

绿色荧光蛋白标记的 CY15 瘤细胞眼前房移植瘤 早期转移的观察

聂 莉¹, 李永平¹, 李亮平², 张文忻¹, 张 波¹

(1. 中山大学中山眼科中心 // 眼科学教育部重点实验室, 广东 广州 510060;

2. Max-Delbruck 分子医学中心, 德国 柏林 13092)

摘 要:【目的】观察绿色荧光蛋白(GFP)标记的恶性组织细胞增生症 CY15 细胞在 Balb/c 鼠眼前房生长及全身转移的规律, 探讨 GFP 作为活细胞标记追踪肿瘤细胞生长、转移的优势并初步探讨肿瘤转移的机制。【方法】将携带绿色荧光蛋白的逆转录病毒 MP71- GFP- PRE 转入 CY15 细胞, G418 筛选阳性克隆。20 只 Balb/c 小鼠(20 只右眼), 手术显微镜下每只小鼠眼前房接种 2 μ L 细胞密度为 2.0×10^6 个/mL 的 CY15GFP 细胞悬液。术后 15 d、20 d 和 30 d 分别处死 5 只小鼠在荧光显微镜下观察全身转移情况。采用流式细胞仪分析术后 30 d 处死的另外 4 只小鼠和 4 只对照小鼠外周血单个核细胞中瘤细胞的比率。【结果】稳定表达绿色荧光蛋白的 CY15GFP 细胞基本保持了亲代细胞的特征, 在前房的成瘤率为 100%。术后 15 d 处死小鼠在荧光显微镜下观察可见肝、肺、胃肠壁等多个脏器中有散在的单个荧光点分布, 为转移的单个肿瘤细胞, 这些荧光点在肝脏中分布的数量最多。术后 20 d、30 d 分别处死 5 只小鼠, 发现随着时间的推移这些微小转移灶逐渐增大。流式细胞仪分析术后 30 d 处死的小鼠外周血单个核细胞中瘤细胞的平均比率为 $0.048\% \pm 0.021\%$ 。【结论】绿色荧光蛋白标记瘤细胞后, 利用荧光显微镜能有效地观察到肿瘤发生远距离转移在继发脏器中分布的单个瘤细胞和普通显微镜下无法分辨的微小转移灶, 这些微小转移灶逐渐增大, 为肿瘤转移的克隆起源学说提供了有力的证据。流式细胞仪能准确定量瘤细胞在外周血中的分布情况。

关键词: 恶性组织细胞增生症; 绿色荧光蛋白; 肿瘤转移; 眼

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0414-05

Early Metastasis of CY15 Cell Expressing Green Fluorescent Protein in Anterior Chamber

NIE Li¹, LI Yong-ping¹, LI Liang-ping², ZHANG Wen-xin¹, ZHANG Bo¹

(1. Key Laboratory of Ophthalmology of Ministry of Education//Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Max-Delbruck-Center for Molecular Medicine, 13092 Berlin, Germany)

Abstract:【Objective】To observe the growth and metastatic rule of malignant histocytosis CY15 cell expressing green fluorescent protein inoculated in the anterior chamber of Balb/c mice, and to further explore the superiority of green fluorescent protein as the marker of living cells to trace the growth and metastasis of the tumor cells. On the basis of this, we discussed the mechanism of metastasis preliminarily. 【Methods】MP71- GFP- PRE, a retrovirus vector that contained green fluorescent protein gene, was transferred into CY15 cell line and the cell clones expressing green fluorescent protein steadily selected by means of G418. 2 μ L of CY15GFP cells (2.0×10^6 cells per milliliter) was injected into the anterior chamber in the right eye of 20 Balb/c mice under the operating microscope. Five mice were sacrificed respectively on the 15th, 20th, and 30th day post-operatively to investigate the metastasis under the fluorescence microscope. The ratio of tumor cells in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was analyzed by flow cytometer for four mice killed on the 30th day and four mice as control. 【Results】Malignant histocytosis CY15GFP cell expressed green fluorescence protein steadily and kept the same characters as its parent cell essentially. Neoplasms were displayed in all the mice in the anterior chamber. On the 15th day post-operatively, scattered single tumor cells expressed green fluorescence were observed in many organs under the fluorescence

收稿日期: 2005-08-16

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2003A3020302)

作者简介: 聂 莉(1981-), 女, 内蒙古锡盟人, 硕士; 李永平, 教授, 通讯作者. E-mail: zoc201@yahoo.com

microscope, such as the liver, lung and the digestive tract, etc. And there were the most fluorescent dots in the liver. Five mice were sacrificed respectively on the 20th and 30th day post-operatively which showed the micrometastasis augmented gradually with the time developed. The average ratio of tumor cells in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was 0.048% x 0.021% by flow cytometer analysis in the 30th day group. 【Conclusion】 The single tumor cells and micrometastasis undetectable by ordinary microscope in the metastatic organs could be observed effectively by the fluorescence microscope when the tumor cell CY15 was labeled by green fluorescent protein. That the micrometastasis grew gradually provided potent evidence for the clone origin theory of metastasis. Flow cytometer could be used to quantitate the distribution of tumor cells in the peripheral blood accurately.

Key words: malignant histiocytosis; green fluorescent protein; neoplasm metastasis; eye

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):414-418,434]

恶性组织细胞增生症是一种起病急、预后极差的血液病,瘤细胞CY15是起源于树突状细胞的恶性组织细胞增生症细胞株^[1]。本研究利用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记恶性组织细胞增生症CY15瘤细胞,将表达绿色荧光的瘤细胞接种到Balb/c鼠眼前房,瘤细胞通过血行转移到达全身多个脏器并克隆生长,成功的模拟了眼内肿瘤远距离转移的过程,并利用荧光显微镜观察早期转移脏器中的单个瘤细胞和普通显微镜下无法分辨的微小转移灶,在此基础上初步探讨肿瘤转移的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

恶性组织细胞增生症CY15细胞系由德国Max-Delbruck分子医学中心李亮平博士和Thomas Kammertoens博士提供;胎牛血清(杭州四季青公司);RPMI1640培养基(Gibco);G418(Gibco),MP71-GFP-PRE逆转录病毒体(由Max-Delbruck中心构建);实验动物:20只雌性Balb/c小鼠,鼠龄4-6周,体质量18-23g(中山大学动物实验中心)。

1.2 建立稳定表达绿色荧光蛋白CY15GFP细胞

CY15细胞常规培养于含100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基中(青霉素终浓度为100 U/mL,链霉素终浓度为100 mg/mL)。3 d传代1次,每天观察肿瘤细胞生长情况;将编码GFP的逆转录病毒MP71-GFP-PRE转入CY15细胞,G418筛选抗性克隆,然后在荧光显微镜下标记并挑选GFP表达最明显的克隆,进一步在96孔板中亚克隆。

1.3 检测体外培养的CY15GFP细胞

HE染色观察细胞形态。CY15GFP细胞生长至

约80%融合时置于激光共聚焦扫描显微镜下(型号ZEISS LSM 510 META)观察并记录拍照。瘤细胞在体外的生长速率用生长曲线来表示,分别将 3×10^4 个CY15细胞和CY15GFP细胞接种在24孔板中,加培养液至2 mL/孔,在接种后第2天开始计数细胞,分别计数3个孔细胞数,取平均值,连续计数7 d,绘制生长曲线。根据细胞生长曲线算出群体倍增时间。计算公式:群体倍增时间(t_b) = $(t \times \lg 2) / (\lg N_t - \lg N_0)$, t 为时间点, N_t 为每一时间点的细胞数, N_0 为最初的细胞数。

1.4 建立小鼠CY15GFP细胞眼前房移植瘤

待细胞生长至对数生长期时收集细胞离心,台盼兰染色活细胞占98%以上,用RPMI1640培养液调整细胞悬液浓度至 2.0×10^6 个/mL作为移植用,收集细胞30 min内用于实验。43 g/L的水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,然后在手术显微镜下用微量注射器吸取2 μ L细胞悬液,即 4×10^3 个细胞,从角巩缘前5 mm透明角膜处穿刺进入前房。

1.5 眼内肿瘤生长及全身转移的观察及单个肿瘤细胞计数

将小鼠乙醚吸入麻醉后置于荧光显微镜(德国Zeiss公司,型号Axioplan2 imaging)的载物台上,以波长为488 nm的蓝色光作为激发光,观察眼内肿瘤生长情况,并拍照记录,每周2次。分别在术后15 d、20 d、30 d处死动物,完整取出肺、肝、肾、脾等,将各器官置于清洁培养皿上,在荧光显微镜下观察并记录转移情况。处死小鼠的各个脏器在50倍光镜下随机选取5个视野计数,计算各个脏器中绿色荧光点的平均值,同一批处死的小鼠特定脏器中细胞数以均值 \pm 标准差表示。

1.6 流式细胞仪分析

处死后30 d的4只小鼠和另外的4只对照小鼠,每只鼠取血900 μ L,分成3份,EDTA抗凝,

红细胞裂解液(自行配制: KHCO_3 1.0 g, NH_4Cl 8.3 g, EDTA- Na_2 37 mg; H_2O 1000mL) 裂解 8 min, PBS 洗两遍后用 0.5 mL PBS 重悬, 流式细胞仪(美国 BD 公司)分析外周血中单个核细胞中的瘤细胞比率(即瘤细胞数/总细胞数 $\times 100\%$), 所得数据采用均值 \pm 标准差表示。流式细胞仪激发波长为 488 nm。

1.7 病理切片的制作、HE 染色观察肿瘤细胞

荧光显微镜观察完毕后将各器官分别置于 100 mL/L 中性甲醛内固定, 经脱水、石蜡包埋, 常规切片后行 HE 染色。

1.8 统计学分析

应用 SPSS11.0 软件包对实验数据进行多个样本均数的方差分析和两个独立样本的随机 t 检验, 分析数据采用均值 \pm 标准差表示, 以 $P < 0.05$ 作为统计学有意义的标准。

2 结果

2.1 恶性组织细胞增生症 CY15 细胞的观察

细胞接种于盖玻片后行 HE 染色可见瘤细胞大部分呈圆形, 部分为梭形、多角形, 细胞体积大小相差悬殊, 圆形细胞体积大于梭形细胞, 还可见瘤巨细胞。细胞胞浆丰富, 核大深染, 细胞异型性明显, 核浆比例大, 大部分细胞为单核, 部分细胞为双核, 也可见多核细胞, 核仁明显, 位于核中央, 一个或多个, 染色质呈粗颗粒状。

2.2 稳定表达绿色荧光蛋白的 CY15GFP 细胞的建立

经携带 GFP 的逆转录病毒感染及 G418 筛选后, 获得了数十个抗性克隆, 其中约 20%~30% 的细胞表达绿色荧光蛋白, 荧光显微镜观察肿瘤细胞发绿色荧光。通过亚克隆和有限稀释后再次挑选出 GFP 表达水平较高且均匀的克隆, 其细胞形态、生长速度等与未转染 GFP 的亲代细胞无明显差异。经流式细胞仪分析 GFP 阳性细胞占 98% 以上, 连续传代 110 余代荧光稳定表达。激光共聚焦扫描显微镜观察培养的 CY15GFP 瘤细胞, 可见细胞大小相差悬殊, 激发光照射下呈现均匀的绿色, 说明细胞能表达绿色荧光蛋白(图 1)。GFP 标记后的 CY15 细胞其形态、生长方式等与未转染的亲代细胞间无明显差异, 二者的生长曲线基本一致(图 2), 细胞倍增时间分别是 30 h 和 29 h。

2.3 CY15GFP 细胞在小鼠前房生长的观察

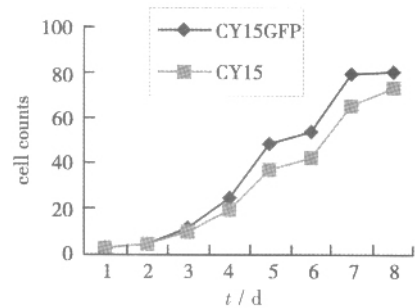


图 2 CY15 细胞和 CY15GFP 细胞生长曲线的比较

Fig.2 Comparison of the growth curve between CY15 and CY15GFP cell

术后连续观察 30 d, 接种的 20 只眼中全部观察到有肿瘤生长, 成瘤率为 100%。术后 3 d 荧光显微镜下观察见前房有散在的绿色荧光颗粒, 为单个肿瘤细胞在前房内生长, 角膜透明, 虹膜血管清晰。随着时间的推移前房发绿色荧光的瘤细胞逐渐增多并且部分克隆生长形成绿色荧光团。术后第 25 d 在荧光显微镜下观察见前房布满弥漫的绿色荧光, 为肿瘤细胞所占据, 部分小鼠角膜也受到肿瘤细胞侵袭, 有大量的新生血管自角膜缘向角膜中央生长(图 3)。

2.4 瘤细胞全身转移的观察

术后 3 d 乙醚麻醉意外死亡一只小鼠, 解剖后在荧光显微镜下观察未见肝、脾、肾等脏器有肿瘤细胞发生转移。术后 15 d 处死 5 只小鼠在荧光显微镜下观察发现肝、肺、肾等有单个的肿瘤细胞转移, 这些单个的肿瘤细胞能清晰的显示绿色荧光, 呈圆形, 在继发脏器中散在分布。其中 5 只小鼠肝脏中均见到散在的单个荧光点(平均每 50 倍视野约 41 个细胞), 瘤细胞大部分位于肝窦内, 少部分位于肝实质内(图 4A), 有 2 只小鼠肝脏中可见瘤细胞形成的荧光团, 每个荧光团由几个或几十个瘤细胞构成(图 4B)。肺脏中也都有单个的肿瘤细胞(平均每 50 倍视野约 8 个细胞), 但未发现瘤细胞克隆生长形成的荧光团。有 2 只小鼠还可见到肾脏、脑和胃肠壁有散在的单个瘤细胞(表 1)。其中 1 只小鼠还可见到单个的瘤细胞粘附在胸壁肌肉组织的血管壁上。术后第 20 d 时处死 5 只小鼠在荧光显微镜下发现肝脏、肺和肾脏中的荧光点较前增多($P < 0.05$), 部分荧光点较前增大, 脾脏中开始出现瘤细胞, 其中有 3 只小鼠肝脏中分别可见到 1~4 个较大的荧光团(图 4C), 2 只小鼠肺脏中也发现 1~2 个较大的荧光克隆团生长。术后

第30天时处死余下的小鼠观察见各个脏器中荧光点的分布趋势与20d时处死的小鼠相近,肝脏、肺脏和肾脏中均可见到肿瘤细胞形成的荧光团块。在发生转移的脏器中肝脏中的绿色荧光点始终分布的最多($P < 0.05$),并随着时间的推移逐渐增多($P < 0.05$)。

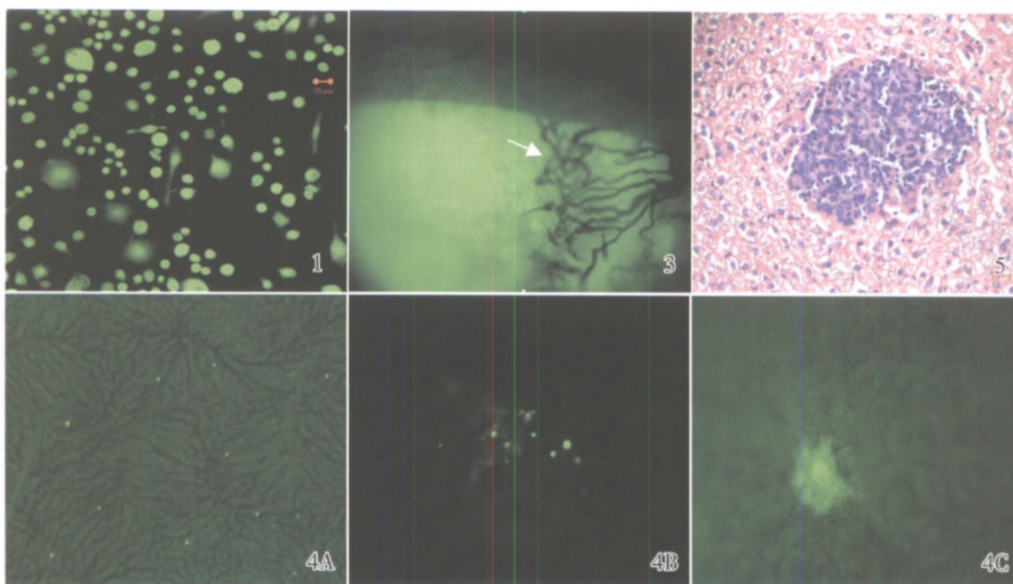


图1 激光共聚焦扫描显微镜观察CY15GFP瘤细胞

图3 荧光显微镜下活体小鼠荷瘤眼球

图4 荧光显微镜下肝脏内的瘤组织

图5 肝脏中的瘤细胞

Fig.1 Confocal scanning microscope picture of CY15GFP ($\times 200$)

Fig.3 The eye bearing tumor of the living mice under the fluorescence microscope ($\times 50$)

Arrow indicates the new vessels of the cornea

Fig.4 Tumor tissue in the liver under fluorescence microscope ($\times 50$)

A: Scattered single tumor cells were observed in the liver; B: Punctiform clones were composed of several tumor cells;

C: Tumor mass displayed green fluorescence

Fig.5 Tumor cells in the liver (HE $\times 400$)

表1 不同脏器中荧光点数目的分布

Table 1 The number of the fluorescent dots distributed in different organs

Organ	15 th	20 th	30 th
Liver	41.4 \pm 7.3 ^{1) 2)}	51.2 \pm 1.3 ^{1) 2)}	55.1 \pm 2.3 ^{1) 2)}
Wall of digestive tract	19.6 \pm 4.2	21.3 \pm 3.5	25.8 \pm 4.1
Lung	8.2 \pm 1.9 ³⁾	14.8 \pm 2.9	15.2 \pm 2.5
Brain	9.0 \pm 2.8	10.6 \pm 1.5	11.2 \pm 3.5
Kidney	4.2 \pm 1.4 ⁴⁾	6.1 \pm 2.6	7.1 \pm 1.9
Spleen	-	4.5 \pm 1.2	4.9 \pm 2.1

1) Compared with each group of 15th, 20th, and 30th day in the liver $P < 0.05$; 2) Compared the dots in the liver with other sites on the 15th, 20th, and 30th day respectively $P < 0.05$; 3) Compared the dots in the lung of 15th day with that of the 20th and 30th day $P < 0.05$; 4) Compared the dots in the kidney of 15th with that of the 20th and 30th day $P < 0.05$

2.5 流式细胞仪分析

经红细胞裂解液裂解红细胞后,获得外周血中的单个核细胞,流式细胞仪分析每只小鼠瘤细胞比率的均数分别为0.075%,0.052%,0.026%,0.039%, $\bar{x} \pm s = 0.048\% \pm 0.021\%$ 。对照组均为阴性,两组比较具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 病理切片结果的观察

HE染色病理切片,根据细胞核的大小、染色质浓密程度、异型性等判断是否为肿瘤细胞。术后第15天处死小鼠眼球石蜡包埋切片观察可见前房有大量肿瘤细胞生长,细胞体积大,排列疏松,与晶体前囊粘连,虹膜为肿瘤细胞浸润,结构不清,瘤细胞部分向前侵犯角膜内皮,并向角膜深层浸润,房角有少量瘤细胞,肿瘤细胞也可以向后浸润生长,玻璃体腔可见散在分布的瘤细胞。术后20d处死小鼠,可见前房瘤细胞较前增多,角膜基质浅中层可见大量新生血管腔,虹膜结构紊乱,房角大量瘤细胞聚集,并破坏小梁和睫状体,视网膜神经纤维层也出现了瘤细胞。肝脏内见肿瘤细胞

呈片状、巢状浸润生长,瘤细胞排列较紧密,瘤体由圆形及椭圆形细胞组成,细胞体积大,大小不一,胞浆丰富,核大深染,核分裂像多见(图5)。肝脏切片未发现典型的单个瘤细胞。肺脏、肾脏、脾脏等组织中瘤细胞也都呈片状、巢状浸润生长。

3 讨论

绿色荧光蛋白是活细胞的理想标记物^[2],它为揭示肿瘤细胞的侵袭转移规律提供了简便、直观、有效的工具。有学者将 GFP 标记的肿瘤细胞接种在实验动物脾脏、门静脉、舌或爪垫等部位^[3-5],观察肿瘤转移情况,能直观的评价肿瘤在体内的早期转移情况,尤其是显示单个的瘤细胞和普通显微镜下无法观察到的微小转移灶^[6]。

目前用来检测肿瘤微小转移灶的方法有免疫组织化学、流式细胞仪分析技术、逆转录-聚合酶链式反应和荧光显微镜等^[7]。流式细胞仪可以采用针对肿瘤细胞标志物的抗体结合荧光物质如异硫氰酸荧光素 FITC 等标记肿瘤细胞,然后用流式细胞仪进行分析。本实验用绿色荧光蛋白标记瘤细胞 CY15,当瘤细胞发生全身转移后血循环中必定有少量的转移的瘤细胞,我们将红细胞裂解后流式细胞仪分析外周血单个核细胞中瘤细胞的比率,在术后 30 d 处死的 4 只小鼠中,这一比率的均数为 0.048%,此方法简便而又相对准确。也有文献报道用 Western blot 和 Northern blot 法分别可以在 1 mg 肝组织中最少定量 1000 个和 1250 个 EGFP 标记的瘤细胞^[3]。

肿瘤转移除表现在一般细胞增殖外,还包括肿瘤新生血管形成、瘤细胞脱落进入脉管系统、在血液中循环及运动和在继发组织器官定位生长等一系列复杂的过程^[9]。其中瘤细胞在继发脏器定位生长这一环节至关重要,了解瘤细胞在继发脏器的生长机制为阻止肿瘤转移提供了科学依据^[9]。Talmadge 利用放射免疫自显影技术分析了皮肤黑色素瘤在肺转移灶的核型,发现各孤立转移瘤的绝大多数异常标记染色体类型相同,这提示转移瘤具有克隆起源,各个转移灶是由单个细胞克隆增殖形成的^[10]。后来又有学者将绿色荧光蛋白标记的肿瘤细胞注射到 SCID 鼠爪垫下,也发现肺转移灶由发绿色荧光的瘤细胞克隆形成^[4]。我们将 GFP 标记的肿瘤细胞 CY15 注入小鼠前房后大约

15 d, 荧光显微镜下发现转移早期全身多个脏器中均有发绿色荧光的单个瘤细胞,此时个别瘤细胞在转移脏器中形成绿色荧光团。随着时间的发展,荧光团逐渐增多,转移脏器中的单个瘤细胞部分克隆生长形成由几个或几十个瘤细胞构成的荧光团。这一现象也显示肿瘤发生转移后在继发脏器中的生长是克隆性的,即每个转移灶是由单个细胞克隆增殖形成的。

不同来源的肿瘤细胞有其容易发生转移的特定脏器,传统上被称为肿瘤转移的器官选择性,例如前列腺癌多转移到骨、眼脉络膜黑色素瘤多转移到肝脏等。本实验所有小鼠无一例外的发生肝转移,而且不同时间点处死的小鼠均在肝脏中分布的瘤细胞数量最多,推测这可能与 CY15 瘤细胞的转移器官选择性有关。肿瘤细胞表型的差异性和继发器官微环境特点共同影响着瘤细胞的器官选择性。CY15GFP 瘤细胞在肝脏中表现出的转移器官选择性其具体机制还有待于进一步探讨。

在转移的早期阶段,实验小鼠全身多个脏器中均能观察到单个散在的肿瘤细胞和肉眼不能发现的微小转移灶,这一结果提示临床上对于一些尚未发生明显转移症状的早期肿瘤病人在局部治疗的同时采取化疗或其他手段杀灭潜伏的转移瘤细胞的必要性。有研究表明微小转移灶对化疗药物的敏感性要远远优于肉眼可见的大的转移病灶^[11],故肿瘤处于亚临床微小病灶时,是化疗的有利时机,即全身性辅助化疗越早越好。

本研究所建立的转移模型,模拟了眼内全身远距离转移的过程。我们从无血管的透明角膜注入瘤细胞进入前房,避免了瘤细胞直接进入血管,瘤细胞通过房角和眼内组织血管进入血液循环,发生全身远处转移这一模型无疑也是研究眼内肿瘤自发性转移机制和相关药物干预及基因治疗实验的良好模型。

参考文献:

- [1] KAMMERTOENS T, WILLEBRAND R, ERDMANN B, et al. CY15, a malignant histiocytic tumor that is phenotypically similar to immature dendritic cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(7): 2560-2564.
- [2] CHENG L, FU J, TSUKAMOTO A, et al. Use of green fluorescent protein variants to monitor gene

(下转第 434 页 to page 434)

- [4] 张 菊, 高艳娥, 赵锦荣. HPV 检测在宫颈癌预警和筛查中的研究[J]. 国外医学妇产科分册 2003, 30(5): 319- 322.
- [5] REMMERBACH T W, BRINCKMANN U G, HEMPRICH A, et al. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets [J]. J Clin Virol, 2004, 30(4): 302- 308.
- [6] RIETHMULLER D, GAY C, BERTRAND X, et al. Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by Hybrid Capture II and polymerase chain reaction[J]. Diagn Mol Pathol, 1999, 8(3):157- 164.
- [7] CAMARA G N, CERQUEIRA D M, OLIVEIRA A P, et al. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003, 98(7): 879- 883.
- [8] GONZALEZ - LOSA MDEL R, ROSADO - LOPEZ I, VALDEZ - GONZALEZ N, et al. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients[J]. J Clin Virol, 2004, 29(3):202- 205.
- [9] PERRONS C, KLETER B, JELLEY R, et al. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA by SPF10 and MY09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic [J]. J Med Virol, 2002, 67(2):246- 252.
- [10] HERRERO R, CASTLE PE, SCHIFFMAN M, et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica[J]. J Infect Dis, 2005, 191(11): 1787- 1799.
- [11] 王金桃,高尔生. HPV 感染与宫颈癌关系研究进展[J]. 国外医学妇幼保健分册,2003,14(6):399- 403.
- [12] POLJAK M, BRENCIC A, SEME K, et al. Comparative evaluation of first - and second - generation digene hybrid capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37 (3):796- 807.

(编辑 张恩健)

(上接第 418 页 from page 418)

- transfer and expression in mammalian cells [J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(5) :606- 609.
- [3] STURM J W, KEESE M A, PETRUCH B, et al. Enhanced green fluorescent protein - transfection of murine colon carcinoma cells: key for early tumor detection and quantification [J]. Clin Exp Metastasis, 2003,20(5):395- 405.
- [4] YAMAMOTO N, YANG M, JIANG P, et al. Determination of clonality of metastasis by cell - specific color - coded fluorescent - protein imaging[J]. Cancer Res, 2003,63(22):7785- 7790.
- [5] SHINTANI S, MIHARA M, NAKAHARA Y, et al. Lymphnode metastasis of oral cancer visualized in liver tissue by green fluorescent protein expression [J]. Oral Oncology, 2002, 38(7): 664- 669.
- [6] YAMAMOTO N, YANG M, JIANG P, et al. Color coding cancer cells with fluorescent proteins to visualize in vivo cellular interaction in metastatic colonies [J]. Anticancer Res, 2004, 24(6):4067- 4072.
- [7] 蒋扬富. 肿瘤微小转移及肿瘤休眠[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1998, 25(4):219- 222.
- [8] CHAMBERS A F, MACDONALD I C, SCHMIDT E E, et al. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy [J]. Cancer Metastasis Rev, 1995, 14(4):279- 301.
- [9] 曾益新. 肿瘤学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 248- 265.
- [10] FIDLER I J, TALMADGE J E. Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell[J]. Cancer Res, 1986, 46(10):5167- 5171.
- [11] NAKANISHI H, ITO S, MOCHIZUKI Y, et al. Evaluation of chemosensitivity of micrometastases with green fluorescent protein gene - tagged tumor models in mice[J]. Methods Mol Med, 2005, 111(6):351- 362.

(编辑 刘清海)