ 1.71 <sup>a</sup>	21.67 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>	24.56 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>	28.35 $\pm$ 4.61 <sup>a</sup>	35.51 $\pm$ 4.93 <sup>a</sup>
200	26.75 $\pm$ 3.53 <sup>ab</sup>	32.27 $\pm$ 2.61 <sup>ab</sup>	32.76 $\pm$ 3.53 <sup>ab</sup>	40.46 $\pm$ 5.52 <sup>ab</sup>	47.65 $\pm$ 7.24 <sup>ab</sup>	59.21 $\pm$ 5.24 <sup>ab</sup>
400	44.35 $\pm$ 3.44 <sup>abc</sup>	56.45 $\pm$ 4.22 <sup>abc</sup>	65.21 $\pm$ 5.02 <sup>abc</sup>	76.65 $\pm$ 3.54 <sup>abc</sup>	73.45 $\pm$ 3.55 <sup>abc</sup>	85.65 $\pm$ 4.31 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup> $P<0.01$ , 与无药物对照组比较; <sup>b</sup> $P<0.01$ , 与 100  $\mu$ mol/L 比较; <sup>c</sup> $P<0.01$ , 与 200  $\mu$ mol/L 比较。

表 2 不同浓度 IFN $\alpha$ 1b 对 I 组、II 组 A431 细胞增殖的抑制率(%, $\bar{x}\pm s,n=20$ )

浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	24 h		48 h		72 h	
	I 组	II 组	I 组	II 组	I 组	II 组
0	0	0	0	0	0	0
100	19.75 $\pm$ 3.16 <sup>a</sup>	26.50 $\pm$ 2.30 <sup>a</sup>	23.65 $\pm$ 7.12 <sup>a</sup>	29.94 $\pm$ 6.24 <sup>a</sup>	31.65 $\pm$ 3.23 <sup>a</sup>	37.33 $\pm$ 4.49 <sup>a</sup>
200	23.46 $\pm$ 2.17 <sup>ab</sup>	31.46 $\pm$ 3.27 <sup>ab</sup>	28.45 $\pm$ 3.52 <sup>ab</sup>	34.65 $\pm$ 3.38 <sup>ab</sup>	36.45 $\pm$ 4.26 <sup>ab</sup>	40.38 $\pm$ 3.99 <sup>ab</sup>
400	27.76 $\pm$ 3.24 <sup>abc</sup>	38.34 $\pm$ 4.25 <sup>abc</sup>	37.86 $\pm$ 2.15 <sup>abc</sup>	45.25 $\pm$ 4.65 <sup>abc</sup>	45.35 $\pm$ 6.26 <sup>abc</sup>	51.65 $\pm$ 2.37 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与无药物对照组比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与 100  $\mu\text{mol/L}$  比较;<sup>c</sup>: $P<0.01$ ,与 200  $\mu\text{mol/L}$  比较。

**2.2 肉桂醛和 IFN $\alpha$ 1b 对不同侵袭性的 A431 细胞增殖活性的影响** 随着肉桂醛、IFN $\alpha$ 1b 浓度的增加,鳞癌细胞被抑制率也随之增高,且 I 组、II 组间对比,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见表 1。随着药物浓度的增加,鳞癌细胞被抑制率也随之增高,且 I 组、II 组间对比,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见表 2。接种后,II 组裸鼠形成的肿瘤较 I 组体积更大,质量更重,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见表 3。

表 3 两组 A431 细胞成瘤活性的比较( $\bar{x}\pm s,n=20$ )

组别	体积( $\text{mm}^3$ )				肿瘤质量 (g)
	3 周	4 周	5 周	6 周	
I 组	393 $\pm$ 41	598 $\pm$ 53	798 $\pm$ 71	1 553 $\pm$ 127	5.38 $\pm$ 0.58
II 组	379 $\pm$ 36 <sup>a</sup>	522 $\pm$ 66 <sup>a</sup>	701 $\pm$ 82 <sup>a</sup>	1 123 $\pm$ 105 <sup>a</sup>	3.05 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与 I 组比较。

**3 讨 论**

SCC 在皮肤肿瘤中发生率较高,对于它的治疗方法和基础研究很多,本实验中,运用 SCC A431 细胞建立了 SCC 体外三维培养模型,并筛选出侵袭性更强的 A431 细胞亚群,并将这两类细胞的生物学特性做了比较,证明了鳞癌细胞三维培养模型的有效性,为今后 SCC 的临床治疗和科研研究提供良好的体外培养模型。

众所周知,目前肿瘤研究的主要手段集中于肿瘤细胞的二维培养、动物荷瘤模型和自发性动物肿瘤模型等方面,都存在着明显的局限性,与临床肿瘤诊治往往存在偏差<sup>[2-3]</sup>。而三维培养,有利于种植细胞固有的生物学特性的维持<sup>[4]</sup>,可以较为真实地再现体外环境中细胞与细胞、细胞与细胞外基质相互间的作用。目前,已经在肿瘤形态发生、侵袭性生长及化疗药物的药理毒理的研究中提供了比较有价值的研究手段<sup>[5-6]</sup>。例如,有学者将乳腺癌(SUM1315、MDA-MB-231)、前列腺癌(LN-CaP)细胞株种植于聚己酸内酯磷盐三钙(mPCL-TCP)、聚甲基丙烯酸-2-羟乙酯(polyHEMA)、Matrigel 等支架材料中,并在三维培养条件下形成肿瘤团块<sup>[7-8]</sup>,并维持了恶性肿瘤的生物学特性<sup>[9-10]</sup>。

在本次实验中,利用复方壳多糖真皮基质凝胶这一三维培养支架为基础,本研究成功地建立了 SCC 体外三维培养模型,这与目前肿瘤侵袭性研究采用的细胞侵袭测定装置系统如 CytoSelect 系统<sup>[11]</sup>、聚碳酸酯滤器穿壁系统<sup>[12]</sup>相比,具有明显的优势,可以真实反映在体情况下肿瘤突破表皮层而进入真皮层的失衡过程,同时能够获得这一类鳞癌细胞亚群。经过肉桂醛和 IFN $\alpha$ 1b 对皮肤鳞癌细胞的增殖抑制实验发现,随着药物浓度的增加,鳞癌细胞被抑制率也随之增高,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),其中肉桂醛在浓度为 400  $\mu\text{mol/L}$ 、作用时间为

72 h 时,对两组细胞的抑制率分别达到(85.65 $\pm$ 4.31)%和(73.45 $\pm$ 3.55)%。而 IFN $\alpha$ 1b 在浓度为 400  $\mu\text{mol/L}$ 、作用时间为 72 h 时,对两组细胞的抑制率则分别达到了(51.65 $\pm$ 2.37)%和(45.35 $\pm$ 6.26)% ,同时这两组实验分组细胞之间比较,相同浓度药物和相同药物作用时间对肿瘤细胞的增殖抑制差异有统计学意义( $P<0.01$ )。另外,两种不同侵袭特性的细胞亚群的成瘤特性差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

综上所述,本研究体外构建鳞癌细胞三维培养模型是成功的,通过此模型,也能够筛选出侵袭性更强的鳞癌细胞,这对构建其他皮肤恶性肿瘤的三维培养模型、治疗药物筛选与评价都有重要的理论和实验指导价值。至于如何维持此种肿瘤三维培养模型的稳定性,以及本次研究中的皮肤鳞癌细胞侵入真皮层的具体机制,需要在今后的实验工作中继续探讨。

**参考文献:**

- [1] 鲁元刚,伍津津,雷霞,等.培养基钙浓度对复方壳多糖组织工程皮肤基底膜构建的形态学研究[J].中国修复重建外科杂志,2007,21(3):298-301.
- [2] Eager RM, Cunningham CC, Senzer NN, et al. Phase II assessment of talabostat and cisplatin in second-line stage IV melanoma[J]. BMC Cancer, 2009, 9(7):263-278.
- [3] Huttmacher DW, Loessner D, Rizzi S, et al. Can tissue engineering concepts advance tumor biology research? [J]. Trends Biotechnol, 2010, 28(3):125-133.
- [4] Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D[J]. Cell, 2007, 130(4):601-610.
- [5] Furth ME, Atala A, Van Dyke ME. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine [J]. Biomaterials, 2007, 28(34):5068-5073.
- [6] Dutta RC, Dutta AK. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications [J]. Biotechnol Adv, 2009, 27(4):334-339.
- [7] Fischbach C, Kong HJ, Hsiong SX, et al. Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3D culture and integrin engagement[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(2):399-404.
- [8] Wang R, Xu J, Juliette L, et al. Three-dimensional co-culture models to study prostate Cancer growth, progression, and metastasis to bone[J]. Semin Cancer Biol, 2005, 15(5):353-364.
- [9] Ingber DE. Can Cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment? [J]. Semin (下转第 3471 页)

研究报告。经芯片检测的结果提示,通过定量 PCR 方法检测了 H19 的过表达可下调 JEG-3 细胞 HES1 的表达。进一步研究表明重度子痫前期胎盘组织中 HES1 mRNA 表达水平下调,提示 HES1 表达受阻时,滋养细胞的分化障碍导致滋养细胞功能异常,从而参与子痫前期的发病。

总之,本次芯片实验结果表明印迹基因 H19 主要可引起转录调控、受体结合、细胞代谢、细胞发育、细胞进程和生物学调节相关基因的改变,从而调节滋养细胞的生物学功能,对未知功能基因的深入研究将有助于进一步了解 H19 对滋养细胞的调控机制。

#### 参考文献:

[1] Marques CJ,Carvalho F,Sousa M,et al. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis[J]. *Lancet*,2004,363(9422):1700-1702.

[2] Isles AR,Holland AJ. Imprinted genes and mother-offspring interactions[J]. *Early Hum Dev*,2005,81(1):73-77.

[3] Feinberg AP,Cui H,Ohlsson R. DNA methylation and genomic imprinting:insights from Cancer into epigenetic mechanisms[J]. *Semin Cancer Biol*,2002,12(5):389-398.

[4] Matouk I,Ayesh B,Schneider T,et al. Oncofetal splice-pattern of the human H19 gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2004,318(4):916-919.

[5] Lottin S,Adriaenssens E,Berteaux N,et al. The human H19 gene is frequently overexpressed in myometrium and stroma during pathological endometrial proliferative events[J]. *Eur J Cancer*,2005,41(1):168-177.

[6] Li YM,Franklin G,Cui HM,et al. The H19 transcript is associated with polysomes and May regulate IGF2 expression in trans[J]. *J Biol Chem*,1998,273(43):28247-28252.

[7] Runge S,Nielsen FC,Nielsen J,et al. H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein[J]. *J Biol Chem*,2000,275(38):29562-29569.

[8] Eggenschwiler J,Ludwig T,Fisher P,et al. Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes[J]. *Genes Dev*,1997,11(23):3128-3142.

[9] Wilkin F,Paquette J,Ledru E,et al. H19 sense and anti-sense transgenes modify insulin-like growth factor-II mRNA levels[J]. *Eur J Biochem*,2000,267(13):4020-4027

[10] Lustig-Yariv O,Schulze E,Komitowski D,et al. The expression of the imprinted genes H19 and IGF-2 in choriocarcinoma cell lines. Is H19 a tumor suppressor gene? [J]. *Oncogene*,1997,15(2):169-177.

[11] Yu LL,Chang K,Lu LS,et al. Lentivirus-mediated RNA interference targeting the H19 gene inhibits cell proliferation and apoptosis in human choriocarcinoma cell line JAR[J]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3679798/g>.

[12] Ishibashi M,Ang SL,Shiota K,et al. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors,premature neurogenesis, and severe neural tube defects[J]. *Genes Dev*,1995,9(24):3136-3148.

[13] Tomita K,Ishibashi M,Nakahara K,et al. Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis[J]. *Neuron*,1996,16(4):723-734.

[14] Kunnimalaiyaan M,Yan S,Wong F,et al. Hairy Enhancer of Split-1(HES-1),a Notch1 effector,inhibits the growth of carcinoid tumor cells[J]. *Surgery*,2005,138(6):1137-1142

[15] Liu J,Ye F,Chen HZ,et al. Expression of Differentiation Associated Protein Hes1 and Hes5 in Cervical Squamous Carcinoma and its Precursors[J]. *Int J Gynecol Cancer*,2007,17:1-7.

(收稿日期:2013-06-12 修回日期:2013-07-25)

(上接第 3467 页)

*Cancer Biol*,2008,18(5):356-364.

[10] Hutmacher DW,Singh H. Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture[J]. *Trends Biotechnol*,2008,26(4):166-172.

[11] Cabello CM,Bair WB,Lamore SD,et al. The cinnamon-derived Michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth

[J]. *Free Radic Biol Med*,2009,46(2):220-231.

[12] Kim A,Son M,Kim KI,et al. Elevation of intracellular cyclic AMP inhibits NF- $\kappa$ B-mediated thymosin  $\beta$ 4 expression in melanoma cells[J]. *Exp Cell Res*,2009,15(19):3325-3335.

(收稿日期:2013-05-12 修回日期:2013-06-22)