

罗丹明123分离肝癌细胞系HepG2异质性亚群的鉴定

千年松, 李 韧, 于衡超, 曹云新, 张福琴, 窦科峰

千年松, 李韧, 于衡超, 张福琴, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710033
曹云新, 中国人民解放军第四军医大学基础医学部免疫学教研室 陕西省西安市 710032

千年松, 2005年中国人民解放军第四军医大学本科, 主要从事肝脏肿瘤的基础研究。

作者贡献分布: 千年松与窦科峰对此文所作贡献均等; 此课题由千年松, 李韧, 于衡超, 曹云新, 张福琴及窦科峰设计; 研究过程由千年松, 李韧, 于衡超, 曹云新及张福琴操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹云新提供; 数据分析由千年松, 李 韧, 于衡超完成; 本论文写作由千年松, 李韧, 于衡超完成。

通讯作者: 窦科峰, 710033, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科。doulkf@fmmu.edu.cn

电话: 029-84771094

收稿日期: 2007-08-23 修回日期: 2008-02-28

Isolation and identification of heterogenic subpopulation from the HepG2 cell line by Rhodamine123 extrusion assay

Nian-Song Qian, Ren Li, Heng-Chao Yu, Yun-Xin Cao, Fu-Qin Zhang, Ke-Feng Dou

Nian-Song Qian, Ren Li, Heng-Chao Yu, Fu-Qin Zhang, Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China
Yun-Xin Cao, Department of Immunology, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Dr. Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China. doulkf@fmmu.edu.cn

Received: 2007-08-23 Revised: 2008-02-28

Abstract

AIM: To establish a method to separate the different subpopulations of HepG2 cell line according to the ability of these cells to extrude the Rho123 dye.

METHODS: Using flow cytometry (FCM) in combination with different binding concentrations of Rho123 to analyze and sort subpopulations according to the ability of these cells to extrude the Rho123 dye. Viable cell count, soft agar cloning method, immunocytochemical staining and tumorigenicity investigation were performed to show the heterogeneity in Rho^{low} and Rho^{high} cells.

RESULTS: Rho^{low} cells and Rho^{high} cells were

separated using FACS analysis according to the ability of these cells to extrude the Rho123 dye. Growth rate, soft agar cloning(50% vs 20%), expression of alpha-fetoproteins (AFP) (31/32 vs 20/26, $P < 0.01$) and tumorigenicity investigation (7/10 vs 1/10) were significantly increased in Rho123^{low} compared with those in Rho123^{high} subpopulation.

CONCLUSION: Subpopulations with stem cell properties of the HepG2 cell line can be enriched by Rho123/FCM, indicating that hepatocellular carcinoma is heterogeneous.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Rho123; Heterogeneity; Tumor stem cells; Flow cytometry

Qian NS, Li R, Yu HC, Cao YX, Zhang FQ, Dou KF. Isolation and identification of heterogenic subpopulation from the HepG2 cell line by Rhodamine123 extrusion assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(9): 941-945

摘要

目的: 建立分离肝癌细胞系HepG2中对罗丹明123(Rho123)染料具有不同排斥能力细胞亚群的方法, 并探讨其在肝癌异质性研究中的意义。

方法: 利用流式细胞分选术(FCM)并结合不同浓度的Rho123染料, 分析和分选肝癌细胞系HepG2细胞中具有不同染料排斥能力的肝癌细胞亚群, 再通过细胞生长的测定、软琼脂克隆形成以及免疫组织化学检测和裸鼠成瘤实验等方法, 以比较不同肝癌细胞亚群的差异。

结果: 根据不同染料排斥能力可以将肝癌细胞系HepG2细胞分为Rho^{low}和Rho^{high}2个亚群, 2个亚群在倍增时间(16.9 h vs 24.7 h)、最大增生倍数(15.2 vs 12.3)、克隆形成率(50% vs 20%)以及甲胎蛋白(AFP)的表达(31/32 vs 20/26)以及裸鼠成瘤实验(7/10 vs 1/10)上具有显著性差异(均 $P < 0.01$), Rho^{low}亚群是具有干细胞特性的。

结论: Rho123结合FCM可以富集具有干细胞特性的Rho^{low}亚群, 同时进一步证实肝癌的异质性。

■背景资料

恶性肿瘤虽然大多数是单克隆增殖而来, 但随着肿瘤的不断演进常常在中晚期出现形态学、生长特性、侵袭性、转移能力以及对放疗和化疗敏感性等方面不尽相同的细胞亚株, 而这种异质性的特点正是恶性肿瘤容易复发转移及产生耐药性的根本原因。HepG2细胞是一种常用的人肝癌细胞系, 他是Aden于1979年从一阿根廷男孩的原代肝胚细胞瘤中分离出的。他的形态类似于人的正常肝实质细胞, 能合成和分泌具有人正常肝实质细胞特征的质粒蛋白。

■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

■相关报道

Minamiguchi *et al* 认为, Rho123^{low}亚群高度富集了原始的造血干细胞, 而且推测人类长期保持增生能力的细胞应该是具有染料外排特性。

关键词: 肝细胞癌; 异质性; 罗丹明123; 肿瘤干细胞; 流式细胞分选术

千年松, 李韧, 于衡超, 曹云新, 张福琴, 窦科峰. 罗丹明123分离肝癌细胞系HepG2异质性亚群的鉴定. 世界华人消化杂志 2008; 16(9): 941-945

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/941.asp>

0 引言

恶性肿瘤虽然大多数是单克隆增殖而来, 但随着肿瘤的不断演进常常在中晚期出现形态学、生长特性、侵袭性、转移能力以及对放疗和化疗敏感性等方面不尽相同的细胞亚株, 而这种异质性的特点正是恶性肿瘤容易复发转移及产生耐药性的根本原因^[1]. 瘤细胞异质性及其所导致的肿瘤细胞的生物学行为的改变, 对了解肿瘤细胞的生物学特性和指导临床有重要意义. 近年来, 利用流式细胞术(flow cytometry, FCM)可以获得组织中具有原始干细胞特征的成体细胞, 利用类似的方法可以将肝癌细胞分成两个不同特性的亚群, 从而获得具有原始干细胞特性的成体细胞. 我们应用罗丹明123(Rho123)结合FCM对肝癌细胞系HepG2细胞系分选为Rho^{low}及Rho^{high}亚群, 对2亚群进行差异性比较, 探讨Rho123/FCM是否可以富集具有干细胞特性的肝癌细胞亚群和揭示肝癌的异质性.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2肝癌细胞由中国人民解放军第四军医大学病理学教研室提供. ♂裸鼠(Balb/C-nu/nu)20只, 4-6 wk龄, 体质量10-19 g, 由中国人民解放军第四军医大学动物实验中心提供. DMEM培养基、2.5 g/L胰酶为Gibco公司产品; 小牛血清为四季青公司产品; Rho123、琼脂粉为Sigma公司产品; 小鼠抗人AFP mAb, 羊抗小鼠IgG二抗免疫组化及DAB显色试剂盒为北京中杉产品; FACS Aria流式细胞分选仪为美国BD公司产品; BX-51免疫荧光显微镜及DP-70数字图像摄影系统为Olympus公司产品.

1.2 方法 HepG2细胞常规消化, HBSS洗涤, 制备成单细胞悬液, 细胞密度为 1×10^6 /L. 等分细胞悬液, 2组均加入荧光染料Rho123, 根据我们对MHCC97细胞系Rho123染色浓度选择终浓度为0.05 mg/L, 其中1组再加入维拉帕米, 终浓度50 mmol/L. 37℃避光水浴30 min, 冰上5 min终止染色, 冰预冷HBSS洗涤细胞并重悬. 激发光源480 nm FCM分选, 对数模式采集信号做一维散点图,

将低Rho123且维拉帕米组缺失的区域设定为Rho^{low}亚群的“门”, 计算百分比, 分选出Rho^{low}及Rho^{high}亚群.

1.2.1 细胞生长的测定: 参考颜政 *et al*^[12]方法, 将Rho^{low}及Rho^{high}亚群消化后, 调整至 3×10^7 /L的细胞密度, 以1 mL/孔分别接种于3 cm的培养皿中, 2 d换液, 连续培养7 d, 每日各取3个计数, 取平均值作为结果. 设3个平行孔, 实验重复3次, 计算平均值.

1.2.2 软琼脂克隆形成实验: 将Rho^{low}及Rho^{high}亚群密度调整至 1×10^7 /L, 按1:1混合12 g/L琼脂糖和2×DMEM(含200 mL/L小牛血清), 备底层琼脂1:1混合7 g/L琼脂糖和2×DMEM, 加入细胞悬液40 μL, 制备上层琼脂. 培养10-14 d, 计数克隆形成数.

1.2.3 甲胎蛋白(AFP)免疫细胞化学分析: 采用SP方法. 操作步骤参照SP试剂盒说明. 一抗AFP mAb, 工作浓度1:100, DAB显色, 苏木精复染. 以PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照. 胞质出现棕黄色颗粒定为阳性. 根据阳性细胞百分率分为: 阳性细胞<10%为(-), 阳性细胞10%-25%为(+), 26%-50%为(++), >50%为(+++).

1.2.4 裸鼠成瘤实验: 将分选得到Rho^{low}及Rho^{high}亚群用无菌技术接种至裸鼠右侧背部皮下, 每组肝癌细胞的接种细胞总数均为 2×10^4 个, 每隔3 d观察皮下肿瘤的生长情况.

统计学处理 用SPSS10.0统计软件包分析, 采用One-way ANOVA均数检验和非参Mann-Whitney两独立样本秩和检验.

2 结果

2.1 Rho^{low}及Rho^{high}亚群的分选 HepG2肝癌细胞大小、形态、细胞质均一性一致, 无PI染色细胞, 无杂细胞干扰. 单纯加入0.05 mg/L Rho123组有一低荧光拖尾, 而维拉帕米拮抗组无此区域(图1), 即Rho^{low}亚群, 占总数的1.6%, 其余为Rho^{high}亚群.

2.2 Rho^{low}及Rho^{high}亚群的生长曲线 Rho123^{low}细胞比Rho123^{high}细胞具有更旺盛的增殖能力, 前者倍增时间16.9 h, 后者24.7 h; 前者最大增生倍数15.2, 后者最大增生倍数为12.3(图2).

2.3 软琼脂克隆形成率 Rho^{low}亚群在软琼脂培养基中培养1 wk后, 大部分肝癌细胞形成了明显的细胞克隆, 克隆形成率达到了50%; 而Rho^{high}亚群的克隆形成率仅为20%(图3).

2.4 AFP免疫细胞化学分析 2组细胞内均有AFP

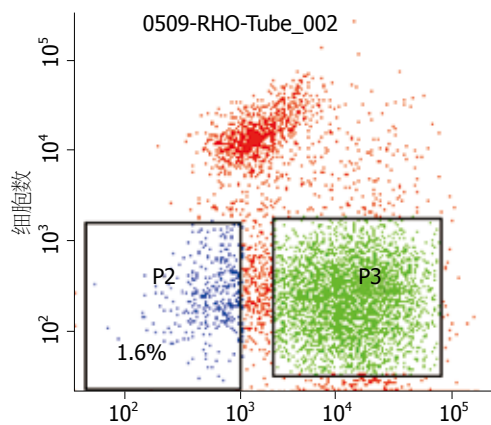


图 1 Rho^{low}及Rho^{high}细胞FCM分选的散点图.

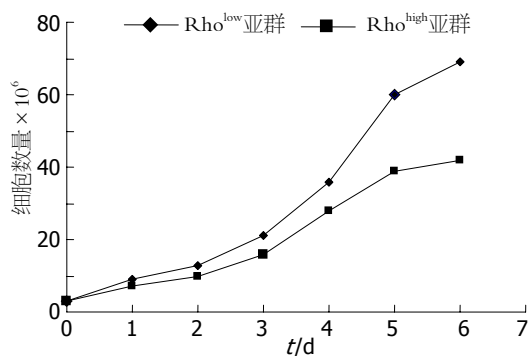


图 2 HepG2肝癌细胞亚群的生长曲线.

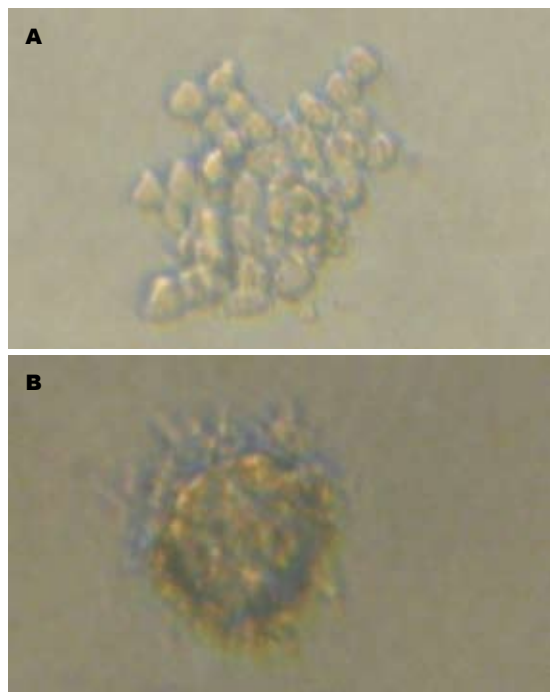


图 3 HepG2肝癌细胞亚群软琼脂克隆形成实验. A: Rho^{low}亚群; B: Rho^{high}亚群.

的阳性表达, 阳性反应为显示位于细胞质的棕黄色颗粒, 且阳性细胞主要集中在Rho^{low}亚群, 两者比较有统计学差异(图4, 表1).

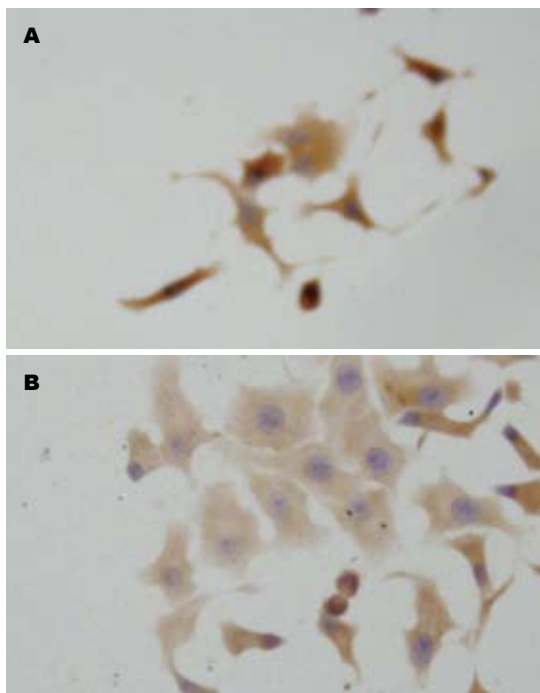


图 4 HepG2肝癌细胞亚群AFP的表达(SP × 200). A: Rho^{low}亚群; B: Rho^{high}亚群.

表 1 HepG2肝癌细胞亚群AFP的表达

细胞亚群	<i>n</i>	-	+	++	+++
Rho ^{low}	32	1	5	19	7 ^b
Rho ^{high}	26	6	13	3	4

$U = 212$, ^b $P < 0.01$ vs Rho^{high}.

2.5 裸鼠成瘤实验 接种Rho^{low}亚群的裸鼠1 mo后在皮下形成明显的种植瘤, 成瘤率为70%(7/10); 而接种了Rho^{high}亚群的裸鼠未见明显成瘤(1/10)(图5).

3 讨论

肿瘤干细胞表现为一种特殊类型的干细胞, 他起源于相对应的成体干细胞. Bonnet *et al*^[1]将肿瘤干细胞定义为: 能分化出不同表型的, 并能自我克隆产生子代致瘤性细胞的肿瘤细胞. 在肿瘤组织中, 这些具有很强肿瘤形成能力的细胞叫肿瘤干细胞^[2], 而那些肿瘤形成能力差或完全失去肿瘤形成能力的细胞则是后者不同程度分化的产物. 人急性髓性白血病干细胞是人恶性肿瘤干细胞的首次报道^[3-5], 直到近几年来人们又开始关注人实体瘤中癌干细胞是否存在的问题^[6]. 随后一些实体肿瘤中, 包括乳腺癌^[7-8]、胰腺癌^[9-10]、肝癌^[11-12]、前列腺癌^[13-14]和脑肿瘤^[15-16]中已发现了肿瘤干细胞. 虽然这种细胞的

■创新盘点

利用流式细胞分选术(FCM)并结合不同浓度的Rho123染料, 分析和分选肝癌细胞系HepG2细胞中具有不同染料排斥能力的肝癌细胞亚群, 以比较不同肝癌细胞亚群的差异.

■应用要点

Rho123结合FCM可以富集具有干细胞特性的 Rho^{low} 亚群, 同时进一步证实肝癌的异质性.

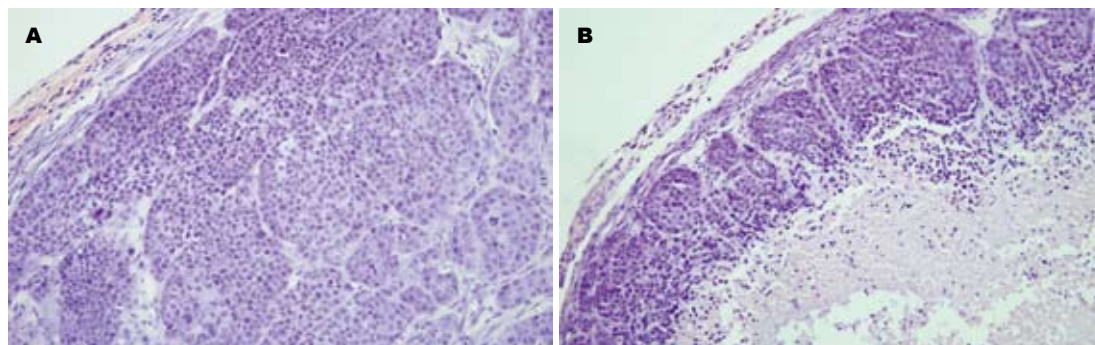


图5 裸鼠HE染色成瘤实验(HE $\times 100$). A: Rho^{low} 亚群; B: Rho^{high} 亚群.

数量极少, 但能够瘤性克隆生长, 从而产生不同表型的癌细胞亚群. 他具有无限的增殖能力和分化潜能, 是肿瘤形成的起始细胞. 他能够通过分裂产生大量的增殖能力有限的其他肿瘤细胞以及增加自身细胞的数量, 所以, 他在肿瘤的发生、恶化、转移中起重要作用^[17]. 肝脏干细胞来源于前肠内胚层, 是肝前体细胞, 在体内可分化为肝实质细胞或胆管上皮细胞^[18]. 肝细胞癌是世界上男性最常见的恶性肿瘤之一, 起病隐匿、发展迅速、恶性程度高, 手术治疗仍然是目前主要的治疗方法, 但术后5年复发率可高达60%. 要从根本上阻止或逆转肝癌的发生, 并寻找新的治疗方法, 就需要从肝癌的细胞学起源方面进行探索.

干细胞在Hochst 33342或Rho123染色时能将该染料泵出, 应用FCM不能被该染料染色的细胞群即是干细胞, 可在众多肿瘤细胞中区分出肿瘤干细胞^[19-20]. Taniguchi *et al*^[21]基于上述细胞标志用FCM成功地对胚胎肝脏干细胞进行了分离培养, 分离的胚胎肝脏干细胞向同系动物肝脏移植可以分化成肝细胞和胆管上皮细胞, 表明胚胎肝脏干细胞的确具有多向分化潜能. Rho123/FCM的基本原理是利用了干细胞对染料具有排斥性这一特异性功能标志, 干细胞能通过细胞表面的P糖蛋白将进入胞内的Rho123主动外泵至胞外, 表现为低荧光的特征, 可分选为 Rho^{low} 和 Rho^{high} 两个亚群^[22], 而且多药抵抗的现象一般伴随P糖蛋白的过度表达. Lo *et al*^[23]用Rho123/FCM成功富集了大鼠精原细胞, 认为Rho123/FCM相对Hoechst/FACS(荧光激活的流式细胞分选法)在分离精原细胞上是有优势的. Minamiguchi *et al*^[24]认为, $\text{Rho}123^{\text{low}}$ 亚群高度富集了原始的造血干细胞, 而且推测人类长期保持增生能力的细胞应该是具有染料外排特性.

HepG2细胞是一种常用的人肝癌细胞系, 他是Aden于1979年从一个阿根廷男孩的原代肝胚细胞瘤中分离出的. 他的形态类似于人的正常肝实质细胞, 能合成和分泌具有人正常肝实质细胞特征的质粒蛋白. 作为一种常用的细胞系HepG2被用于多项研究中. 我们成功地利用了Rho123/FCM将培养的HepG2肝癌细胞系根据对Rho123染料外排能力不同分选为 Rho^{low} 和 Rho^{high} 2个亚群. 比较2个亚群, 发现2者的生物学性状有诸多差异, 存在明显的异质性. Rho^{low} 比 Rho^{high} 亚群具有更短的群体倍增时间和更高的增殖倍数. 软琼脂克隆形成实验是测定单个细胞增殖能力的有效方法, Rho^{low} 亚群在软琼脂培养基中培养3 wk后, 大部分肝癌细胞形成了明显的细胞克隆, 克隆形成率达到了50%; 而 Rho^{high} 亚群在软琼脂培养基中未能形成明显的细胞克隆, 克隆形成率仅为20%, 说明 Rho^{low} 相对 Rho^{high} 亚群具有更强的增值能力. 癌症干细胞起源学说认为癌症干细胞虽然数目很少, 但能构瘤性克隆生长, 从而产生不同表型的癌细胞亚群^[25]. AFP属胚胎类抗原, 作为一种胚胎时期或病理状态的基因表达产物, 他伴随着胚胎发育和细胞分裂旺盛的过程. 肝癌细胞分化程度越低, 原始性程度越高, 合成的AFP越多, AFP表达水平从一定程度上可判断肝癌细胞的分化程度^[26-30]. 在癌的生物学特性中, 作为恶性肿瘤的重要标志的成瘤能力最为关键. 实验证实 Rho^{low} 和 Rho^{high} 2个亚群的成瘤能力存在明显差异, 证明两亚群细胞的成瘤能力的异质性. 有理论认为^[6], 这也许是由于不同潜能的肿瘤细胞亚群与宿主组织或是细胞之间相互作用, 不断消长和选择组织过程中使最具有成瘤能力的细胞竞争性存活和发展的结果. 肿瘤干细胞的不对称分裂, 分裂后形成2个不对称细胞的机制才可能是肿瘤异质性的根本原因. Rho^{low} 亚群具有较强的增值和成瘤能力. 以上结果说明 Rho^{low} 亚群具有

基本的肿瘤干细胞特性. 利用Rho123/FCM分离出具有干细胞特性Rho^{low}亚群是可行的, 仍需要在表面标志的鉴定筛选等方面做进一步工作.

利用Rho123分离出的Rho^{low}和Rho^{high}2个亚群在生长曲线、增值能力、表面标志表达和成瘤能力方面存在异质性, 表明Rho^{low}亚群是有干细胞特性的, 利用荧光激活的流式细胞分选技术并结合Rho123染料在肝癌HepG2细胞系中分离出具有干细胞特性的细胞亚群是可行的, 同时表明肝癌HepG2细胞系也并非由统一的细胞组成, 其中实际还存在肝细胞生物学行为的亚系, 其异质性可能产生于干细胞的分化.

4 参考文献

- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005; 65: 3035-3039
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110
- Ayton PM, Cleary ML. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* 2001; 20: 5695-5707
- Jordan CT. Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 708-712
- Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004; 23: 7267-7273
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-3988
- Gonzalez-Sarmiento R, Perez-Losada J. Breast cancer, a stem cell disease. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008; 3: 55-65
- Yasuda A, Sawai H, Takahashi H, Ochi N, Matsuo Y, Funahashi H, Sato M, Okada Y, Takeyama H, Manabe T. The stem cell factor/c-kit receptor pathway enhances proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 2006; 5: 46
- Missiaglia E, Blaveri E, Terris B, Wang YH, Costello E, Neoptolemos JP, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR. Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidate markers for pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Int J Cancer* 2004; 112: 100-112
- 颜政, 方驰华. 人肝细胞癌细胞亚群的克隆分离及异质性机制的初步研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 481-485
- Potter JD. Morphostats: a missing concept in cancer biology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 161-170
- Ten Have-Opbroek AA, Benfield JR, Hammond WG, Dijkman JH. Alveolar stem cells in canine bronchial carcinogenesis. *Cancer Lett* 1996; 101: 211-217
- Jordan CT. Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 708-712
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 5821-5828
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401
- Potter JD. Morphostats: a missing concept in cancer biology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 161-170
- 陈铁军, 方驰华, 朱明德. 利用大鼠Y染色体特异性PCR技术检测卵圆细胞源性肝癌细胞. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 563-567
- Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3701-3710
- Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- Taniguchi H, Kondo R, Suzuki A, Zheng YW, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M, Fukao K, Nakauchi H. Clonogenic colony-forming ability of flow cytometrically isolated hepatic progenitor cells in the murine fetal liver. *Cell Transplant* 2000; 9: 697-700
- Wang Y, Hao D, Stein WD, Yang L. A kinetic study of Rhodamine123 pumping by P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1671-1676
- Lo KC, Brugh VM 3rd, Parker M, Lamb DJ. Isolation and enrichment of murine spermatogonial stem cells using rhodamine 123 mitochondrial dye. *Biol Reprod* 2005; 72: 767-771
- Minamiguchi H, Wingard JR, Laver JH, Mainali ES, Shultz LD, Ogawa M. An assay for human hematopoietic stem cells based on transplantation into nonobese diabetic recombination activating gene-null perforin-null mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 487-494
- 王锡山, 刘彦龙, 杨艳梅. 大肠癌细胞系Lovo中亚群(SP)细胞的分离培养和鉴定. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 953-959
- 张宁, 窦科峰, 李韧, 樊菁, 张福琴. 肝癌细胞系MHCC97亚群中甲胎蛋白的表达差异. *第四军医大学学报* 2006; 27: 1799-1801
- Ohguchi S, Nakatsukasa H, Higashi T, Ashida K, Nouse K, Ishizaki M, Hino N, Kobayashi Y, Uematsu S, Tsuji T. Expression of alpha-fetoprotein and albumin genes in human hepatocellular carcinomas: limitations in the application of the genes for targeting human hepatocellular carcinoma in gene therapy. *Hepatology* 1998; 27: 599-607
- Niwa Y, Matsumura M, Shiratori Y, Imamura M, Kato N, Shiina S, Okudaira T, Ikeda Y, Inoue T, Omata M. Quantitation of alpha-fetoprotein and albumin messenger RNA in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 23: 1384-1392
- Zhang XL, Shi JQ, Zuo SH. A comparative study of the expression of ras oncogenic protein P21 and oncofetal protein AFP, CEA in human hepatocellular carcinoma (HCC). *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 1994; 23: 155-158
- Tsutsumi T, Ido A, Nakao K, Hamasaki K, Kato Y, Ohtsuru A, Nakata K, Tamaoki T, Nagataki S. Reciprocal regulation of alpha-fetoprotein and albumin gene expression by butyrate in human hepatoma cells. *Gastroenterology* 1994; 107: 499-504

■同行评价

本文实验方法可靠, 结果可信, 书写规范, 对进一步研究肝癌疗效的影响因素有一定的指导作用.