

·基础研究·

靶向 IGF1R 的 siRNA 抑制人肝癌细胞 SMMC7721 裸鼠移植瘤的实验研究

牛 坚¹, 钱海鑫², 李向农¹, 韩泽广³

Inhibitory Effect of IGF1R siRNA on the Growth of Human Liver Cancer SMMC7721 Cell Xenograft in Nude Mice

NIU Jian¹, QIAN Hai-Xin², LI Xiang-Nong¹, HAN Ze-Guang³

1. 徐州医学院附属第一医院

普外科,

江苏 徐州 221004

2. 苏州大学附属第一医院

普外科,

江苏 苏州 215006

3. 国家人类基因组南方研究中心,

上海 201203

*1. Department of General Surgery,**The First Affiliated Hospital,**Xuzhou Medical College,**Xuzhou, Jiangsu, 221004,**P. R. China**2. Department of General Surgery,**The First Affiliated Hospital,**Soochow University,**Suzhou, Jiangsu, 221004,**P. R. China**3. Chinese National Human**Genome Research Center at**Shanghai,**Shanghai, 201203,**P. R. China*

通讯作者:牛 坚

Correspondence to: NIU Jian

Tel: 86-13952182546

Fax: 86-516-5601527

E-mail: njnj_001@163.com

收稿日期:2006-12-01

修回日期:2007-04-10

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** Using small interfering RNA (siRNA) to inhibit mammal gene expression becomes an effective technique in studying gene function. This study was to investigate the effect of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) siRNA on the growth of human liver cancer SMMC7721 cell xenograft in nude mice. **METHODS:** siRNA targeting IGF1R was designed, and plasmid SMMC7721-IGF1R-siRNA was constructed and transfected into SMMC7721 cells (SMMC7721-IGF1R-siRNA cells); the cells transfected with SMMC7721-IGF1R-mutation (SMMC7721-IGF1R-mutation cells) were used as negative control, and untransfected cells as empty control. Stable cell clones were screened by G418, and transplanted into nude mice to establish cancer xenograft. Tumor growth was monitored. Tumor morphology was observed with HE staining. The expression of IGF1R protein in tumor tissues was detected by Western blot. Microvessel density (MVD) in tumor tissues was detected by SP immunohistochemistry. Cell apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay. **RESULTS:** The tumor volume was significantly smaller in SMMC7721-IGF1R-siRNA group than in SMMC7721-IGF1R-mutation group and SMMC7721 group ($P < 0.05$). Necrosis and cell apoptosis were found in SMMC7721-IGF1R-siRNA group. The expression of IGF1R protein was significantly lower in SMMC7721-IGF1R-siRNA group than in SMMC7721-IGF1R-mutation group and SMMC7721 group ($P < 0.05$). MVD was significantly lower in SMMC7721-IGF1R-siRNA group than in SMMC7721-IGF1R-mutation group and SMMC7721 group (11.3 ± 4.4 vs. 36.7 ± 7.6 and 28.4 ± 6.5 , $P < 0.05$). The apoptosis rate of tumor cells was significantly higher in SMMC7721-IGF1R-siRNA group than in SMMC7721-IGF1R-mutation group and SMMC7721 group [$(50.2 \pm 6.4)\%$ vs. $(5.4 \pm 1.0)\%$ or $(6.0 \pm 2.1)\%$, $P < 0.05$]. **CONCLUSION:** IGF1R siRNA can inhibit the growth of SMMC7721 cell xenograft in nude mice.

KEYWORDS: RNA interference; Human insulin-like growth factor receptor 1; Microvessel density; Gene expression; SMMC7721 cells; Xenograft tumor; Nude mouse

【摘 要】背景与目的:利用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)抑制哺乳动物基因表达已成为研究基因功能的一种有效方法。本研究探讨人胰岛素样生长因子 1 类受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)的短发夹环 RNA 对人肝癌细胞株 SMMC7721 裸鼠移植瘤的抑制作用。方法:设计并合成特异性靶向 IGF1R 的 siRNA 片段,构建 SMMC7721-IGF1R-siRNA 表达质粒,将其转入 SMMC7721 细胞。通过 G418 筛选出稳定株,移植裸鼠成瘤。同时设立对照组。根

据体积的均值绘制肿瘤生长曲线,以 HE 染色法观察质粒处理后瘤组织的病理改变,Western blot 检测肿瘤组织中 IGF1R 的表达变化,免疫组化 SP 法检测检测瘤组织内微血管密度,原位末端标记法(TUNEL 法)检测肿瘤细胞的凋亡情况。结果:SMMC7721-IGF1R-siRNA 组肿瘤体积与 SMMC7721-IGF1R-mutation 组、SMMC7721 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。病理学检查及 TUNEL 检测发现,SMMC7721-IGF1R-siRNA 组肿瘤生长受到抑制,细胞凋亡指数 $[(50.2 \pm 6.4)\%]$ 明显高于 SMMC7721-IGF1R-mutation 组 $[(5.4 \pm 1.0)\%]$ 和 SMMC7721 组 $[(6.0 \pm 2.1)\%]$ ($P < 0.05$)。SMMC7721-IGF1R-siRNA 组与 SMMC7721-IGF1R-mutation 组、SMMC7721 组相比,瘤内 IGF1R 蛋白表达明显下调。SMMC7721-IGF1R-siRNA 组微血管密度 (11.3 ± 4.4) 与 SMMC7721-IGF1R-mutation 组 (36.7 ± 7.6) 、SMMC7721 组 (28.4 ± 6.5) 相比明显下降 ($P < 0.05$)。结论:构建的 SMMC7721-IGF1R-siRNA 具有 RNA 干扰作用,能抑制 SMMC7721 细胞裸鼠移植瘤的生长。

关键词:RNA 干扰;人胰岛素样生长因子 1 类受体;微血管密度;基因表达;SMMC7721 细胞;移植瘤;裸鼠

中图分类号:R735.70 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2007)07-0703-06

在细胞周期中,一旦细胞进入 G_1 期,在其他生长因子缺乏的情况下,胰岛素样生长因子 1 (insulin like growth factor 1, IGF1)可促使细胞增殖周期完成^[1]。双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA)可以特异性地诱导与之同源的內源信使 RNA(messenger RNA, mRNA)降解,从而特异性地使相应基因表达沉默,这一现象称为 RNA 干涉(RNA interference, RNAi)。小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)为研究未知功能的基因提供了新的反向遗传学手段,同时在人类基因治疗方面具有潜在应用价值。

IGF1R 蛋白在原发性肝癌中具有选择性表达的特性,有望成为肝癌基因治疗的合理靶点^[2,3]。人肝癌细胞系 SMMC7721 为上海第二军医大学建株,其 IGF1R 蛋白为阳性。为了观察 IGF1R-siRNA 在动物体内的作用,我们在 BALB/c 裸鼠体内建立皮下荷人肝癌小鼠模型,观察皮下移植瘤的生长、IGF1R 蛋白表达、细胞凋亡和肿瘤微血管的形成等指标,以期在整体水平对 IGF1R-siRNA 的作用做出评价。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

18 只 BALB/c 裸小鼠由中国科学院上海实验

动物中心提供 [实验动物合格证号为 SCXK (沪) 2006-0010],鼠龄 4~6 周,体重 18~20 g,雌雄共用,SPF (specific-pathogen free)条件下饲养。

1.2 主要试剂

兔抗人 IGF1R 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,兔抗人 VIII 因子相关抗原抗体购自 DAKO 公司, Histostain™-SP (链霉卵白素-过氧化物酶)免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司,TUNEL 试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 IGF1R 的设计与合成

通过 <http://www.dharmacon-sidesign-center.com/> 网站的 siRNA 设计软件设计针对 IGF1R 的特异性 siRNA 片段,一条为 5'-ATACGGATCACAAGTTGAG-3',另一条为 5'-CTCAACTTGTGATCCGTAT-3'。同时使其中的一个碱基发生突变作为阴性对照,一条为 5'-ATACGGATCATTAAGTTGAG-3',另一条为 5'-CTCAACTTATGATCCGTAT-3',阴影为突变的碱基。上述片段由上海赛百胜生物工程公司合成,分别命名为 SMMC7721-IGF1R-siRNA 和 SMMC7721-IGF1R-mutation。

SMMC7721-IGF1R-siRNA 质粒、人肝癌细胞株 SMMC7721 由国家人类基因组南方研究中心提供。质粒构建及稳定株的建立参考文献[4]。

1.4 移植瘤裸鼠模型的建立

将 18 只 BALB/c 裸小鼠随机分为 3 组,每组 5 只,每组另留 1 只以备意外死亡时补充。A 组为 SMMC7721 空白对照组,B 组为 SMMC7721-IGF1R-mutation 组,C 组为 SMMC7721-IGF1R-siRNA 组。

SMMC7721 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在含 5% CO_2 的 37℃ 培养箱中连续培养。待细胞长至对数生长期 (50%~70% 面积)时,用 1% 胰酶消化,收集 5×10^7 个培养的细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,无血清 DMEM 洗细胞,再次离心,加少许无血清 DMEM 洗液将细胞混匀,总体积至 1.0 ml。分别取上述制备好的细胞悬液各 0.1 ml (约 5×10^6 个细胞),用微量注射器注入到裸鼠前肢的腹部皮下,形成直径 3 mm 左右的皮下隆起。

1.5 肿瘤生长曲线测绘

种植完成后,每天观察注射部位有无感染及肿瘤生长后有无自然消退。待肿瘤出现后,观察并记录各组裸鼠的肿瘤重量(W)。于接种细胞后 35 天处死荷瘤裸鼠,肉眼观察移植瘤的大体形态,拍照。处死动物后,进行解剖学检查,大体观察移植瘤的生长

状况及周围脏器受累情况。取出肿瘤后用双面刀片将肿瘤切成 1.0 cm×1.0 cm 大小的组织块,浸入 4%多聚甲醛内固定 24 h,备用。根据公式抑瘤率 = $\frac{W_{\text{SMMC7721 or SMMC7721-IGF1R-mutation}} - W_{\text{SMMC7721-IGF1R-siRNA}}}{W_{\text{SMMC7721}}} \times 100\%$,计算抑瘤率并绘制时间-抑瘤率曲线。

1.6 瘤组织 HE 染色

上述处理后的标本经脱水、透明、浸蜡、包埋后,5 μm 厚切片;切片二甲苯脱蜡(10 min×2);置入无水乙醇 10 min;浸入苏木精 5~10 min;自来水浸洗;稀盐酸+乙醇溶液分色数秒;自来水浸洗;淡氨水中胞核蓝化 3~5 min;70%、80%、90%乙醇 10 min 浸洗各一次;伊红 10 min;95%乙醇 2 次,100%乙醇 1 次,各 5 min;二甲苯 10 min×3 次;树脂封片,常规 HE 染色,封片显微镜下观察瘤组织。

1.7 Western blot 检测肿瘤组织中 IGF1R 的表达

称取约 20 mg 新鲜瘤组织,提取蛋白质,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳条件:60 V 30 min,160 V 1.5 h。电泳结束后,电转移法将蛋白从凝胶中转移到 PVDF 膜上,甲醇固定 PVDF 膜后,用含 5%脱脂奶粉的封闭液 4℃孵育过夜。一抗(兔抗人 IGF1R 多克隆抗体)10 ml(1:1 000 稀释)室温孵育 2 h,二抗(鼠抗兔多克隆抗体)10 ml(1:5 000 稀释)室温孵育 2 h 后,PVDF 膜用 ECL 化学发光试剂盒处理并在暗室显影。用紫外分光光度计与可见分析装置(FR-200)(复日科技公司,自带软件)行灰度扫描。

1.8 免疫组织化学 S-P 法检测瘤组织内微血管密度

参照 Weidner 等^[5]的方法,用免疫组化法抗Ⅷ因子相关抗原单克隆抗体染色标记血管内皮细胞,计算肿瘤内着色的毛细血管和微血管。用计算机辅助的图像分析系统,以 5 个随机 200 倍视野血管的均数表示该组织的微血管密度(microvessel density, MVD)。

1.9 原位末端标记法(TUNEL)检测移植瘤的凋亡

冰冻切片采用新鲜配置的 4%多聚甲醛溶液固定,室温下 30 min。PBS 洗片后,0.3%过氧化氢甲醇溶液室温下孵育 30 min;PBS 洗片后,0.1% TritonX-100 枸橼酸钠溶液冰上作用 2 min;PBS 洗片后,擦干周围的水分,滴加 50 μl TUNEL 反应混合液,在湿盒中 37℃孵育 60 min;PBS 洗片,擦干周围水分,加入 50 μl 转化剂-POD,在湿盒中 37℃孵育 30 min;PBS 洗片后,加入 80 μl DAB 溶液,

室温下孵育,显微镜下观察着色后,立即用 PBS 冲洗停止反应。常规复染,脱水,封片保存。在 100 倍视野下随机选取 5 个视野,计算凋亡细胞在全部细胞中所占的比例。凋亡指数(apoptosis index, AI) = 阳性染色细胞数/总细胞数×100%。

1.10 统计学处理

测定值以均数±标准差表示,采用 Fisher's 确切概率法、方差分析进行假设检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 荷瘤裸鼠模型的潜伏期

SMMC7721-IGF1R-siRNA 组裸鼠成瘤的潜伏期为(25.0±1.8)天,SMMC7721-IGF1R-mutation 组和 SMMC7721 组成瘤的潜伏期分别为(13.5±3.1)天、(14.7±2.5)天,实验组成瘤时间明显被推迟($P < 0.05$)。

2.2 荷瘤裸鼠模型的肿瘤生长

对照组第 13 天左右接种部位开始出现扁平结节,并逐渐长大。SMMC7721-IGF1R-siRNA 组裸鼠皮下移植瘤的生长慢于对照组。在实验结束时,SMMC7721-IGF1R-siRNA 组抑瘤率为 54.8%,显著高于 SMMC7721-IGF1R-mutation 组和 SMMC7721 组($P < 0.05$)。表明 IGF1R-siRNA 转染具有一定的抑制肿瘤生长的作用。实验组中无自然死亡动物。见图 1。

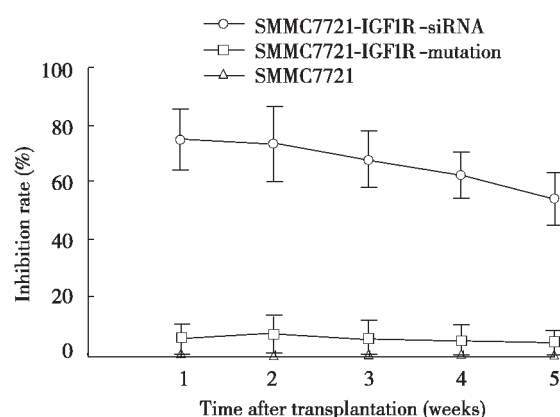


图 1 各组裸鼠时间-抑瘤率曲线

Figure 1 Inhibitory effect of IGF1R siRNA on the growth of human liver cancer SMMC7721 cell xenograft in nude mice

2.3 移植瘤大体观察

实验结束后处死裸鼠,取出皮下肿瘤组织,肉眼观察见移植瘤外观呈粉红色,表面凸凹不平,结

节状或分叶状,质中;切面中心为灰白色,瘤组织质脆且易碎。SMMC7721-IGF1R-siRNA 组肿瘤组织表面有较完整的纤维包膜,包膜完整易分离;而对照组包膜常欠完整,与周围组织有一定程度的粘连。其他组织和器官未见转移的肿瘤病灶。见图 2。



图 2 各组移植瘤的大体观察

Figure 2 Gross observation of SMMC7721 cell xenograft in nude mice

Fiber capsules of the xenograft tumors in SMMC7721-IGF1R-siRNA group are complete, while fiber capsules of the xenograft tumors in SMMC7721-IGF1R-mutation group and SMMC7721 group are incomplete and adhere to surrounding tissues.

2.4 肿瘤组织病理学特点

在 HE 染色切片上,对照组肿瘤细胞体积大、胞浆丰富、核/浆比例大、染色深,可见巨核细胞,有丝分裂相多见,癌巢大、细胞丰富、排列紧密、间质稀少、血窦丰富,结节外部分有极薄的结缔组织被膜与周围的正常组织分隔,但包膜多不完整。相反,SMMC7721-IGF1R-siRNA 组肿瘤细胞较少、细胞分界清、癌巢小、间质丰富、血窦稀少,并可见散在的部分细胞核与胞浆呈固缩坏死样改变,不伴炎症反应,结节的纤维包裹明显且完整。见图 3。

2.5 肿瘤组织中 IGF1R 的表达

如图 4 所示,SMMC7721-IGF1R-siRNA 组肿瘤组织中 IGF1R 的表达明显低于对照组。经灰度扫描分析,其蛋白表达量为 SMMC7721 组的 18.0% 和 SMMC7721-IGF1R-mutation 组的 17.0% ($P < 0.05$)。

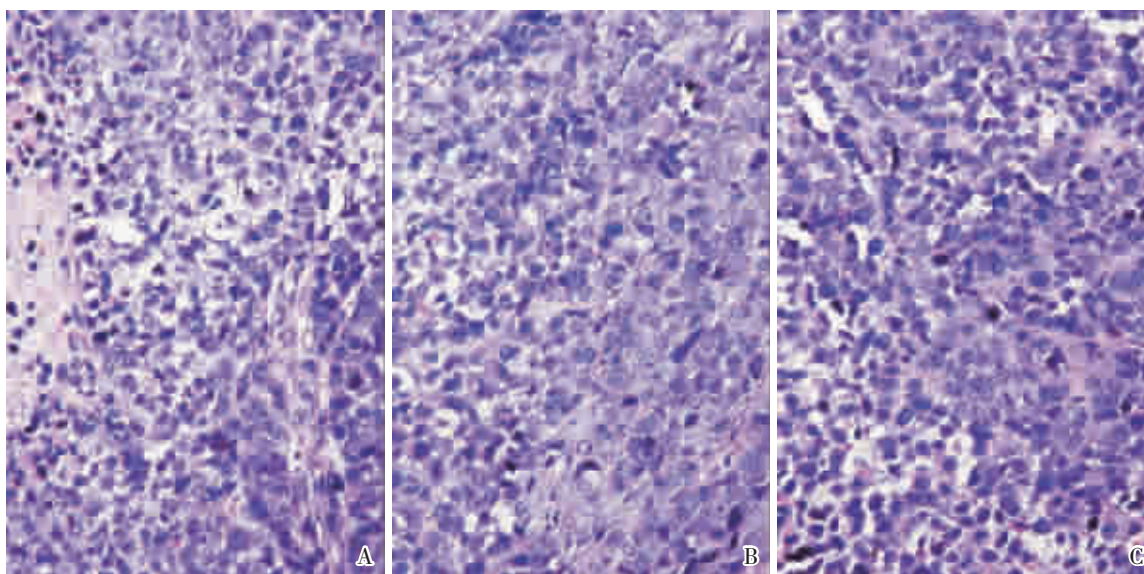


图 3 裸鼠皮下移植瘤组织形态 (HE ×200)

Figure 3 Morphology of the xenograft tumors in nude mice (HE ×200)

More necrosis tumor cells, less cancer nests and less blood sinuses are presented in SMMC7721-IGF1R-siRNA group (A); while tumor cells grow well, and more cancer nests and more blood sinuses are presented in SMMC7721-IGF1R-mutation group (B) and SMMC7721 group (C).

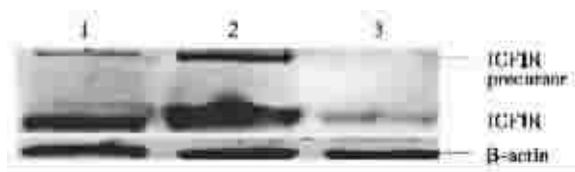


图 4 Western blot 检测各组移植瘤组织中 IGF1R 蛋白的表达
Figure 4 Expression of IGF1R protein in the xenograft tumors analyzed by Western blot

Lane 1: SMMC7721 cells; lane 2: SMMC7721-IGF1R-mutation cells; lane 3: SMMC7721-IGF1R-siRNA cells.

2.6 肿瘤组织中的 MVD

不同区域的微血管计数不同,形态不规则,部分血管无明显管腔,部分呈发芽状,SMMC7721-IGF1R-mutation 组 (36.7 ± 7.6) 和 SMMC7721 组 (28.4 ± 6.5) 的 MVD 值明显高于 SMMC7721-IGF1R-siRNA 组 (11.3 ± 4.3)。组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 5。

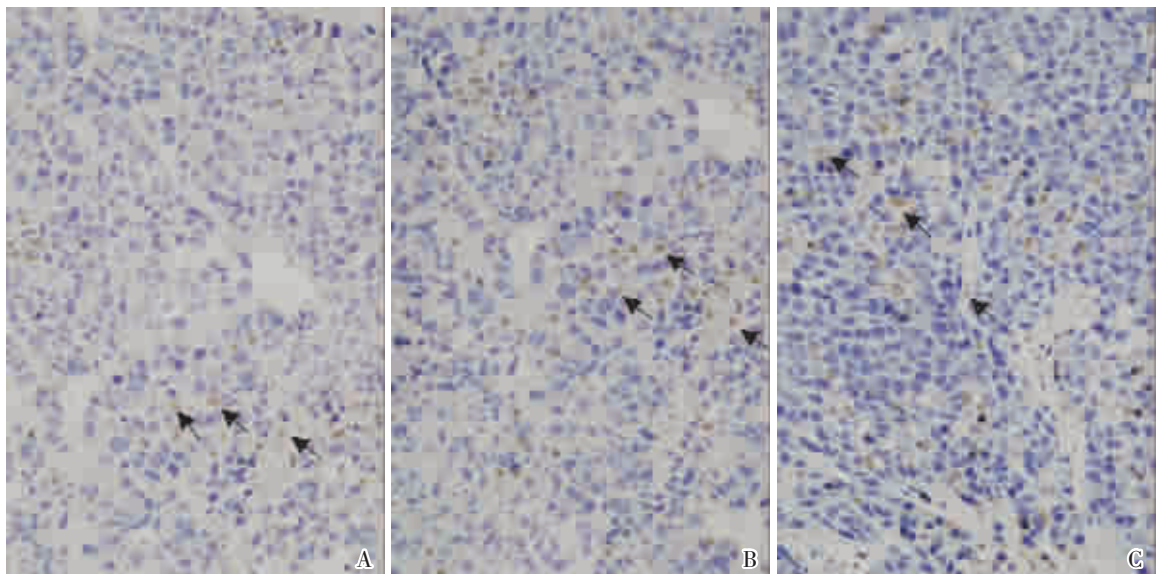


图 5 各组移植瘤组织中 MVD (SP ×200)

Figure 5 Microvessel density (MVD) in the xenograft tumors in nude mice (SP ×200)

MVD is lower in SMMC7721-IGF1R-siRNA group (A) than in SMMC7721-IGF1R-mutation group (B) and SMMC7721 group (C); arrows indicate pulmonary capillary endothelial cells.

2.7 移植瘤组织的凋亡指数

SMMC7721-IGF1R-siRNA 组部分细胞出现阳性反应, AI 为 $(50.2 \pm 6.4)\%$ 。SMMC7721-IGF1R-

mutation 和 SMMC7721 组的 AI 分别为 $(5.4 \pm 1.0)\%$ 和 $(6.0 \pm 2.1)\%$, 与 SMMC-IGF1R-siRNA 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 6。

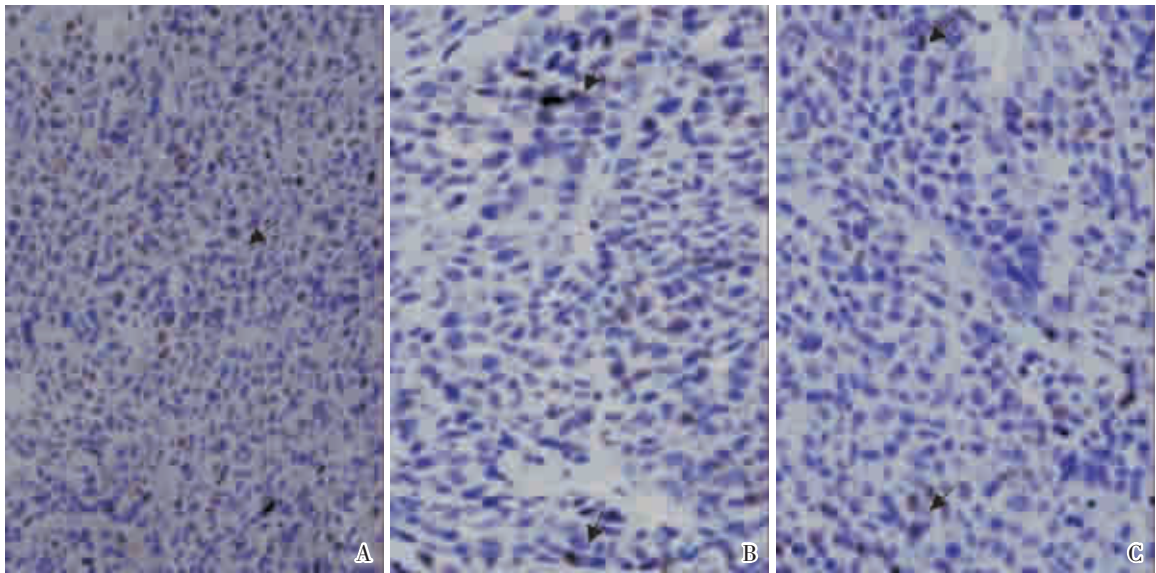


图 6 荷瘤裸鼠瘤体内肿瘤细胞凋亡情况 (TUNEL ×100)

Figure 6 The tumor cell apoptosis in the xenograft tumors in nude mice (TUNEL ×100)

Scattered apoptosis cells with umber particles in nuclei are presented in SMMC7721-IGF1R-siRNA group (A); while much lesser apoptosis tumor cells are presented in SMMC7721-IGF1R-mutation group (B) and SMMC7721 group (C); arrows indicate apoptosis cells.

3 讨 论

裸鼠皮下移植瘤模型是常用的一种肿瘤实验

研究模型,具有移植方法简便、肿瘤移植后潜伏期短、易于直接观察等优点,且肿瘤生长的不同时间测量同一动物肿瘤体积也极方便,因而在肿瘤研

究中得到了广泛的应用。所以,本实验中我们选择了裸小鼠皮下移植瘤模型来研究体内 IGF1R-siRNA 转染阻断 IGF1R 表达对肿瘤细胞一般生物学特性的影响。

在本研究中发现,IGF1R-siRNA 阻断 IGF1R 表达后,SMMC7721 细胞移植瘤在裸鼠皮下的生长受到了显著抑制;不仅如此,与对照组相比,其瘤组织纤维包裹显著而完整、间质丰富。

本研究还发现,IGF1R-siRNA 组的瘤组织中,血窦形成明显少于对照组,表明 IGF1R-siRNA 转染可能还与抑制肿瘤血管生成相关。正常情况下的血管形成是一个有序、受到严格控制并自限的过程;相反,在病理情况下血管形成显著增加,不再自限,10%的血管内皮细胞呈活跃增生。病理性血管形成在肿瘤的生长和转移过程中是一个非常重要的事件,与肿瘤发展的阶段和血管侵袭密切相关,在临床上反映预后和死亡的重要指标。血管生成不仅是原位瘤生长所必需的,也是肿瘤转移灶形成的前提。实体肿瘤的发展可分为血管形成前期和血管形成期,在血管形成前期,肿瘤无诱导血管形成的能力,且肿瘤的体积也有限。肿瘤细胞会分泌一些血管形成因子来诱发新血管的形成,从而满足肿瘤继续增殖所需的氧气和营养物质。新生血管形成是肿瘤迅速增殖和侵袭转移的重要条件和病理基础,肿瘤组织新生血管形成往往与转移癌转移程度呈正相关。肿瘤组织石蜡切片的 MVD 值是反映肿瘤血管形成的一项有效方法,并且可作为反映预后的独立指标。其方法就是在最活跃的肿瘤血管形成区域测定每单位面积被免疫染色的微血管数,由此反映血管形成热点(hot spot)区的血管形成情况。本研究以免疫组化法检测 MVD 值,结果表明 IGF1R-siRNA 转染对肿瘤血管形成起着显著的抑制作用。IGF1R-siRNA 转染的 SMMC7721 细胞在裸鼠皮下生长显著受到抑制,与肿瘤细胞侵袭性密切相关的 MVD 显著降低,表明 IGF1R 表达阻断使肝癌细胞在体内的侵袭能力受到明显抑制。

IGF1R 在恶性肿瘤中有选择性表达的特性,使其可望成为肿瘤治疗的有效靶点^[3,6]。Resnicoff 等^[7]认为,体内细胞凋亡程度与 IGF1R 数量减少

有关,在裸鼠中肿瘤的发生严格依赖于细胞逃逸凋亡的数量,IGF1R 数量减少可诱导细胞凋亡。实验显示,在将成纤维细胞置于大鼠皮下的生物扩散时,细胞逐渐凋亡,而过表达 IGF1R 的成纤维细胞及受体表达增加的肿瘤起源细胞存活时间显著延长。此外研究还表明,IGF1R 的数量水平在细胞存活中起着决定性作用,只有达到某一水平,才能将细胞由不进行有丝分裂的模式转化为有丝分裂模式^[7]。这些都表明,以 IGF1R 为靶点是合理而行之有效的。我们在前文中也证实了在体外用 IGF1R-siRNA 转染 IGF1R 阳性的 SMMC7721 细胞后,抑制细胞增殖^[4]。本文在裸鼠体内建立皮下移植肝癌模型,结果证实 IGF1R-siRNA 可下调肿瘤组织 IGF1R 蛋白表达,抑制肿瘤生长。理想的人类肿瘤动物移植模型的建立是研究肿瘤生物学和抗肿瘤实验治疗的重要工具,本实验模型的成功率达 100%,为后续原位肿瘤模型实验奠定了良好的基础。

[参 考 文 献]

- [1] Russell W E, Van Wyk J J, Pledger W J, et al. Inhibition of the mitogenic effect of plasma by a monoclonal antibody to somatomedin C [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984,81(8): 2389-2393.
- [2] Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation [J]. *Mol Pathol*, 2001,54(3):133-137.
- [3] Hellawell G O, Turner G D, Davies D R, et al. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease [J]. *Cancer Res*, 2002,62(10):2942-2950.
- [4] 牛 坚,黄 健,韩泽广,等. RNA 干涉胰岛素样生长因子 1 类受体的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2006,23(7): 872-873.
- [5] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer [J]. *Am J Pathol*, 1995,147(1):9-13.
- [6] Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation [J]. *Mol Pathol*, 2001,54(3):133-137.
- [7] Resnicoff M, Burgaud J L, Rotman H L, et al. Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors [J]. *Cancer Res*, 1995,55(17): 3739-3741.

[编辑及校对:张 菊]