

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01055

· 论 著 ·

人去唾液酸糖蛋白受体单克隆抗体制备及其初步应用

李 军^{1,2}, 陈 磊², 孙 斌², 张 妤², 钱海华², 殷正丰^{2*}

1. 苏州大学医学部临床医学院, 苏州 215006

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤研究室, 上海 200438

[摘要] **目的** 制备人去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的小鼠单克隆抗体,并应用该抗体检测 ASGPR 在细胞系和组织中的表达。**方法** 对 ASGPR H1 大亚基进行序列分析,选取 ASGPR1 全长序列制备免疫原。通过 RT-PCR 合成 ASGPR1 cDNA,构建 ASGPR1 表达重组载体,在 *E. coli* BL21 中表达后纯化,获得目的抗原。应用传统融合杂交瘤技术制备小鼠单克隆抗体,常规检测单抗亚类和效价,竞争抑制实验鉴定单抗特异性。用流式细胞术和免疫组织化学法分别检测 ASGPR 在多种肝源性与非肝源性细胞系以及多种肝组织中的表达。**结果** 制备的单克隆抗体亚型为 IgG1,效价达 1 : 12 800。竞争抑制实验结果显示该单抗具有很好的 ASGPR 结合特异性,而且识别的肽段位于 ASGPR 胞外段。流式细胞术检测结果显示,ASGPR 不同程度地表达于肝源性细胞系,但不表达于非肝源性细胞系。免疫组织化学检测结果显示,ASGPR 专一性表达于正常肝组织和肝癌组织,在肝癌组织的表达与分化程度有关,高分化肝癌中的阳性率高于低分化肝癌(75.0% vs 28.6%, $P < 0.05$)。**结论** 成功制备高特异性人 ASGPR 小鼠单克隆抗体,适用于用流式细胞术和免疫组织化学法检测 ASGPR 表达,可用于临床病理鉴定原发性肝癌与转移性肝癌。

[关键词] 去唾液酸糖蛋白受体;单克隆抗体;肝肿瘤;流式细胞术;免疫组织化学

[中图分类号] R 392.116

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)10-1055-06

Preparation of mouse anti-human asialoglycoprotein receptor monoclonal antibody and its preliminary application

LI Jun^{1,2}, CHEN Lei², SUN Bin², ZHANG Yu², QIAN Hai-hua², YIN Zheng-feng^{2*}

1. School of Clinical Medicine, Medical College of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China

2. Molecular Oncology Laboratory, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To prepare a mouse monoclonal antibody against human asialoglycoprotein receptor (ASGPR), and to apply it for detecting ASGPR expression in cell lines and tissues. **Methods** The structure of ASGPR H1 major subunit was analyzed and the full length of ASGPR1 was selected to synthesize immunizing peptide. cDNA was amplified by RT-PCR and then subcloned into prokaryotic vector pGEX-4T-1. The recombinant protein was expressed by *E. coli* BL21 and purified for subsequent immunization. The conventional hybridoma technique was used to generate mouse monoclonal antibody. The isotype and the titer were regularly tested. Inhibition experiment was conducted to identify the specific binding of the antibody to ASGPR. Finally, the expression of ASGPR was detected in various intra-hepatic and extra-hepatic cell lines by flow cytometry and in different liver tissues by immunohistochemistry method. **Results** Monoclonal antibody against human ASGPR was successfully prepared and was identified as IgG1, with the titer reaching 1 : 12 800. Inhibition experiment indicated a satisfactory specific binding of the antibody to ASGPR and that the recognition epitope was located in the extracellular domain of ASGPR. Flow cytometric analysis showed various levels of ASGPR expression in intra-hepatic cell lines, but not in extra-hepatic cell lines. Immunohistochemistry detection showed that ASGPR was specifically expressed in the normal liver tissues and hepatocellular carcinoma (HCC) tissues, and the expression in HCC tissues was associated with the differentiation degree, with the expression being significantly higher in well-differentiated HCC than that in the poorly-differentiated HCC (75.0% vs 28.6%, $P < 0.05$). **Conclusion** We have successfully prepared the monoclonal antibody against human ASGPR with

[收稿日期] 2013-04-19

[接受日期] 2013-06-28

[基金项目] 国家传染病重大专项课题(2012ZX10002012-010),国家高技术研究发展计划(“863”计划,2007AA02Z461),国家自然科学基金(81172207, 81272669). Supported by National Key Project for Infectious Diseases of China (2012ZX10002012-010), National High-Tech Research and Development Program of China (“863” Program, 2007AA02Z461), and National Natural Science Foundation of China (81172207, 81272669).

[作者简介] 李 军,硕士生. E-mail: lijun_doctor@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875354, E-mail: yinzfk@aliyun.com

high specificity; the antibody can be used for flow cytometric analysis and immunohistochemistry detection of ASGPR and for clinical distinguish of primary or metastatic liver cancer.

[Key words] asialoglycoprotein receptor; monoclonal antibodies; liver neoplasms; flow cytometry; immunohistochemistry
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(10): 1055-1060]

去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)又称肝凝集素或肝糖凝集蛋白^[1],专一性表达于肝实质细胞表面,主要生理功能为清除外周血循环中含有D-半乳糖残基或N-乙酰半乳糖胺残基的糖蛋白、脂蛋白和凋亡细胞^[1-2]。鉴于其肝细胞表达特异性及独特的生理功能,ASGPR在介导肝脏疾病的基因和药物靶向治疗方面的潜在应用价值一直受到重视^[3-5]。然而,可能由于只在近期才有市售ASGPR单克隆抗体,迄今尚未见应用ASGPR单克隆抗体进行相关研究的报道。人ASGPR由H1和H2两个亚基组成,分别由ASGPR1和ASGPR2基因编码,其中H1亚基在识别配体和介导内吞中发挥重要作用^[1],因此针对H1亚基的抗体更有应用价值。本研究通过研制和鉴定人ASGPR1特异性小鼠单克隆抗体,并应用该抗体检测多种肝源性和非肝源性细胞系以及多种肝组织中ASGPR的表达,了解其表达规律,为进一步开展ASGPR的基础和临床研究提供实验试剂和参考数据。

1 材料和方法

1.1 材料 雌性BALB/c小鼠由第二军医大学实验动物中心提供。非肝源性细胞系(人乳腺癌细胞系MCF-7、人肾癌细胞系A498、人结肠癌细胞系SW480)、人肝癌细胞系(Huh7、PLC/PRF/5、Hep3B、HepG2)和正常人肝细胞系(Chang liver)均购自中国科学院上海细胞生物研究所。31例诊断明确的病理标本由第二军医大学东方肝胆外科医院病理科提供,包括良性肝病组织8例(肝硬化5例、脂肪肝3例)、原发性肝癌组织22例和转移性肝癌组织1例(结肠癌肝转移)。另有5例正常肝组织取自良性肝病患者周边正常肝组织。*E. coli* BL21、pGEX-4T-1质粒为本实验室保存。单抗亚类鉴定试剂盒购自美国Sigma公司,ELISA试剂盒购自美国Rapidbio公司,SP免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。FITC标记山羊抗小鼠IgG二抗购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 单克隆抗体制备 对ASGPR H1大亚基进行蛋白质序列分析,并综合其亲水性、免疫原性和表位暴露性等参数,选取ASGPR1全长序列用于制备免

疫原。通过RT-PCR合成ASGPR1 cDNA,以pGEX-4T-1质粒为载体,构建加上谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签的ASGPR1表达重组载体,转化*E. coli* BL21感受态细胞,经筛选和培养、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达、GST亲和柱纯化、12% SDS-PAGE检测融合蛋白表达。小鼠免疫、细胞融合、阳性杂交瘤细胞克隆筛选、腹水生产和抗体纯化等方法均按照传统融合杂交瘤技术^[6]进行。

1.3 单克隆抗体鉴定 采用单抗亚类鉴定试剂盒鉴定单抗亚类,ELISA试剂盒检测单抗效价。采用竞争抑制实验鉴定单抗特异性;过量的去唾液酸胎球蛋白(ASGPR配体,美国Sigma公司)或纯化的重组ASGPR1蛋白(如上述自制)分别与单克隆抗体在37℃共孵育HepG2肝癌细胞系,参照下述流式细胞术方法进行检测。

1.4 流式细胞术检测 ASGPR在细胞系中的表达 在ASGPR受检细胞系检测管中加入适度稀释的单克隆抗体100 μL,对照管中加入等量稀释液,37℃孵育1 h,洗涤后均加入FITC标记山羊抗小鼠IgG二抗,常温避光孵育30 min,PBS洗2次,各加入200 μL PBS重悬,应用FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司)进行数据采集,FlowJo 7.6软件(美国Tree Star公司)进行分析。

1.5 免疫组织化学检测 ASGPR在肝组织样本中的表达 采用SP染色法,DAB显色。每张切片随机观察5个视野,每个视野计数100个细胞。按着色程度记分:无色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分;再根据阳性细胞所占百分比评分:<5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。着色程度与阳性细胞百分比相加:0分(-),1~2分(+),3~4分(++),5~7分(+++)。0~1分为阴性表达,2~7分为阳性表达。具体判定标准参照文献^[7]。

1.6 统计学处理 应用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本率的比较采用 χ^2 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 单克隆抗体制备 ASGPR H1大亚基蛋白的

序列结构如图 1A 所示。经 *E. coli* BL21 表达后纯化目的蛋白, SDS-PAGE 检测其相对分子质量和纯度, 结果如图 1B 所示, 大小为 60 000 左右, 符合预期。免疫小鼠均产生了良好的免疫反应, 取其中抗血清效价最高的小鼠做后续的细胞融合实验, 最终获得稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。本研究选取其中一株(取名为 AR-1)进行腹水生产, 纯化抗体后进行鉴定和初步应用。

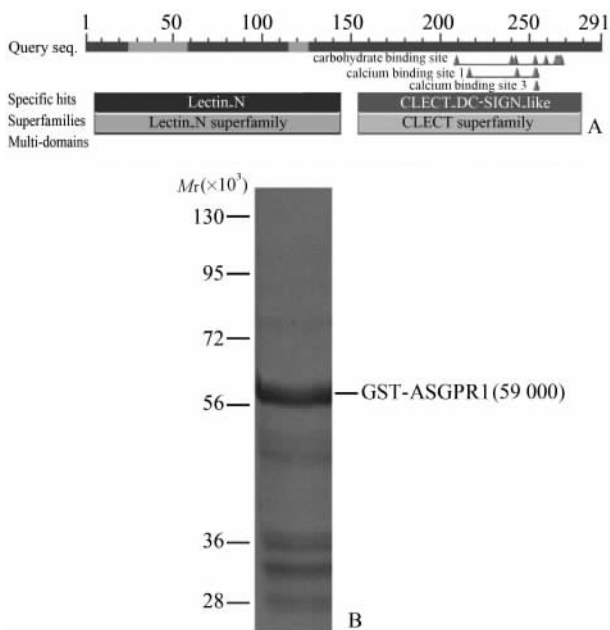


图 1 ASGPR H1 大亚基结构和纯化目的蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig 1 Structure of ASGPR H1 subunit and

SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein

A: Structure of ASGPR H1 subunit (ASGPR1). ASGPR H1 subunit consists of 291 amino acids (aa), with 1-40 aa intracellular, 41-60 aa transmembrane and 61-291 aa extracellular. The main extracellular functional region is its carbohydrate recognition domain, which is a C-type lectin, containing carbohydrate binding site and calcium binding site. B: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the recombinant glutathione S-transferase (GST)-ASGPR1. The mass of ASGPR H1 subunit is about 34 000 itself and about 60 000 with GST

2.2 单克隆抗体鉴定 AR-1 株产生的单克隆抗体属于 IgG1, 效价可达 1 : 12 800。竞争抑制实验结果显示, 该抗体与 HepG2 肝癌细胞结合可被过量的去唾液酸胎球蛋白或纯化重组 ASGPR1 蛋白抑制(图 2), 说明其不仅具有很好的 ASGPR 结合特异性, 而且识别的肽段位于 ASGPR 胞外段。

2.3 ASGPR 在肝源性及非肝源性细胞系的表达 选取 MCF-7、A498、SW480 等非肝源性细胞系,

以及人肝癌细胞系 Huh7、PLC/PRF/5、Hep3B、HepG2 和正常人肝细胞系 Chang liver 等肝源性细胞系, 以 AR-1 单克隆抗体标记后上流式细胞仪分析。结果显示, 非肝源性细胞系中均未检测到 ASGPR 表达; 而在受检的肝源性细胞系中, ASGPR 表达存在差异, 其中 HepG2 细胞表达率最高, 为 (94.2 ± 2.1)%, Hep3B、PLC/PRF/5 和 Huh7 细胞表达率分别为 (38.2 ± 5.6)%, (24.6 ± 4.4)% 和 (8.7 ± 2.4)%, 而正常人肝细胞 Chang liver 几乎不表达, 为 (0.9 ± 0.7)%。典型结果如图 3 所示。

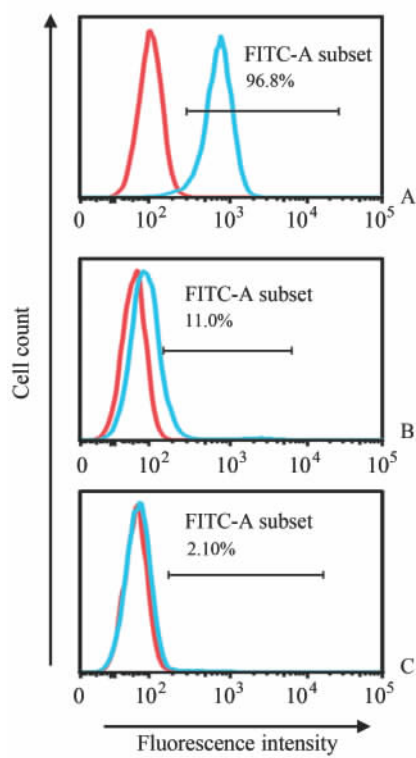


图 2 ASGPR 单克隆抗体竞争抑制实验

Fig 2 Competitive inhibition experiment of anti-ASGPR monoclonal antibody

ASGPR: Asialoglycoprotein receptor. A: Control, only the antibody was incubated with HepG2 cells; B: The antibody and excessive asialofetuin were incubated together with HepG2 cells; C: The antibody and purified recombinant protein were incubated together with HepG2 cells

2.4 ASGPR 在肝组织中的表达 ASGPR 阳性着色呈棕黄色颗粒状, 主要定位于肝实质细胞的胞膜上, 部分可见胞质着色。在 5 例正常肝组织(图 4A) 和 8 例良性肝病组织(图 4B、4C)中, ASGPR 呈现均一性的阳性表达。在结肠癌肝转移标本中, 结肠癌组织不表达 ASGPR, 而癌旁肝组织高表达 ASGPR, 可以明显区分结肠癌组织和癌旁正常肝组织(图

4D)。在 22 例原发性肝癌组织中,不同肝癌组织 ASGPR 表达水平存在差异,并且同一组织中不同肝癌细胞表达不均一(图 4E~4G)。分析原发性肝癌组织 ASGPR 表达与其临床病理学资料间的关系(表 1),发现 ASGPR 表达与患者性别、年龄、肿瘤大

小、甲胎蛋白水平、乙肝病毒感染、Child-Pugh 分级等均无关($P>0.05$),但与 Edmondson-Steiner 病理分级有关,在高分化(I~II 级)肝癌组织中的表达阳性率高于低分化(III~IV 级)肝癌组织(75.0% vs 28.6%, $P<0.05$)。

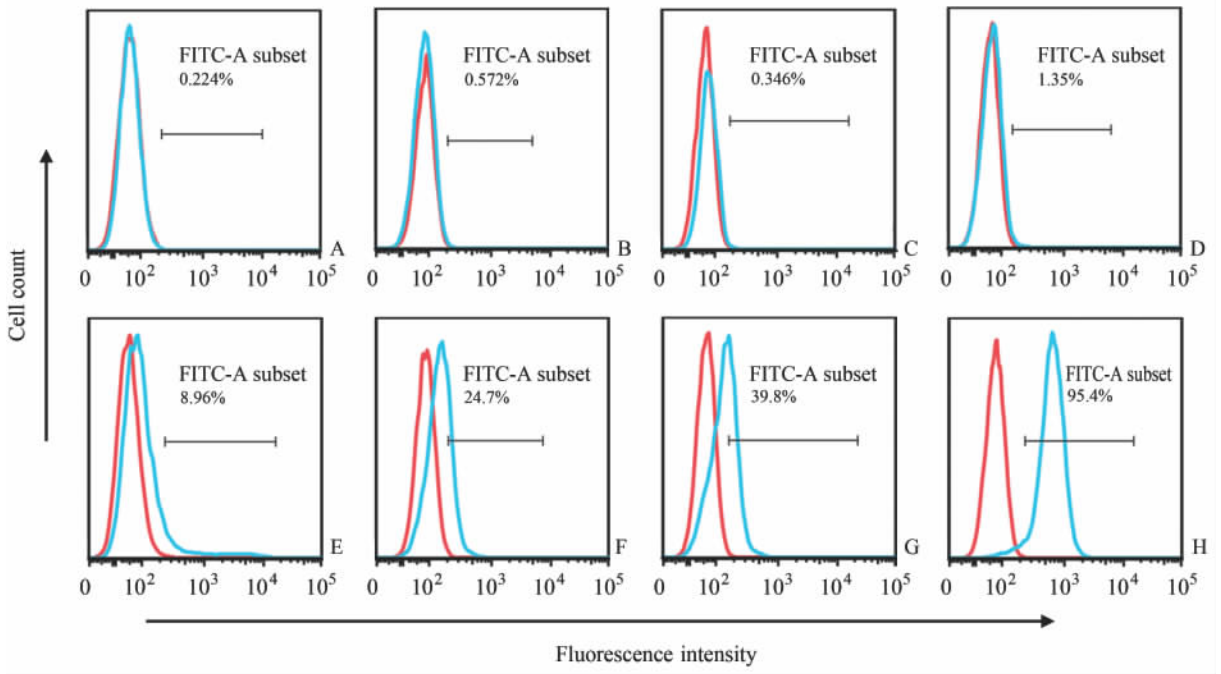


图 3 流式细胞术检测 ASGPR 在肝源性及非肝源性细胞系中的表达

Fig 3 Flow cytometric detection of ASGPR expression in intra-hepatic and extra-hepatic cell lines

ASGPR: Asialoglycoprotein receptor. A: MCF-7 cells; B: A498 cells; C: SW480 cells; D: Chang liver cells; E: Huh7 cells; F: PLC/PRF/5 cells; G: Hep3B cells; H: HepG2 cells

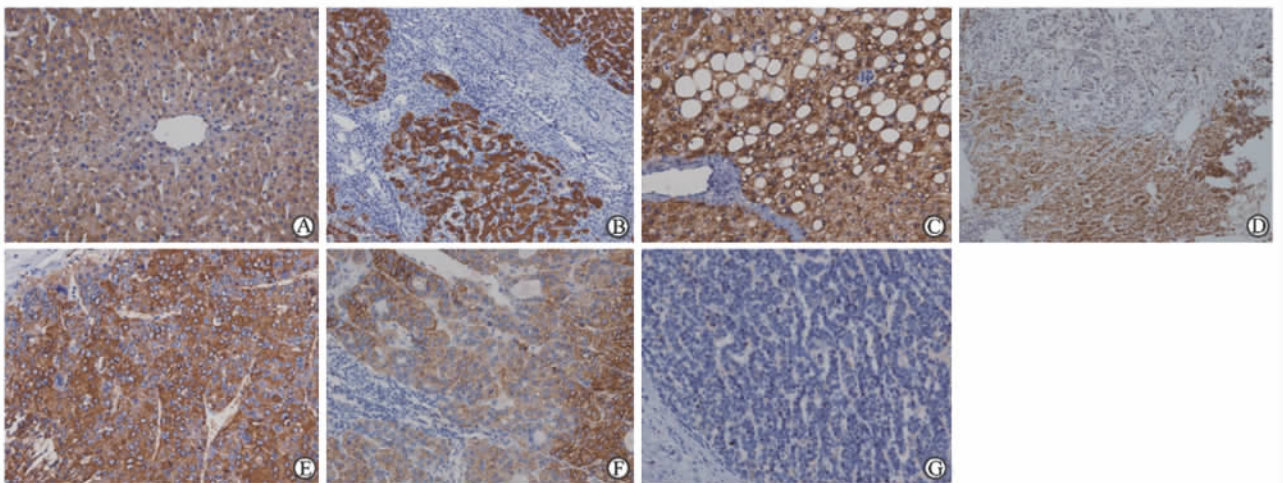


图 4 免疫组化检测 ASGPR 在正常肝组织、良性肝病组织及肝癌组织中的表达(SP 法)

Fig 4 Detection of ASGPR expression in normal liver tissues, non-malignant liver tissues and malignant liver tumor tissues by immunohistochemistry SP method

ASGPR: Asialoglycoprotein receptor. A: Normal liver; B: Liver cirrhosis; C: Fatty liver; D: Colorectal liver metastasis; E-G: Hepatocellular carcinoma. Original magnification: $\times 100$

表 1 22 例原发性肝癌组织中
ASGPR 表达与临床病理特征的关系

Tab 1 Relationship between ASGPR expression and clinicopathological features of 22 primary HCC tissues

Feature	N	ASGPR positive n(%)	χ^2	P
Gender			0.041	0.840
Male	18	8(44.4)		
Female	4	2(50.0)		
Age (years)			0.566	0.452
>50	15	6(40.0)		
≤50	7	4(57.1)		
Tumor size d/cm			0.321	0.571
>3	14	7(50.0)		
≤3	8	3(37.5)		
AFP ρ_B /(ng · mL ⁻¹)			0.006	0.937
≥400	9	4(44.4)		
<400	13	6(46.2)		
HBV			0.206	0.650
Positive	19	9(47.4)		
Negative	3	1(33.3)		
Child-Pugh class			0.244	0.885
A	11	5(45.5)		
B	8	4(50.0)		
C	3	1(33.3)		
Edmondson-Steiner grade			4.426	0.035
I or II	8	6(75.0)		
III or IV	14	4(28.6)		

ASGPR: Asialoglycoprotein receptor; HCC: Hepatocellular carcinoma; AFP: Alpha fetal protein; HBV: Hepatitis B virus

3 讨论

由于 ASGPR 具有独特的分子生物学功能及肝组织特异性,因此一直被认为是肝脏疾病靶向治疗的一个理想靶标。利用其特异性配体进行肝脏药物和基因靶向递送的研究^[3-5]屡见报道。只是在近期,才有人利用 ASGPR 大亚基异构体蛋白 H1b^[8]、ASGPR H1 大亚基糖识别区基因(CRDH1)^[9]、ASGPR 基因片段^[10]等制备单克隆抗体。本研究利用 ASGPR H1 大亚基全长编码基因合成的目的抗原作为免疫原,制备人 ASGPR 小鼠单克隆抗体。竞争抑制实验及多种细胞系和肝组织检测结果表明,经筛选获得的单克隆抗体能特异性识别并结合位于 ASGPR 胞外段的肽段,意味着该抗体可以被应用于基于 ASGPR 胞外段结构或功能的基础和应用研究。

以往已有一些应用不同方法检测 ASGPR 在组

织、细胞表达的报道。Park 等^[10]应用流式细胞术检测到 ASGPR 在不同肝癌细胞系的表达存在差异;Trerè 等^[11]应用免疫组织化学方法检测到 ASGPR 在肝癌组织中的表达存在差异。这些研究提示,准确检测 ASGPR 在细胞系及组织中的表达谱对于 ASGPR 介导肝脏疾病靶向治疗显得非常重要。本研究应用基于自制单克隆抗体的实验方法检测了部分细胞系及临床组织标本中 ASGPR 的表达,了解其表达规律。其中流式细胞术检测了 3 种肝外来源的细胞系及 5 种肝癌或正常肝细胞系,结果显示,在受检的 3 种肝外来源的细胞系中,均未检测到 ASGPR 表达;而在肝源性细胞系中,HepG2 表达率最高,达到 90% 以上;出乎意料的是,正常人肝细胞 Chang liver 中几乎不表达。分析 ASGPR 在肝源性细胞系表达差异的原因,一方面可能由于 ASGPR 胞外段结构易受细胞分离及培养环境中损伤因素的影响^[12],从而导致肝细胞表面 ASGPR 数量减少;另一方面可能与不同细胞系的分化程度不同有关^[10],但这似乎不能解释正常人肝细胞 Chang liver 不表达的现象。该现象的出现也可能与 Chang liver 细胞系保真度不足有关,很多研究报道了一些细胞系从建立开始起即逐渐被其他快速增殖的细胞系(如 HeLa 细胞系)污染甚至取代^[13-16],Chang liver 细胞即可能是其中之一^[17],实际已非最初分离时的肝源性细胞,鉴于此,分离原代肝细胞进行表达检测或许更有意义;也可能还存在其他影响表达差异的分子机制,有待于进一步研究。我们还采用免疫组化检测了正常肝组织、良性肝病组织、原发性肝癌组织、转移性肝癌组织等,结果显示,在正常肝组织及良性肝病组织中,ASGPR 均呈现阳性表达,但在结肠癌肝转移组织中,癌巢和癌旁组织分别呈现明显的阴性与阳性表达。上述结果是迄今较全面的 ASGPR 检测表达谱,表明 ASGPR 表达具有肝细胞特异性,可以在临床病理诊断中用于区分原发性肝癌和转移性肝癌,甚至可以用于区分原发性肝癌中的肝细胞癌和胆管细胞癌。但需要注意的是,在原发性肝细胞癌组织中,ASGPR 表达水平不一,且表达差异与分化程度相关,高分化肝癌的阳性表达率高于低分化肝癌(75.0% vs 28.6%, $P < 0.05$)。

总之,我们研制的人 ASGPR 小鼠单克隆抗体具有良好的特异性,适用于 ASGPR 表达的流式细胞术和免疫组化检测,特别是可用于临床病理鉴定原发性肝癌与转移性癌。其他潜在的应用价值则包

括可能取代 ASGPR 配体用于介导肝脏疾病治疗药物或基因的靶向递送以及外周血循环肝癌细胞的捕获和分离^[18]等。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Stockert R J. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression[J]. *Physiol Rev*, 1995, 75: 591-609.
- [2] Grewal P K. The Ashwell-Morell receptor[J]. *Methods Enzymol*, 2010, 479: 223-241.
- [3] Bernardes G J, Kikkeri R, Maglinao M, Laurino P, Collet M, Hong S Y, et al. Design, synthesis and biological evaluation of carbohydrate-functionalized cyclodextrins and liposomes for hepatocyte-specific targeting[J]. *Org Biomol Chem*, 2010, 8: 4987-4996.
- [4] Medina S H, Tekumalla V, Chevliakov M V, Shewach D S, Ensminger W D, El-Sayed M E. N-acetylgalactosamine-functionalized dendrimers as hepatic cancer cell-targeted carriers[J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 4118-4129.
- [5] Ma J, Huang C, Yao X, Shi C, Sun L, Yuan L, et al. Inhibition of hepatitis B virus and induction of hepatoma cell apoptosis by ASGPR-directed delivery of shRNAs[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e46096.
- [6] Lee S, Park H C, Bae S, Hong J, Choi J, Hong K, et al. Monoclonal antibodies against recombinant AtHOS15[J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2012, 31: 118-124.
- [7] Zhang X, Li N, Li X, Zhao W, Qiao Y, Liang L, et al. Low expression of DAB2IP contributes to malignant development and poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27: 1117-1125.
- [8] 刘嘉, 丁红晖, 杨燕, 胡斌, 余源, 黄红平, 等. 抗人 ASGPR 大亚基异构体蛋白 H1b 多克隆抗体的制备和鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 10: 917-919.
- [9] Zhao X, Yu Z, Dai W, Yao Z, Zhou W, Zhou W, et al. Construction and characterization of an anti-asialoglycoprotein receptor single-chain variable-fragment-targeted melittin[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2011, 58: 405-411.
- [10] Park J H, Kim K L, Cho E W. Detection of surface asialoglycoprotein receptor expression in hepatic and extra-hepatic cells using a novel monoclonal antibody[J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28: 1061-1069.
- [11] Trerè D, Fiume L, De Giorgi L B, Di Stefano G, Migaldi M, Derenzini M. The asialoglycoprotein receptor in human hepatocellular carcinomas: its expression on proliferating cells[J]. *Br J Cancer*, 1999, 81: 404-408.
- [12] Casey C A, Kragoskow S L, Sorrell M F, Tuma D J. Chronic ethanol administration impairs the binding and endocytosis of asialo-orosomucoid in isolated hepatocytes[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 2704-2710.
- [13] Lucey B P, Nelson-Rees W A, Hutchins G M, Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, 133: 1463-1467.
- [14] Buehring G C, Eby E A, Eby M J. Cell line cross-contamination; how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it? [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2004, 40: 211-215.
- [15] Stacey G N. Cell contamination leads to inaccurate data; we must take action now[J]. *Nature*, 2000, 403: 356.
- [16] Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler H G, Kohara A, MacLeod R A, et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127: 1-8.
- [17] Ludueña M A, Iverson G M, Sussman H H. Expression of liver and placental alkaline phosphatases in Chang liver cells[J]. *J Cell Physiol*, 1977, 91: 119-129.
- [18] Xu W, Cao L, Chen L, Li J, Zhang X F, Qian H H, et al. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 3783-3793.

[本文编辑] 商素芳