论著

文章编号:1000-5404(2009)23-2302-04

马兜铃酸对人肾小管上皮细胞损伤的体外实验研究

王梓华,黄云剑 (第三军医大学新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 研究马兜铃酸(aristolochic acid,AA)对人近端肾小管上皮细胞(HK-2细胞)的损伤及可能机制。**方法** 将细胞分为4组:正常对照组与AA30、60、120 μmol/L组($n=6$),分别作用于HK-2细胞培养48 h后,倒置相差显微镜观察细胞形态,CCK8试剂盒(Cell Counting Kit-8)检测增殖,流式细胞仪检测凋亡,Western blot分析激活型Caspase-3的表达,全自动生化检测仪测定上清液中乳酸脱氢酶(LDH)和β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG酶)的含量,激光共聚焦扫描荧光显微镜(laser scanning confocal microscope,LSCM)观察α-平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin,α-SMA)和E-钙黏连蛋白(E-cadherin)的表达,ELISA测定上清液中转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)和Ⅲ型胶原的分泌。**结果** HK-2分别在30、60、120 μmol/L AA作用48 h后,出现增殖抑制,凋亡增加,激活型Caspase-3表达增多,LDH和NAG酶升高,均呈剂量依赖性。60 μmol/L浓度的AA还表现E-cadherin表达减弱,α-SMA表达增强,TGF-β1和Ⅲ型胶原分泌明显增加($P<0.05$)。**结论** AA可引起HK-2细胞明显的增殖抑制、凋亡和上皮-间充质转分化呈一定的浓度依赖性。

关键词: 马兜铃酸;肾小管上皮细胞;转分化;凋亡

中图法分类号: R392.12 **文献标识码:** A

Mechanism of aristolochic acid induced injury in human renal tubular epithelial cells *in vitro*

WANG Zi-hua, HUANG Yun-jian (Department of Nephrology, Renal Disease Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the possible injury mechanism of human kidney proximal tubular epithelial cell-2 (HK-2) induced by aristolochic acid (AA). **Methods** Cultured HK-2 cells were divided into 4 groups: normal control, treated by AA at the concentration of 30, 60 and 120 μmol/L for 48 h respectively. The morphological changes were observed by inverted phase contract microscopy. The cell viability was measured by the Cell Counting Kit-8 (CCK8) assay. Apoptotic cells were identified by flow cytometry. Expression of active Caspase-3 was measured by Western blot analysis. Automatic biochemical analyzer was used to detect the contents of LDH and β-N-Acetylglucosaminidase (NAG) in the supernatant. The expression of E-cadherin and a-SMA was detected with laser scanning confocal microscope (LSCM). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of TGF-β1 and collagen Ⅲ in the supernatant quantitatively. **Results** AA inhibited HK-2 cells proliferation, induced cell apoptosis and activated Caspase-3 expression, and increased the LDH and NAG levels. All of these were in a concentration-dependent manner. AA at the concentration of 60 μmol/L inhibited E-cadherin expression, increased α-SMA expression and TGF-β1 and collagen Ⅲ secretion. **Conclusion** AA inhibits cell proliferation, induces apoptosis and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in HK-2 cells. AA at relatively low concentration (≤60 μmol/L) mainly induces EMT in HK-2 cells, while, that at high concentration (≥120 μmol/L) causes apoptosis and cytotoxicity.

Key words: aristolochic acid; human renal tubular epithelial cells; transdifferention; apoptosis

马兜铃酸(aristolochic acid,AA)是马兜铃属植物的主要成分,常用于利胆、利水、通络。常用中草药有:马兜铃、关木通、广防己等。目前中草药肾毒性问题已引起国内外学者的广泛关注。国外学者已发现服用某些含有AA的中草药后可导致肾小管间质进行性纤维化(renal tubulointerstitial fibrosis,RIF),最终引起肾功能衰竭,称之为马兜铃酸肾病(aristolochic acid nephropathy,AAN)[1],其发病机制不明。本实验拟观察不同浓度AA作用于HK-2一定时间后的增殖、凋亡、酶代谢等表现,并探讨AA浓度与损伤之间的关系及可能的发病机制,为临床治疗提供指导。

基金项目: 国家自然科学基金(30570871);重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5017)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570871) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5017)

作者简介: 王梓华,女,河北省石家庄市人,硕士研究生,医师,主要从事中毒性肾病及肾间质纤维化方面的研究。E-mail:wangzihua2001@163.com

通信作者: 黄云剑,电话:(023)68774021,E-mail:yun81@sina.com

收稿日期: 2009-05-26;**修回日期:** 2009-06-18

1　材料与方法

1.1　材料

人近端肾小管上皮细胞株(human kidney proximal tubular epithelial cell-2,HK-2)购自美国 ATCC 菌种保藏中心。马兜铃酸购自美国 Sigma 公司,DMEM-F12 培养基及胎牛血清(美国 Hyclone 公司),兔抗人 α-平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,α-SMA)抗体(英国 Abcam 公司),小鼠抗人 E-cadherin 抗体(美国 Santa Cruz 公司),小鼠抗人 β-actin 抗体、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉公司),Cy3 标记山羊抗兔 IgG、兔抗激活型 Caspase-3 抗体、CCK8 试剂盒(中国碧云天生物公司),TGF-β1 和Ⅲ型胶原 ELISA 试剂盒(中国晶美生物公司),其余无机盐均为国产分析纯产品。

1.2　细胞培养及分组

HK-2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液传代培养,条件为 37 ℃,5% CO_2。分为 4 组($n=6$):正常对照组(仅加入培养液),AA30 组(AA 的终浓度 30 μmol/L),AA60 组(AA 的终浓度 60 μmol/L),AA120 组(AA 的终浓度 120 μmol/L),观察 48 h 后各指标的变化。

1.3　观察指标

1.3.1　细胞形态　　于倒置显微镜下观察 48 h 后各组细胞的形态变化。

1.3.2　CCK8 试剂盒检测细胞增殖情况　　HK-2 接种于 96 孔培养板中,待 12 h 细胞贴壁后,换为无血清培养基培养 24 h 使处于同步状态,加入各处理因素培养 48 h,每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,在细胞培养箱中孵育 0.5 ~ 4 h,使用酶联免疫仪以 450 nm 为检测波长,用空白孔调零,读取光密度值[$D(450)$]。

1.3.3　流式细胞仪检测细胞凋亡　　HK-2 接种于 50 ml 培养瓶中,24 h 同步化,加入各处理因素 48 h 后,收集细胞悬液,PBS 漂洗,用 250 μl 结合缓冲液悬浮细胞,调节细胞数为 1×10^6 个/ml,取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5 μl AnnexinV/FITC 和 20 μg/ml 的碘化丙锭溶液 10 μl,混匀后于室温避光孵育 15 min;在反应管中加入 400 μl 结合缓冲液,及时上流式细胞仪分析。

1.3.4　Western 印迹分析激活型 Caspase-3 的表达　　各组细胞经 RIPA 液裂解,12 000 r/min 4 ℃离心 30 min 提取细胞蛋白。用 Bradford 法测定蛋白质浓度,加入上样缓冲液煮沸 5 min 后行 10% SDS-PAGE 垂直凝胶电泳,再将蛋白质电转移到 PVDF 膜上,室温下 5 % 脱脂牛奶封闭 2 h,TBST 液洗膜后分别与兔抗激活型 Caspase-3 抗体(1∶1 000)或小鼠抗 β-actin 抗体(1∶1 000)在 4 ℃下孵育过夜,再用 1∶1 000 稀释的辣根过氧化酶标记的山羊抗兔或山羊抗小鼠-IgG,37 ℃,1 h,TBST 液洗膜后在暗室中加 ECL 发光试剂,X 光胶片下曝光,常规方法显影、定影。用 Gel Doc2000 凝胶成像系统在可见光投射下观察照相,并对各条带进行图像扫描分析,测定积分光密度值(integrating optical density,IOD),计算激活型 Caspase-3 与 β-actin IOD 的比值,作为蛋白的相对含量。

1.3.5　LDH 和 NAG 酶含量测定　　HK-2 以 2×10^5/孔接种于 24 孔培养板中,加入各处理因素后 48 h,采用全自动生化检测仪检测细胞上清液中 LDH 和 NAG 酶的含量。

1.3.6　免疫荧光染色测定细胞 α-SMA 和 E-cadherin 的表达　　HK-2 接种于放有盖玻片的 24 孔培养板中,贴壁后,换为无血清培养基培养 24 h 后,加入各组浓度的 AA 培养 48 h。细胞爬片经 4% 多聚甲醛固定,血清封闭后加入抗 E-cadherin 抗体,4 ℃过夜,加入 FITC 标记的二抗,37 ℃孵育 30 min,PBS 漂洗,0.1% 的 triton 打孔 30 min,加入抗 α-SMA 抗体,4 ℃过夜,Cy3 标记的二抗在 37 ℃下孵育 30 min,PBS 漂洗,特异性核染色剂 DAPI(1∶500)室温下避光染核 30 min,PBS 漂洗,水溶性封片剂封片,通过 LSCM 观察和计算平均荧光强度。

1.3.7　ELISA 检测　　HK-2 以 2×10^5/孔接种于 24 孔培养板中,加入各处理因素后 48 h,通过 ELISA 试剂盒测定上清液中 TGFβ1 和Ⅲ型胶原的含量。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,组间比较运用单因素方差分析。

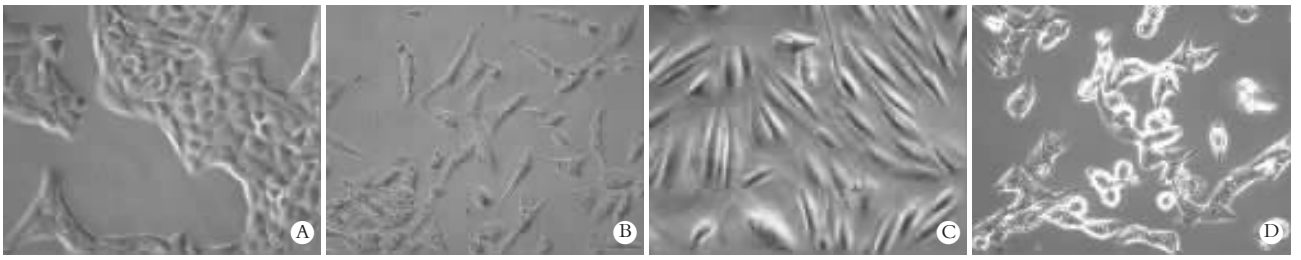
2　结果

2.1　AA 对 HK-2 细胞形态的影响

正常对照组可见 HK2 细胞间连接紧密,成团生长,形态呈鹅卵石样。AA30 组可见细胞连接松散,部分细胞失去鹅卵石样的形态,拉长呈纺锤状。AA60 组可见大多数细胞拉长呈纺锤状,似成纤维细胞。AA120 组可见到多数细胞缩小变圆,漂浮增多,表明细胞凋亡或坏死增多(图 1)。

2.2　AA 对 HK-2 细胞增殖和凋亡的影响及其细胞毒效应

与正常对照组相比,AA30 组和 AA60 组细胞增殖 $D(450)$ 值有所降低($P>0.05$);在 AA120 组的 $D(450)$ 值显著降低($P<0.05$),细胞出现明显的增殖抑制。与正常对照组相比,各浓度 AA 组凋亡值均显著增加($P<0.05$),AA120 组凋亡值达到最大值。LDH 和 NAG 酶的含量均随着 AA 浓度的提高而增加,分别同正常对照组和 AA30 组比较,在 AA 60 组显著增加($P<0.05$),在 AA120 组,两酶值均达到最大($P<0.05$),表明此时 HK-2 细胞损伤最重(表 1)。



A:正常对照,B: AA30 组, C:AA60 组,D:AA120 组

图 1　4 组 HK-2 细胞培养 48 h 后形态学比较　(倒置相差显微镜 ×400)

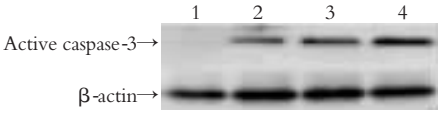
表1 各组浓度的AA对HK-2细胞增殖和凋亡的影响及其细胞毒效应($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	D(450)	凋亡值(%)	LDH (U/L)	NAG(U/L)
正常对照组	0.445±0.068	4.43±0.30	224.47±17.24	7.87±0.24
AA30组	0.442±0.062	10.65±0.12[a]	249.62±20.17	8.03±0.11
AA60组	0.422±0.051	27.93±0.75[ab]	279.04±29.94[ab]	15.25±0.12[ab]
AA120组	0.335±0.076[abc]	38.86±0.56[abc]	325.85±24.67[abc]	28.53±0.14[abc]

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与AA30组比较;c:$P<0.05$,与AA60组比较

2.3 AA对HK-2细胞表达激活型Caspase-3的影响

Western blot及蛋白相对含量检测示,激活型Caspase-3在正常对照组中几乎无表达(0.04±0.01),同正常对照组相比,在AA30组(0.38±0.04)、AA60组(0.60±0.08)、AA120组(0.64±0.03)表达均显著增加($P<0.05$),AA120组同AA60组相比,表达未有明显增加(图2)。



1:E-cadherin;2:AA30组;3:AA60组;4:AA120组

图2 AA对HK-2细胞表达激活型Caspase-3的影响

2.4 AA对HK-2细胞E-cadherin和α-SMA的影响

正常对照组HK-2细胞正常表达E-cadherin,几乎无α-SMA的表达;同正常对照组相比,随着AA浓度的增加,HK-2细胞E-cadherin的荧光强度显著降低($P<0.05$),在AA 120 μmol/L浓度时降至最低。同正常对照组相比,AA30组和AA60组细胞α-SMA的荧光强度显著增强($P<0.05$);同AA60组相比,AA120组细胞α-SMA的荧光强度明显减弱($P<0.05$),可能与AA所致细胞损伤有关(表2)。

表2 各浓度AA作用后α-SMA和E-cadherin的表达平均荧光强度变化($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	E-cadherin	α-SMA
正常对照组	789±42	45±4
AA30组	537±44[a]	156±11[a]
AA60组	270±29[ab]	393±21[ab]
AA120组	220±21[abc]	167±11[ac]

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与AA30组比较;c:$P<0.05$,与AA60组比较

2.5 AA对HK-2细胞分泌因子的影响

同正常对照组相比,AA30组细胞分泌TGF-β1和Ⅲ型胶原均有所增加,但差异不显著;在AA60组TGF-β1和Ⅲ型胶原分泌均明显增加($P<0.05$);同AA30组和AA60组比较,在AA120组,TGF-β1和Ⅲ型胶原均明显下降($P<0.05$),这可能与细胞出现明显的增殖抑制和细胞损伤有关(表3)。

表3 ELISA测定上清液中TGF-β1和Ⅲ型胶原的分泌($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	TGF-β1 (pg/ml)	Ⅲ型胶原(ng/ml)
正常对照组	83.37±0.78	10.55±1.33
AA30组	84.41±0.91	12.59±1.69
AA60组	128.27±1.01[ab]	58.63±3.37[ab]
AA120组	77.48±1.12[abc]	9.43±0.93[bc]

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与AA30组比较;c:$P<0.05$,与AA60组比较

3 讨论

AA是马兜铃科植物的主要成分,主要损伤部位是肾小管细胞。持续或大量服用AA,患者多进入不可逆的肾功能衰竭,目前对AA损伤机制未完全了解,治疗上也无有效办法,所以明确AA的致病机制,对临床治疗有着重要的指导意义。本实验采用较MTT法灵敏度高、重复性好的CCK8法检测HK-2细胞的增殖,以及流式细胞仪检测凋亡。结果显示,在低浓度(30、60 μmol/L) AA时,细胞增殖D(450)值有所降低,但无统计学差异,这与我们选择AA浓度以不明显影响细胞增殖活性有关,但在120 μmol/L浓度时,细胞增殖抑制与正常对照组差异有统计学意义,说明随着AA浓度的增加,HK-2增殖明显受到影响。与正常对照组相比,在各浓度AA组凋亡值均显著增加,AA浓度越大,HK-2凋亡越明显,在120 μmol/L浓度时,贴壁细胞数量减少,漂浮细胞增多。上述结果表明AA浓度越高,HK-2细胞增殖抑制和凋亡越明显。AA是通过何种途径启动肾小管细胞的凋亡机制仍然不清楚。由半胱氨酸蛋白水解酶(Caspase)家族成员介导的蛋白酶级联反应过程在凋亡过程中的作用至关重要,其中Caspase-3是哺乳动物细胞凋亡中的关键蛋白酶[2],凋亡发生时被激活为有活性的Caspase-3,裂解相应的细胞质和细胞核底物而诱导细胞凋亡[3]。本实验Western blot显示在各浓度AA组,激活型Caspase-3表达均增加,该作用呈浓度依赖性,表明AA可能是通过激活Caspase-3酶活性而诱导HK-2细胞凋亡的。本研究表明AA120组同AA60组相比,活化Caspase-3表达未有明显增加,可能的原因是AA在120 μmol/L时有明显细胞毒效应,细胞损伤相对严重,结构被破坏,各种蛋白亦被破坏降解。但Caspase-3具体通过何种途径激活尚待进一步探讨。

检测肾小管损伤的标志酶有LDH、NAG酶等。LDH是糖降解过程中一种重要的酶,NAG是细胞溶酶体内的酸性溶解酶,两者在肾脏中以肾小管含量最高,急性损伤时,胞内的酶释放出来引起上清酶含量增高[4,5]。本实验发现,细胞上清液中LDH和NAG酶的含量随着AA浓度的升高而增加,提示AA浓度越高,生化代谢紊乱越严重,产生的细胞毒效应越明显。

本实验结果还提示AA在较低浓度时,肾小管细胞出现了EMT表现。肾小管细胞发生EMT时主要表现为细胞极性和紧密连接消失,E-cadherin表达受抑制,表达α-SMA、波形蛋白。E-cadherin降低和α-SMA表达是发生EMT的主要表现。其中E-cadherin是上皮细胞的标记分子,对维持细胞间紧密连接,稳定细胞表型具有重要的作用[6]。肾小管上皮细胞表达α-SMA是其向肌成纤维细胞(myofibroblasts,MF)转分化的标志[7]。我们实验显示在AA达到60 μmol/L时EMT较为明显,可见多数细胞拉长,呈纺锤状细胞,失去鹅卵石样的形状,同时E-cadherin表达减弱,α-SMA的表

达增强,但在 AA 120 μmol/L 时,因细胞活性受到影响,上皮-间充质转分化表现反而不明显。说明在 AA 较低浓度时,肾小管一方面出现增殖抑制、凋亡增加,另一方面出现上皮-间充质转分化,这与 AAN 临床分型中慢性 AAN 的表现一致[8]。肾小管细胞表达 α-SMA 多数情况与 TGF-β1、TNF-α、IL--1、CTGF 等致纤维化因子有关,其中 TGF-β1 作用最为明显,介导Ⅲ型胶原等细胞外基质沉积,加重 RIF[9]。本研究 ELISA 也显示,同对照组相比,在 30 μmol/L AA 浓度时,细胞分泌 TGF-β1 和Ⅲ型胶原分泌均有所增加,在 60 μmol/L AA 浓度时,TGF-β1 和Ⅲ型胶原分泌均明显增加,提示在 AA 较低浓度时 EMT 发生与 TGF-β1 表达有关。EMT 是 RIF 的重要原因[10],因此,探讨 AA 肾病 EMT 机制对寻找有效治疗方法有重要意义。

总之,AA 可引起 HK-2 细胞增殖抑制、凋亡和 EMT,在不明显影响细胞活力和增殖的情况下,AA 可诱导肾小管细胞发生 EMT,但高浓度条件下,细胞可出现明显的细胞凋亡和生化代谢紊乱,产生明显的细胞毒效应。尽管我们的实验提示凋亡与 HK-2 Caspase-3 酶活化有关,EMT 与 HK-2 TGF-β1 分泌增加有关,但详细的机制需要进一步研究。

参考文献:

[1] Cosyns J P. Aristolochic acid and 'Chinese herbs nephropathy': a review of the evidence to date[J]. Drug Saf,2003,26(1):33 - 48.

[2] El-Atat F A, Stas S N, McFarlane S I, *et al*. The relationship between hyperinsulinemia, hypertension and progressive renal disease[J]. J Am Soc Nephrol,2004,15(11):2816 - 2827.

[3] Balachandran P,Wei F,Lin R C,*et al*. Structure activity relationships of aristolochic acid analogues: toxicity in cultured renal epithelial cells [J]. Kidney Int,2005,67(5):1797 - 1805.

[4] Mohas M, Szigeti N, Marko L, *et al*. Serum total LDH activity and LDH-2 isozyme in nephrotic syndrome[J]. Kidney Blood Press Res, 2008,31(1):47 - 54.

[5] Kagawa T, Takao T, Horino T,*et al*. Angiotensin II receptor blocker inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced cell damage in human renal proximal tubular epithelial cells[J]. Nephrology (Carlton),2008, 13(4):309 - 315.

[6] Bedi S, Vidyasagar A, Djamali A. Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis[J]. Transplant Rev (Orlando),2008,22(1):1 - 5.

[7] 吕智美,邓华聪,诸葛福媛,等. AP-1 活化在高糖诱导肾小管上皮细胞转分化中的作用[J]. 第三军医大学学报,2008,30(22):2107 - 2110.

[8] Li X,Wang H. Aristolochic acid nephropathy: what we know and what we have to do[J]. Nephrology (Carlton),2004,9(3):109 - 111.

[9] Kisseleva T, Brenner D A. Fibrogenesis of parenchymal organs[J]. Proc Am Thorac Soc,2008,5(3):338 - 342.

[10] Burns W C,Kantharidis P,Thomas M C. The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease[J]. Cell Tissues Organs,2007,185(1 - 3):222 - 231.

(编辑　龙　亮)

(上接 2298 页)

Malmö 对 7165 例死亡的癌症患者进行了大量的实践工作,结果发现 92 例存在胃转移,转移率为 1.28%。在瑞典进行的一项大的尸检系列研究中发现大部分继发性胃癌是由乳腺转移而来,其次是恶性黑色素瘤和肺癌,较少见的还有来自卵巢、睾丸、肝、结肠以及腮腺的癌可转移至胃。有报道显示,50% ~ 70% 的乳腺癌患者发生了胃转移[1]。然而来自荷兰的一项长达 15 年的研究显示,3569 例原发性乳腺癌患者仅有 27 例患者的原发性乳腺癌转移到胃[2]。任何恶性肿瘤均可通过血行转移至胃,上皮性肿瘤发生血行胃转移较罕见,主要见于肺及乳腺的恶性肿瘤,原发性乳腺癌胃转移常为小叶癌而非导管癌[3],其临床及病理改变与胃的原发性低分化腺癌无明显差异,常规鉴别困难,依靠临床病史、免疫组织化学染色及分子标记物可助区分胃内的印戒细胞癌是否为转移性乳腺癌。转移性乳腺癌表达:ER 72%,PR 33%,GCDFP 78% 和 CK5/6 61%,而原发性胃癌表达:ER 0%,PR 0%,GCDFP 0%,CK5/6 14%[4],CK7 和 CK20 在鉴别诊断中亦能发挥重要的作用,CK7 阳性常提示为转移性癌,而 CK20 阳性常提示为原发性癌。

出血和上腹部痛是乳腺癌胃转移患者最常见的症状,还可伴有呕吐和食欲减退等症状,个别患者可缺乏腹部症状。诊断为原发性乳腺癌后发生胃转移的平均间隔时间为 6(0.12 ~ 12.5)年。1 例乳腺癌患者在其原发癌被诊断 30 年后发生了胃转移。原发性乳腺癌发生胃转移表示肿瘤已经到了晚期、扩散期,常可见到其他部位的血行转移,如骨、脑转移等。患者的预后非常差,平均生存时间为 11 个月,范围从 3 个月到 5 年不等。其胃镜下改变主要有 3 种形态:①火山口样溃疡;②单个或多个胃壁内散在的局限性结节或呈息肉状改变,可有或无溃疡;③局限性或弥漫性胃壁受累,胃腔狭窄、僵硬,蠕动消失,呈皮革胃改变。

尽管随着医学水平的发展,肿瘤患者的预后逐渐改善,但胃肠转移也经常发生。因此,应对恶性肿瘤患者进行详细的内镜检查,内镜活检以及患者临床病史相关信息对于正确诊断胃转移有益。我们认为早期诊断胃肿瘤是原发性还是继发性是非常必要的,这为临床采取正确、及时和有效的治疗措施提供科学的依据,从而可提高患者的生存质量。

关键词: 乳腺;胃;转移癌

中图法分类号: R735.2; R737.9　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] Majerus B, Timmermans M. Gastric metastases of ovarian adenocarcinoma. Apropos of a case[J]. Acta Chir Belg, 1990, 90(4):166 - 171.

[2] 虞积耀,崔全才. 消化系统肿瘤病理学和遗传学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:76 - 77.

[3] 回允中. ROSAI&ACKERMAN 外科病理学[M]. 第 9 版. 北京:北京大学医学出版社,2006:686.

[4] 黄文斌, 陈洁宇. 免疫组化在区分胃肠道原发性腺癌和转移性乳腺癌中的价值[J]. 临床与实验病理学杂志,2005,20(3):302.

(编辑　张　维)