

## 汉族人肾透明细胞癌肺转移小鼠模型的建立及肺转移细胞亚株的筛选

翟羽佳<sup>1</sup>, 谭晓洁<sup>1</sup>, 林丽萍<sup>1</sup>, 侯建国<sup>2</sup>, 武旗<sup>2</sup>, 常文军<sup>1</sup>, 马立业<sup>3</sup>, 姚明<sup>4</sup>, 曹广文<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

3. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

4. 上海肿瘤研究所实验动物中心, 上海 200003

**[摘要]** **目的:**建立可稳定传代的肾透明细胞癌小鼠肺转移模型,并在此基础上初步筛选出肾透明细胞癌特异性鼠肺转移细胞亚株,为后续研究奠定基础。**方法:**选用本实验室前期建立的肾透明细胞癌细胞株 RCC05-TXJ,体外扩增培养制成细胞悬液后注射于 NOD-SCID 小鼠颈背部皮下,成瘤后取出瘤组织接种于另外 NOD-SCID 小鼠的肾包膜下,待有肉眼可见瘤块后,处死小鼠并取出肿瘤组织接种于新 NOD-SCID 小鼠的肾包膜下,反复数轮,直至出现稳定的鼠肺转移模型。此时取模型鼠肺转移组织,一部分继续接种于新鼠肾包膜下,反复数轮,尝试以转移组织诱导肺转移;另一部分进行原代培养,细胞经体外扩增纯化后制成悬液接种于新鼠肾包膜,数轮循环至产生肺转移,筛选能产生稳定鼠肺转移的细胞亚株。整个筛选过程均观察记录原位成瘤、淋巴及肺转移形成情况,并对肿瘤组织进行病理组织学观察及 CA9(肾癌标志)、CD133(干细胞标志)表达检测。

**结果:**以 RCC05-TXJ 细胞株接种所致 NOD-SCID 小鼠颈背部皮下肿瘤组织作为移植瘤材接种鼠肾包膜在第 2 轮即出现鼠肺转移,此后 3~6 轮以鼠肺转移组织移植肾包膜下,均能成功诱导转移。以鼠肺转移组织原代培养 RCC 细胞均获成功,第 6 轮原代培养细胞扩增纯化后制成的细胞悬液(RCC05-TXJ-L)接种于鼠肾包膜下,出现特异性肺转移,重复 2 轮实验结果稳定。RCC05-TXJ-L 细胞具有生长速度快(传代时间约为 2 d)、原位成瘤时间短(1 周左右)、接种后转移性较强、CA9 及 CD133 表达升高等特点。**结论:**RCC05-TXJ 在 NOD-SCID 小鼠体内多轮反复筛选可建立稳定的肾细胞癌鼠肺转移动物模型;在此基础上筛选出的肺转移性细胞亚株 RCC05-TXJ-L 可稳定诱导 NOD-SCID 鼠产生肺部转移。

**[关键词]** 肾细胞癌;肺转移;动物模型;肺转移细胞亚株

**[中图分类号]** R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1446-05

### Establishing a lung metastasis mouse model of clear cell renal cell carcinoma and screening of lung metastasis sub-cell line

ZHAI Yu-jia<sup>1</sup>, TAN Xiao-jie<sup>1</sup>, LIN Li-ping<sup>1</sup>, HOU Jian-guo<sup>2</sup>, WU Qi<sup>2</sup>, CHANG Wen-jun<sup>1</sup>, MA Li-ye<sup>3</sup>, YAO Ming<sup>4</sup>, CAO Guang-wen<sup>1\*</sup>

1. Department of Epidemiology, Faculty of Health Service, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

3. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

4. Center of Experimental Animals, Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200003

**[ABSTRACT]** **Objective:** To establish a lung metastasis mouse model of clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) and screen for lung metastasis CCRCC cell line, so as to lay a foundation for future study. **Methods:** RCC05-TXJ, a CCRCC cell line established by our lab, was used in the present study. The cells were proliferated and the cell suspension was subcutaneously injected into the NOD-SCID mice. The newly-formed tumors were transplanted into the renal capsule of NOD-SCID mice (*in situ*), and the formed tumors were harvested and again transplanted into NOD-SCID mice. A stable mouse model with CCRCC lung metastasis was established following several cycles of the transplantation. This transplantation cycle was repeated until the development of stable lung metastasis. The lung metastasis tissues were then injected into renal capsule for several cycles to induce the lung metastasis. The metastasis tissues were also primary cultured and proliferated and the cell suspensions were injected into renal capsule until the development of lung metastasis. The sub-cell lines which could stably produce lung metastasis were screened. During the screening, the *in situ* tumor information, lymphatic and pulmonary metastasis were all recorded in detail.

**[收稿日期]** 2008-03-07 **[接受日期]** 2008-09-02

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30571609, 30873041). Supported by National Natural Science Foundation of China (30571609, 30873041).

**[作者简介]** 翟羽佳, 硕士. E-mail: zhaiyujia.1982@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070420, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

Immunohistochemistry analyses were used to examine the expression of CA9 (a marker of renal cells) and CD133 (a marker of stem cells) on the metastatic CCRCC cells. **Results:** The lung metastasis was observed in the second cycle of the *in situ* transplantation of RCC05-TXJ in NOD-SCID mice. When the metastatic lung carcinoma tissues were used for *in situ* transplantation, lung metastasis was successfully established during the 3-6 cycles. CCRCC cells were successfully cultured with lung metastatic tissues, and the cell suspension of the passage 6 cells caused lung metastasis after implanted in the renal capsule. The result was stable in two repeated cycles. The lung metastatic RCC05-TXJ-L cells grew fast (average passage time was 2 days), and had a short *in situ* tumor-forming time (1 week). They also had a strong potential for lung metastasis and high expression of CA9 and CD133. **Conclusion:** Repeated *in situ* transplantation of RCC05-TXJ can be used to establish stable lung metastasis mice model of CCRCC. The selected RCC05-TXJ-L sub-cell line can stably induce lung metastasis in NOD-SCID mice.

**[KEY WORDS]** renal cell carcinoma; lung metastasis; animal model; lung metastasis sub-cell line

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1446-1450]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系统常见的恶性肿瘤,其发病率近年来呈明显上升趋势,且预后较差<sup>[1]</sup>。30%的 RCC 患者在确诊时已出现转移,30%的原位肿瘤患者在根治性切除术后 5 年内发生转移<sup>[2]</sup>,其转移常见部位是肺、淋巴系统、骨、肝脏以及脑组织<sup>[3]</sup>。肾透明细胞癌是 RCC 中较常见的一种类型,其主要向肺、骨等组织转移,目前尚不清楚其确切的转移机制,针对其的药物研发也缺乏有效的评价手段。建立肾透明细胞癌肺转移实验动物模型是相关研究的有力工具之一,但目前仍然缺乏稳定的中国汉族人肾透明细胞癌肺转移动物模型。我们的前期研究<sup>[4-5]</sup>成功建立了肾透明细胞癌原位肿瘤转移裸鼠模型,并采用中国汉族人肾透明细胞癌组织标本成功建立了两个转移潜能不同的肾透明细胞癌细胞系(RCC05-TXJ、RCC05-ZYJ)。本研究在此基础上,进一步尝试建立稳定的肾透明细胞癌肺转移动物模型,筛选合适的肺转移细胞亚株,为后续研究奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 细胞来源及细胞悬液的制备 实验细胞来源于本室前期研究<sup>[4]</sup>建立的汉族人肾透明细胞癌细胞系 RCC05-TXJ 第 12 代细胞,以 20% 灭活胎牛血清(杭州四季青生物技术公司)的 RPMI 1640 培养液(Gibco 生物制品公司)培养,培养条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub>;调整其状态,镜下观察肿瘤细胞生长状况良好,取对数生长期细胞,0.25% 胰酶消化收集,离心清洗 6 min,弃上清液,以 D-hanks 洗涤 1 遍,以 RPMI 1640 液稀释至细胞密度为 1×10<sup>7</sup>/ml 的单细胞悬液。

1.2 实验动物来源及移植瘤组织的获取 雄性 NOD-SCID 小鼠,4~5 周龄,体质量 20~25 g,由上海肿瘤研究所动物实验中心提供,SPF 级饲养环境中饲养。取 3 只 NOD-SCID 小鼠,颈背部皮肤常规 75% 乙醇消毒,将 0.2 ml 制备好的肿瘤细胞悬液

(密度为 1×10<sup>7</sup>/ml)注射于 NOD-SCID 小鼠颈背部皮下,接种后的小鼠置于 SPF 环境内继续饲养。肉眼观察成瘤约 1 cm<sup>3</sup> 时处死小鼠,剥离肿瘤组织。经病理证实均为肾透明细胞癌后用 4℃ 无菌 RPMI 1640 培养液洗涤,裁剪成直径约 1 mm 组织块,冰上放置备用。

### 1.3 稳定肺转移动物模型的建立及特异转移亚株的筛选

1.3.1 肿瘤接种 取 NOD-SCID 小鼠,按 70~80 μl/10 g 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠,约 5~10 min 小鼠进入麻醉状态,即可开始手术。肾区 75% 乙醇消毒,腰背部纵切口,肾包膜横切口,将适量备用肿瘤组织移植于肾包膜下。术后继续饲养于 SPF 环境下,每日 2 次观察 NOD-SCID 小鼠肾区,了解移植瘤的生长情况和 NOD-SCID 小鼠的活动状态。待肉眼可见小鼠肾区成瘤约 1 cm<sup>3</sup> 时,脱颈处死小鼠并解剖。

1.3.2 术后大体观察 观察移植瘤生长状况及其周围脏器是否受累;有无肾门、肺门淋巴结转移;肺表面有无转移灶(以上均以病理结果为确诊依据)。待出现肺转移倾向后,在无菌状态下取出一部分肺转移组织,直接接种于小鼠肾包膜下,经多轮小鼠间传代至出现稳定的肺转移;一部分肺转移肿瘤组织进行细胞培养并取细胞悬液接种于肾包膜下,经多轮筛选,至筛选出特异性肺转移的细胞亚株,应用该亚株诱导稳定的肾透明细胞癌肺转移小鼠模型。

1.3.3 组织学观察 每轮结束后取 NOD-SCID 小鼠肺、肝、脾、肿大的淋巴结及其他异常组织行 H-E 染色,观察组织学变化;每轮肺转移灶培养细胞行免疫组化染色,观察 CA9 及干细胞较特异性的细胞表面标志物 CD133<sup>[6]</sup> 的表达。

1.3.4 流式细胞仪检测 分别取第 6 轮实验动物肺转移灶与肾原位肿瘤培养的细胞用流式细胞仪检测细胞表面 CA9 及 CD133 的表达情况并进行分析,流式结果均重复 3 次。

1.4 统计学处理 利用 SPSS 12.0 进行统计分析, 计量资料主要采用两样本均数  $t$  检验, 计数资料采用  $\chi^2$  检验, 检验水准为  $\alpha=0.05$ 。应用 Epi Info 进行成瘤时间趋势检验。

## 2 结果

2.1 各轮成瘤情况 将皮下成瘤的瘤材移植肾包膜下作为第 1 轮, 成瘤后肾原位瘤行肾包膜下种植。第 2 轮肉眼观察肾周成瘤约  $1\text{ cm}^3$  时, 处死小鼠, 发

现肺部白色斑块。取该组织一部分肾包膜下种植, 至第 4 轮时以肺转移组织接种新鼠肾包膜下时可诱导形成稳定的人肾细胞瘤肺转移; 取肺转移灶行细胞培养后接种肾包膜也可诱导肺转移。重复 2 轮转移倾向均稳定。总结 6 轮实验可以发现, 随着体内传代次数的增加, RCC05-TXJ 诱导原位成瘤及肺转移时间明显缩短 ( $P_{\text{trend}} < 0.05$ ), 出现恶液质的小鼠数量增加、出现时间也明显缩短, 且肾脏的成瘤率均为 100% (表 1)。

表 1 第 1~6 轮组织肾包膜下种植成瘤情况

Tab 1 Tumor formation of the first to sixth cycles of *in situ* transplantation

Cycles	Origin of tumor for <i>in situ</i> inoculation	Time of tumor formation* t/d	Rate of tumor formation <i>in situ</i>	Lymph node enlargement	Tumor focus in lung	Bloody ascites	Dyscrasia
1	s. c.	40	3/3	—	0/3	0/3	0/3
2	Kidney	39	6/6	+	4/6	4/6	2/6
3	Lung	27	4/4	+	3/4	3/4	2/4
4	Lung	20	4/4	+	2/4 $\Delta$	1/4	2/4
5	Lung	12	3/3	+	3/3	0/3	3/3
6	Lung	8	3/3	+	3/3	0/3	3/3

\*  $P_{\text{trend}} < 0.05$ ;  $\Delta$  Two mice died at the night without harvesting fresh tumor samples. The tumor size was about  $500\text{ mm}^3$

2.2 大体观察结果 RCC05-TXJ 注射的 NOD-SCID 小鼠皮下成瘤后, 培养原代细胞以肾包膜下注射法进行鼠间传代, 每轮均可见肾包膜下成瘤, 表面不光滑, 最大直径  $1.5\text{ cm}$ , 肾包膜受累, 与周围肠管及脾脏粘连。自第 2 轮起见肾包膜破坏严重, 肾组织被肿瘤侵蚀程度不同 (严重时可被完全侵蚀), 出现腹壁淋巴结及腹主动脉淋巴结肿大, 肉眼见肺表面弥漫性斑块。在第 3~4 轮移植中发现各有 2 只 NOD-SCID 小鼠出现血性腹水。各轮 NOD-SCID 小鼠的肝脏、脾脏、心脏、骨均未发现明显转移。

2.3 组织学观察结果 每轮 NOD-SCID 小鼠解剖后将怀疑为肿瘤的组织送病理检验。病理证实小鼠间传代中每轮所形成的肾原位肿瘤均为肾透明细胞癌。自第 2 轮发现腹主动脉旁淋巴结肿大, 但病理无法证实为转移; 在肺叶发现肉眼可见的斑块, 病理也无法确证。第 3 轮病理证实局部转移、淋巴结转移及肺转移均为肾透明细胞癌 (图 1)。

2.4 稳定肺转移细胞亚株的形态学特性及致癌特性 经过 4 个轮次的肾包膜下组织接种后, RCC05-TXJ 在小鼠体内可以诱导稳定的肺转移, 此时培养肺内转移组织得到的细胞株也可产生稳定的肺转移, 标记为 RCC05-TXJ-L (图 2A)。该株细胞体积较 RCC05-TXJ 低代细胞 (图 2B) 明显变小, 与 RCC05-TXJ 高代细胞 (图 2C) 的体积和形态基本一

致, 与肾原位培养的 RCC05-TXJ-R (图 2D) 体积形态无明显差异。但与未筛选的 RCC05-TXJ 及小鼠体内筛选后的肾原位株相比, RCC05-TXJ-L 生长速度加快, 传代时间约为 2 d。培养中发现 RCC05-TXJ-L 具有贴壁快、消化快的特点 (贴壁时间  $< 1\text{ h}$ , 消化时间  $< 2\text{ min}$ )。该细胞亚株制成悬液后注射于小鼠肾包膜下可诱导肺转移, 重复验证 2 轮结果较稳定, 原位成瘤时间约为 1 周。40 d 后小鼠出现恶液质, 肾组织破坏严重, 周围脏器粘连, 肺部出现转移。而 RCC05-TXJ-R 致转移性极差。

2.5 稳定肺转移细胞亚株免疫组化及流式细胞仪检测结果 免疫组化染色结果表明, 小鼠肺转移灶培养的 RCC05-TXJ-L 细胞中 MN/CA9 呈阳性 (图 3A), 而且 CD133 表达也阳性 (图 3B)。流式细胞仪检测结果表明, CA9 在相同培养代数 (10 代) 的 RCC05-TXJ-L 中表达率为  $(14.35 \pm 1.20)\%$ , RCC05-TXJ-R 为  $(12 \pm 2.26)\%$ , 表达有所升高, 但无统计学差异; CD133 在 RCC05-TXJ-L 中表达率为  $(37.95 \pm 4.21)\%$ , RCC05-TXJ-R 为  $(26.5 \pm 2.36)\%$ , CD133 表达明显升高, 有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

目前肿瘤转移理论仍然是基于转移瘤突变前体细胞存在于原发癌中这一被大多数肿瘤学家接受的

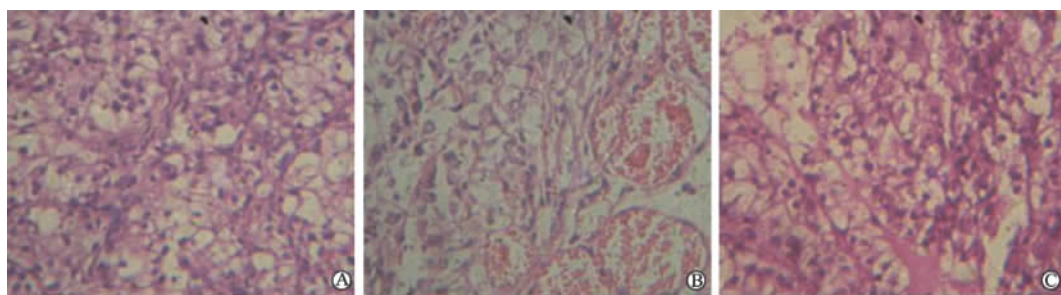


图 1 种植后第 3 轮小鼠性腺(A)、淋巴结(B)和肺(C)转移组织病理学观察

Fig 1 Pathology observation (H-E staining) of metastasis in genital gland (A), lymph node(B) and lung(C) at the 3<sup>rd</sup> cycle of transplantation

Original magnification:  $\times 100$

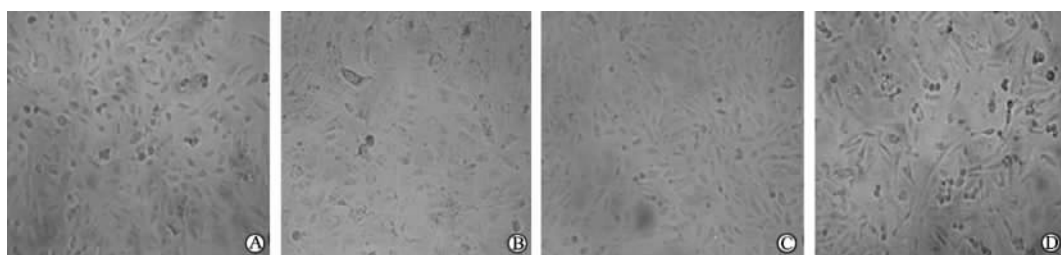


图 2 细胞形态学观察

Fig 2 Cell morphology observation

A:RCC05-TXJ-L; B:RCC05-TXJ at the 12<sup>th</sup> passage; C:RCC05-TXJ at 88<sup>th</sup> passage; D:RCC05-TXJ-R. Original magnification:  $\times 100$

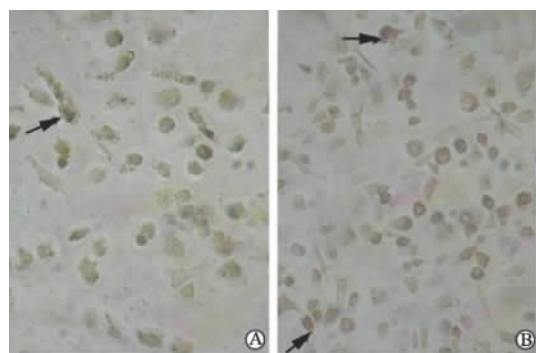


图 3 RCC05-TXJ-L 细胞的 CA9(A)、CD133(B)免疫组化结果

Fig 3 Immunohistochemistry of CA9(A) and CD133(B) in RCC05-TXJ-L cells (DAB staining, arrows)

Original magnification:  $\times 300$

基本原理<sup>[7]</sup>。肾癌发展的不同阶段,细胞周期调节、凋亡、黏附活动以及新血管生成有关的基因表达谱明显不同<sup>[8]</sup>。体内移植模型是肿瘤实验研究的主要方法之一。以往研究<sup>[5]</sup>一般采用无 T 细胞裸鼠建立人肾癌移植模型,这种模型虽然在一定程度上保持了人肾癌的生物特性,但有 B 细胞和巨噬细胞代偿,成瘤率受影响。NOD-SCID 小鼠是一种先天性 T 细胞和 B 细胞双重免疫缺陷动物,不仅可成功

移植人肿瘤细胞,而且可利用人类有关免疫细胞进行免疫功能重建,适合于研究人类免疫细胞和肿瘤的关系,是较好的活体测试系统。目前国内外已有用 NOD-SCID 小鼠重建人免疫系统并移植人类肿瘤成功的报道<sup>[9-11]</sup>。

移植瘤在免疫缺陷动物体内连续传代,能保持原发肿瘤生物学特点。在传代时,首先选择的是新鲜肿瘤组织,这部分组织中生长周期短和生长活跃的细胞的比例大,易于种植。本实验选用转移性肾癌的低代数细胞先进行皮下移植,成瘤后进行肾包膜下移植形成转移后用转移灶行体内传代,并采取一系列措施提高种植转移成功率。具体措施包括:(1)国内外实验室大多使用细胞系,但在细胞建系过程中细胞的一部分生物学特性有所改变,低代数肿瘤细胞能最大限度保留肿瘤细胞群的自然属性。RCC05-TXJ 组织来源为肾透明细胞癌骨转移灶,已具有转移能力,其透过细小血管壁经血途径转移的能力较强。(2)肾肿瘤的异质性较高,直接选用新鲜的肿瘤组织或单纯以组织培养的原代细胞悬液种植动物皮下或进行原位移植的方法会因为恶性程度低或肿瘤细胞含量较少或细胞状态差等问题导致成瘤率较低。因此,本研究借鉴 Yoshimasu 等<sup>[12]</sup>的方法,以细胞悬液先进行皮下移植,成瘤后用肿瘤组织

块取代细胞悬液的组织原位移植模型。与细胞原位移植模型或单纯组织移植模型相比,该方法能保持肾癌细胞本身多样性,移植材料具备恶性肿瘤原有的组织结构,大大提高了接种成功率,其动物模型原位成瘤率可高达100%,转移率也有所提高。

本研究结果发现,所建的肺转移动物模型具有如下特点:原位成瘤率为100%;具有特异的肺转移倾向;局部淋巴结受累较多;随着接种代数的增加,肺转移成功率逐渐升高,成瘤潜伏期缩短,转移出现时间也缩短,其中第6轮仅8d即已成原位瘤,2周已出现转移;对动物进行尸检,连续两轮共3只NOD-SCID小鼠均出现血性腹水。上述结果提示:在动物体内筛选过程中,具有转移潜能的细胞存在逐渐富集;同种鼠系的体内环境能使移植组织缩短移植适应潜伏期,这可能是人肾癌移植传代过程中生长速度加快的原因之一;血性腹水多因癌结节破裂出血所致,但尸检中未发现肾原位肿瘤破裂,考虑因肿瘤细胞脱落引起腹腔种植转移所致。

CD133是干细胞较特异性的标志物之一<sup>[13-14]</sup>,在结肠癌、基底细胞癌、乳腺癌及胰腺癌<sup>[15]</sup>中均有异常表达;CA9广泛表达于肾细胞癌中并且有望作为其恶性程度的标志<sup>[16]</sup>。本研究在建立动物模型的过程中分离培养了特异性肺转移的肾癌细胞株RCC05-TXJ-L与肾癌原位株RCC05-TXJ-R,经流式细胞仪分析发现,与RCC05-TXJ-R相比,高侵袭性RCC05-TXJ-L细胞CA9表达升高不明显,但CD133的表达显著升高。结果提示动物体内高转移性细胞株的筛选过程可能是分化及转移能力较强干细胞的富集过程,这部分转移性强的细胞具有易消化、易贴壁、分化快等特性,使得这类细胞在动物体内更易从原发灶脱落引起腹腔种植或导致腹水的形成,通过某些途径到达靶器官迅速黏附形成转移。

本实验建立的人肾透明细胞癌肺转移模型较好地模拟了肾透明细胞癌的人体腹腔生长环境,符合人肾透明细胞癌的生物特点,可为探索人肾透明细胞癌肺播散途径、腹水的发生机制和客观评价治疗手段的效果提供合适的动物模型。此外,由于在临床手术中获得肾癌转移组织非常困难,本研究应用动物模型成功地分离出肺转移细胞亚株并用于建立肺转移动物模型,发现该方法培养肾细胞癌肺转移亚株比直接应用临床新鲜肾癌转移组织培养更加简便易行,比通过体内传代长期获得动物转移模型的方法更加简便、经济、稳定,且不受其他条件制约。但本研究仍存在一定的局限:经6轮移植筛选出的细胞是否能够成为细胞亚株证据不足,无法确定建

立亚株必须筛选的次数;该方法的稳定性仍需进一步的实验验证。

## [参考文献]

- [1] Cohen H T, McGovern F J. Renal-cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 2477-2490.
- [2] Lam J S, Leppert J T, Figlin R A, Beldegrun A S. Role of molecular markers in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma[J]. *Urology*, 2005, 66(5 Suppl): 1-9.
- [3] Vidart A, Fehri K, Pfister C. Unusual metastasis of renal carcinoma[J]. *Ann Urol (Paris)*, 2006, 40: 211-219.
- [4] 翟羽佳, 谭晓洁, 侯建国, 肖建如, 徐丹枫, 余永伟, 等. 汉族人肾透明细胞癌细胞系的建立[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 479-484.
- [5] 张玉侠, 曹广文, 温宗梅, 张明霞, 蔡春晓, 谭晓洁, 等. 两种方法建立人肾透明细胞癌裸鼠原位移植转移模型及其比较[J]. *安徽医科大学学报*, 2005, 40: 399-402.
- [6] Richardson G D, Robson C N, Lang S H, Neal D E, Maitland N J, Collins A T. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 16): 3539-3545.
- [7] Klein C A, Blankenstein T J, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein N H, et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer[J]. *Lancet*, 2002, 360: 683-689.
- [8] Calvo A, Xiao N, Kang J, Best C J, Leiva I, Emmert-Buck M R, et al. Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in mouse and human tumors[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 5325-5335.
- [9] Gyory F, Mezosi E, Szakall S, Bajnok L, Varga E, Borbely A, et al. Establishment of the hu-PBL-SCID mouse model for the investigation of thyroid cancer[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2005, 113: 359-364.
- [10] Xie X, Ye D F, Chen H Z, Lu W G, Fu Y F, Cheng B, et al. Effect of interleukin-7 gene transfection into ovarian carcinoma cell line SKOV3 *in vitro* and *in vivo*[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92: 578-585.
- [11] 黄嘉凌, 刘燕艳, 刘然义, 方壮伟, 申全, 吕明德. 腹腔注射人淋巴细胞建立人肝癌PBL-SCID嵌合模型[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2005, 11: 121-124.
- [12] Yoshimasu T, Sakurai T, Oura S, Hirai I, Tanino H, Kokawa Y, et al. Increased expression of integrin alpha3beta1 in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line[J]. *Cancer Sci*, 2004, 95: 142-148.
- [13] Zhou L, Wei X, Cheng L, Tian J, Jiang J J. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line[J]. *Laryngoscope*, 2007, 117: 455-460.
- [14] Woodward W A, Sulman E P. Cancer stem cells: markers or biomarkers[J]? *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27: 459-470.
- [15] Hermann P C, Huber S L, Herrler T, Aicher A, Ellwart J W, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1: 313-323.
- [16] Al-Ahmadie H A, Alden D, Qin L X, Olgac S, Fine S W, Gopalan A, et al. Carbonic anhydrase IX expression in clear cell renal cell carcinoma: an immunohistochemical study comparing 2 antibodies[J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32: 377-382.