

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.16.003

## TLR9 对胰腺癌裸鼠增殖生长及化疗耐药性的研究\*

刘宇<sup>1</sup>,雷泽华<sup>1△</sup>,杜波<sup>1</sup>,王志旭<sup>1</sup>,高峰畏<sup>1</sup>,王清<sup>1</sup>,张建新<sup>2</sup>

(1.四川省乐山市人民医院普外科 614000;2.江苏大学附属医院,江苏镇江 212001)

**[摘要]** **目的** 观察 TLR9 在不同的活化状态下对人胰腺癌裸鼠移植瘤生长及药物抗性的影响。**方法** 建立人胰腺癌 PANC-1 细胞裸鼠移植瘤模型,并随机分为 6 组:无菌生理盐水组、TLR9 激动剂、TLR9 抑制剂组、吉西他滨组、TLR9 抑制剂+吉西他滨组、TLR9 激动剂+吉西他滨组进行实验。游标卡尺记录肿瘤体积大小及生长情况,采用免疫组化方法检测肿瘤 TLR9 受体表达情况,核磁共振成像(MRI)观察肿瘤生长、转移及周围组织侵犯情况。**结果** 吉西他滨组、TLR9 激动剂+吉西他滨组、TLR9 抑制剂+吉西他滨组肿瘤摘除后体积及生长速度明显小于其他组( $P<0.05$ ),TLR9 激动剂+吉西他滨组生长速度及肿瘤摘除后体积明显大于 TLR9 抑制剂+吉西他滨组及吉西他滨组( $P<0.05$ ),TLR9 抑制剂+吉西他滨组与吉西他滨组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),TLR9 激动剂组、TLR9 抑制剂组及生理盐水组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。种植后 7 周小鼠在 MRI 下观察,瘤成椭圆形,境界清楚,周围组织未见明显转移及对周围组织的侵犯;检测肿瘤组织中并鉴定表面明确有 TLR9 的表达。**结论** 胰腺癌裸鼠移植瘤中确有 TLR9 的阳性表达,TLR9 的激活可以明显降低胰腺癌对吉西他滨化疗的敏感性,增加肿瘤的耐药性,相反促进肿瘤生长。

**[关键词]** 胰腺肿瘤;裸鼠;吉西他滨;TLR9**[中图分类号]** R735.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)16-2167-03**Research on influence of TLR9 on pancreatic cancer nude mouse model growth and resistance to chemotherapy\***Liu Yu<sup>1</sup>, Lei Zehua<sup>1△</sup>, Du Bo<sup>1</sup>, Wang Zhixu<sup>1</sup>, Gao Fengwei<sup>1</sup>, Wang Qing<sup>1</sup>, Zhang Jianxin<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, Leshan Municipal People's Hospital, Leshan, Sichuan 614000, China;

2. Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of TLR9 on the nude mouse transplanted tumor growth of human pancreatic cancer and its drug resistance. **Methods** The nude mouse transplanted tumor of human pancreatic cancer PANC-1 was established and randomly divided into 6 groups for conducting the experiment: sterile normal saline group, TLR9 agonist, TLR9 inhibitor group, gemcitabine group, TLR9 inhibitor plus gemcitabine Bin group, TLR9 agonist plus gemcitabine. The tumor size and growth situation were recorded by the vernier caliper. The immunohistochemical method was used to detect tumor TLR9 receptor expression. The tumor growth, metastasis and paracancerous tissue invasion situation were observed by the magnetic resonance imaging (MRI). **Results** The volume and growth speed of resected tumor mass in the gemcitabine group, TLR9 agonist + gemcitabine group, TLR9 inhibitor plus gemcitabine group was significantly smaller than those in other groups ( $P<0.05$ ), which in the TLR9 agonist + gemcitabine group were significantly greater than those in the TLR9 inhibitor plus gemcitabine group and gemcitabine group ( $P<0.05$ ), the difference between the TLR9 inhibitor plus gemcitabine group and gemcitabine group had statistical significance ( $P<0.05$ ), while the difference among the TLR9 agonist group, TLR9 inhibitor group and normal saline group had no statistical significance ( $P>0.05$ ). The tumor in mice at 7 weeks after planting showed oval shape with clear boundary by MRI observation, no obvious metastasis and paracancerous invasion were seen in paracancerous tissues no statistically significant, 5 weeks, 6 weeks after planting, seven weeks mice observed in MRI, the tumor into an, state clearly that the transfer of the surrounding tissue, no significant vascular invasion, heart, liver, kidney disease. The TLR9 expression on the surface of tumor tissue was detected and identified. **Conclusion** Pancreatic cancer nude mouse transplanted tumor has definitely positive expression of TLR9, TLR9 activation can significantly decrease the sensitivity of pancreatic cancer to chemotherapy, increases the drug resistance of tumor, on contrary promotes the tumor growth.

**[Key words]** pancreatic neoplasms; nude mouse; gemcitabine; TLR9

胰腺癌是一种临床常见消化道恶性肿瘤,据最新流行病学统计,美国每年有 45 220 例新发现的胰腺癌病例,同时有 38 460 例胰腺癌的患者死亡,而世界范围内的胰腺癌年发病的病例达 277 668 例,年死亡病例达 266 029 例<sup>[1]</sup>。胰腺癌虽然不是高发病例,但由于其发病隐匿,恶性程度高,手术切除率低等原因,发病率与病死率相近<sup>[2]</sup>。目前国内外惟一公认对胰腺癌

有化疗作用的吉西他滨,也随着胰腺癌化疗耐药性的增加,治疗效果逐渐降低,所以探寻降低胰腺癌对吉西他滨的耐药性成为研究提高治疗胰腺癌效果的方向。近年来有研究表明,胰腺癌中存在 TLR9 表达,且 TLR9 的表达及活化水平与肿瘤细胞生长情况呈正相关<sup>[3]</sup>。但尚未见在不同的活化状态下 TLR9 对人胰腺癌裸鼠移植瘤生长及药物耐药性的影响的相关试验

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070287)。 作者简介:刘宇(1986—),硕士,医师,主要从事肝胆外科工作。 △ 通信作者, E-mail:leitsehua@126.com。

研究,尤其是动物体内试验。

本研究通过吉西他滨、TLR9 激动剂 OND1826 及抑制剂 OND2088 干预,观察 TLR9 在不同的活化状态下人胰腺癌裸鼠移植瘤生长、转移以及对周围组织的侵犯情况,并研究其对胰腺癌的吉西他滨耐药性的影响。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 胰腺癌 PANC-1 细胞由上海中山医院实验中心惠赠,BALB/c 裸鼠 3~5 周龄,体质量 18~21 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司[动物许可证编号:SCXK(沪)2007-0005],饲养于江苏大学实验动物中心屏障环境(SPF 级),DMEM 培养基、胎牛血清购、青链双抗购自 Gibco 公司,OND1826(Invivogen 公司)、OND2088(Invivogen 公司),吉西他滨购于礼来公司,TLR-9(SANTA CRUZ 公司),HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(SANTA CRUZ 公司),核磁共振仪由江苏大学附属医院放射科提供。

**1.2 人胰腺癌荷瘤鼠模型的建立** 培养 PANC-1 细胞至对数生长期后,收集细胞并用 PBS 液调整细胞悬液浓度至  $1 \times 10^8$  个/mL。随机选取 5 只裸鼠,碘伏消毒裸鼠右侧前腋下皮肤,每只裸鼠皮下注射 0.2 mL 细胞悬液( $2 \times 10^7$  个细胞)。接种 5 d 左右后可见接种部位皮下长出豌豆大小硬结,10 d 时皮下移植瘤长成约 0.7 cm $\times$ 0.8 cm $\times$ 0.8 cm,约 3 周后颈椎脱臼法处死裸鼠。处死裸鼠后,摘除肿瘤后用 PBS 冲洗,修剪肿瘤块大小约 1 mm<sup>3</sup> 左右,随机选择 40 只裸鼠,用显微外科镊子夹取肿瘤块于接种针头内(20# 腹穿针),接种于裸鼠右侧前腋下,以皮下肿瘤结节长至出现 0.5 mm $\times$ 0.5 mm 硬结,变成肉色为标准,10 d 左右成瘤<sup>[4]</sup>,成瘤率 97.5%。

**1.3 实验分组及给药干预** 当右侧前腋下皮下肿瘤结节长至出现 0.5 mm $\times$ 0.5 mm 硬结,成肉色时。随机于 39 只成瘤老鼠中选取 36 只分成 6 组:无菌生理盐水组(腹腔注射生理盐水)、TLR9 激动剂组(腹腔注射)、TLR9 抑制剂组(腹腔注射)、吉西它滨组(生理盐水稀释后以 25 mg/kg,3 天/次,共 4 次)、TLR9 激动剂+吉西它滨组(给予吉西他滨 25 mg/kg,3 天/次,共 4 次,吉西它滨最后 1 次给药后 4 d 开始腹腔注射 TLR9 激动剂,7 天/次,共 6 次)、TLR9 抑制剂+吉西它滨组(给予吉西他滨 25 mg/kg,3 天/次,共 4 次,吉西它滨最后一次给药后 4 d 开始腹腔注射 TLR9 抑制剂,7 天/次,共 6 次)进行实验。

**1.4 肿瘤生长情况观察** 36 只裸鼠完成实验,未出现意外死亡,分组后给药干预,以游标卡尺每隔 4 d 记录肿瘤大小,肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)= $1/2 \times AB^2$ (A、B 分别为经过中心点的肿瘤最大径和最小径)<sup>[5]</sup>,绘制肿瘤生长曲线,观察结束后小鼠用于 MRI 成像,而后以颈椎脱臼法处死,摘除肿块甲醛固定,用于病理学检测。

**1.5 MRI 了解肿瘤对周围组织的侵袭及转移情况** 将小鼠带于江苏大学附属医院放射科,盐酸氯氨酮腹腔注射麻醉后,于小鼠固定器上给予 MRI 的拍摄,观察对周围组织的侵犯及转移情况。

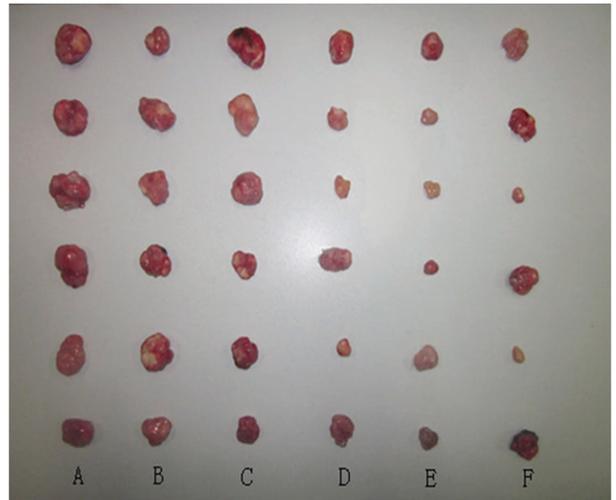
**1.6 检测裸鼠皮下胰腺癌移植瘤组织中 TLR9 的表达**:取下各组裸鼠胰腺癌移植瘤组织以 4% 福尔马林固定,石蜡包埋,取生理盐水组肿瘤作 TLR-9 免疫组织化学染色,显微镜下观察,拍片。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS 16.0 统计软件分析,各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本间均数比较用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 一般情况** 裸鼠予皮下种瘤后,各组小鼠生长良好,未出现死亡,给药干预后,各组老鼠无特殊异常,正常进食,活动好。

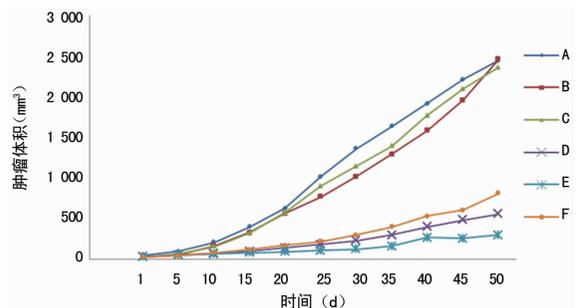
**2.2 腺癌裸鼠皮下肿瘤体积** 当肿瘤生长约豌豆大小硬结,各组给药干预,游标卡尺测量肿瘤生长情况,最后 1 次给药 7 d 后瘤块大小见图 1。吉西他滨组、TLR9 激动剂+吉西它滨组、TLR9 抑制剂+吉西它滨组肿瘤块体积明显较其他组小( $P < 0.05$ ),TLR9 激动剂+吉西它滨组体积(814.56 $\pm$ 529.70) mm<sup>3</sup> 比 TLR9 抑制剂+吉西它滨组体积(301.48 $\pm$ 109.51) mm<sup>3</sup> 及吉西他滨组(561.06 $\pm$ 277.43) mm<sup>3</sup> 肿瘤块大( $P < 0.05$ ),TLR9 抑制剂+吉西它滨组与吉西他滨组比较( $P < 0.05$ );TLR9 激动剂组、TLR9 抑制剂组及生理盐水组肿瘤大小差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



A: 无菌生理盐水组; B: TLR9 激动剂组; C: TLR9 抑制剂组; D: 吉西它滨组; E: TLR9 激动剂+吉西它滨组; F: TLR9 抑制剂+吉西它滨组。

图 1 各组胰腺癌肿瘤摘除后比较

**2.3 人胰腺癌裸鼠皮下肿瘤模型生长情况** 可见给药干预以后,TLR9 激动剂+吉西它滨组及 TLR9 抑制剂+吉西它滨组明显较对照组生理盐水组的生长速度减慢,见图 2。TLR9 激动剂+吉西它滨组及 TLR9 抑制剂+吉西它滨组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),TLR9 抑制剂+吉西它滨组的生长速度也较 TLR9 激动剂+吉西它滨组减慢。

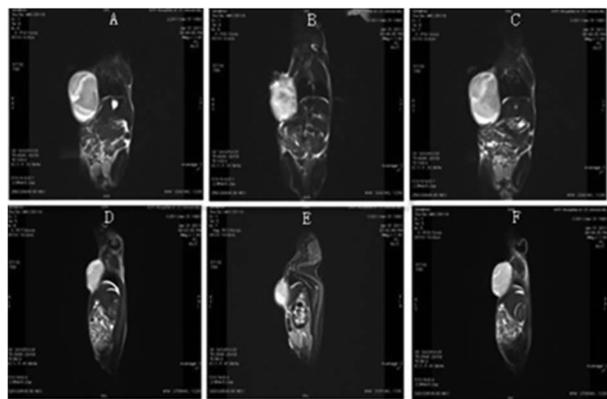


A: 无菌生理盐水组; B: TLR9 激动剂组; C: TLR9 抑制剂组; D: 吉西它滨组; E: TLR9 激动剂+吉西它滨组; F: TLR9 抑制剂+吉西它滨组。

图 2 各组小鼠肿瘤生长曲线

**2.4 MRI 了解肿瘤对周围组织的侵袭及转移情况** 分别选取各组 7 周肿瘤老鼠在 MRI 下观察,可见 7 周肿瘤成椭圆形,境界清楚,周围组织未见明显转移,肝肾未见明显转移,见

图 3。



A: 无菌生理盐水组; B: TLR9 激动剂组; C: TLR9 抑制剂组; D: 吉西它滨组; E: TLR9 激动剂 + 吉西它滨组; F: TLR9 抑制剂 + 吉西它滨组。

图 3 各组裸鼠在 MIR 下的影像观察

2.5 各组裸鼠处死后摘除肿瘤体质量、体积及抑瘤率 生理盐水组、TLR9 激动剂组、TLR9 抑制剂组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 吉西他滨组的抑瘤率为 77.9%, 吉西它滨 + TLR9 激动剂组抑瘤率为 66.7%, 吉西它滨 + TLR9 抑制剂组抑瘤率为 87.7%, 见表 1。

表 1 各组肿瘤生长抑制作用比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	瘤重(g)	瘤体积(mm)
生理盐水组	2.33 ± 0.12	2 446.45 ± 138.83
TLR9 激动剂组	2.35 ± 0.25	2 458.76 ± 266.32
TLR9 抑制剂组	2.27 ± 0.36	2 358.35 ± 328.90
吉西它滨组	0.33 ± 0.18	561.06 ± 277.43
吉西它滨 + TLR9 抑制剂组	0.14 ± 0.05	301.48 ± 109.51
吉西它滨 + TLR9 激动剂组	0.42 ± 0.35	814.56 ± 529.70

2.6 肿瘤组织表面 TLR9 的表达检测 免疫组化结果显示胰腺癌组织 TLR9 表达阳性, 成棕黄色, 主要位于细胞质及细胞间质, 见图 4。

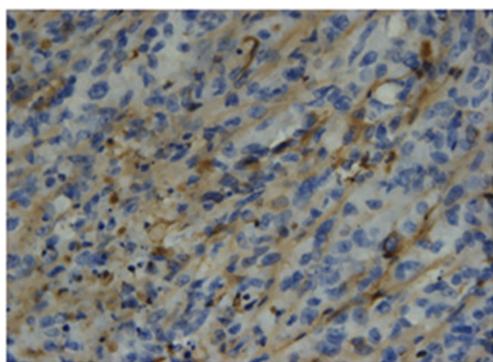


图 4 裸鼠胰腺癌组织 TLR9 表达 (×400)

### 3 讨论

胰腺癌是人常见的恶性肿瘤, 近 20 年我国的发病率有增加的趋势, 已从第 16 位跃升至第 6 位, 其发病隐匿, 恶性程度高, 手术切除率低, 预后极差<sup>[6]</sup>。对于胰腺癌患者, 目前治愈的惟一方法是手术切除, 但是胰腺癌局部的浸润, 强烈的结缔组织增生反应常会累及周围重要的脏器, 减少这些肿瘤完整切除的机会<sup>[7]</sup>。大多数患者确诊时局部已不能手术或已有远处转

移, 只有 20%~30% 的患者可以接受手术切除。即使在这部分手术的患者中, 肿瘤复发率很高, 5 年生存率只有 15%~20%<sup>[8]</sup>, 中位生存时间 15~19 个月。目前的许多方法如化疗、放疗、酶抑制剂等对于治疗胰腺癌效果不佳。因此, 基因治疗胰腺癌始终是这一领域的焦点。有研究结果表明 Toll 样受体和 TLR9 诱导及其信号转导通路在肿瘤的发展中发挥了重要作用<sup>[9]</sup>; 有学者已指出 TLR9 在胰腺癌组织、胰腺癌旁组织及正常胰腺癌组织都有表达, 且在胰腺癌中表达最多, 癌旁组织次之, 正常胰腺组织最少<sup>[10]</sup>; 发现 TLR9 与胰腺癌增殖、侵袭、转移有密切联系, 通过本实验研究发现它还与胰腺癌耐药有关, 未来在临床治疗中, TLR9 的研究可能可以为肿瘤的化疗和免疫治疗提供新的治疗方案。

吉西他滨是目前公认的胰腺癌抗肿瘤药物, 其机理为药物进入细胞后代谢成为有活性的二磷酸盐和三磷酸盐, 并在细胞内聚集, 竞争性掺入 DNA 双键, 从而抑制肿瘤细胞的 DNA 合成。即便如此, 单独静脉使用吉西他滨仍然效果有限。最新报道单独静脉使用吉西他滨的临床受益率为 23.8%, 中位生存期 5.7 个月, 6 个月累积生存率 46%, 9 个月累积生存率 24%, 中位疾病进展时间 2.1 个月<sup>[11]</sup>。这一现象提示胰腺肿瘤细胞对抗癌药物具有耐药性。

作者前期体外试验中已证实 TLR9 的激活可以增加胰腺癌细胞对吉西他滨的耐药。为进一步证明 TLR9 对胰腺癌的化疗耐药性影响, 本研究中通过建立裸鼠胰腺癌肿瘤模型, 并观察记录分析肿瘤生长情况。本研究结果显示, 吉西他滨组、TLR9 激动剂 + 吉西它滨组、TLR9 抑制剂 + 吉西它滨组肿瘤体积及生长速度明显小于其他组 ( $P < 0.05$ ); TLR9 激动剂 + 吉西它滨组生长速度及体积明显大于 TLR9 抑制剂 + 吉西它滨组及吉西他滨组 ( $P < 0.05$ ); TLR9 抑制剂 + 吉西它滨组与吉西他滨组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); TLR9 激动剂组、TLR9 抑制剂组及生理盐水组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。免疫组织化学显示移植瘤中有明显 TLR-9 表达, 主要位于细胞质及间质中, MRI 观察显示肿瘤种植 7 周后, 肿瘤周围组织及血管未见明显侵犯。上述结果提示, TLR-9 受体的活化可增加胰腺癌细胞对吉西他滨的耐药作用, 降低胰腺癌对化疗的敏感性, 促进肿瘤生长, 相关则抑制生长。

综上所述, TLR-9 的激活可以明显增加胰腺癌细胞对化疗的耐药性, 降低其对吉西他滨诱导的凋亡的敏感性。但胰腺癌中 TLR-9 受体所介导的化疗耐药性机制仍不明, 有待进一步研究。

### 参考文献

[1] Mantoni TS, Lunardi S, Al-Assar O, et al. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through  $\beta 1$ -integrin signaling[J]. Cancer Res, 2011, 71(10): 3453-3458.

[2] Wu HQ, Wang B, Zhu SK, et al. Effects of CPG ODN on biological behavior of PANC-1 and expression of TLR9 in pancreatic cancer[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(8): 996-1003.

[3] Shankar S, Marsh L, Srivastava RK. EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C nude mice through modulation of FKHL1/FOXO3a and neuropilin [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 372(1/2): 83-94. (下转第 2173 页)

芽水提取物可使小鼠心脏组织 SOD 活性明显提高,高剂量的无果枸杞芽水提取物可明显降低小鼠心脏组织 MDA 水平,提示低剂量的无果枸杞芽水提取物其抗氧化能力相对较弱,不能完全清除自由基抵损伤的作用;中、高剂量的无果枸杞芽水提取物其抗氧化成分含量较高,可显著提高衰老小鼠 SOD 活性,发挥其抗氧化能力,SOD 不断清除心肌组织中的自由基,减少脂质过氧化,降低氧自由基对心肌组织造成的损害,保证心肌组织代谢平衡,维持其功能正常,发挥抗氧化、抗衰老作用。

本研究应用不同剂量的无果枸杞芽水提取物干预后,通过免疫组织化学方法和 Western-blot 技术观察到衰老心肌细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达变化,结果表明中、高剂量的无果枸杞芽水提取物可增加衰老心肌细胞 Bcl-2 蛋白的表达,降低 Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达。而且免疫组化和 Western-blot 检测结果一致,实验结果亦表明中、高剂量的无果枸杞芽水提取物使 Bcl-2/Bax 比值增加,提示无果枸杞芽水提取物可改变 Bcl-2 蛋白家族 Bcl-2 家族成员的表达,减少心肌细胞的凋亡。

因此,无果枸杞芽水提取物抗心肌细胞凋亡机制可能与提高衰老小鼠心脏组织 SOD 活性,降低 MDA 水平,提高机体抗氧化能力,减少了氧自由基在体内的堆积对心肌组织造成的损害,同时无果枸杞芽水提取物上调抗凋亡蛋白 Bcl-2,下调促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 蛋白的表达,提高 Bcl-2/Bax 比值有关,发挥抗心肌细胞凋亡的作用。有关无果枸杞芽水提取物中的哪种或哪些成分发挥了作用需要进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Mallat Z, Fornes P, Costagliola R, et al. Age and gender effects on cardiomyocyte apoptosis in the normal human heart[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2001, 56(11): 719-723.
- [2] Lakatta EG. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age[J]. *Physiol Rev*, 1993, 73(2): 413-467.
- [3] 陈海军,王慧茹,张莲香,等.宁夏无果枸杞芽水提取物对慢性温和不可预见性应激小鼠学习记忆的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2014, 30(2): 211-216.
- [4] 张莲香,陈海军,胡嘉航,等.宁夏无果枸杞芽提取物对自然衰老小鼠 SOD、MDA 及 NCAM 的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2012, 34(12): 1265-1268.

- [5] 中华医学会.法定计量单位在医学上的应用[M].3版.北京:人民军医出版社,2001.
- [6] Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling[J]. *Nature*, 2002, 415(6868): 240-243.
- [7] Warner HR, Hodes RJ, Pocinski K. What does cell death have to do with aging? [J]. *J Am Geriatr Soc*, 1997, 45(9): 1140-1146.
- [8] Dorn GW. Mechanisms of non-apoptotic programmed cell death in diabetes and heart failure[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(17): 3442-3448.
- [9] Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(2): 247-261.
- [10] Nitahara JA, Cheng W, Liu Y, et al. Intracellular Calcium, DNase activity and myocyte apoptosis in aging Fischer 344 rats[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30(3): 519-535.
- [11] 王瑾,王晓樑,白克华,等.心肌细胞凋亡对老年大鼠心脏功能的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2013, 44(10): 758-762.
- [12] 王莉,魏智清.宁夏枸杞芽水提取物增强小鼠抗疲劳抗缺氧能力研究[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(3): 583-584.
- [13] Shi XY. The antioxidation and mechanism of tea polyphenols[J]. *Foreign Med Sci; SecPharm*, 1998, 25(4): 196-198.
- [14] Chen X, Lu Y, Li QS, et al. The protective effect of EGCG on Hydrogen peroxide induced SH-SY5Y cell injury[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, 27(3): 320-324.
- [15] 龚太平,纪晓萍.传统中医抗衰老中药的微量元素分析[J]. *微量元素与健康研究*, 2002, 19(3): 32-33.
- [16] Ostrakhovitch LA, Lordnejad MR, Schliess F, et al. Copper ions strongly activate the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway independent strongly of the generation of reactive oxygen species[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 397(2): 232-239.
- [17] 李保玉,金毅,王景华,等. ET-NO 系统与心肌胶原代谢的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 1999, 15(1): 57-59.

(收稿日期:2017-01-20 修回日期:2017-03-24)

(上接第 2169 页)

- [4] Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, et al. Assessment of tumor cells in a mouse model of diffuse infiltrative glioma by Raman spectroscopy[J]. *Biomed Res Int*, 2014(2): 860241.
- [5] Philips P, Li Y, Martin RC. Low-energy DC current ablation in a mouse tumor model[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1121(1121): 257-265.
- [6] Lepage C, Capocaccia R, Hackl M, et al. Survival in patients with primary liver cancer, gallbladder and extrahepatic biliary tract cancer and pancreatic cancer in Europe 1999-2007; results of EURO-CARE-5[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(51): 2169-2178.
- [7] 卢旷逸,范昕,马小艳,等. TLR9 激动剂在胰腺星状细胞介导的胰腺癌耐药中的作用[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2012, 22(3): 223-226.

- [8] 孙运良,徐灿,苏长青,等.靶向重组腺病毒介导 Hsp70 基因表达对大鼠胰腺癌移植瘤的抑制作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(1): 15-21.
- [9] Wu HQ, Wang B, Zhu SK, et al. Effects of CPG ODN on biological behavior of PANC-1 and expression of TLR9 in pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(8): 996-1003.
- [10] Zambirinis CP, Levie E, Nguy S, et al. TLR9 ligation in pancreatic stellate cells promotes tumorigenesis[J]. *J Exp Med*, 2015, 212(12): 2077-2094.
- [11] Bruckner H. Phase I and II studies of intravenous Regin-G as monotherapy for stage IV b gemcitabine-resistant pancreatic cancer[J]. *Br J Surg*, 2014, 63(2): 162-165.

(收稿日期:2017-01-14 修回日期:2017-03-18)