

基于去唾液酸糖蛋白受体的循环肝癌细胞磁性分选检测法及其改良

余锋, 陈磊, 徐文, 曹璐, 张妤, 施乐华, 殷正丰

■背景资料

肿瘤转移是一个多阶段、多步骤的复杂过程。存在于原发瘤和转移瘤之外的肿瘤细胞统称为游离肿瘤细胞(ITCs)。其中进入血液的又称循环肿瘤细胞(CTCs)。目前CTCs的临床意义在乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等多种肿瘤中逐渐得到肯定。

余锋, 陈磊, 徐文, 曹璐, 张妤, 施乐华, 殷正丰, 上海第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室 上海市 200438
余锋, 中国人民解放军第101中心医院肝胆外科 江苏省无锡市 214044

余锋, 主治医师, 主要从事肝胆疾病的外科治疗。

国家863基金资助项目, No. 2007AA02Z461

国家科技重大专项基金资助项目, No. 2012ZX10002021

作者贡献分布: 此课题由余锋、施乐华及殷正丰设计; 研究过程由陈磊、徐文、曹璐及张妤操作完成; 研究所用试剂与实验材料由殷正丰提供; 数据分析由余锋完成; 本论文写作由余锋与殷正丰共同完成。

通讯作者: 殷正丰, 教授, 200438, 上海市杨浦区长海路225号, 上海第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室。

yinzfk@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-01-22 修回日期: 2013-02-18

接受日期: 2013-03-15 在线出版日期: 2013-04-08

Detection of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using an improved asialoglycoprotein receptor-based separation method

Feng Yu, Lei Chen, Wen Xu, Lu Cao, Yu Zhang, Le-Hua Shi, Zheng-Feng Yin

Feng Yu, Lei Chen, Wen Xu, Lu Cao, Yu Zhang, Le-Hua Shi, Zheng-Feng Yin, Laboratory of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

Feng Yu, Department of Hepatobiliary Surgery, the 101st Hospital of Chinese People's Liberation Army, Wuxi 214044, Jiangsu Province, China

Supported by: National High-Tech Research and Development Program of China, No. 2007AA02Z461; China National Key Projects, No. 2012ZX10002021

Correspondence to: Zheng-Feng Yin, Professor, Laboratory of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University, 225 Changhai Road, Yangpu District, Shanghai 200438, China. yinzfk@yahoo.com.cn

Received: 2013-01-22 Revised: 2013-02-18

Accepted: 2013-03-15 Published online: 2013-04-08

Abstract

AIM: To introduce a novel magnetic cell separation system which allows for immunomorphological identification and enumeration of circulating tumor cells (CTCs) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: The asialoglycoprotein receptor (ASGPR) is a transmembrane protein expressed exclusively on the surface of hepatocytes. We have recently developed a sensitive and specific system mediated by the interaction of the ASGPR with its ligand to magnetically separate CTCs in HCC patients. In the system, HCC cells were bound by biotinylated asialofetuin, an ASGPR ligand, and subsequently labeled by anti-biotin antibody-coated magnetic beads, followed by magnetic separation. The separated HCC cells were then identified by immunofluorescence staining using the hepatocyte-specific antibody Hep Par 1. In this study, we used EDTA instead of heparin for anticoagulation because heparin could cause the presence of gels in cell suspension, which affected the passage of cells through the separation column and reduced the separation efficiency. The recovery, specificity and sensitivity of the HCC CTC separation and detection system were determined by performing Hep3B cell spiking experiments.

RESULTS: Calcium chelating agent EDTA was used for anticoagulation instead of heparin in some steps of the original method and gel phenomenon no longer appeared in the cell suspension. The cell spiking experiments showed that when there were 10, 30, 90, 270 and 810 Hep3B cells spiked into five milliliters of peripheral blood from healthy volunteers, the average recovery was $\geq 70\%$ at each spiking level and the recovery of the modified method was higher than that of the original method ($P < 0.05$).

CONCLUSION: We have developed a new tool that allows for highly sensitive and specific separation and detection of CTCs in HCC patients. It may be clinically useful for diagnosis and monitoring of HCC. The cell spiking experiments showed that the recovery of the modified method was higher than that of the original method.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Circulating tumor cells; Asialoglycoprotein receptor; Hepatocellular carcinoma

■同行评议者

斯坎德尔·白克力, 教授, 新疆医科大学基础医学院生物化学教研室

Yu F, Chen L, Xu W, Cao L, Zhang Y, Shi LH, Yin ZF. Detection of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using an improved asialoglycoprotein receptor-based separation method. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(10): 858-864 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/858.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i10.858>

摘要

目的: 介绍一种肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)富集和检测系统, 并对该系统进行改良, 以提高循环肿瘤细胞的检出率。

方法: 去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)是一种特异表达于肝实质细胞膜的跨膜蛋白。我们建立了一种基于ASGPR的磁性分选和Hep par 1免疫鉴定的循环肝癌细胞富集和计数系统。首先以生物素化去唾液酸胎球蛋白作为配体与肝癌细胞结合, 然后用抗生物素抗体磁珠进行间接磁性标记, 从而磁性捕获循环肝癌细胞, 接着用Hep par 1进行免疫荧光染色鉴定, 并对阳性细胞进行计数。文献报道和实际操作中发现, 检测过程中采用肝素抗凝会引起细胞悬液中出现凝胶, 影响细胞通过分离柱, 降低分离效率。我们将部分步骤改用乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)替代肝素抗凝, 采用Hep3B肝癌细胞掺入试验对两种方法回收情况进行比较。

结果: 部分步骤改用EDTA抗凝后, 细胞悬液中未出现凝胶现象。细胞掺入试验显示, 5 mL健康志愿者外周血中分别掺入10、30、90、270和810个Hep3B细胞, 在每个掺入水平, 改良法Hep3B细胞的平均回收率均 $\geq 70\%$, 回收效率明显增加($P < 0.05$)。

结论: 基于ASGPR的循环肝癌细胞富集和计数系统是一种具有临床应用潜能的循环肝癌细胞检测方法。经改良后能够有效消除细胞悬液中凝胶形成的现象, 肝癌细胞回收效率较原检测法明显提高。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 循环肿瘤细胞; 去唾液酸糖蛋白受体; 肝细胞癌

核心提示: 介绍并改良一种基于肝细胞膜表面去唾液酸糖蛋白受体的循环肝癌细胞富集和检测系统。改良系统具有高度的敏感性和特异性。该系统有望在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的早期诊断、预测转移复发、疗效监测以及筛选HCC肝移植受者等方面得到临床应用。并

有可能成为一个重要的技术平台, 推动HCC临床应用研究和基础研究的进步。

余锋, 陈磊, 徐文, 曹璐, 张好, 施乐华, 殷正丰. 基于去唾液酸糖蛋白受体的循环肝癌细胞磁性分选检测法及其改良. *世界华人消化杂志* 2013; 21(10): 858-864 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/858.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i10.858>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者体内的循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs), 即循环肝癌细胞, 是HCC转移和复发的根源。检测循环肝癌细胞对于预测HCC转移复发具有重要临床意义^[1]。目前分离CTCs的标准方法是基于肿瘤细胞表面上皮性抗原的磁性激活细胞分选技术(magnetic-activated cell separation, MACS)^[2]。由于缺乏针对肝癌细胞表面特异性抗原的单克隆抗体, 迄今少见MACS用于分离循环肝癌细胞的报道。基于上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)抗体磁珠的CellSearch系统已被美国FDA批准用于检测乳腺癌、结肠癌和前列腺癌CTCs^[3]。尽管肝癌细胞属于上皮性细胞, 但EpCAM仅在约35%左右的HCC组织标本中表达^[4-6]。因此, CellSearch系统并不适合用于分离、检测循环肝癌细胞。

去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)是一种特异表达于肝实质细胞膜的跨膜蛋白, 能结合和内吞以半乳糖基和N-乙酰半乳糖胺基为端基的分子^[7]。这一特性已被用于设计多种实验研究。比如, 利用放射性核素标记这样的糖蛋白, 选择性地与肝细胞膜上的ASGPR相结合, 可以进行肝显像^[8,9]; 而以这样的糖蛋白为载体将抗肿瘤药物、降胆固醇药物甚至治疗基因导向肝实质细胞, 则是药物肝靶向递送的一个重要研究命题^[10,11]。近期我们报道一种基于ASGPR的磁性分选和肝细胞特异性抗体Hep par 1免疫鉴定的循环肝癌细胞富集和计数系统^[12], 即以生物素化去唾液酸胎球蛋白作为配体与肝癌细胞结合, 然后用抗生物素抗体磁珠进行间接磁性标记, 从而磁性捕获循环肝癌细胞, 接着用Hep par 1进行免疫荧光染色鉴定, 并对阳性细胞进行计数。由于肝细胞通常不会脱落进入血循环, 除非演变成肿瘤细胞, 因此检测到的细胞即为循环肝癌细胞。该系统解决了以前所报道方法的固有问题, 敏感性

■ 研发前沿

现有的CTCs分离、检测技术方法较多, 美国Veridex公司研发的专有技术CellSearch™ System可自动分选从上皮性肿瘤上脱落进入血液中的肿瘤细胞, 该技术已经FDA批准应用于预测转移性乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌的无进展生存时间和总存活时间。

■相关报道

近年来分子生物学技术的发展,使分离和计数外周血中的CTCs成为可能。CTCs可能是原发肿瘤基因和表型特征的最好的代表。对外周血中的CTCs进行分离和鉴定可能适用于各种肿瘤的诊断,而且,CTCs可能将用于干预治疗决策的制定,并且可以作为分子靶向应用的靶标。

高,特异性好。临床病例检测结果显示,HCC患者CTCs阳性率和数目均与HCC进展程度成显著正相关。

该检测系统全程采用肝素抗凝,但文献报道和实际操作中发现,Ficoll分离单个核细胞过程中采用肝素抗凝会引起细胞悬液中出现凝胶,影响细胞通过分离柱,降低分离效率^[13]。我们将部分步骤改用钙离子螯合剂乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)替代肝素抗凝。因配体和ASGPR的结合是Ca²⁺依赖的,反应体系中必须有Ca²⁺存在,故在去唾液酸胎球蛋白与肝癌细胞孵育过程中加入Ca²⁺,以补充抗凝过程中EDTA结合的Ca²⁺。我们采用Hep3B肝癌细胞掺入试验对这两种方法的回收情况进行了比较。

1 材料和方法

1.1 材料 所有血液标本均在东方肝胆外科医院(上海)采集。选取7个健康志愿者,每人抽取5份外周静脉血,每份5 mL,用含EDTA的5 mL抗凝管(Greiner bio-one)替代BD Vacutainer[®]管收集。标本保存于4 °C,并且在采集后6 h内处理。研究方案获得东方肝胆外科医院伦理审查委员会批准,每个志愿者均签署书面知情同意书。Ficoll-Paque PLUS购自GE公司(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA);生物素抗体磁珠(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany);50 mL离心管(Corning Inc., Corning, NY, USA);离心涂片机(Wescor Inc. UT, USA);小鼠抗人肝细胞单克隆抗体(anti-human hepatocyte, Hep Par 1; Dako, Copenhagen, Denmark);大鼠抗人CD45单抗(Santa Cruz, CA, USA);Sulfo-NHS-LC-Biotin(Pierce, Rockford, IL, USA);去唾液酸胎球蛋白(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);大鼠抗人CD45单抗(Santa Cruz, CA, USA);兔抗小鼠-Alexa Fluor 647 IgG(Invitrogen, CA, USA);兔抗大鼠-Alexa Fluor 488(Invitrogen, CA, USA);抗荧光淬灭剂(Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA);Olympus SZX直立反射显微镜(Olympus America);5 mL抗凝管(Greiner bio-one)。

1.2 方法

1.2.1 去唾液酸胎球蛋白的生物素化:按照厂家说明书,用Sulfo-NHS-LC-Biotin标记去唾液酸胎球蛋白,并纯化。具体方法如下:(1)称取2.0 mg氨基生物素化试剂Sulfo-NHS-LC-Biotin,加入

360 μL双蒸水中,终浓度为10 mmol/L;(2)称取9.6 mg去唾液酸胎球蛋白,溶解于2 mL双蒸水中;(3)加入40 μL 10 mmol/L的Sulfo-NHS-LC-Biotin;(4)冰上反应2 h;(5)将反应液移入离心超滤管,25 °C 4 000 g,离心20 min;(6)在离心管中加入双蒸水和L-赖氨酸,使总体积为3 mL,L-赖氨酸终浓度为0.08 mg/mL,室温放置0.5 h;(7)将离心超滤管于25 °C 4 000 g,离心20 min;(8)吸出超滤管中残留液体,加1 mL双蒸水稀释;(9)用BCA蛋白定量试剂盒按照说明书操作,测定生物素化去唾液酸胎球蛋白浓度;(10)用双蒸水调整去唾液酸胎球蛋白浓度至所需浓度,0.22 μm滤器无菌过滤后50 μL/管分装,-80 °C保存备用。

1.2.2 单个核细胞富集:根据厂家说明书,从全血样本中分离单个核细胞(包括肿瘤细胞)。具体步骤如下:5 mL全血与平衡盐溶液(NaCl溶液,0.14 mol/L)等量混合,仔细平铺于12 mL Ficoll-Paque PLUS分离液上,400 g,18 °C,于50 mL离心管中离心30 min。然后收集单个核细胞层,并用平衡盐溶液洗涤2次。

1.2.3 磁性标记:将细胞与生物素化去唾液酸胎球蛋白充分混合,加入2 mmol/L的氯化钙溶液200 μL,于37 °C孵育45 min。稀释缓冲液洗涤2次,用20 μL抗生物素抗体磁珠4 °C作用15 min进行磁性标记,然后将细胞用稀释缓冲液洗涤,再用1 mL稀释缓冲液悬浮。用稀释缓冲液平衡MS分离柱,再使经磁性标记的细胞流经其中。用稀释缓冲液(3×500 μL)将阴性细胞从分离柱中洗去。然后将分离柱移开磁场,用1 mL稀释缓冲液将残留在分离柱中的细胞快速冲出。用离心涂片机将富集到的细胞组分在多聚赖氨酸玻片上制成细胞涂片,37 °C干燥15 min。用4%甲醛固定15 min,立刻进行免疫荧光染色,或-80 °C保存备用。

1.2.4 免疫荧光染色:采用小鼠抗人肝细胞单克隆抗体鉴定肝癌细胞。具体步骤:用洗液(PBS-0.1% Tween 20)冲洗细胞片。用含5%BSA的洗液孵育30 min封闭非特异结合位点。然后用Hep Par 1单抗和大鼠抗人CD45单抗在湿盒中37 °C孵育1 h。再用兔抗小鼠-Alexa Fluor 647 IgG,兔抗大鼠-Alexa Fluor 488作为二抗室温避光孵育30 min。在经过4',6'-diamidino-2-phenylindole(DAPI)染色后,采用抗荧光淬灭剂封片。

1.2.5 CTCs鉴定和计数:采用带自动扫描平台

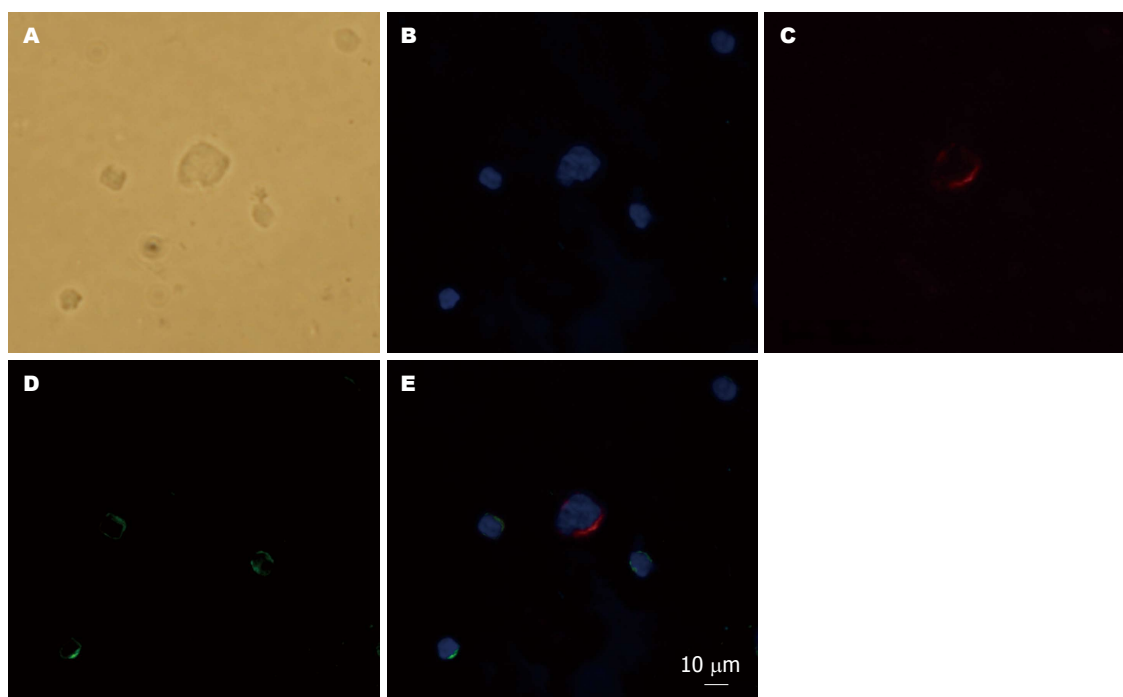


图 1 从掺入Hep3B细胞的健康志愿者外周血样本中分离到的Hep3B肝癌细胞(HepPar 1抗体染色 $\times 400$)。A: Bright Field Image; B: DAPI; C: Hep Par 1; D: CD45; E: Merge.

■创新盘点

本文系统地解决了以前所报道方法的固有问题, 敏感性高, 特异性好。临床病例检测结果显示, HCC患者CTCs阳性率和数目均与HCC进展程度呈显著正相关。针对Ficoll分离单个核细胞过程中采用肝素抗凝会引起细胞悬液中出现凝胶, 影响细胞通过分离柱, 降低分离效率的问题, 我们将部分步骤改用EDTA替代肝素抗凝, 改良后的循环肝癌细胞分离/检测系统具有高度的敏感性和特异性。

(Prior Scientific)的Olympus SZX直立反射显微镜观察细胞片。采用可编程的平台和Qcapture Pro软件(Media Cybernetics)对细胞片进行 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 方格自动扫描。仔细分析捕获的图像, 并计数符合预定标准的细胞。颜色、亮度和细胞大小、形状、核大小等形态学特征符合标准的细胞被认为是潜在的CTCs, 排除细胞碎片和非特异染色的细胞。Hep Par 1阳性、DAPI阳性、CD45阴性, 并且符合形态学特征的细胞记为CTCs。细胞计数表述为每5 mL血液CTCs细胞数。

1.2.6 细胞掺入试验评价系统的回收率、敏感性和特异性: 抽取健康志愿者外周静脉血, 每份5 mL, 用含EDTA的5 mL抗凝管收集。每个志愿者的5份血液中分别掺入约10、30、90、270和810个Hep3B肝癌细胞。掺入细胞计数采用COULTER[®] LH750型血液分析仪进行。对于特异性分析, 另选2个健康志愿者, 每人各抽取5份外周静脉血, 每份5 mL。来自其中1个健康志愿者的5份血样中每份掺入100个MCF-7乳腺癌细胞, 来自其中另1个健康志愿者的5份血样中每份掺入100个A498肾癌细胞。然后将以上35个血样本用前述CTCs分离和鉴定方法进行处理和分析。以上所有操作由同一位操作者进行。

2 结果

将不同数目的人肝癌细胞Hep3B掺入抽取的5 mL

健康志愿者的外周血样本中, 然后用所建立的循环肝癌细胞分离/鉴定系统进行肝癌细胞分离鉴定。分离后采用Hep Par 1抗体进行免疫荧光染色鉴定的肝癌细胞(图1)。对于免疫荧光染色, 肝癌细胞特征为: Hep Par 1阳性、DAPI阳性、CD45阴性, 细胞呈圆至椭圆形, 细胞核完整, 具有细胞体积大、核浆比高等恶性肿瘤细胞特征。排除细胞碎片和非特异染色的细胞, 符合上述特征的细胞记为CTCs。

用含EDTA的5 mL抗凝管替代肝素抗凝管收集血液, 细胞悬液中未再出现凝胶现象。将不同数目的人肝癌细胞Hep3B掺入抽取的5 mL健康志愿者的外周血样本中, 掺入数分别为10、30、90、270和810个, 每个掺入水平为5个血样本。在各个掺入水平, 改良法的平均回收率分别为88%、75%、80%、73%和70%, 而原检测法在相应掺入水平的平均回收率分别为72%、69%、66%、64%、61%^[6], 每个掺入水平的回收率差异均有统计学意义($P<0.05$)(表1)。在掺入100个人乳腺癌细胞MCF-7的所有5个血样本和掺入100个人肾癌细胞系A498的所有5个血样本中, 没有1个样本检出Hep Par 1阳性肿瘤细胞。

3 讨论

CTCs检测已在乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等大量类型的肿瘤中得到广泛应用^[14-16]。MACS是目

■应用要点

本文建立的基于去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的循环肝癌细胞分离/检测系统有望在HCC的早期诊断、预测转移复发、疗效监测以及筛选HCC肝移植受者等方面得到临床应用。同时,利用该系统分离到的循环肝癌细胞,可进行直接分析和继续培养。因此,该系统有可能成为一个重要的技术平台,推动HCC临床应用研究和基础研究的进步。

表 1 改良法与原检测法在各个细胞数掺入水平的回收率比较

掺入细胞数	原检测法			改良法			P值
	平均回收数	SD	平均回收率(%)	平均回收数	SD	平均回收率(%)	
10	7	2	72	9	1	88	0.035
30	21	4	69	23	3	75	0.047
90	59	9	66	72	12	80	0.023
270	172	13	64	198	13	73	0.045
810	496	28	61	568	43	70	0.002

前临床检测CTCs的标准方法。然而,由于缺乏肝癌细胞特异性表面单克隆抗体,少见用该方法分离循环肝癌细胞的报道。本研究创造性地建立了基于肝实质细胞表面的特异性受体ASGPR及其配体相互作用的循环肝癌细胞磁性分选方法,从而绕开了因缺少肝癌细胞表面特异性抗体而造成的瓶颈。分离到的肝癌细胞采用肝细胞特异性抗体Hep Par 1的免疫荧光染色鉴定方法进行鉴定。

ASGPR特异表达于肝实质细胞和肝癌细胞^[17-22],且Hep Par 1抗体能识别包括正常细胞和肝癌细胞在内的肝源性细胞^[23-26]。通常认为正常肝细胞一般不会进入血循环,除非演变成肿瘤细胞后才有这种可能,因此可认为用我们的系统检测到的细胞即为肝癌细胞。有报道显示感染了淋球菌的尿道上皮细胞和近端肾小管上皮细胞也表达ASGPR^[27,28],然而这些细胞一般不会出现在外周血中。事实上,即使有少量ASGPR阳性的非肝源性细胞存在于富集的细胞组分中,也不会产生阳性结果,因为我们采用肝细胞特异性抗体Hep Par 1检测肝癌细胞。因为有30%左右HCC病例AFP阴性^[29,30],因此AFP抗体用于检测循环肝癌细胞可能会产生假阳性。此外,相比较于广谱角蛋白抗体CK3-6H5,考虑到潜在的假阳性结果可能,我们也更倾向于使用肝细胞特异性抗体Hep Par 1检测循环肝癌细胞。

Almeida等^[13]报道,当肝素浓度为5-225 U/mL时,将会和淋巴细胞形成凝胶状胶体,胶体形成范围与肝素及淋巴细胞的浓度有关。单核细胞分离液Ficoll-Paque Plus使用手册中亦指出:细胞分离过程中,样品中添加的肝素可能会导致细胞悬液形成凝胶。我们在实际操作过程中也发现类似现象,肝素与细胞悬液形成的凝胶通过磁性分离柱时,流速十分缓慢,影响了回收效率。我们在改良法中使用EDTA抗凝管替代肝素抗凝管收集外周血。EDTA与钙离子结合成螯合

物,从而阻止血液凝固。但配体和ASGPR的结合是Ca²⁺依赖的,反应体系中必须有Ca²⁺存在,故我们在去唾液酸糖蛋白作为配体与肝癌细胞孵育过程中加入Ca²⁺,以补充抗凝过程中EDTA结合的Ca²⁺。细胞掺入试验结果显示,改良法在各个掺入水平,回收率均≥70%。回收效率较原检测法明显提高(所有P<0.05)。在掺入100个人乳腺癌细胞MCF-7的所有5个血样本和掺入100个人肾癌细胞系A498的所有5个血样本中,没有1个样本检出Hep Par 1阳性肿瘤细胞。以上结果显示本研究所建立的循环肝癌细胞分离/检测系统具有高度的敏感性和特异性。

总之,我们建立的基于ASGPR的循环肝癌细胞分离/检测系统有望在HCC的早期诊断、预测转移复发、疗效监测以及筛选HCC肝移植受者等方面得到临床应用。同时,利用该系统分离到的循环肝癌细胞,可进行直接分析和继续培养。因此,该系统有可能成为一个重要的技术平台,推动HCC临床应用研究和基础研究的进步。

4 参考文献

- Funaki NO, Tanaka J, Seto SI, Kasamatsu T, Kaido T, Imamura M. Hematogenous spreading of hepatocellular carcinoma cells: possible participation in recurrence in the liver. *Hepatology* 1997; 25: 564-568 [PMID: 9049199 DOI: 10.1002/hep.510250312]
- Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007; 253: 180-204 [PMID: 17314005 DOI: 10.1016/j.canlet.2006.12.014]
- Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the Cell-Search System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol* 2010; 2010: 617421 [PMID: 20016752 DOI: 10.1155/2010/617421]
- de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 1999; 188: 201-206 [PMID: 10398165 DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199906)188:]
- Ruck P, Wichert G, Handgretinger R, Kaiserling E. Ep-CAM in malignant liver tumours. *J Pathol* 2000; 191: 102-103 [PMID: 10767726 DOI: 10.1002/(SICI)1

- 096-9896(200005)191:]
- 6 Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, Budhu A, Zanetti KA, Chen Y, Qin LX, Tang ZY, Wang XW. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 1451-1461 [PMID: 18316609 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6013]
 - 7 Spiess M. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry* 1990; 29: 10009-10018 [PMID: 2125488 DOI: 10.1021/bi00495a001]
 - 8 Sugahara K, Togashi H, Takahashi K, Onodera Y, Sanjo M, Misawa K, Suzuki A, Adachi T, Ito J, Okumoto K, Hattori E, Takeda T, Watanabe H, Saito K, Saito T, Sugai Y, Kawata S. Separate analysis of asialoglycoprotein receptors in the right and left hepatic lobes using Tc-GSA SPECT. *Hepatology* 2003; 38: 1401-1409 [PMID: 14647051 DOI: 10.1016/j.hep.2003.09.031]
 - 9 Kaneta T, Hakamatsuka T, Ito H, Maruoka S, Fukuda H, Takahashi S, Yamada S. Usefulness of asialoglycoprotein receptor imaging for the evaluation of liver metastasis of neuroblastoma. *Ann Nucl Med* 2004; 18: 355-358 [PMID: 15359931 DOI: 10.1007/BF02984476]
 - 10 Rensen PC, Sliedregt LA, van Santbrink PJ, Ferns M, Schifferstein HN, van Leeuwen SH, Souverijn JH, van Berkel TJ, Biessen EA. Stimulation of liver-directed cholesterol flux in mice by novel N-acetylgalactosamine-terminated glycolipids with high affinity for the asialoglycoprotein receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 169-175 [PMID: 16254203 DOI: 10.1161/01.ATV.0000193620.98587.40]
 - 11 Wang S, Cheng L, Yu F, Pan W, Zhang J. Delivery of different length poly(L-lysine)-conjugated ODN to HepG2 cells using N-stearyllactobionamide-modified liposomes and their enhanced cellular biological effects. *Int J Pharm* 2006; 311: 82-88 [PMID: 16427225 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.12.014]
 - 12 Xu W, Cao L, Chen L, Li J, Zhang XF, Qian HH, Kang XY, Zhang Y, Liao J, Shi LH, Yang YF, Wu MC, Yin ZF. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 3783-3793 [PMID: 21527564 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0498]
 - 13 Almeida AP, Beaven MA. Gel formation with leucocytes and heparin. *Life Sci* 1980; 26: 549-555 [PMID: 6767888 DOI: 10.1016/0024-3205(80)90318-5]
 - 14 Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, Anand A, Smith K, Maslak P, Doyle G, Terstappen LW, Lilja H, Heller G, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2023-2029 [PMID: 17404082 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2701]
 - 15 Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781-791 [PMID: 15317891 DOI: 10.1056/NEJMoa040766]
 - 16 Sastre J, Maestro ML, Puente J, Veganzones S, Alfonso R, Rafael S, García-Saenz JA, Vidaurreta M, Martín M, Arroyo M, Sanz-Casla MT, Díaz-Rubio E. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Ann Oncol* 2008; 19: 935-938 [PMID: 18212090 DOI: 10.1093/annonc/mdm583]
 - 17 Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 1982; 51: 531-554 [PMID: 6287920 DOI: 10.1146/annurev.bi.51.070182.002531]
 - 18 Trerè D, Fiume L, De Giorgi LB, Di Stefano G, Migaldi M, Derenzini M. The asialoglycoprotein receptor in human hepatocellular carcinomas: its expression on proliferating cells. *Br J Cancer* 1999; 81: 404-408 [PMID: 10507763 DOI: 10.1038/sj.bjc.6690708]
 - 19 Park JH, Cho EW, Shin SY, Lee YJ, Kim KL. Detection of the asialoglycoprotein receptor on cell lines of extrahepatic origin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 304-311 [PMID: 9514919 DOI: 10.1006/bbrc.1998.8256]
 - 20 Park JH, Kim KL, Cho EW. Detection of surface asialoglycoprotein receptor expression in hepatic and extra-hepatic cells using a novel monoclonal antibody. *Biotechnol Lett* 2006; 28: 1061-1069 [PMID: 16799763 DOI: 10.1007/s10529-006-9064-0]
 - 21 Díaz C, Vargas E, Gätjens-Boniche O. Cytotoxic effect induced by retinoic acid loaded into galactosyl-sphingosine containing liposomes on human hepatoma cell lines. *Int J Pharm* 2006; 325: 108-115 [PMID: 16870366]
 - 22 Jain V, Nath B, Gupta GK, Shah PP, Siddiqui MA, Pant AB, Mishra PR. Galactose-grafted chylomicron-mimicking emulsion: evaluation of specificity against HepG-2 and MCF-7 cell lines. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 303-310 [PMID: 19222902 DOI: 10.1211/jpp.61.03.0004]
 - 23 Wennerberg AE, Nalesnik MA, Coleman WB. Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol* 1993; 143: 1050-1054 [PMID: 7692729]
 - 24 Minervini MI, Demetris AJ, Lee RG, Carr BI, Madariaga J, Nalesnik MA. Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. *Mod Pathol* 1997; 10: 686-692 [PMID: 9237179]
 - 25 Butler SL, Dong H, Cardona D, Jia M, Zheng R, Zhu H, Crawford JM, Liu C. The antigen for Hep Par 1 antibody is the urea cycle enzyme carbamoyl phosphate synthetase 1. *Lab Invest* 2008; 88: 78-88 [PMID: 18026163 DOI: 10.1038/labinvest.3700699]
 - 26 Lugli A, Tornillo L, Mirlacher M, Bundi M, Sauter G, Terracciano LM. Hepatocyte paraffin 1 expression in human normal and neoplastic tissues: tissue microarray analysis on 3,940 tissue samples. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 721-727 [PMID: 15491968 DOI: 10.1309/KC09YTF2M4DLUYQ6]
 - 27 Seow YY, Tan MG, Woo KT. Expression of a functional asialoglycoprotein receptor in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephron* 2002; 91: 431-438 [PMID: 12119473 DOI: 10.1159/000064283]
 - 28 Harvey HA, Ketterer MR, Preston A, Lubaroff D, Williams R, Apicella MA. Ultrastructural analysis of primary human urethral epithelial cell cultures infected with *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1997; 65: 2420-2427 [PMID: 9169783]
 - 29 Murugavel KG, Mathews S, Jayanthi V, Shankar EM, Hari R, Surendran R, Vengatesan A, Raghuram K, Rajasambandam P, Murali A, Srinivas U, Palaniswamy KR, Pugazhendhi T, Thyagarajan SP. Alpha-fetoprotein as a tumor marker in hepa-

同行评价

本文学术价值较高,具有一定的指导意义。

- tocellular carcinoma: investigations in south Indian subjects with hepatotropic virus and aflatoxin etiologies. *Int J Infect Dis* 2008; 12: e71-e76 [PMID: 18658001 DOI: 10.1016/j.ijid.2008.04.010]
- 30 Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, Mazzella G, Accogli E, Caraceni P, Domenicali

M, De Notariis S, Roda E, Bernardi M. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol* 2001; 34: 570-575 [PMID: 11394657 DOI: 10.1016/S0168-8278(00)00053-2]

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表,同时保护作者与《世界华人消化杂志》的合法权益,本刊对修回稿要求如下.

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函.内容包括:(1)保证无重复发表或一稿多投;(2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突;(3)所有作者均审阅过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该文代表其真实研究成果,保证文责自负;(4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件;通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核复核稿;(5)列出作者贡献分布;(6)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信;(7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改,而作者必须于15天内将单位介绍信、作者复核要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期发回的,作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负.作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期);起止页码.如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有.编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布;作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.