肿瘤相关研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001402

PKC信号通路在 *KISS1* 基因抑制人结直肠癌 HCT116 细胞侵袭迁移的作用

陈志华[1],韩宏景[1],林素勇[1],苏小宝[1],戴起宝[1],陈绍勤[1],吴佩文[2]

(1. 福建医科大学附属第一医院胃肠外科 2 区,福州 350005;2. 福建医科大学附属第一医院内分泌科,福州 350005)

【摘 要】目的:探讨 PKC 信号通路在 *KISS1* 基因发挥抑制结直肠癌细胞 HCT116 侵袭迁移的作用。**方法**:构建 pGC-LV-*KISS1*-EGFP 慢病毒载体感染人结直肠癌细胞 HCT116,分空白对照组(CON 组)、空载体对照组(NC 组)、过表达组(OE 组)。qRT-PCR 和 Western blot 检测 *KISS1* 基因 mRNA 和 Metastin、PKC 信号通路的关键分子 PKCα、PKCβII 及下游 E 钙黏蛋白表达量的变化。Transwell 法检测细胞侵袭、迁移能力的变化。**结果**:转染后能够稳定表达报告基因 EGFP,荧光率均>80%,且 OE 组 *KISS1* 基因 mRNA、Metastin 表达量较 CON 组和 NC 组均明显升高($P<0.05$)。转染后,PKCβⅡ的蛋白表达量(0.288 2±0.023 7)较 CON 组(0.530 9±0.013 3)和 NC 组(0.511 7±0.008 5)明显下降($P<0.05$),而 PKCα 的表达水平无明显变化($P>0.05$);下游效益蛋白 E 钙黏蛋白表达量(0.633 2±0.017 4)较 CON 组(0.232 2±0.019 6)和 NC 组(0.252 3±0.018 2)明显升高($P<0.05$)。OE 组细胞侵袭、迁移能力较 CON 组和 NC 组均明显下降($P<0.05$)。**结论**:*KISS1* 基因可能通过下调 PKCβⅡ后上调下游蛋白 E 钙黏蛋白的表达而发挥抑制结直肠癌细胞 HCT116 侵袭、迁移作用,有望成为防治结直肠癌转移的新靶点。

【关键词】结直肠癌;*KISS1* 基因;PKC;信号通路;转移

【中图分类号】R735.34 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-03-02

作者介绍:陈志华,Email:chenzhihua139@126.com,研究方向:胃肠道肿瘤的外科治疗及基础研究,外科营养的应用。

通信作者:吴佩文,Email:247056892@qq.com。

基金项目:国家重点临床专科建设基金资助项目(编号:2013-GJLCZD);福建医科大学苗圃基金资助项目(编号:2014MP020);福建省教育厅 B 类科技项目(JB12108)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170919.1555.008.html (2017-09-19)

expression indicates poor clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma[J]. Experimental and therapeutic medicine,2013,5(1):112-118.

[4] Xu LF,Ni JY,Sun HL,et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1α silencing on the proliferation of CBRH-7919 hepatoma cells[J]. World J Gastroenterol,2013,19(11):1749-1759.

[5] 楼 梦,贾 英. HIF-α 和 miR-210 在宫颈鳞癌中的表达及其相关性[J]. 重庆医科大学学报,2015,40(4):604-606.

[6] Shimada K,Nara S,Esaki M,et al. Intrapancreatic nerve invasion as a predictor for recurrence after pancreaticoduodenectomy in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas[J]. Pancreas,2011,40(3):464-468.

[7] Takahashi H,Ohigashi H,Ishikawa O,et al. Pefineural invasion and lymph node involvement as indicators of surgical outcome and pattern of recurrence in the setting of preoperative gemcitabine-based chemoradiation therapy for resectable pancreatic cancer[J]. Ann Surg,2012,255(1):95-102.

[8] Bapat AA,Hostetter G,Von Hoff DD,et al.Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer[J]. Nat Rev Cancer,2011,11(10):695-707.

[9] Basile JR,Holmbeck K,Bugge TH,et al. MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D [J]. J Biol Chem,2007,282(9):6899-6905.

[10] Binmadi NO,Yang YH,Zhou H,et al. Plexin-B1 and semaphorin 4D cooperate to promote perineural invasion in a RhoA/ROK dependent manner[J]. Am J Pathol,2012,180(3):1232-1242.

[11] Kato S,Kubota K,Shimamura T,et al. Semaphorin 4D:a lymphocyte semaphorin,enhances tumor cell motility through binding its receptor,plexinB1,in pancreatic cancer[J]. Cancer Sci,2011,102(11):2029-2037.

[12] Wang JS,Jing CQ,Shan KS,et al. Semaphorin 4D and hypoxia-inducible factor-1α overexpression is related to prognosis in colorectal carcinoma[J]. World J Gastroenterol,2015,21(7):2191-2198.

[13] 付 岚,张晓霞,陈旭霞,等. 胰腺癌临床诊断现状的单中心调查报告[J]. 重庆医科大学学报,2014,39(3):357-359.

(责任编辑:张辉洁)

Expression of *KISS1* gene inhibits the human colorectal carcinoma cell HCT116 migration by PKC signaling pathway

Chen Zhihua[1], *Han Hongjing*[1], *Lin Suyong*[1], *Su Xiaobao*[1], *Dai Qibao*[1], *Chen Shaoqin*[1], *Wu Peiwen*[2]

(*1. Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University;*

2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of *KISS1* gene suppression on the metastatic capacity of the human colorectal carcinoma cells HCT116 and the involvement of protein kinase C signaling pathway. ***Methods***: pGC-LV-*KISS1*-EGFP lentiviral vector was constructed and the colorectal cancer cells HCT116 was infected and divided into: the point blank control group (CON), the non-carrier contral group (NC) and the over-expression group (OE). qRT-PCR and Western blot methods were used to detect KISS1 gene product mRNA and Metastin level, the key molecular of PKC signaling pathway PKCα, PKCβ Ⅱ and E-cadherin sticky protein expression. Transwell Chambers methods were used to detect the changes of cell's invasion and migration ability. ***Results***: After lentiviral transfection, HCT-116 cells could stably express EGFP report gene, and the fluorescence rate was over 80%. Compare with those of the CON and NC, the *KISS1* gene product mRNA and Metastin level of the OE were significantly increased. The protein expression of PKCβ Ⅱ (0.288 2 ± 0.023 7) was significantly increased compared with that of the CON (0.530 9 ± 0.013 3) and NC (0.511 7 ± 0.008 5, $P<0.05$). But the protein expression of PKCα had no significant change ($P>0.05$). The E-cadherin expression level (0.633 2 ± 0.017 4) rose highly compared with that of the CON (0.232 2 ± 0.019 6) and NC (0.252 3 ± 0.018 2) with statistical significances ($P<0.05$). The cell's invasion, migration ability of the OE group also significantly decreased compared with that of the other two groups ($P<0.05$). ***Conclusion***: *KISS1* gene may regulate the PKCβ Ⅱ and raise the E-cadherin sticky protein expression and plays a role of inhibiting the invasion and migration in the HCT116, which will become a new target for the prevention and treatment of colorectal cancer metastasis.

【Key words】colorectal carcinoma; *KISS1*; protein kinase C; invasion; metastasis

KISS1 是一种新近发现的肿瘤转移抑制基因之一，本课题组前期研究[1-3]发现 *KISS1* 基因具有抑制结直肠癌的转移能力，但 *KISS1* 基因发挥抑制结直肠癌转移作用的下游信号传导通路目前暂不明确。在促进青春期发育过程中，*KISS1* 基因起着重要的作用[4]，且有研究[5]发现 *KISS1* 基因可调控 PKC 信号通路各蛋白的表达而影响 GnRH、LH 等激素的表达释放。那么，*KISS1* 基因是否通过 PKC 信号传导通路参与结直肠癌侵袭和转移的调节过程？本研究将对其进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人结肠癌细胞株 HCT116 为福建医科大学附属第一医院中心实验室保存。RPMI1640 培养基为 Gibco 公司；TRIzol Reagent、M-MLV 逆转录酶、real-time PCR Master Mix 为 invitrogen 公司；Matrigel、Transwell 小室为 BD 公司产品；兔抗人单克隆 KISS1、PKCα、PKCβ Ⅱ、E 钙黏蛋白和 GAPDH 抗体为美国 Abcam 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 分组 *KISS1* 过表达组（OE 组）为制备好的 DNA 溶液（pGC-LV 载体 20 μg，pHelper 1.0 载体 15 μg，pHelper 2.0 载体 10 μg）与 Lipofectamine 2000 载体转染后，与 HCT116细胞共培养处理；空载体转染的对照组（NC 组）为不含 *KISS1* 基因的空白 Lipofectamine 2000 载体与 HCT116 细胞共培养处理；空白对照组（CON 组）为无处理的 HCT116 细胞。每次实验每组样本为 6 个，所有实验均重复 3 次。

1.2.2 细胞培养 细胞贴壁生长于含有 10%胎牛血清和 100 U/mL 青霉素+链霉素的 RPMI1640 培养基中，37 ℃、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养，每 2~3 d 以 0.25%的胰蛋白酶消化传代 1 次。

1.2.3 载体 pGC-LV-*KISS1*-EGFP 的构建及转染 人类 *KISS1* 基因 CDS 区全长共 438 bp，以人类基因组 DNA 为模板，设计人类 *KISS1* 基因上下游引物，上游引物：5'-TACTGC-TTTTCCTCTGTGCCACC-3'，下游引物：5'-TAGCTGCTGGC-CTGTGGGTCT-3'；产物 89 bp。反应条件 94 ℃，5 min；94 ℃，30 s；55 ℃，30 s；72 ℃，2 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。纯化回收 PCR 产物并与慢病毒载体 pGC-LV-EGFP 分别进行 *Age* Ⅰ酶切，酶切片段回收并 T4 DNA 连接酶连接，转化感受态大肠杆菌。选取单个菌落进行 PCR 鉴定，PCR 阳性克隆进行测序，测序结果与 GenBank 数据库进行 Blast 比对，验证 pGC-LV-*KISS1*-EGFP 载体构建成功。用脂质体 Lipofectamine™ 2000 包裹慢病毒三质粒系统（LV-EGFP、pHelper 1.0 和 pHelper2.0）在无血清 Opti-MEM 培养基中 5% CO_2、37 ℃孵育箱内共转染 HCT116 细胞，进行病毒包装，稳定传代进行后续实验研究。将处于对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板中，进行最佳感染复数（multiplicity of infection, MOI）测

定，每孔(3~5)×10^3细胞，分别加入 90 μL 无血清培养基及 10 μL 的 1×10^6 TU、1×10^5 TU、1×10^4 TU 3 个不同稀释梯度的病毒至孔中，细胞数目生长至约 1×10^4 个/孔，感染及培养 72 h 后，观察增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达情况，观察感染效果确认感染条件和感染参数。随机选取 20 个视野进行阳性细胞计数并测定转染率，同一视野下荧光显微镜与普通显微镜观察到细胞数之比为荧光率，即转染率=(绿色荧光的细胞/普通显微镜总细胞)×100%。

1.2.4 Real-time PCR 检测 *KISS1* mRNA 的表达 Trizol 提取细胞总 RNA，取 2 μg 总 RNA 应用 M-MLV 逆转录酶逆转录成 cDNA，用 ABI 7500 real-time PCR 反应仪检测 mRNA 表达；引物序列由 Primer5.0 软件设计，上海吉凯基因技术有限公司代合成，*KISS1* 上游：5'-TACTGCTTTTCCTCTGTGCCACC-3'，下游：5'-TAGCTGCTGGCCTGTGGGTCT-3'，产物 89 bp；GAPDH 上游：5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3'，下游：5'-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'，产物 121 bp。反应体系：2.5 μmol/L 上下游引物各 1 μL，cDNA 1 μL，SYBR premix ex taq 10 μL，25 mmol/L Mg^{+2} 4 μL，ddH_2O 8 μL。反应程序：95 ℃，30 s；95 ℃，5 s；60 ℃，34 s，40 个循环。按 RQ=$2^{-\Delta\Delta Q}$ 计算相对表达量。

1.2.5 Western-blot 法检测各蛋白质指标的表达 收集细胞，细胞蛋白裂解液裂解，超声剪切 DNA，考马斯亮蓝法浓度测定后，上样 SDS-PAGE 电泳，进行各指标的蛋白免疫印迹分析实验。显色后观察和量化分析采用化学发光法和 GIS1000 软件分析系统。

1.2.6 Transwell 法检测细胞侵袭、迁移能力 1:3 稀释的基质胶 Matrigel 50 μL 包被 Transwell 小室上室底部，4 ℃风干。每孔加入 50 μL 含 10 g/L BSA 的无血清培养液，37 ℃水化 30 min。取 200 μL 含 1×10^5 个/mL 细胞悬液接种入上室，下室加入 500 μL 含 5% FBS 培养基，小心操作避免产生气泡，常规培养细胞 24 h 后，无菌棉签小心擦去基质胶和上室内的细胞，室温下将膜风干，4%多聚甲醛固定 15 min，PBS 洗涤 2 次后风干，加入 500 μL 结晶紫染色液，浸润小室膜，37 ℃培养箱中孵育 15~20 min 后，PBS 洗涤 2 次；风干后在 200倍倒置显微镜下观察，随机取 16 个视野拍照及计数。Transwell 迁移实验步骤与侵袭实验基本一致，区别：不需要包被基质胶 Matrigel；细胞密度为 1×10^6 个/mL；下室培养基仅含 2.5% 的 FBS。所有实验均重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件分析，所有计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间两两比较时先进行多样本方差齐性检验，若方差齐，则 LSD-*t* 检验；若方差不齐，则运用 Dunnett's *T*3 法进行检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 慢病毒转染荧光率的鉴定结果

慢病毒 pGC-LV-*KISS1*-EGFP 载体转染成功的 HCT116 人结直肠癌细胞可以表达绿色荧光蛋白，CON 组细胞在普通显微镜下可见细胞状态良好，排布均匀呈椭圆形，荧光显微镜下(激发波长 488 nm，发射波长 507 nm)未见 EGFP 蛋白荧光。NC 组和 OE 组在荧光显微镜下均可看到 EGFP 蛋白发绿色荧光，NC 组 100× 显微镜下转染率(fluorescence rate) 84.57%，200×为 84.18%；OE 组 100× 为 83.16%，200× 为 82.67%，均大于 80%，说明转染成功且效果比较理想(图 1)。

2.2 转染前后 HCT116 细胞 *KISS1* 基因 mRNA 和 Metastin 表达水平的变化

转染后 OE 组 *KISS1* 基因 mRNA 相对表达量(121.731±4.721)明显高于 CON 组(0.829±0.082)和 NC 组(1.295±

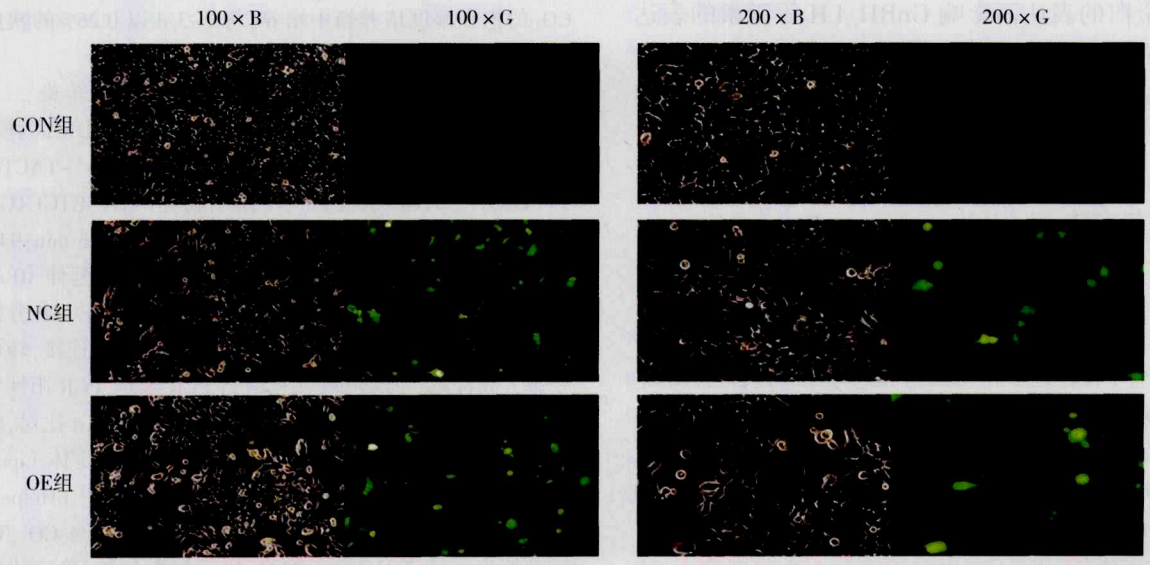


图 1 各组细胞转染后 EGFP 蛋白荧光表达率

Fig.1 Expression rate of EGFP in different groups after transfected with *KISS1* gene

0.063），Metastin 表达量（0.638 4 ± 0.024 2）与 CON 组（0.298 1 ± 0.014 7）和 NC 组（0.282 1 ± 0.017 3）相比明显升高，差异均具有统计学意义（$P<0.05$），而 CON 组与 NC 组之间比较无统计学差异（$P>0.05$）（图 2、图 3），表明慢病毒转染 HCT116 细胞后 *KISS1* 基因能稳定过表达 mRNA、Metastin 蛋白。

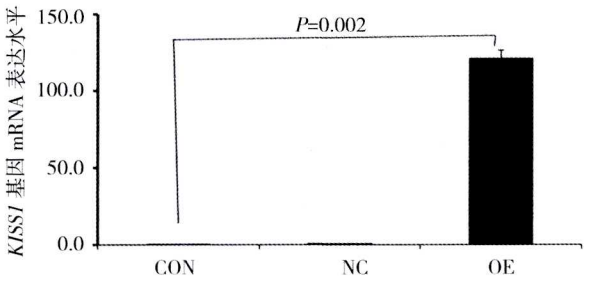


图 2　不同转染组中 *KISS1* 基因 mRNA 蛋白表达水平（RQ 值）

Fig.2　Different expressions of the mRNA of KISS1 in different groups

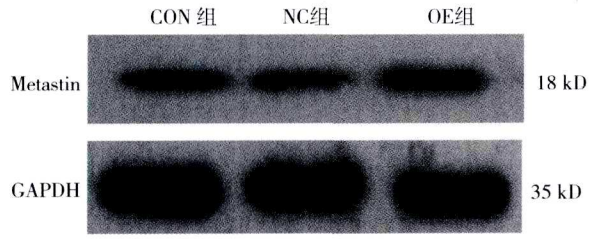


图 3　不同转染组中 *KISS1* 基因 Metastin 蛋白表达水平

Fig.3　Different expressions of the Metastin in different groups

2.3　转染前后细胞 PKCα、PKCβII 及 E 钙黏蛋白的表达量的变化

与 CON 组相比，OE 组 PKCα 表达无明显改变（$P>0.05$）；PKCβⅡ的蛋白表达量（0.288 2 ± 0.023 7）较 CON 组（0.530 9 ± 0.013 3）和 NC 组（0.511 7 ± 0.008 5）明显下降（$P<0.05$），而 PKCα 的表达水平无明显变化（$P>0.05$）；下游效益蛋白 E 钙黏蛋白表达量（0.633 2 ± 0.017 4）较 CON 组（0.232 2 ± 0.019 6）和 NC 组（0.252 3 ± 0.018 2）明显升高（$P<0.05$）。NC 组与 CON 组之间的比较均无统计学差异（$P>0.05$）（表 1，图 4）。

表 1　转染前后 PKCα、PKCβⅡ及 E 钙黏蛋白的表达情况（灰度值）

Tab.1　Different expressions of the PKCα，PKCβⅡ and E-cadherin after transfection

组别	PKCα	PKCβⅡ	E钙黏蛋白
CON组	0.696 1 ± 0.017 3	0.530 9 ± 0.013 3	0.232 2 ± 0.019 6
NC组	0.659 3 ± 0.019 7	0.511 7 ± 0.008 5	0.252 3 ± 0.018 2
OE组	0.662 1 ± 0.014 9	0.288 2 ± 0.023 7[a]	0.633 2 ± 0.017 4[a]

注：a，CON 与 NC 比较，$P<0.05$

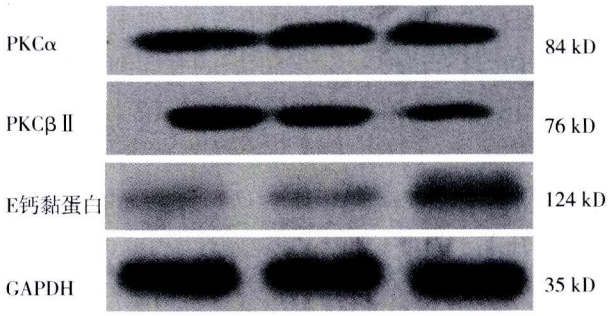


图 4　不同转染组中目的蛋白 PKCα、PKCβⅡ、E 钙黏蛋白表达情况

Fig.4　Different expressions of the PKCα，PKCβⅡ and E-cadherin in different groups

2.4　转染前后各组细胞的侵袭、迁移能力的变化

与 CON 组和 NC 组相比，转染后 OE 组 HCT116 细胞侵袭能力明显减低（$P<0.05$），HCT116 细胞迁移能力亦明显减低（$P<0.05$）；而 CON 组与 NC 组之间的侵袭、迁移能力比较无明显变化（$P>0.05$）（表 2，图 5）。

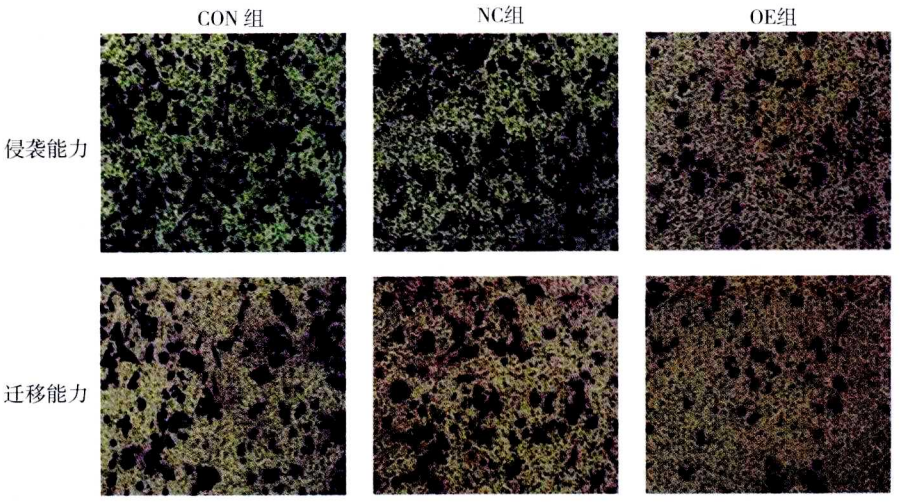


图 5　转染前后各组 HCT116 细胞侵袭、迁移能力的变化

Fig.5　Change of the invasion and migration ability of cells in different groups after transfection

表 2 转染前后各组 HCT116 细胞的侵袭和迁移能力的变化

Tab.2 Changes of the invasion and migration ability of cells after transfection in different groups

组别	CON组	NC组	OE组
侵袭	153.670 ± 6.367	148.820 ± 6.353	73.820 ± 4.897[a]
迁移	226.830 ± 5.328	218.540 ± 5.273	86.150 ± 3.281[a]

注：a，CON 与 NC 比较，$P<0.05$

3 讨 论

蛋白激酶 C(protein kinase C，PKC)是一类钙与磷脂依赖的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族，参与细胞信号转导、基因表达调节、细胞增殖、细胞凋亡与分化[6]。PKC 具有许多亚型，在不同的肿瘤细胞中发挥不同作用。PKCα 在细胞内信息传递、调节细胞的增殖分化、肿瘤的发生发展及多药性耐药等多种生理和病理过程中发挥作用。Oster 和 Leitges[7]发现 PKCα 在 Apc(Min/+)的小鼠肠道肿瘤中表达明显下调，PKCα 敲除的小鼠更容易自发形成肠道肿瘤侵袭性肿瘤，提示 PKCα 在结直肠癌中可能起着抑癌基因的作用，可以抑制结直肠癌细胞增殖，促进肿瘤细胞凋亡。PKCβ 作为经典 PKC 的一员，PKCβⅡ在肿瘤的发生发展、侵袭转移和血管形成中起重要作用，增加肿瘤发生的易感性[8]；Spindler 等[9]发现 PKCβⅡ表达阳性的患者较表达阴性的患者具有较差的中位生存期。

Dissanayake 等[10]发现黑色素瘤细胞中 PKC 的表达、活性随 *KISS1* 基因产物的变化而改变；Jiang 等[11]发现 *KISS1* 是卵巢癌的转移抑制基因，同时激活 PKC 的表达能够抑制卵巢癌细胞的转移，其中 80%的肿瘤细胞的转移作用是由 *KISS1* 表达起作用，推测 *KISS1* 可通过 PKC 信号通路来发挥作用。本课题组前期研究[1-3]发现 *KISS1* 基因具有抑制结直肠癌的转移能力，*KISS1* 基因是否通过 PKC 信号传导通路参与结直肠癌侵袭和转移的调节过程目前暂未见报道。本课题通过构建慢病毒载体 pGC-LV-*KISS1*-EGFP 并成功转染 *KISS1* 基因表达水平相对较低的人结直肠癌 HCT116 细胞，稳定过表达 KISS1 基因，发现转染后细胞中 PKCβⅡ表达水平明显下降、E 钙黏蛋白明显升高，而 PKCα 表达量无明显改变，提示 *KISS1* 基因抑制结直肠癌转移与 PKC 信号转导通路相关，且可能通过下调 PKCβⅡ从而上调下游蛋白 E 钙黏蛋白的表达而发挥作用，同时发现转染后结直肠癌细胞侵袭及迁移能力明显下降。

综上所述，在结直肠癌的演进过程中，*KISS1* 基因可能是通过抑制 PKC 信号通路中 PKCβⅡ的表达进而上调下游效应分子 E 钙黏蛋白的表达来发挥肿瘤转移抑制效应。但是，*KISS1* 抑制结直肠癌转移的分子机制十分复杂，揭示 *KISS1* 基因抑制结直肠癌转移的具体作用信号转导通路及其作用机制还需要进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] 陈绍勤，林素勇，戴起宝，等. 肿瘤转移抑制基因 Kiss-1 对构建原代人结直肠癌裸鼠肝转移瘤模型的影响[J]. 中华实验外科学，2012，29(2)：209-211.

[2] 陈绍勤，陈志华，林素勇，等. 5-杂氮-2'-脱氧胞苷对人结直肠癌 HCT116 细胞 KISS1 基因表达及侵袭迁移的影响[J]. 肿瘤，2014，1(34)：24-32.

[3] Chen SQ，Chen ZH，Lin SY，et al. KISS1 methylation and expression as predictors of disease progression in colorectal cancer patients[J]. World J Gastroenterol，2014，20(29)：10071-10081.

[4] Gianetti E，Seminara S. Kisspeptin and KISS1R：a critical pathway in the reproductive system[J]. Reproduction，2008，136(3)：295-301.

[5] Biran J，Ben-Dor S，Levavi-Sivan B，et al. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates[J]. Biol Reprod，2008，79(4)：776-786.

[6] Mochly-Rosen D，Das K，Grimes KV. Protein kinase C，an elusive therapeutic target[J]. Nat Rev Drug Discov，2012，11(12)：937-957.

[7] Oster H，Leitges M. Protein kinase c alpha but not PKC zeta suppresses intestinal tumor formation in Apc Min/+ mice[J]. Cancer Res，2006，66(14)：6955-6963.

[8] Bullenkamp J，Käken J，Festy F，et al. Apoptin interacts with and regulates the activity of protein kinase C beta in cancer cells[J]. Apoptosis，2015，20(6)：831-842.

[9] Spindler KL，Lindebjerg J，Lahn M，et al. Protein kinase C-beta Ⅱ(PKC-beta Ⅱ) expression in patients with colorectal cancer[J]. Int J Colorectal Dis，2009，24(6)：641-645.

[10] Dissanayake SK，Wade M，Johnson CE，et al. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition[J]. J Biol Chem，2007，282(23)：17259-17271.

[11] Jiang Y，Berk M，Singh LS，et al. Kiss1 suppresses metastasis in human ovarian cancer via inhibition of protein kinase C alpha[J]. Clin Exp Metastasis，2005，22(5)：369-376.

（责任编辑：方 济）