论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0652-04

n-6/n-3 多不饱和脂肪酸不同比例对乳腺癌细胞脂代谢调控基因的影响

韦 娜,糜漫天 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨不同 n-6/n-3 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid,PUFA)构成对乳腺癌细胞脂代谢调控基因及 MAPK 活性的影响。**方法** 选用 MCF-7(ER^+)和 MDA-MB-231(ER^-)乳腺癌细胞为实验对象,用不同 n-6/n-3 PUFA 构成(1~10)处理细胞后,MTT 法观察细胞增殖能力, RT-PCR 分析细胞脂代谢关键性调控基因(COX-2、5-LOX、PPARβ 和 PPARγ)表达变化,Western blot 检测细胞 MAPK 蛋白磷酸化水平。**结果** MCF-7 细胞不表达 COX-2 基因。与对照组相比,单纯 n-6 和 10∶1 n-6/n-3 PUFA 能明显促进这两种乳腺癌细胞增殖,诱导细胞 COX-2、5-LOX、PPARβ 和 PPARγmRNA 表达上调,并促进细胞 MAPK 磷酸化($P<0.01$);与之相反的是,单纯 n-3 和 1∶1 n-6/n-3 PUFA 显著抑制细胞生长,下调细胞 COX-2、5-LOX、PPARβ 和 PPARγ mRNA 表达,并抑制细胞 MAPK 磷酸化($P<0.01$);但 5∶1 n-6/n-3 PUFA 效果不明显。**结论** n-6/n-3 PUFA 不同比例对 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞脂代谢调控基因及信号转导的影响是不同的。在 n-6/n-3 比值为 1~10 范围内,单纯 n-3 和 1∶1 n-6/n-3 能明显抑制脂代谢基因表达及信号转导,发挥显著抗乳腺癌细胞增殖效应。

关键词: n-6/n-3 PUFA 不同比例; 乳腺癌细胞; 脂代谢调控基因; MAPK 活性

中图法分类号: Q591.5; R737.9; R977.6 **文献标识码**: A

Effects of different n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on lipid metabolic gene expression in breast cancer cell lines

WEI Na, MI Man-tian (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of different n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the lipid metabolic gene expression and MAPK activity in breast cancer cell lines. **Methods** MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with n-6 polyunsaturated fatty acid, or n-3 polyunsaturated fatty acid, or the mixture of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid at ratio of 1∶1, 5∶1, 10∶1. The cell proliferation capacity was detected by MTT, the expression of lipid metabolic gene (COX-2, 5-LOX, PPARβ and PPARγ) were assayed by RT-PCR, MAPK phosphorylation levels were detected by Western blotting. **Results** COX-2 mRNA expression was not found in MCF-7 cells. As compared to normal control group, pure n-6 and 10∶1 n-6/n-3 promoted cell proliferation, up-regulated the expression of COX-2, 5-LOX, PPARβ and PPARγ mRNA, increased MAPK phosphorylation levels in MCF-7 and MDA-MB-231 cells ($P<0.01$), while pure n-3 and 1∶1 n-6/n-3 repressed cell proliferation, down-regulated COX-2, 5-LOX, PPARβ and PPARγ mRNA expression, and decreased MAPK phosphorylation levels ($P<0.01$). However, 5∶1 n-6/n-3 had no obvious influence on the lipid metabolic gene expression and MAPK activity. **Conclusion** The different n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio had diverse effects on the lipid metabolic gene expression and signal transduction in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Among the mixture of n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids we studied, pure n-3 and n-6/n-3 at ratio of 1∶1 could significantly inhibit the breast cancer cells proliferation through down-regulating the lipid metabolic gene expression and signal transduction.

Key words: n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio; breast cancer cell; lipid metabolic gene; MAPK activity

乳腺癌是引起妇女死亡的常见肿瘤,也是与膳食脂肪关系最为密切的一类肿瘤。现有研究表明不同种类的脂肪酸对肿瘤发生的影响不同,如 n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 polyunsaturated fatty acid,n-3 PUFA,如鱼油)有抗肿瘤及诱导肿瘤细胞凋亡的作用[1], n-6 PUFA(如葵花籽油、豆油、玉米油等)却能促进肿瘤发生和肿瘤细胞生长,但其中的分子机制不清。更为重要

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500408);"达能"营养基金资助项目(2004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500408) and Danone Nutrition Foundation (2004)

作者简介:韦 娜(1973-),女,重庆市人,博士研究生,实验师,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291

通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292, E-mail: mimt@sina.com

收稿日期:2005-11-06;**修回日期**:2005-12-21

的是,研究表明脂肪组织中适当的 n-6/n-3 PUFA 含量而非这些脂肪酸单一浓度与乳腺癌发病关系密切[2],但何为适当的 n-3/n-6 PUFA 含量目前尚无定论。环氧合酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)、5-脂氧合酶(5-Lipoxygenase,5-LOX)和过氧化物酶增殖活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs)作为脂代谢关键性调控基因,能影响细胞增殖、分化或凋亡,并在肿瘤发生过程中发挥重要作用。因此,本研究中,我们结合人们日常膳食特点,设计 n-6/n-3 比值为 1 ~ 10(从普通食物中较容易获得的范围),通过观察 n-6/n-3 PUFA 不同比例对雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性(ER^+)和阴性(ER^-)乳腺癌细胞系增殖状况、脂代谢关键性调控基因及后续信号转导的影响,探讨何种 n-6/n-3 PUFA 构成具有抗癌作用。

1　材料与方法

1.1　细胞系的培养

MCF-7 人乳腺癌细胞(ER^+)和 MDA-MB-231(ER^-)细胞系由中国科学院上海细胞所提供。细胞在含 10% 热灭活小牛血清的 DMEM/F12 高糖培养基中常规传代培养。

1.2　实验试剂

亚油酸(LA,n-6 PUFA)和二十碳五烯酸(EPA,n-3 PUFA)购自 Sigma 公司,溶于无水乙醇,终浓度为 0.5 mol/L,分装充氮后 -80 ℃保存,每次均使用未开启的储备液,以保证脂肪酸效应。实验设计分为对照组、单纯 n-6 PUFA 处理组、单纯 n-3 PUFA 处理组、1∶1 n-6/n-3 PUFA 组、5∶1 n-6/n-3 PUFA 组、10∶1 n-6/n-3 PUFA 组,共计 6 组。n-6 和 n-3 PUFA 处理细胞剂量参照预实验结果,单独使用时剂量为 1.5×10^{-4} mol /L。Tripure™分离试剂、RT-PCR 试剂购自 Promega 公司。RT-PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。p-ERK、p-P38 和 actin 鼠单克隆抗体购自北京中杉公司。蛋白提取液各组分购自 Sigma 公司。

1.3　实验方法

1.3.1　MTT 比色实验　　MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞以 5×10^4/ml 密度接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl,加入处理因素培养 12 ~ 48 h,收获细胞前 4 h 每孔加入 15 μl MTT(5 mg/ml),继续培养 4 h,弃去培养液,加入 200 μl 二甲基亚砜。室温放置 30 min,用酶标仪在 490 nm 测定 OD 值[D(490)]。

1.3.2　RT-PCR 检测 COX-2、5-LOX、PPARβ 和 PPARγ 的表达

1.3.2.1　提取总 RNA　　将 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞处理 48 h 后,用 1 ml Tripure™分离试剂提取细胞总 RNA,详细步骤参见试剂盒说明书。以紫外分光光度计检测 RNA 含量及 $D(260)/D(280)$ 比值,并保存于 -80 ℃备用。

1.3.2.2　逆转录　　取 3 μg 总 RNA,65 ℃孵育 5 min 后加入 RNA 酶抑制剂、dNTP、$Oligod(T)_{15}$ 及逆转录酶,反应体积为 20 μl,37 ℃、1 h 进行逆转录,70 ℃、10 min 灭活逆转录酶。

1.3.2.3　PCR 扩增　　根据 GenBank 设计的引物序列见表 1。

表 1　引物序列

基因	序列(5′-3′)	退火温度	引物长度(bp)
COX-2	TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT	54 ℃	304
	AGATCATCTTGCCTGAGTATCTT		
5-LOX	CCCGGGGCATGGAGAGCA	60.5 ℃	416
	GCGGTCGGGCAGCGTGTC		
PPARβ	ATGGAGCAGCCACAGGAGGAAGCC	68.5 ℃	198
	GCATGAGGCCCCGTCACAGC		
PPARγ	GACCACTCCCACTCCTTT	59 ℃	240
	CGACATTCAATTGCCATGAG		
GAPDH	CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA	60 ℃	603
	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC		
18S	GGACCAGAGCGAAAGCATTTGCC	65 ℃	495
	TCAATCTCGGGTGGCTGAACGC		

反应总体积 50 μl,加入模板 DNA 0.75 μg,扩增片段上游和下游引物终浓度为 0.3 μmol/L,待 95 ℃变性 5 min 后加入 5.0 U *Taq*DNA 聚合酶,共 40 个循环。取 4 μl 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad 成像分析仪观察并照相。

1.3.3　MAPK 活性分析

1.3.3.1　细胞蛋白的提取　　处理 48 h 后,常规收获各组细胞,在 1×10^7 细胞数中加入 100 μl 预冷至 0 ℃的 NP-40 裂解液(50 mmol/L、pH 8.0 的 Tris · Cl, 150 mmol/L NaCl, 25 mmol/L NaF, 5 mmol/L $Na_4P_2O_7$, 0.1% NP-40, 10 μg/ml Aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, 1 mmol/L PMSF)裂解,冰上放置30 min,4 ℃、12 000 × g 离心 15 min,将上清收集至另一微量离心管。

1.3.3.2　蛋白质浓度测定　　按 Lowry 比色法,以 BSA 为标准蛋白,用 Eppendorf Biophotometer 仪测定样品蛋白浓度。

1.3.3.3　免疫印迹分析　　分别取各组不同组分蛋白 15 μl 样品,加入 15 μl 2 × SDS 加样缓冲液,沸水中煮沸 5 min,经 10% SDS-PAGE 电泳后电转移转膜,1% BSA 封闭 37 ℃、1 h,分别加入稀释后的一抗 37 ℃孵育 1 h,特异性二抗及 SP-HRP 孵育 37 ℃、1 h,再用 0.05% DAB 缓冲液显色 3 min。

1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析。

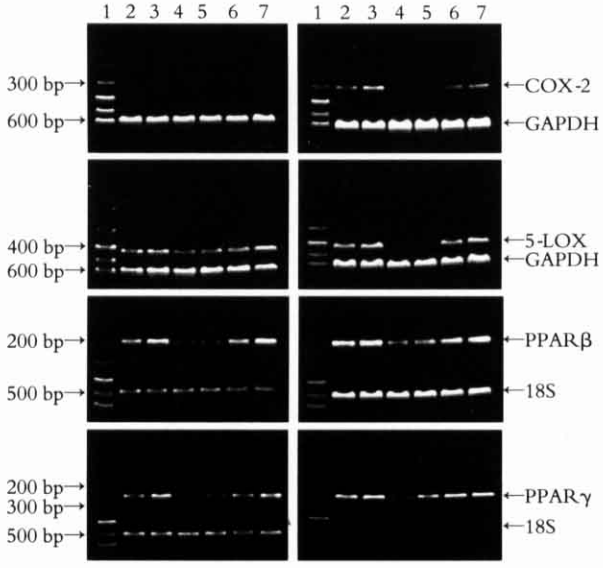
2　结果

2.1　n-6/n-3 PUFA 不同比例对 ER^+ 和 ER^- 乳腺癌细胞增殖能力的影响

n-6/n-3 PUFA 不同比例处理两种细胞 12 h, 未见明显效应。但作用于 MCF-7 细胞 24 ~ 48 h 后,与对照组比较,单纯n-6(LA)、5∶1 n-6/n-3 和 10∶1 n-6/n-3 PUFA 有明显的促细胞增殖作用($P < 0.01$, $F = 542.938$ 和 378.209, $P = 0.000$),而单纯 n-3(EPA)和 1∶1 n-6/n-3 PUFA 则显著抑制细胞的生长($P < 0.01$)。MDA-MB-231 细胞虽经 n-6/n-3 PUFA 不同比例处理 24 ~ 48 h 后具有与 MCF-7 细胞相同趋势($F = 263.133$ 和 $1\,006.749$, $P = 0.000$),但 5∶1 n-6/n-3 PUFA 组与对照组比较,无明显效应($P > 0.05$)。

2.2 n-6/n-3 PUFA 不同比例对 ER^+ 和 ER^- 乳腺癌细胞脂代谢调控基因表达的影响

COX-2、5-LOX、PPARβ 和 PPARγ 作为细胞脂代谢关键性调控基因，n-6/n-3 PUFA 不同比例处理 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 48 h，除 MCF-7 细胞不表达 COX-2 基因外，与对照组比较，单纯 n-6 和 10∶1 n-6/n-3 PUFA 明显促进细胞 COX-2、5-LOX、PPARβ 和 PPARγ mRNA 表达。与之相反的是，单纯 n-3 和 1∶1 n-6/n-3 PUFA 显著降低 COX-2、5-LOX、PPARβ 和 PPARγ mRNA 表达。而 5∶1 n-6/n-3 PUFA 组对这些脂代谢调控基因表达无明显作用（$P>0.05$），见图 1。



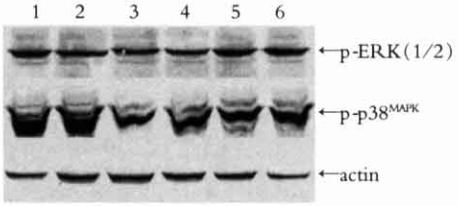
左：MCF-7 乳腺癌细胞；右：MDA-MB-231 乳腺癌细胞

1：PCR 标准；2：对照组；3：n-6 PUFA 组；4：n-3 PUFA 组；5：1∶1 n-6/n-3 组；6：5∶1 n-6/n-3 组；7：10∶1 n-6/n-3 组

图 1 n-6/n-3 PUFA 不同比例对 ER^+ 和 ER^- 乳腺癌细胞脂代谢调控基因表达的影响

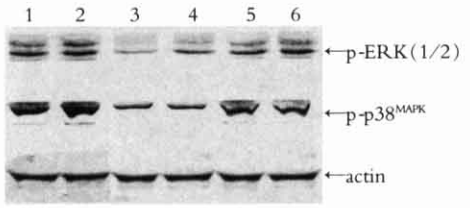
2.3 n-6/n-3 PUFA 不同比例对 ER^+ 和 ER^- 乳腺癌细胞 MAPK 活性的影响

免疫印迹结果显示，n-6/n-3 PUFA 不同比例处理 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 48 h，与对照组比较，单纯 n-6 和 10∶1 n-6/n-3 PUFA 可上调两种乳腺癌细胞 ERK 和 $p38^{MAPK}$ 蛋白磷酸化水平，单纯 n-3 和 1∶1 n-6/n-3 PUFA 下调这两种蛋白磷酸化，而 5∶1 n-6/n-3 PUFA 无明显影响（$P>0.05$）。见图 2、3。



1：对照组；2：n-6 PUFA 组；3：n-3 PUFA 组；4：1∶1 n-6/n-3 组；5：5∶1 n-6/n-3 组；6：10∶1 n-6/n-3 组

图 2 n-6/n-3 PUFA 不同比例对 MCF-7 乳腺癌细胞 MAPK 活性的影响



1：对照组；2：n-6 PUFA 组；3：n-3 PUFA 组；4：1∶1 n-6/n-3 组；5：5∶1 n-6/n-3 组；6：10∶1 n-6/n-3 组

图 3 n-6/n-3 PUFA 不同比例对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 MAPK 活性的影响

3 讨论

大量研究表明膳食脂肪的摄入和种类与乳腺癌的发生、发展关系密切，且指出脂肪组织中适当的 n-6/n-3 PUFA 含量而非这些脂肪酸单一浓度与乳腺癌息息相关[2]。目前，我国国人的膳食脂肪摄入主要以 n-6 PUFA（葵花籽油、豆油等）为主，导致 n-6 与 n-3 PUFA 的比值较高，而近年来我国乳腺癌发病率呈逐年升高的趋势，尤其在经济发达地区和部分大城市[3]。因此，研究膳食中 n-6 与 n-3 PUFA 适当比例迫在眉睫。

n-6 PUFA 是 COX-2 和 5-LOX 的特异性底物，研究表明，n-6 PUFA 在细胞膜上与 COX-2 和 5-LOX 反应，生成的花生酸类化合物（如 PGE_2、12-羟甘碳四烯酸等）具有促癌作用。而 COX-2 和 5-LOX 在乳腺癌细胞中高表达，可通过活化 G-蛋白耦联受体、促进肿瘤血管生成、抑制细胞凋亡和机体免疫力等途径，增强癌细胞增殖、迁移和侵袭[4]。n-3 PUFA 相对 n-6 PUFA 而言，与 COX-2 和 5-LOX 具有更高的亲和性，当这两种脂肪酸同时存在时，n-3 PUFA 能竞争性抑制 COX-2 和 5-LOX 活性，且已发现减少 n-6 PUFA 代谢产物的合成是 n-3 PUFA 最显著的抑癌机制之一[5]。但 COX-2 与 5-LOX 不同的是，COX-2 在乳腺癌细胞中表达率仅为 60%，并与高病理分级、ER^-、肿瘤转移等预后不良相关。在本研究中，我们发现 MCF-7 细胞不表达 COX-2 基因，可能与 MCF-7 作为低侵袭性乳腺癌细胞的这一特性有关。而在 n-6/n-3 PUFA 不同比例中，单纯 n-6 和 10∶1 n-6/n-3 能增强 ER^+ 和 ER^- 乳腺癌细胞增殖和 COX-2、5-LOX mRNA 表达，5∶1 n-6/n-3 虽无明显效应，但单纯 n-3 和 1∶1 n-6/n-3 却明显降低两种乳腺癌细胞增殖[6]和 COX-2、5-LOX mRNA 表达。推测可能在单纯 n-3 和 1∶1 n-6/n-3 组中，n-3 PUFA 竞争性抑制 n-6 PUFA 与 COX-2 和 5-LOX 的结合，降低 COX-2 和 5-LOX 活性的同时，使 n-6 PUFA 生成的花生酸类化合物合成受阻，从而抑制乳腺癌细胞生长。

PPARs 是脂肪酸代谢的重要细胞核受体，其调控

的基因参与细胞增殖、分化或凋亡过程。由于还是配体活化的转录因子，n-6 和 n-3 PUFA 及其代谢产物作为 PPARs 内源性配体，参与 PPARs 功能调节[7]。Saez 等[8]证实，加强 PPARβ 和 PPARγ 核受体介导的 Wnt、细胞周期调控蛋白、NF-κB 等信号途径能加剧乳腺癌发展。且 COX-2 与 PPARs 存在内在联系，Callejas 等[9]指出人乳腺上皮细胞的 COX-2 启动子内含有过氧化物酶增殖反应元件（PPRE），COX-2 表达可受 PPARβ 和 PPARγ 调控。结合本研究，n-6/n-3 PUFA 不同比例处理乳腺癌细胞后，其 PPARβ 和 PPARγ mRNA 表达与 COX-2 具有相同变化趋势，即单纯 n-6 和 10∶1 n-6/n-3 上调 PPARs 基因表达，5∶1 n-6/n-3 无明显效应，而单纯 n-3 和 1∶1 n-6/n-3 PUFA 下调 PPARs 基因表达。提示 n-6 和 n-3 PUFA 虽同为 PPARs 内源性配体，对 PPARs 转录活性的调节却具有完全相反的作用，这可能也是 n-6/n-3 PUFA 不同比例发挥对乳腺癌细胞增殖截然相反效应的重要分子机制。此外，本研究还显示，单纯 n-6 和 10∶1 n-6/n-3 增加 ERK1 和 $p38^{MAPK}$ 蛋白活性，单纯 n-3 和 1∶1 n-6/n-3 抑制 MAPK 信号通路的转导，而根据文献[10]报道，下调 $p38^{MAPK}$ 活性也可抑制 COX-2 mRNA 表达，表明 n-6 和 n-3 PUFA 可通过多条途径调控乳腺癌细胞增殖。

由此，我们的研究表明 n-6/n-3 PUFA 不同比例对乳腺癌细胞脂代谢调控基因及信号转导的影响是不同的。n-6/n-3 比值为 1～10，单纯 n-3 和 1∶1 n-6/n-3 能发挥明显的抗乳腺癌细胞增殖的作用。

参考文献：

[1] STILLWELL W, JENSKI L. International workshop on cellular and molecular aspects of omega-3 fatty acids and cancer[J]. J Lipid Res, 2002, 43 (9): 1579 - 1580.

[2] TERRY P D, ROHAN T E, WOLK A. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence[J]. Am J Clin Nutr, 2003, 77(3): 532 - 543.

[3] 陈可欣，何　敏，董淑芬，等. 天津市女性乳腺癌发病率死亡率和生存率分析[J]. 中华肿瘤杂志，2002，24(6)：573 - 575.

[4] SINGH B, BERRY J A, SHOHER A, *et al*. COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells[J]. Int J Oncol, 2005, 26(5): 1393 - 1399.

[5] LARSSON S C, KUMLIN M, INGELMAN-SUNDBERG M, *et al*. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms[J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79(6): 935 - 945.

[6] 韦　娜，糜漫天. n-6/n-3 多不饱和脂肪酸不同比例对乳腺癌细胞缝隙连接细胞通讯的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(4)：338 - 341.

[7] KOTA B P, HUANG T H, ROUFOGALIS B D. An overview on biological mechanisms of PPARs[J]. Pharmacol Res, 2005, 51(2): 85 - 94.

[8] SAEZ E, ROSENFELD J, LIVOLSI A, *et al*. PPAR gamma signaling exacerbates mammary gland tumor development[J]. Genes Dev, 2004, 18(5): 528 - 540.

[9] CALLEJAS N A, CASTRILLO A, BOSCA L, *et al*. Inhibition of prostaglandin synthesis up-regulates cyclooxygenase-2 induced by lipopolysaccharide and peroxisomal proliferators[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 288(3): 1235 - 1241.

[10] GAUTHIER M L, PICKERING C R, MILLER C J, *et al*. p38 regulates cyclooxygenase-2 in human mammary epithelial cells and is activated in premalignant tissue[J]. Cancer Res, 2005, 65(5): 1792 - 1799.

（编辑　薛国文）

（上接 651 页）

病例是因其他疾病就诊或尸检发现。文献报道该瘤发生钙化的几率高于其他肾肿瘤，所以边界清楚的肿瘤伴有钙化可提示该瘤的可能。后肾腺瘤好发于肾皮质，多为单侧结节状肿块，直径 0.3～20 cm，肿瘤可有包膜，与周围肾组织分界清楚，切面灰黄色，实性，可见出血坏死、囊性变及钙化，肿瘤细胞小而一致，分化成熟，形态良性，无核分裂像，排列成小管状，疏密不一，也可呈花蕾状，似肾小球样结构，部分可见乳头状排列，间质常有水肿。免疫组化染色呈 Vimentin 阳性，EMA 阴性[4]。本组病例均为体检发现的肾脏包块，呈椭圆形，直径 2 cm 和 8 cm。镜下肿瘤由均匀一致的小细胞构成，排列成肾小管样结构。免疫组化肿瘤细胞呈 Vimentin 阳性，广谱上皮标记 CAM5.2阳性，EMA 阴性。后肾腺瘤预后较好，单纯手术摘除尚无复发病例。建议术前行穿刺活检或术中冰冻诊断，避免肾脏切除。本组 1 例行肿块摘除，另 1 例因肿瘤较大，压迫周围肾组织行左肾切除治疗，2 例术后随访 1 年和 3 个月，一般情况均可，无肿瘤复发。

关键词：肾脏；后肾腺瘤

中图法分类号：R737.11　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 樊　峰，纪小龙，吴伟国，等. 肾脏后肾腺瘤 1 例并文献复习[J]. 诊断病理学杂志，1999，6(2)：124 - 125.

[2] 文载律，罗　伟，陈乐真. 后肾性腺瘤 3 例报道并文献复习[J]. 临床与实验病理学杂志，2002，18(2)：143 - 145.

[3] 周　虹，吴秋良，张　萍. 后肾性腺瘤 3 例分析[J]. 昆明医学院学报，2004，25(1)：94 - 96.

[4] MOSTOFI F K, DAVIS C J. World Health Organization. Histological typing of kidney tumours[M]. 2nd ed. New York: Spinger, 1998: 8.

（编辑　龙　亮）