

大鼠 Kupffer 细胞内外 Sonazoid 微泡超声辐照下的动态现象

刘广健¹, 吕明德^{1*}, 森安史典², 谢晓燕¹, 刘泳东³, 徐作峰¹, 谢晓华¹, 王竹¹

(1.中山大学附属第一医院超声波科,广东广州 510080; 2.日本东京医科大学消化内科,日本东京 160-0023;3.中山大学附属第一医院病理科,广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨超声辐照对 Kupffer 细胞内外 Sonazoid 微泡运动和形态的影响。【方法】分离大鼠 Kupffer 细胞。使用倒置相差显微镜观测 Kupffer 细胞吞噬 Sonazoid 微泡的情况。并使用临床超声检查仪在不同声压下辐照,观察微泡在 Kupffer 细胞内外的动态现象。【结果】Kupffer 细胞对 Sonazoid 微泡吞噬率为 91%。游离微泡在机械指数(MI)0.21 时由静止出现震动,产生震动的最佳 MI 为 0.21 ~ 0.44,微泡破裂的声压阈值是 1.03。MI=1.18 是黏附微泡破裂的阈值。被吞噬微泡破裂的阈值为 MI=1.37。【结论】Sonazoid 微泡能够被体外培养的 Kupffer 细胞吞噬。超声辐照下,声压对 Kupffer 细胞内外 Sonazoid 微泡的运动和形态有明显影响作用。

关键词: Kupffer 细胞; Sonazoid 微泡; 超声辐照; 现象

中图分类号: R445.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)05-0571-06

Dynamic Phenomena of Sonazoid Microbubbles in Cultures of Rats Kupffer Cells during Ultrasound Insonation

LIU Guang-jian¹, LU Ming-de^{1*}, Fuminori Moriyasu², XIE Xiao-yan¹, LIU Yong-dong³, XU Zuo-feng¹,
XIE Xiao-hua¹, WANG Zhu¹

(1.Department of Medical Ultrasonics, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Gastroenterology & Hepatology, Tokyo Medical University, Tokyo 160-0023, Japan; 3. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the influence of ultrasound insonation to the shape and movement of Sonazoid microbubbles outside and inside of Kupffer cells. 【Methods】 Kupffer cells were isolated from rats. Phagocytosis of Sonazoid microbubbles were observed under inverted phase contrast microscope. Ultrasound insonation was performed using a clinical ultrasound scanner, phenomena of microbubbles outside and inside of Kupffer cells in an acoustic field with different acoustic pressure were observed. 【Results】 The phagocytosis rate of Sonazoid microbubbles by Kupffer cells was 91%. The thresholds in term of mechanical index (MI) for free microbubbles to begin oscillation, reach best oscillation, and destruction were 0.21, 0.44, and 1.03, respectively. The thresholds of destruction were 1.18 for adherent microbubbles, and 1.37 for phagocytosed microbubbles, respectively. 【Conclusions】 Sonazoid microbubbles could be phagocytosed by Kupffer cells in vitro. Acoustic pressure of ultrasound insonation affects the movement and the shape of Sonazoid microbubbles outside and inside of Kupffer cells obviously.

Key words: Kupffer cells; sonazoid microbubbles; ultrasound insonation; phenomena

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(5): 571-576]

Sonazoid 是一种新型超声造影剂 (ultrasound contrast agent, UCA), 该微泡除具备血池造影剂特点外还能够被 Kupffer 细胞吞噬^[1-2], 用于肝脏超声造影 (contrast-enhanced ultrasound, CEUS) 可同时进行组织血流灌注显像和肝实质特异性显像,

在肝脏局灶性病变更定性诊断和病灶探查方面具有较高的应用价值^[3-5]。通常认为, 被 Kupffer 细胞吞噬的 Sonazoid 微泡是造成肝实质特异性显像的基础。目前关于 Kupffer 细胞内外的微泡在超声辐照下的动态现象, 尤其是在使用临床超声检查条件

收稿日期: 2012-02-24

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (30901384)

作者简介: 刘广健, 博士学位, 副主任医师, E-mail: liugj@mail.sysu.edu.cn; * 通信作者: 吕明德, 博士学位, 教授, E-mail: lumd@live.com

的辐照下微泡的表现尚无报导^[6]。本研究是针对上述空白的实验工作,以进一步探讨 Sonazoid-CEUS Kupffer 期显像的机制。

1 材料与方 法

1.1 Kupffer 细胞的分离、培养和鉴定

清洁级雄性 Wistar 大鼠,鼠龄 12~16 周,体质量 200~400 g,购自 CLEA 公司(东京,日本)。本实验已得到日本东京医科大学动物实验伦理委员会的批准,实验过程按有关规定施行。本研究中采用了 IV 型胶原酶(collagenase)和链霉菌蛋白酶(pronase)消化方法分离 Kupffer 细胞,具体分离、培养以及鉴定方法见参考文献 1。

1.2 Kupffer 细胞吞噬 Sonazoid 微泡的观测

1.2.1 微泡的制备 动物实验专用 Sonazoid (Daiichi Sankyo Company, Ltd., Tokyo, Japan) 干冻粉一支,注入 2 mL 注射用蒸馏水,用力振荡至乳白色悬液。Sonazoid 微泡由氟碳气体(C₄F₁₀)和脂质外壳构成,直径约 2.4~3.5 μm,标准浓度为 1×10⁹ mL⁻¹^[7]。取 0.02 mL 标准浓度的 Sonazoid 悬液,加入 19.98 mL 注射用蒸馏水制成 1:1000 标准浓度液,此时微泡的最终浓度为 1×10⁶ mL⁻¹。

1.2.2 吞噬过程观测 将载有 Kupffer 培养细胞的玻片及有机玻璃支架反转置于装有 40 mL RPMI 1640 细胞培养液的培养皿中。将按照 1:1000 稀释的 0.5 mL Sonazoid 溶液用一个弯曲的 21G 注射器针头注入玻片下方。使用倒置相差显微镜实时观测细胞吞噬微泡的过程,至少连续观测 30 min,整个过程使用显微镜载物台专用加热装置(MPF-10-O, IEDA, Japan)加热,保证细胞培

养皿 37℃ 恒温。Kupffer 细胞吞噬 Sonazoid 微泡的全过程通过显微镜目镜连接的 3CCD 数码摄像机(JU-TU531T, Toshiba Corp., Tokyo, Japan)及数字化录像机(DSR-20MD, Sony, Tokyo, Japan)录制,用于资料分析。

1.2.3 吞噬观测指标 ①吞噬微泡的细胞数及百分比。②被细胞吞噬的微泡数。③细胞吞噬微泡所需的时间。④被吞噬微泡在细胞内稳定存在的时间。

1.3 超声辐照 Sonazoid 微泡的动态现象的观测

1.3.1 超声辐照仪器 使用临床超声诊断仪(Aplio XV, PVT 382 微凸阵探头,频率 1~6 MHz, Toshiba, Japan)。成像模式为脉冲反向成像,成像参数见表 1。使用倒置相差显微镜 200 倍放大下观察 Kupffer 细胞及 Sonazoid 微泡在超声辐照下的情况。

1.3.2 超声辐照 按照吞噬微泡部分的方法,微泡注入 10 min 后开始超声辐照。超声探头经机械臂固定于桌面,探头表面以 45 度角浸入培养液液面以下,实验装置示意图见图 1。同一条件下超声辐照时间每次持续 10 s。超声输出的强度以屏幕显示的机械指数(mechanical index, MI)为准,MI 由 0.08 逐渐升高至 1.6。用显微镜观测超声辐照全过程并用数字化录像机录制,用于资料分析。

1.3.3 超声辐照观测指标 ①微泡类型。分为 3 类:游离微泡、黏附微泡和吞噬微泡。游离微泡是指自由悬浮于培养液中,不与 Kupffer 细胞接触的微泡;黏附微泡是指吸附于 Kupffer 细胞表面,但主体仍位于细胞外的微泡;吞噬微泡是指完全位于 Kupffer 细胞内的微泡。②微泡运动方式和形态改变。运动方式分为静止、震动和移动。静止是指微泡处于非常稳定的状态,无任何活动;震动是指

表 1 超声辐照条件的设定

Table 1 Setting of ultrasound scanner used in the experiment

Parameter	Specification/setting
Machine type	Toshiba Aplio XG with PVT 382BT Probe
Imaging mode	Pulse inversion imaging
Mechanical index/MI	0.08 to 1.6 (as read on screen)
Frequency/MHz	3.5
Pulse repetition frequency (PRF)/kHz	3~5
Frame Rate/Hz	1 or 15
Depth/cm	4
Focus Position/cm	4
Focus Number	1

微泡仅在原位有轻微的颤动;移动是指微泡震动快速并伴随较大范围的移位。形态改变包括压缩和破裂。压缩是指微泡体积明显缩小;破裂是指微泡瞬间消失。

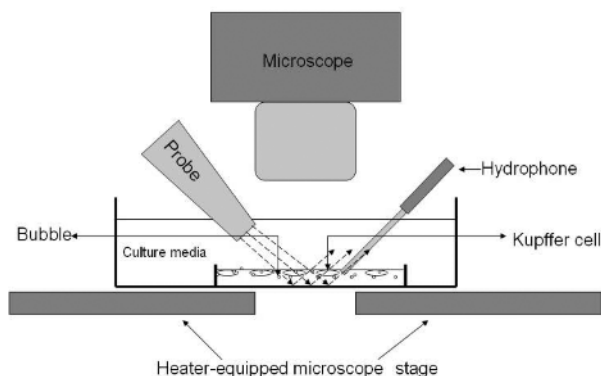


图 1 实验装置示意图

Fig.1 Scheme of the experimental setup

The dotted line represented the propagation of ultrasound waves

上述指标由两位未参与实验操作过程的研究者依据录像资料观测分析,意见不同时经协商达成一致。

1.4 统计分析

所有结果均采用计数和百分数表示。超声辐照下微泡各种动态现象的发生频率以占同类微泡的百分数表示。

2 结果

2.1 Kupffer 细胞的分离、培养和鉴定

分离得到的 Kupffer 细胞经苔盼蓝染色试验活性大于 90%。光学显微镜下新鲜分离的细胞呈球形。培养 24 h 后细胞呈椭圆形或多角形,胞核较大呈圆形或肾形,胞浆透亮。经鉴定,细胞纯度 95%以上。

2.2 Kupffer 细胞吞噬 Sonazoid 微泡

共观察了 96 个 Kupffer 细胞,其中 87 个细胞(91%)吞噬了 Sonazoid 微泡,3 个(3%)细胞黏附了微泡,6 个细胞(6%)既无吞噬亦无黏附微泡。共观察了 480 个 Sonazoid 微泡,其中 324 个(68%)为游离状态,72 个(15%)被 Kupffer 细胞吸附,84 个(18%)被细胞吞噬。细胞吞噬微泡耗时 2 至 90 min 不等,每个细胞吞噬微泡的数目 1 至 8 个不等。Kupffer 细胞吞噬微泡后,细胞的形态及胞内的

微泡均保持完好。24 h 后观察,仍可见部分细胞内有完好的微泡样结构。

2.3 超声辐照 Sonazoid 微泡的动态现象

实施超声辐照实验 4 次,辐照频率为 3.5 MHz,帧频为 15 Hz。共计观察微泡 187 个,其中游离微泡 148 个,黏附微泡 18 个,吞噬微泡 21 个。

游离微泡的动态表现见图 2。MI 小于 0.21 时,81.2%~100%的微泡呈静止状态。随着 MI 的提高,静止状态的微泡由 80.4%(MI = 0.21)减少到 26.8%(MI = 0.53),震动状态的微泡由 42.1%(MI = 0.21)增加到 80.0%(MI = 0.44)。当 MI 为 0.53 时,移动状态的微泡比例最高(为 36.8%),压缩的微泡小于 35%,破裂的微泡小于 16.6%。当 MI 为 0.75 时,压缩的微泡增加至 75%。当 MI 为 1.03 时,100%的游离微泡破裂。综上所述,使游离微泡发生震动的声压阈值为 MI = 0.21,MI = 0.44 时震动表现达到峰值;MI = 0.53 时移动表现达到峰值;MI = 0.75 使微泡发生压缩改变达到峰值,MI = 1.03 为微泡破裂的声压阈值。

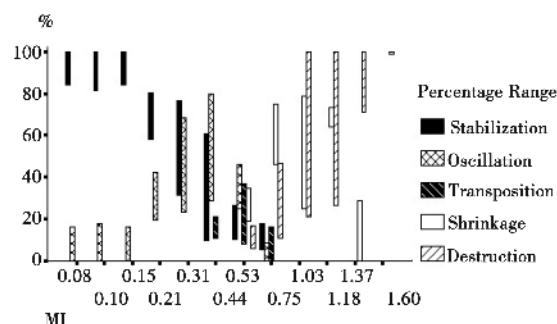


图 2 游离微泡在高帧频超声辐照下的表现

Fig.2 Behavior of free microbubbles under high frame rate ultrasound exposure

黏附微泡的动态表现见图 3。本组未见震动的微泡。MI 小于 0.53 时,所有黏附微泡为静止状态。MI 为 0.53 时,部分微泡从 Kupffer 细胞表面脱离,部分微泡发生压缩。随着超声 MI 的增加,压缩的微泡由 33.3%(MI = 0.75)增加至 66.7%(MI = 1.18),破裂的微泡由 33.3%(MI = 0.75)增高至 100%(MI = 1.37)。综上所述,MI = 0.53 是微泡从细胞表面脱离的阈值,MI = 1.03 时微泡发生压缩达到峰值,MI = 1.18 是微泡破裂的声压阈值。

吞噬微泡的动态表现见图 4。本组未见震动及移动表现的微泡。当辐照超声 MI 小于 0.53 时,所

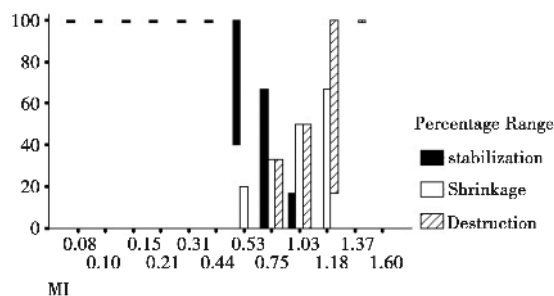


图 3 黏附微泡在高帧频超声辐照下的表现。

Fig.3 Behavior of adherent microbubbles under high frame rate ultrasound exposure

有细胞内的微泡呈静止状态。随着 MI 的增加,压缩的微泡由 8.3%(MI = 0.53) 增高至 75%(MI = 1.03),破裂微泡由 25%(MI = 1.03)增高至 100%(MI = 1.6)。使吞噬微泡发生压缩改变的阈值为 MI = 1.18,发生破裂的阈值为 MI = 1.37。

根据上述观察,我们在表 2 中总结了高帧频超声辐照下 Sonazoid 微泡各种不同表现的声压阈值。

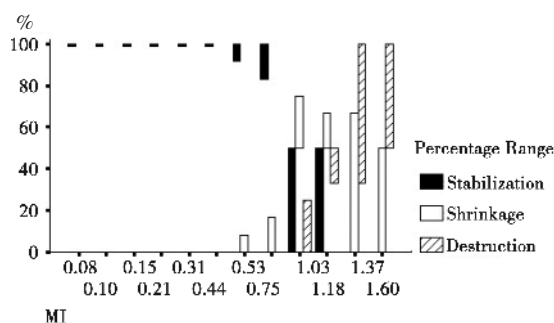


图 4 吞噬微泡在高帧频超声辐照下的表现。

Fig.4 Behavior of phagocytosed microbubbles under high frame rate ultrasound exposure

3 讨 论

Kupffer 细胞吞噬 Sonazoid 微泡已被研究证

实。Yanagisawa 等^[1]使用光学显微镜和平行板流动腔系统,发现微泡与细胞接触后 1 min 内即可见到细胞伪足包绕微泡,5 min 后微泡即被细胞吞噬并向胞核方向移动,最终有 99% 的细胞吞噬了微泡。他们还观察了 Kupffer 细胞吞噬 Optison、Levovist、Imavist 和 SonoVue 微泡的情况,相应微泡吞噬率分别为 99%,47%,0 和 7.3%。Watanabe 等^[2]使用活体显微镜和激光共聚焦显微镜来观察活体和离体 Kupffer 细胞与 Sonazoid 的关系,证实了微泡位于细胞之内。本研究使用倒置相差显微镜再次验证了 Kupffer 细胞对 Sonazoid 微泡的吞噬,细胞吞噬率高达 91%。

微泡在超声辐照下的表现受到辐照超声特性(频率和强度等)、微泡周围液体特性(温度和粘稠度等)以及微泡本身物理性质(大小、外壳、共振频率和阻尼系数等)的影响^[8-12]。Sonazoid 是一种直径范围 2.4 ~ 3.5 μm 的氟碳气体微泡^[7]。经理论模型推算及辐照实验证实,直径为 2.5 μm 、3.7 μm 和 6.2 μm 的氟碳气体微泡的最佳共振频率为 5.0 MHz、3.5 MHz 和 2.0 MHz^[9]。本研究采用临床超声检查的条件辐照,频率 3.5 MHz,恰好落在最佳共振频率的范围之内。

微泡在声场交变声压的作用下产生压缩和膨胀运动,其运动模式与声场压力的关系文献已有报道^[13]。通常认为,当声压低于 50 kPa 时,微泡产生线性共振;中等声压下(50 ~ 200 kPa),微泡呈非线性运动;高声压(> 200 kPa)下,微泡破裂消失。Bouakaz 等^[13]采用高速照相技术,观测到一种白蛋白包裹的氮气微泡在超声辐照下的表现与辐照的声压和微泡大小相关。辐照声压可分为微泡非破坏区、交界区和破坏区 3 个区域,非破坏区和破坏区的声压阈值分别为 MI < 0.3 和 MI > 0.6。声压处于交界区内时,微泡先被压缩,然后外壳出现

表 2 高帧频超声辐照下 Sonazoid 微泡不同表现的声压阈值

Table 2 Thresholds for different kinds of microbubble behavior under high frame rate ultrasound exposure

Behavior	Free Bubble		Adherent Bubble		Phagocytosed Bubble	
	MI	Pressure/MPa	MI	Pressure/MPa	MI	Pressure/MPa
Stabilization	0.21	0.172 8-0.2304				
Oscillation	0.44	0.307 2-0.4608				
Transposition	0.53	0.307 2-0.576	0.53	0.307 2-0.576		
Shrinkage	0.75	0.345 6-0.864	1.03	0.403 2-1.152	1.18	0.403 2-1.382 4
Destruction	1.03	0.403 2-1.152	1.18	0.403 2-1.382 4	1.37	0.518 4-1.612 8

裂缝,气体外漏,微泡剧烈收缩直至消失,被释放出来的气体聚集成游离气泡,几毫秒后随即溶解于介质中。他们还发现当微泡非常小时,微泡发生共振,但不易被破坏;当微泡直径较大($\geq 5 \mu\text{m}$)时即使超声能量非常小,微泡也将被破坏。至于由磷脂外壳包裹氟碳气体的 Sonazoid 微泡在超声辐照下、特别是在临床超声检查应用的辐照条件下将发生什么样的现象,目前没有资料,本研究对此作了探索。

实验结果显示,游离 Sonazoid 微泡在接受超声辐照的声压大小,可有静止、震动、移动3种运动方式和压缩、破裂2种形态改变。当 $MI < 0.21$ 时,80%以上微泡保持静止状态,被压缩和破坏的声压阈值分别为 $MI = 0.75$ 和 $MI = 1.03$ 。本研究中观测到的微泡发生压缩和破裂的声压阈值数据高于 Bouakaz 等的报道,原因可归咎于微泡大小和超声辐照频率的差异。Sonazoid 微泡平均直径 $3 \mu\text{m}$,较含氮气微泡($4 \mu\text{m}$)更小;本实验的超声辐照频率为 3.5 MHz ,较 Bouakaz 等使用的 1.7 MHz 更高。

微泡在低声压下产生非线性共振或高声压下破裂时都能释放出强烈的非线性谐波信号用于 CEUS 成像。根据本研究的观察, $MI = 0.21 \sim 0.44$ 是使游离微泡发生震动的最佳声压范围,适合于连续成像。

除游离微泡外,认识黏附微泡和吞噬微泡在超声辐照下的表现特征亦非常重要。本研究中观察到黏附微泡在中声压($MI = 0.53$)辐照下可从 Kupffer 细胞表面脱离,成为游离微泡。这种脱离现象可解释为超声辐照的能量超过了细胞表面受体的吸附力和电荷以及声场作用力之和。本研究发现黏附微泡发生压缩和破裂的阈值显著高于游离微泡, MI 分别为 1.03 和 1.18 ,原因可能是由于双层磷脂结构的细胞膜柔软且富有弹性,微泡的震动被细胞膜缓冲所致。尽管文献报道微泡破裂可以导致“空化效应”,但本研究没有发现与黏附微泡破裂相关的细胞损伤。

吞噬微泡在超声辐照下的表现主要取决于辐照能量以及胞浆的粘滞系数和热阻尼系数。Dayton 等^[14]报告细胞内微泡的粘滞系数大约为细胞外游离微泡的7倍,由于受到胞内粘稠胞浆以及其它内容物的影响,辐照下微泡大小以及外壳的改变较胞外游离微泡大大减少。Lindner 等^[15]报告被

白细胞吞噬的白蛋白外壳微泡在低能量超声(-400 kPa)的辐照下微泡大小没有显著变化,随着声压的升高(-940 kPa),数个声波即可导致微泡体积缩小直至破裂消失,当声压达到 -1600 kPa 时,单个声波即可击破细胞内的微泡。本研究中被吞噬的 Sonazoid 微泡发生压缩和破裂的阈值分别为 $MI = 1.18$ 和 1.37 ,均明显高于游离或黏附微泡。

体外培养的 Kupffer 细胞对 Sonazoid 微泡存在高度吞噬现象。超声辐照的条件(声压、帧频)对微泡的运动和形态有明显的影响作用。在频率 3.5 MHz 、帧频 15 Hz 的辐照条件下,使游离微泡发生震动的声压阈值为 $MI = 0.21$, $MI = 0.44$ 时震动表现达到峰值, $MI = 1.03$ 为微泡破裂的声压阈值。 $MI = 1.18$ 是黏附微泡破裂的阈值,吞噬微泡破裂的阈值为 $MI = 1.37$ 。

参考文献:

- [1] Yanagisawa K, Moriyasu F, Miyahara T, et al. Phagocytosis of ultrasound contrast agent microbubbles by Kupffer cells[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33(2): 318-325.
- [2] Watanabe R, Matsumura M, Munemasa T, et al. Mechanism of hepatic parenchyma-specific contrast of microbubble-based contrast agent for ultrasonography: microscopic studies in rat liver[J]. *Invest Radiol*, 2007, 42(9): 643-651.
- [3] Hatanaka K, Kudo M, Minami Y, et al. Sonazoid-enhanced ultrasonography for diagnosis of hepatic malignancies: comparison with contrast-enhanced CT[J]. *Oncology*, 2008, 75(Suppl 1): 42-47.
- [4] Moriyasu F, Itoh K. Efficacy of perflubutane microbubble-enhanced ultrasound in the characterization and detection of focal liver lesions: phase 3 multicenter clinical trial[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2009, 193(1): 86-95.
- [5] Sugimoto K, Shiraishi J, Moriyasu F, et al. Improved detection of hepatic metastases with contrast-enhanced low mechanical-index pulse inversion ultrasonography during the liver-specific phase of sonazoid: observer performance study with JAFROC analysis [J]. *Acad Radiol*, 2009, 16(7): 798-809.
- [6] Takeuchi H, Ohmori K, Kondo I, et al. Interaction with leukocytes: phospholipid-stabilized versus albumin-shell microbubbles [J]. *Radiology*, 2004, 230(3): 735-742.
- [7] Sontum PC, Ostensen J, Dyrstad K, et al. Acoustic

- properties of NC100100 and their relation with the microbubble size distribution[J]. *Invest Radiol*, 1999, 34(4): 268–275.
- [8] de Jong N, Bouakaz A, Frinking P. Basic acoustic properties of microbubbles [J]. *Echocardiography*, 2002, 19(3): 229–240.
- [9] de Jong N, Hoff L, Skotland T, et al. Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres: theoretical considerations and some measurements [J]. *Ultrasonics*, 1992, 30(2): 95–103.
- [10] Wei K, Skyba DM, Firschke C, et al. Interactions between microbubbles and ultrasound: In vitro and in vivo observations[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, 29(5): 1081–1088.
- [11] de Jong N, Frinking PJ, Bouakaz A, et al. Optical imaging of contrast agent microbubbles in an ultrasound field with a 100-MHz camera[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2000, 26(3): 487–492.
- [12] Walker KW, Pantely GA, Sahn DJ. Ultrasound-mediated destruction of contrast agents. Effect of ultrasound intensity, exposure, and frequency [J]. *Invest Radiol*, 1997, 32(12): 728–734.
- [13] Bouakaz A, Versluis M, de Jong N. High-speed optical observations of contrast agent destruction[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31(3): 391–399.
- [14] Dayton PA, Chomas JE, Lum AF, et al. Optical and acoustical dynamics of microbubble contrast agents inside neutrophils[J]. *Biophys J*, 2001, 80(3): 1547–1556.
- [15] Lindner JR, Coggins MP, Kaul S, et al. Microbubble persistence in the microcirculation during Ischemia/reperfusion and inflammation is caused by integrin- and complement-mediated adherence to activated leukocytes [J]. *Circulation*, 2000, 101(6): 668–675.

(编辑 王晓鹰)

(上接第 566 页 from page 566)

- stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype[J]. *J Clin Pathol*, 2011, 64(11): 937–946.
- [11] Lottaz C, Beier D, Meyer K, et al. Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(5): 2030–2040.
- [12] Vizio B, Mauri FA, Prati A, et al. Comparative evaluation of cancer stem cell markers in normal pancreas and pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(1): 69–76.
- [13] Bae KM, Parker NN, Dai Y, et al. E-cadherin plasticity in prostate cancer stem cell invasion [J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(1): 71–84.
- [14] Odoux C, Fohrer H, Hoppo T, et al. A stochastic model for cancer stem cell origin in metastatic colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68, (17): 6932–6941.
- [15] Herpel E, Jensen K, Muley T, et al. The cancer stem cell antigens CD133, BCRP1/ABCG2 and CD117/c-KIT are not associated with prognosis in resected early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(12): 4491–4500.
- [16] Oliva J, French BA, Qing X, et al. The identification of stem cells in human liver diseases and hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 88 (3): 331–340.
- [17] Grozdanov PN, Yovchev MI, Dabeva MD. The oncofetal protein glypican -3 is a novel marker of hepatic progenitor/oval cells [J]. *Lab Invest*, 2006, 86 (12): 1272–1284.
- [18] Song W, Li H, Tao K, et al. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Clin Pract*, 2008, 62 (8): 1212–1218.
- [19] Durnez A, Verslype C, Nevens F, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma: A possible progenitor cell origin [J]. *Histopathology*, 2006, 49(2): 138–151.
- [20] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919–928.
- [21] Shen Y, Cao D. Hepatocellular carcinoma stem cells: origins and roles in hepatocarcinogenesis and disease progression[J]. *Front Biosci: Elite Ed*, 2012, 12(4): 1157–1169.
- [22] Wang XQ, Ongkeko WM, Chen L, et al. Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway [J]. *Hepatology*, 2010, 52 (2): 528–539.
- [23] Wei C, Guo-min W, Yu-jun L. Apoptosis resistance can be used in screening the markers of cancer stem cells[J]. *Med Hypotheses*, 2006, 67(6): 1381–1383.
- [24] Ma S, Chan KW, Guan XY. In search of liver cancer stem cells[J]. *Stem Cell Rev*, 2008, 4(3): 179–192.

(编辑 刘清海)