论著

文章编号:1000-5404(2010)09-0912-05

人结肠癌细胞株 CW-2 干细胞富集方法的比较

刘 美,李少林,陈 宓,李小青,龙 浩 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院放射医学教研室)

[摘要] **目的** 比较3种细胞分选方法对人结肠癌细胞株 CW-2 干细胞的富集效率,探讨获得肿瘤干细胞的有效方法。**方法** 采用单纯无血清悬浮培养、无血清悬浮培养+奥沙利铂、无血清悬浮培养+奥沙利铂+流式细胞术(多重联合)分别富集人结肠癌细胞株 CW-2 干细胞;应用流式细胞术、NOD-SCID 小鼠致瘤实验和 Transwell 侵袭实验比较3种方法的富集效率;分别测量不同时间点(4、7、9、14、21、28 d)各组小鼠成瘤情况;免疫组化检测移植瘤中 CD44 和 EPCAM 的表达情况。**结果** 无血清悬浮培养细胞、无血清悬浮培养+奥沙利铂处理细胞和多重联合分选细胞中具有结肠癌干细胞特性的 $CD44^+EPCAM^+$ 细胞,细胞比例分别为57.39%、73.85%、89.57%;多重联合分选细胞接种 NOD-SCID 小鼠后成瘤时间早、瘤体增长速度快,各时间点体积分别为(209.25±31.54)、(500.00±72.90)、(852.75±157.51)、(2 280.00±440.91)、(4 897.00±1 154.15)、(11 070.00±3 559.86)mm^3,与无血清悬浮培养细胞、无血清悬浮培养+奥沙利铂处理细胞的成瘤能力比较差异有统计学意义($P<0.05$);单纯无血清悬浮培养细胞、无血清悬浮培养+奥沙利铂处理细胞和多重联合分选后细胞接种72 h后穿过人工基底膜的细胞数分别为(98±7)/视野、(135±7)/视野、(188±6)/视野,3组之间差异有统计学意义($P<0.05$);各组移植瘤中均表达 CD44 和 EPCAM。3种分选方法所获得细胞中干细胞含量由高到低为:多重联合分选后细胞、无血清悬浮培养+奥沙利铂处理细胞、单纯无血清悬浮培养细胞。**结论** 多重联合法富集肿瘤干细胞的效果明显强于单纯无血清悬浮培养和无血清悬浮培养+化疗药物法,是获得肿瘤干细胞较好的方法。

[关键词] 肿瘤干细胞;结肠肿瘤;流式细胞术;细胞分离;细胞培养技术

[中图法分类号] R329-33; R73-354; R735.35 **[文献标志码]** A

Comparison on enriching methods for colon cancer stem cells from human colon cancer cell line CW-2

Liu Mei, Li Shaolin, Chen Mi, Li Xiaoqing, Long Hao (Department of Radiation Medicine, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate an effective method to enrich tumor stem cells by comparing the efficiency of the 3 cell isolation methods. **Methods** CW-2 stem cells were enriched with 3 different methods, including simple serum-free medium, serum-free medium combination with oxaliplatin, and the second one further combined with flow cytometry (multi-combination). The enrichment efficiency of the 3 methods was then analyzed and compared with flow cytometry, tumorigenicity assay in NOD-SCID mice and Transwell invasion assay *in vitro*. The expressions of CD44 and EPCAM were determined by immunohistochemistry method. **Results** The frequency of $CD44^+$ $EPCAM^+$ cells were 57.39%, 73.85 % and 89.57% separately in cells enriched by simple serum-free medium, serum-free medium combination with oxaliplatin and multi-combination; The tumor xenograft of cells enriched by multi-combination were formed earliest and grew fastest than the tumor xenograft of cells enriched by pure serum-free medium and serum-free medium combination with oxaliplatin. The volume of transplantation tumor from cells enriched by multi-combination were (209.25±31.54), (500.00±72.90), (852.75±157.51), (2 280.00±440.91), (4 897.00±1 154.15), (11 070.00±3 559.86) mm^3 separately on the 4th, 7th, 9th, 14th, 21st and 28th day. Tumor-forming capability of the 3 group cells had statistically significant differences ($P<0.05$). The number of cells past through man-made GBM to down-room were (98±7) cells per field view, (135±7) cells per field of view, and (188±6) cells per field of view separately in cells enriched by simple serum-free medium, serum-free medium combination with oxaliplatin and multi-combination. Invasion capability of the 3 group cells had statistically significant differences ($P<0.05$). So the cells enriched by multi-combination had most tumor stem cells than the cells en-

[基金项目] 国家自然科学基金(30970843)

[通信作者] 李少林,电话:(023)68485007,E-mail: shaolinli202@sina.com

riched by other 2 methods. CD44 and EPCAM all expressed in each group of tumor xenograft. **Conclusion** Multi-combination is highest than pure serum-free medium and serum-free medium combination with oxaliplatin in enrichment capability of tumor stem cells and is a better method to enrich tumor stem cells.

[Key words] neoplastic stem cells; colon neoplasms; flow cytometry; cell separation; cell culture techniques

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30970843). Corresponding author: Li Shaolin, Tel: 86-23-68485007, E-mail: shaolinli202@sina.com

肿瘤干细胞理论认为结肠癌的发生、复发和转移的根源是肿瘤内部一小部分具有自我更新、多向分化潜能的细胞，即肿瘤干细胞（tumor stem cell, TSC）[1-3]。结肠癌干细胞的分离纯化是研究结肠癌的关键步骤。单纯无血清悬浮培养、无血清悬浮培养+化疗药物、流式细胞术是国内外学者们常用的分离结肠癌干细胞的方法[4-10]，但各方法都只能对干细胞起富集作用，且各方法之间的效率差异并未明确。本实验是分别应用单纯无血清悬浮培养、无血清悬浮培养+奥沙利铂、无血清悬浮培养+奥沙利铂+流式细胞术（多重联合）分别获得结肠癌CW-2干细胞，并比较3种方法富集肿瘤干细胞效率的差异，探讨获得肿瘤干细胞的有效方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人结肠癌细胞株CW-2购自中国科学院细胞库，RPMI1640和DMEM/F12培养基购自HyClone公司，胰酶购自GIBCO公司，重组人表皮细胞生长因子（recombinant human epidermal growth factor, EGF）、重组人白血病抑制因子（recombinant human leukemia inhibitory factor, LIF）、重组人碱性成纤维生长因子（recombinant human fibroblast growth factor-basic, bFGF）购自Sinobio公司，青霉素G、链霉素购自华北制药股份有限公司，奥沙利铂购自深圳海王药业有限公司，Anti-CD44-FITC、Anti-EPCAM-PerCP-Cy 5.5和其同型抗体购自BD Bioscience公司，Transwell小室购自Costar公司，24孔板购自Corning公司，Matrigel胶购自BD Bioscience公司，免疫组化用CD44、EPCAM单克隆抗体购自GST公司。

1.2 方法

1.2.1 CW-2细胞传统含血清培养基（serum-supplemented medium, SSM）常规培养　将CW-2细胞以10^5/ml接种于含10%胎牛血清RPMI1640的SSM中，并添加青霉素G（100 U/ml）和链霉素（100 U/ml），在37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱中培养，2 d换液，待细胞长满瓶底80%左右时用PBS液冲洗，0.25%胰酶+0.01% EDTA混合液消化、传代。

1.2.2 无血清悬浮培养富集结肠癌CW-2干细胞　将SSM中处于对数增长期的细胞以10^5/ml接种于由DMEM/F12（1∶1）、EGF（20 ng/ml）、bFGF（10 ng/ml）、LIF（10 ng/ml）组成的无血清培养基（serum-free medium, SFM）中传代培养，另在培养基中添加青霉素G（100 U/ml）和链霉素（100 U/ml）。前14 d直接向培养瓶中加入培养液，14 d后通过胰酶消化法和机械吹打法分离成单细胞悬液后传代。每天观察CW-2细胞在SFM中形成肿瘤干细胞球的过程。

1.2.3 无血清悬浮培养+奥沙利铂富集结肠癌CW-2干细胞　将SSM中处于对数增长期的细胞以10^5/ml接种于由DMEM/F12（1∶1）、EGF（20 ng/ml）、bFGF（10 ng/ml）、LIF（10 ng/ml）组成的SFM中传代培养。另在培养基中添加青霉素G（100 U/ml）、链霉素（100 U/ml）和奥沙利铂（1 ng/ml）。药物处理24 h后800 r/min离心5 min去除化疗药物，重新加入无血清培养液，继续培养。前14 d直接向培养瓶中加入培养液，14 d后通过胰酶消化法和机械吹打法分离成单细胞悬液后传代。每天观察CW-2细胞在SFM中形成肿瘤干细胞球的过程。

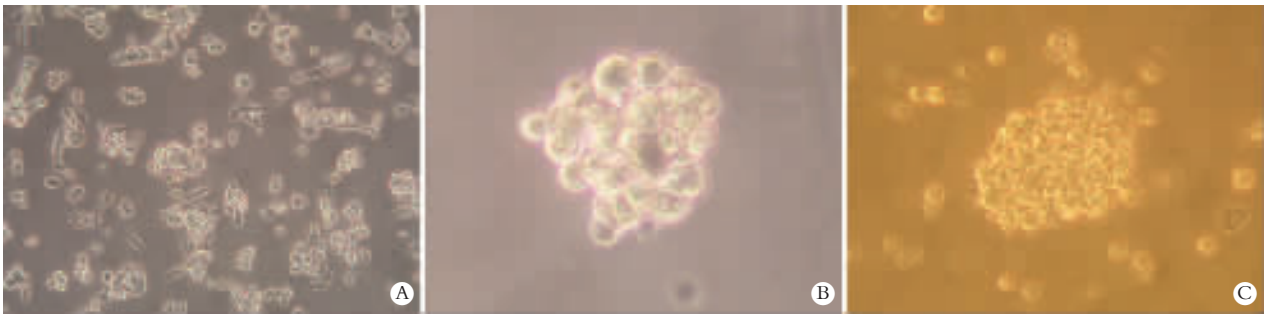
1.2.4 流式细胞仪分选　将无血清悬浮培养+奥沙利铂处理14 d后悬浮细胞球消化、离心、PBS清洗后以10^7/ml密度重悬于PBS中，以10^6细胞加入20 μl的标准分别加入Anti-CD44-FITC和Anti-EPCAM-PerCP-Cy 5.5，室温避光放置30 min后用含1%胎牛血清的DF12（DMEM/F12）离心洗涤2次，以10^6/ml细胞密度重悬于PBS中，在FACS上分选出$CD44^+EPCAM^+$细胞。

1.2.5 流式细胞检测　将无血清悬浮培养14 d后细胞球、无血清悬浮培养+奥沙利铂处理后14 d细胞球和多重联合分选细胞分别以10^6/ml重悬于200 μl PBS中，分别加入20 μl的Anti-CD44-FITC和Anti-EPCAM-PerCP-Cy 5.5。每组对照中加入同型鼠IgG，避光孵育30 min，离心半径3 cm、1 000 r/min离心5 min，弃上清，PBS洗2次，离心弃上清，用200 μl PBS重悬细胞，上机分析。检测CW-2细胞中$CD44^+EPCAM^+$细胞比例。

1.2.6 动物致瘤实验　12只4～5周龄NOD-SCID小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供，性别不限，采用完全随机分组法分成SFM组、SFM+奥沙利铂组、多重联合分选组，各4只。将单纯无血清悬浮培养细胞、无血清悬浮培养+奥沙利铂处理细胞、多重联合分选细胞收集后调整至所需浓度，按1∶1比例与Matrigel混合，分别以10^4细胞数量接种于NOD-SCID小鼠右肩胛部皮下。每周2次观察肿瘤生长状况，测量并记录第4、7、9、14、21、28天肿瘤的体积，4周后将小鼠断颈处死，摘取皮下肿瘤。

1.2.7 免疫组化和HE染色　将摘取的皮下肿瘤标本10%甲醛固定，常规脱水、石蜡包埋，3 mm连续切片，分别进行HE染色和免疫组化染色，免疫组化采用SABC法和DAB显色法，具体步骤按照说明书要求。染色结果判定标准为：DAB阳性染色为棕（黄）色，计数4个不同高倍视野下200个癌细胞，阳性细胞数>10%为阳性，≤10%为阴性。

1.2.8 Transwell侵袭实验　将10 mg/ml的Matrigel胶与RPMI1640培养液按1∶5的比例混合，每孔取60 μl混合液均匀铺于Transwell小室的聚碳酸酯微孔膜上制成人工基底膜。37 ℃温育30 min使胶固化。下室内加入600 μl趋化因子



A:培养第2天;B:培养第7天;C:培养第14天

图1 单纯无血清悬浮培养CW-2细胞不同时间形成的贴壁细胞和悬浮细胞球倒置显微镜观察 (×200)

(3T3上清液):胎牛血清培养液比例为1∶1的混合培养液,上室内分别加入500 μl无血清悬浮培养14 d细胞+SFM、无血清悬浮培养+奥沙利铂处理后14 d细胞+SFM、多重联合分选后细胞+SFM,各组细胞密度均为3×10^5/ml,每组设6个相同的孔。在37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱中培养。72 h后200倍倒置显微镜下观察下室内细胞,计数每个200倍镜视野下细胞的数量,每下室计3个视野后取平均值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 11.0统计分析软件进行行×列表资料的χ^2检验、多重测量设计资料的方差分析、完全随机设计资料的方差分析、多样本均数的多重比较(SNK-q检验)。

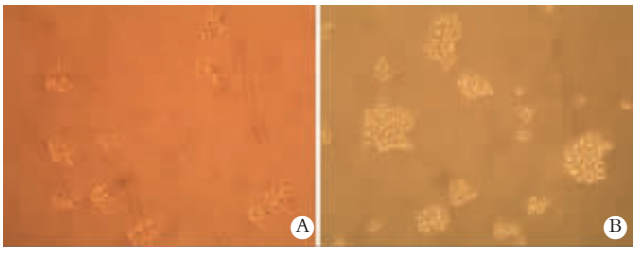
2 结果

2.1 SFM培养形成悬浮的肿瘤干细胞球

CW-2细胞接种于SFM中,第2天大部分细胞贴壁,几乎无死亡细胞,第7天时大部分细胞坏死、凋亡崩解,仅有少部分细胞存活下来并形成疏松的悬浮肿瘤干细胞球。新形成的肿瘤干细胞球不甚规则,新生单个细胞以"出芽"的方式连接在球体上。第14天时细胞球明显较第7天时更大、连接更紧密、不易准确区分细胞与细胞间界限(图1)。

2.2 SFM培养+奥沙利铂富集结肠癌CW-2干细胞

奥沙利铂处理后SFM中CW-2细胞第2天和单纯无血清培养细胞一样,大部分细胞帖壁生长,但细胞凋亡坏死速度更快,形成悬浮细胞球时间更早,第4天左右就出现大部分细胞的坏死凋亡崩解,形成类似无血清悬浮培养第7天左右的细胞球,之后细胞球可逐渐增大(图2)。



A:单纯无血清悬浮培养;B:无血清悬浮培养+奥沙利铂处理

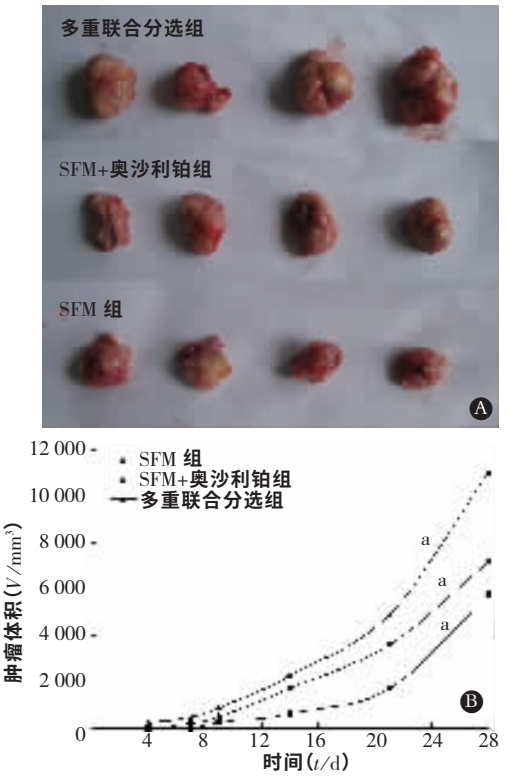
图2 SFM培养第7天与SFM培养+奥沙利铂处理后第7天形成的悬浮结肠癌CW-2干细胞球倒置显微镜观察 (×200)

2.3 流式细胞术检测$CD44^+EPCAM^+$细胞比例

单纯无血清悬浮培养细胞、无血清悬浮培养+奥沙利铂处理细胞、多重联合分选后细胞中$CD44^+EPCAM^+$细胞比例分别为57.39%、73.85%、89.57%,3者差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 动物致瘤实验

多重联合分选组成瘤时间早,第4天可触及肿瘤,SFM+奥沙利铂处理组和SFM组相对较晚,分别于第7、9天触及肿瘤;多重联合分选组瘤体增长速度快,接种后第4、7、9、14、21、28天肿瘤的体积均明显较SFM+奥沙利铂处理组和SFM组大,各组间差异有统计学意义($P<0.05$,图3)。



A:3种方法分选细胞接种28 d后所形成的皮下肿瘤;B:3种方法分选细胞接种后不同时间成瘤体积曲线;a:$P<0.05$,3组间两两比较

图3 3种方法分选细胞接种后成瘤情况分析

2.5 免疫组化和HE染色

单纯无血清悬浮培养细胞、无血清悬浮培养+奥沙利铂处理细胞及多重联合分选后细胞移植瘤均在细胞膜和细胞质中表达CD44和EPCAM。HE染色可见细胞核大浓染,核浆比增大,核分裂像增多,见腺管样结构,符合结肠癌病理改变(图4)。

2.6 3 种方法分选细胞体外侵袭实验

多重联合分选组、无血清悬浮培养 + 奥沙利铂处理组及单纯无血清悬浮培养组下室细胞数分别为(188 ± 6)/视野、(135 ± 7)/视野、(98 ± 7)/视野,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$,图 5)。

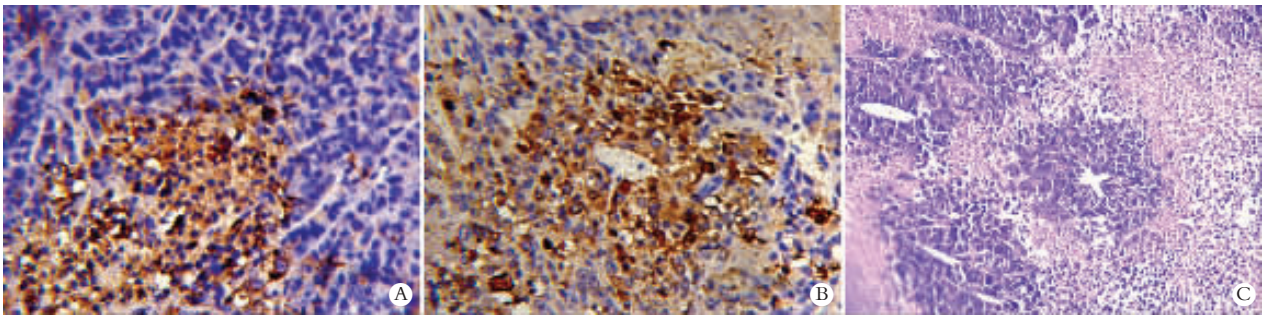
3 讨论

肿瘤干细胞学说起源于 20 世纪 60 年代,但直到 1994 年 Lapidot 等[11]才首次分离出了人急性粒细胞白血病干细胞,证实了肿瘤干细胞的客观存在。随后,在乳腺癌[12]、肺癌[13]、肝癌[14]、结肠癌[1,5-10]等实体肿瘤中分离纯化出肿瘤干细胞,进一步验证了肿瘤干细胞理论。

肿瘤干细胞分离方法的选择是得到肿瘤干细胞成功与否的关键。单纯无血清悬浮培养、无血清悬浮培养 + 化疗药物、无血清悬浮培养 + 化疗药物 + 流式细胞术是国内外常用的富集方法[1,5-18]。各方法都已得到广泛的应用且取得了一定的效果,但何种方法最为有效值得进一步探讨。

2007 年 Ricci-Vitiani 等[5]分离出纯度为 82% 具有结肠癌干细胞特性的 $CD133^+$ 细胞,同年 Dalerba 等[4]通过流式细胞检测出结肠癌新鲜单细胞悬液中具有结肠癌干细胞特性的 $CD44^+EPCAM^+$ 细胞,平均含量为 11.4%。接着国内的学者们也分别从人结肠癌 Lovo 细胞株[15]、SW480 细胞株[16]、HCT166 细胞株[17]、Colo205 细胞株[18]中分离出了一定纯度的肿瘤干细胞。本实验选择以国内外尚少见报道的人结肠细胞株 CW-2 为研究对象,以 Dalerba 等[4]将 CD44 和 EPCAM 作为结肠癌干细胞的表面标志物分离出具有肿瘤干细胞特性的 $CD44^+EPCAM^+$ 细胞群为理论依据,应用了多重联合、单纯无血清悬浮培养和无血清悬浮培养 + 奥沙利铂分别富集得到了人结肠癌 CW-2 干细胞,并通过流式细胞检测所得 3 种细胞群中 $CD44^+EPCAM^+$ 细胞的比例,进而判断肿瘤干细胞含量高低。由于肿瘤干细胞理论认为结肠癌干细胞是结肠癌的复发、侵袭、转移的根源[2-4],复发和侵袭的能力是由干细胞的含量决定,故本实验还进行了体内成瘤实验和体外侵袭实验来比较 3 种细胞分选方法所获得细胞中肿瘤干细胞含量高低,从而比较 3 种分选方法富集结肠癌干细胞能力的强弱,探讨获得肿瘤干细胞的有效方法。

本研究结果显示单纯无血清悬浮培养细胞、无血清悬浮培养 + 奥沙利铂处理细胞、多重联合分选细胞中 $CD44^+EPCAM^+$ 细胞的含量分别为 57.39%、73.85%、89.57%;多重联合分选细胞成瘤时间早、侵袭速度快,具有比无血清悬浮培养 + 奥沙利铂处理细胞和单纯无血清悬浮培养细胞更强的成瘤和侵袭转移能力,根据肿瘤干细胞具有成瘤、侵袭转移能力而非肿瘤干细胞无成瘤、侵袭转移能力[1-3]的理论可得 3 种分选方法所获得细胞中肿瘤干细胞的含量由高到低为:多重联合分选后细胞、无血清悬浮培养 + 奥沙利铂处



A:移植瘤中 CD44 的表达(SABC ×400);B:移植瘤中 EPCAM 的表达(SABC ×400);C:移植瘤 HE 染色结果(×200)

图 4 免疫组化染色观察移植瘤中 CD44、EPCAM 的表达和组织病理学变化



A:多重联合分选;B:无血清培养 + 奥沙利铂处理;C:单纯无血清培养

图 5 Transwell 侵袭实验检测 3 种方法分选细胞的侵袭能力 (倒置显微镜 ×200)

理细胞、单纯无血清悬浮培养细胞,由此可见多重联合富集肿瘤干细胞的能力优于其他2种分选法。本研究比较了3种常用细胞分选方法分离纯化肿瘤干细胞的效率,为以后正确选用分离方法提供了理论依据,对肿瘤干细胞的进一步研究具有重要意义。

参考文献:

[1] Li F, Tiede B, Massague J, *et al*. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis[J]. Cell Res, 2007, 17(1): 3-14.

[2] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, *et al*. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.

[3] 卞修武. 对肿瘤研究前沿之肿瘤干细胞的几点认识[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(11): 995-997.

[4] Dalerba P, Dylla S J, Park I K, *et al*. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(24): 10158-10163.

[5] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, *et al*. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells[J]. Nature, 2007, 445(7123): 111-115.

[6] O'Brien C A, Pollett A, Gallinger S, *et al*. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice[J]. Nature, 2007, 45(7123): 106-110.

[7] Chu P, Clanton D J, Snipas T S, *et al*. Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties[J]. Int J Cancer, 2009, 124(6): 1312-1321.

[8] Botchkina I L, Rowehl R A, Rivadeneira D E, *et al*. Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: genomic analysis[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2009, 6(1): 19-29.

[9] Huang E H, Hynes M J, Zhang T, *et al*. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3382-3389.

[10] Barker N, Van-Es J H, Kuipers J, *et al*. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5[J]. Nature, 2007, 449(7165): 1003-1007.

[11] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, *et al*. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice[J]. Nature, 1994, 367(6464): 645-648.

[12] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, *et al*. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties[J]. Cancer Res, 2005, 65(13): 5506-5511.

[13] Kim C F, Jackson E L, Woolfenden A E, *et al*. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer[J]. Cell, 2005, 121(6): 823-835.

[14] Baumann U, Crosby H A, Ramani P, *et al*. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell?[J]. Hepatology, 1999, 30(1): 112-117.

[15] 王锡山,刘彦龙,杨艳梅. 大肠癌细胞系Lovo中亚群(SP)细胞的分离培养和鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(9): 953-959.

[16] 刘海光,张筱骅,潘贻飞,等. SW480侧群细胞分选及其ABCG2的检测[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(10): 737-740.

[17] 陈克力,梁后杰,江恒,等. 人HCT116结肠癌细胞系中$CD133^+$结肠癌干细胞分离及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(4): 330-333.

[18] 李鹰飞,肖冰,赖卓胜,等. 无血清培养的大肠癌Colo205细胞生成肿瘤干细胞球的研究[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(2): 236-240.

(**收稿**:2009-11-01;**修回**:2009-12-17)

(编辑 吴培红)

(上接911页)

治疗能够取得更好的效果[7-9]。本病例在感染得到控制后加用激素治疗,减轻了炎症反应并减少了角膜混浊的程度。但是在此类感染性疾病中使用激素必须非常谨慎。

绿脓杆菌为革兰阴性小杆菌,营养要求不高,它广泛存在于自然界的土壤、污水及空气中,亦可寄生于体表乃至结膜囊内。最适宜的繁殖温度为30~37 ℃,同时绿脓杆菌可污染多种眼液,如荧光素、的卡因、可的松、疱疹净或阿托品等溶液。因此对手术器械的严格高温高压消毒以及液体的随时更换可以有效预防感染的发生。该病例是强调LASIK术后绿脓杆菌感染对患者的严重影响,以提高屈光手术医师对该种感染的重视。尽管目前的医学水平无法完全杜绝LASIK术后感染,但通过仔细的术前检查,完善的手术器械消毒和处理、进行严格的无菌操作并控制好围手术期的每一个环节,是可以将感染发生率减低到最小程度的。同时密切的术后观察和早期的病原学检查以及针对性的用药能够起到积极的作用。

参考文献:

[1] Chang M A, Jain S, Azar D T. Infections following laser in situ keratomileusis: an integration of the published literature[J]. Surv Ophthalmol, 2004, 49(3): 269-280.

[2] Bourcier T, Thomas F, Borderie V, *et al*. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases[J]. Br J Ophthalmol, 2003, 87(7): 834-838.

[3] Chambers D, Scott F, Bangur R, *et al*. Factors associated with infection by Pseudomonas aeruginosa in adult cystic fibrosis[J]. Eur Respir J, 2005, 26(4): 651-656.

[4] Alarcon I, Kwan L, Yu C, *et al*. Role of the corneal epithelial basement membrane in ocular defense against Pseudomonas aeruginosa[J]. Infect Immun, 2009, 77(8): 3264-3271.

[5] Willcox M D. Pseudomonas aeruginosa infection and inflammation during contact lens wear: a review[J]. Optom Vis Sci, 2007, 84(4): 273-278.

[6] Hazlett L D. Bacterial infections of the cornea (Pseudomonas aeruginosa)[J]. Chem Immunol Allergy, 2007, 92: 185-194.

[7] Wilhelmus K R. Indecision about corticosteroids for bacterial keratitis: an evidence-based update[J]. Ophthalmology, 2002, 109(5): 835-843.

[8] Suwan-Apichon O, Reyes J M, Herretes S, *et al*. Topical corticosteroids as adjunctive therapy for bacterial keratitis[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2007, (4): CD005430.

[9] Karicherla P, Hobden J A. Nona-D-arginine therapy for Pseudomonas aeruginosa keratitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(1): 256-262.

(**收稿**: 2010-03-28;**修回**: 2010-04-10)

(编辑 王 红)