

# 细胞穿膜 - 靶向双肽修饰紫杉醇纳米制剂的制备、表征及体外抗胶质瘤评价

石姣姣 姜 尧 梁 珍 侯春英 张 蕊 刘雁勇 杨 楠 左萍萍

**摘 要** 目的 以胶质瘤 U251 细胞为研究对象,制备细胞穿膜 - 靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂 (TN - PTX),研究其性质及体外抗肿瘤活性。方法 采用噬菌体展示技术体外筛选与 U251 细胞特异性结合的靶向肽;界面沉淀法制备紫杉醇 (PTX) 纳米粒,将靶向肽、细胞穿膜肽 TAT 修饰于其表面,制备 TN - PTX;对 TN - PTX 的粒径、Zeta 电位、载药量、形态外貌、体外释放等方面进行表征;CCK8 实验探讨 TN - PTX 对 U251 细胞增殖能力的影响。结果 筛选的靶向肽 HK 特异性良好,TN - PTX 的粒径为  $350.5 \pm 31.8 \text{ nm}$ ,Zeta 电位为  $-31.9 \pm 5.0 \text{ mV}$ ,载药量为 5.01%,形貌基本呈圆球形,分布较均匀,体外释放缓慢。PTX 浓度相同时,TN - PTX 对 U251 细胞的杀伤作用比 PTX 强。结论 TN - PTX 性质稳定,具有一定缓释作用,在细胞水平对 U251 细胞具有更强的细胞毒性作用。

**关键词** 紫杉醇 纳米粒 靶向肽 细胞穿膜肽 胶质瘤

中图分类号 R9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.006

**Preparation, Characteristics and Anti - tumoral Efficacy *in vitro* of Cell Penetrating Peptide Modified Paclitaxel Targeted Nanoparticles.** Shi Jiaojiao, Jiang Yao, Liang Zhen, et al. Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medical Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

**Abstract Objective** In order to prepare cell penetrating peptide modified paclitaxel PLGA targeted nanoparticles (TN - PTX), and evaluate the properties and the anti - tumoral efficacy of the nanoparticles *in vitro*. **Methods** The targeting peptide was specifically screened in human glioma U251 cells by phage display technology and paclitaxel (PTX) nanoparticles were prepared by the interfacial precipitation method. We successfully prepared a novel paclitaxel targeted nanoparticles modified with the targeting peptide and the cell penetrating peptide TAT by amide condensation reaction. Characteristics of TN - PTX, including particle size, Zeta potential, drug loadings, the morphological appearance, were investigated and the anti - tumoral efficacy of TN - PTX was also evaluated *in vitro*. **Results** The targeting peptide exhibited a good specificity to glioma. The particle size of TN - PTX was  $350.5 \pm 31.8 \text{ nm}$ , and the Zeta potential was  $-31.9 \pm 5.0 \text{ mV}$ , and drug loading was 5.01%. The morphology of TN - PTX is basically homogeneous sphere. *In vitro* inhibition study results indicated that TN - PTX exhibited more efficient inhibitory effects on the U251 cells than PTX with the same concentration of PTX. **Conclusion** TN - PTX possessed the stable properties and significantly inhibited the tumor proliferation than PTX *in vitro*.

**Key words** Paclitaxel; Nanoparticles; Targeting peptide; Cell penetrating peptide; Glioma

紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 是一种抗微管药物,能够促进微管蛋白聚合,抑制其解聚,抑制细胞有丝分裂和增殖,从而发挥抗肿瘤作用。研究表明,紫杉醇在治疗胸腺癌、肺癌、乳腺癌、脑部肿瘤等方面均有作用,但其难溶于水,限制了其临床应用<sup>[1-6]</sup>。纳米粒是由天然或合成高分子物质构成的 10 ~ 1000nm 的固态胶体颗粒,可作为运输药物的载体,具有颗粒小、

比表面积大等特性,能够提高药物生物利用度,通过一定表面修饰还能改善其性质<sup>[6]</sup>。尽管具有上述优点,传统纳米制剂因缺少靶向性而引起非特异性杀伤等不良反应。

胶质瘤是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤,具有浸润性生长、高侵袭性、预后差等特点,其经典治疗方案是手术治疗、放射治疗联合化学治疗,但是由于体内血 - 脑屏障的存在,疗效仍然不尽人意。因此,寻求更有效的治疗方案势在必行。

细胞穿膜肽 (cell penetrating peptides, CPPs) 能携带包括多肽、蛋白质、质粒 DNA、siRNA、纳米粒等物质进入细胞。其中, I 型人免疫缺陷病毒转录激活因

基金项目:国家重点基础研究发展计划 (“973”计划) 项目 (2010CB934002)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所、北京协和医学院基础学院药理学

通讯作者:左萍萍,博士,教授,电子信箱:zuopp@126.com

子 TAT(human immunodeficiency virus - 1 transcription activator, HIV - I TAT) 已被广泛研究, 它不仅能穿透细胞膜, 还能穿透血 - 脑屏障, 利于体内运输。1985 年 Smith<sup>[7]</sup> 建立噬菌体展示技术, 已在抗原表位筛选、药物筛选、分子生物学等领域得到广泛应用, 更是目前肿瘤靶向治疗靶标筛选的最常用方法<sup>[8-11]</sup>。本研究拟将细胞穿膜肽 TAT、靶向肽作为纳米粒的两个修饰配体, 改善纳米粒的性质。

本研究旨在运用噬菌体展示技术筛选与胶质瘤 U251 细胞特异性结合的靶向肽, 用免疫组化法验证其靶向性, 将靶向肽、细胞穿膜肽与紫杉醇纳米粒相连, 制备细胞穿膜 - 靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂, 并对其进行表征和体外抗胶质瘤评价。

### 材料与方法

1. 细胞系: 人胶质瘤 U251 细胞系购于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心, 培养于 MEM - EBSS 培养基 (含 10% 胎牛血清) 中, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每隔 3~4 天传代。

2. 主要试剂及仪器: Ph. D. -7TM 噬菌体展示肽库试剂盒 (New England Biolabs, 美国), 紫杉醇 PTX (北京诺瑞医药技术有限公司), 聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物 (poly lactic - co - glycolic acid, PLGA)、聚乙二醇 (polyvinyl alcohol, PVA)、丙酮 (国药集团化学试剂有限公司), 乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺 (EDC), N - 羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 聚乙二醇 (PEG), CCK8 试剂盒 (日本 Dojindo 公司)。低温高速离心机 (美国 Sigma 公司), 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), 激光散射粒度仪 (英国 Malvern 公司), 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 酶标仪 (上海三科仪器有限公司)。

3. 噬菌体展示技术筛选靶向肽: (1) 3 轮淘选: 培养皿中 U251 细胞加封阻液作用 1h, 0.1% TBST (Tris 缓冲液 + Tween) 洗皿 6 次, 加浓度为  $2 \times 10^{11}$  pfu (嗜菌斑形成单位数) 噬菌体肽库液, 温和摇动 1h, 0.1% TBST 洗皿 10 次, 加洗脱液, 温和摇动 1h, 洗脱液用 1mol/L Tris - HCl (pH 9.1) 缓冲液中和, 为一轮淘选洗脱物。洗脱物加入 ER2738 菌液 37℃、250r/min 振荡培养 4.5h, 4℃、10000r/min 离心 10min, 取 80% 上清加 1/6 体积 PEG/NaCl 过夜; 4℃、10000r/min 离心 15min, 沉淀物重悬于 TBS, 4℃ 离心 5min, 上清加 1/6 体积 PEG/NaCl, 4℃ 离心 10min, 沉淀物重悬于 TBS 中, 为扩增后洗脱物。测定扩增后洗脱物效价, 计算下轮淘选相应于  $2 \times 10^{11}$  pfu 的加入量。重复以上步骤 2 次进行 3 轮淘选。(2) 提取 DNA 并测序: 第 3 轮淘选的洗脱物不再扩增, 提取噬菌体 DNA, 委托英潍捷基生物技术有限公司用 -96g III 通用测序引物测序。(3) 分析 DNA 序列: 找出测序结果中出现次数最多的共有 DNA 序列。

4. 靶向肽的特异性验证: (1) 取材制备石蜡切片: 选取人

多形性胶质母细胞瘤组织、人星形细胞瘤组织、人少枝胶质细胞瘤组织、人的正常心、肝、脾、肺、肾组织制备石蜡切片。(2) 免疫组织化学实验: 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水; 25μg/ml 亲合素溶液孵育 20min, PBS 洗 3 次; 滴加生物素标记的靶向肽, 孵育 90min, TBST 洗 3 次; 滴加异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的亲合素, 孵育 30min, TBST 洗 3 次; 滴加 DAPI, 抗荧光衰减封片剂封片, 荧光显微镜下观察。

5. 界面沉淀法制备制备紫杉醇纳米粒: 称取 PTX 6mg、PLGA 60mg 溶于 3ml 丙酮中 (有机相), 水相为 30ml 1% PVA 水溶液。冰浴条件下, 边搅拌边逐滴将有机相加入水相中, 1000r/min 搅拌 0.5h, 再 500r/min 搅拌 5h 除去有机溶剂。4℃、15000r/min 离心 10min, 超纯水洗涤沉淀 3 次, 冷冻干燥。

6. 制备细胞穿膜 - 靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂<sup>[12]</sup>: 称取紫杉醇纳米粒 0.06g, 加 60ml Activation Buffer (pH 6.0) 超声重悬 (功率 200W), 加 0.024g EDC 与 0.036g NHS, 室温搅拌 30min, 加过量靶向肽、细胞穿膜肽, 冰浴搅拌 4h, 4℃、15000r/min 离心 10min, 超纯水洗涤沉淀 3 次, 冷冻干燥。

7. 细胞穿膜 - 靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂的表征: (1) 测粒径、Zeta 电位: 取适量纳米粒, 加超纯水超声重悬, 用激光散射粒度仪测定粒径及 Zeta 电位。(2) 测载药量: 称取定量纳米粒, 用 0.5ml 色谱纯乙腈溶解, 加 10μl 内标多西紫杉醇溶液, 4℃、12000r/min 离心 10min, 取上清, 用高效液相色谱 (HPLC) 测 PTX 含量, 计算载药量。(3) 形貌观察: 取适量纳米粒, 超声重悬于超纯水中, 稀释后均匀滴在铜网上并晾干, 置于透射电子显微镜 (TEM) 下, 观察形貌。(4) 体外释放: 10mg 纳米粒超声重悬于 3ml PBS (pH 7.4) 中, 转入透析袋并封口, 置于 200ml PBS (pH 7.4, 10mg/ml BSA) 中, 加 200μl 双抗, 体系密闭, 在 37℃、100r/min 不断搅拌的条件下进行释放, 分别在 1、2、4、6、8、12、24、48、72、96h 取样 1ml, 同时补充等体积 PBS (pH 7.4, 10mg/ml BSA), HPLC 测 PTX 含量并计算释放率。等量 PTX 的释放方法同上 (整个研究中所用的超声功率均为 200W)。

8. CCK8 试验: 将 U251 细胞稀释成  $3 \times 10^4$ /ml 的单细胞悬液, 每孔 100μl 接种于 96 孔板, 培养 24h 后分别加入 5、20、80nmol/L 的紫杉醇 (PTX)、紫杉醇纳米粒 (N - PTX)、细胞穿膜 - 靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂 (TN - PTX), 平行 3 孔, 孵育 48h, 每孔加 10μl CCK - 8 溶液, 温育 1.5h 后在 450nm 波长测吸光度值, 重复该实验 3 次, 统计细胞存活率。

### 结 果

1. 靶向肽筛选结果: 在测序结果中找到两个酶切位点, 分析酶切位点之间的七肽序列中出现次数最多的共有序列: NH<sub>2</sub> - His - Pro - Tyr - Ser - Thr - Ser - Lys - COOH (NH<sub>2</sub> - HPIYSTSK - COOH, HK), 拟作为靶向肽。

2. 靶向肽特异性验证结果: 七肽 HK 能显著地与不同的人胶质瘤组织相结合, 包括人多形性胶质母细

胞瘤、人星形胶质细胞瘤、人少枝胶质细胞瘤,绿色荧光显著,而阴性肽则未见结合(图 1)。此外并未观察

到七肽 HK 与正常人的心、肝、脾、肺、肾组织结合。以上结果表明七肽 HK 特异性良好,可作为靶向肽。

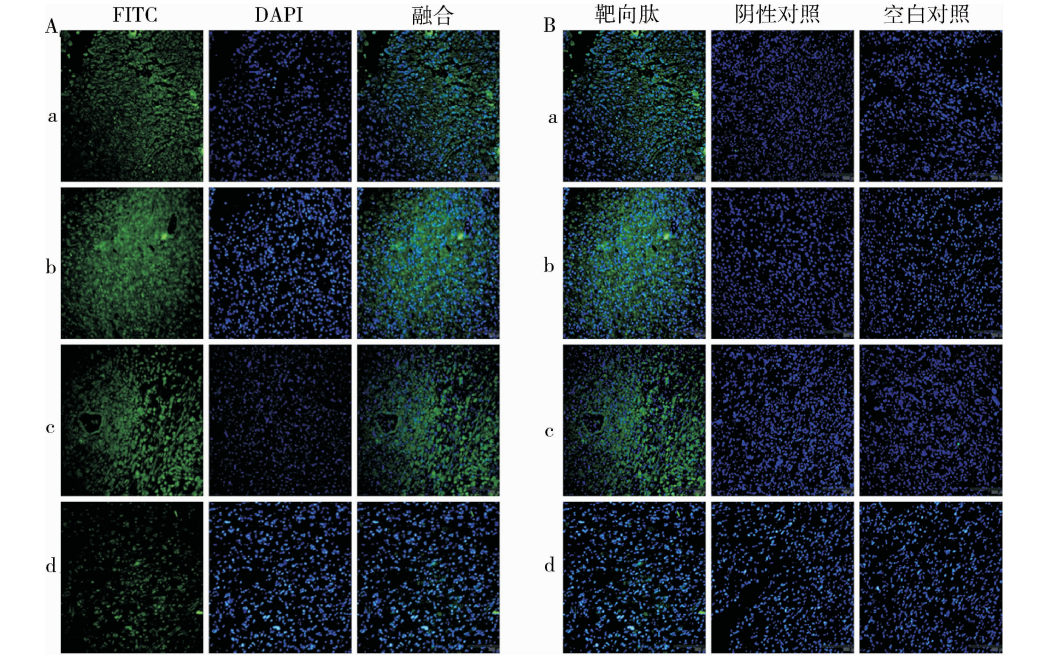


图 1 靶向肽 HK 与不同的人胶质瘤组织的结合情况  
靶向肽 HK、阴性肽以生物素标记,与组织相结合后,再与连有 FITC 的亲素特异性结合,荧光显微镜下呈现绿色荧光。细胞核以 DAPI 染色,呈现蓝色荧光。A. 融合前图片;B. 融合后图片。a. 人多形性胶质母细胞瘤;b. 人少枝胶质细胞瘤;c. 人星形胶质细胞瘤 I;d. 人星形胶质细胞瘤 II

3. 细胞穿膜 - 靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂 (TN - PTX) 的制备及表征结果:经激光散射粒度仪测定,TN - PTX 的粒径为  $350.5 \pm 31.8\text{nm}$ ;多分散系数 PDI 为  $0.224 \pm 0.034$ ,表明粒径分布集中;

Zeta 电位为  $-31.9 \pm 5.0\text{mV}$ ,绝对值较大,表明纳米粒较稳定。HPLC 测定 TN - PTX 的载药量为 5.01%。TEM 分析,纳米粒形貌基本呈圆球形,分布较均匀(图 2)。

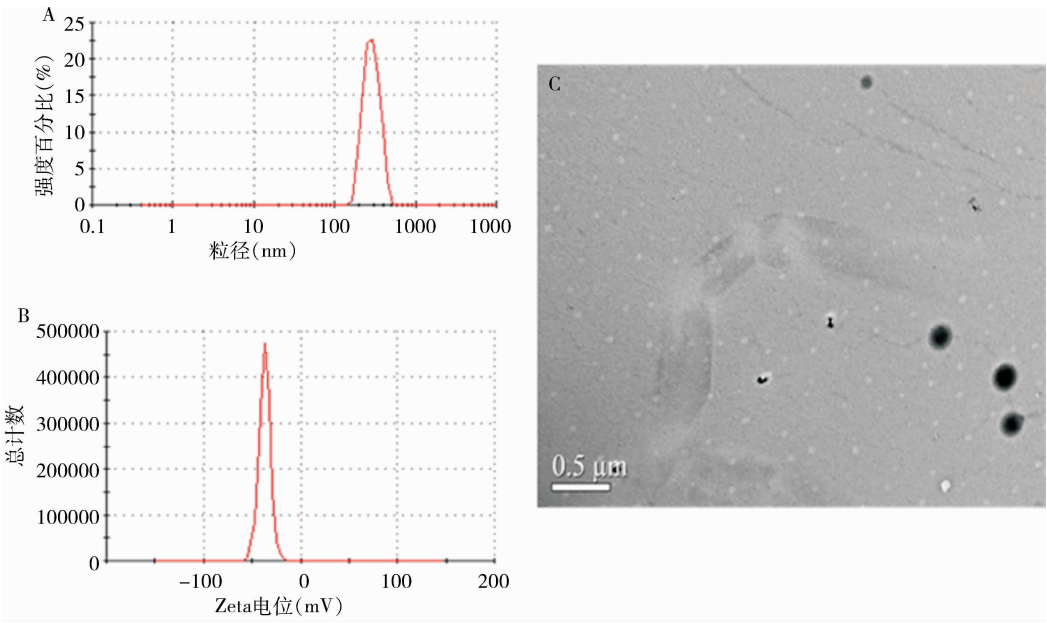


图 2 细胞穿膜 - 靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂的粒径、Zeta 电位、形貌结果  
A. 粒径强度分布;B. Zeta 电位分布;C. 形貌

4. 细胞穿膜-靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂 (TN-PTX) 体外释放结果: 在 96h 内, PTX 释放率达到 80%, 而 TN-PTX 则释放缓慢, 释放率只有 50% (图 3), 表明 TN-PTX 具有一定的缓释作用。

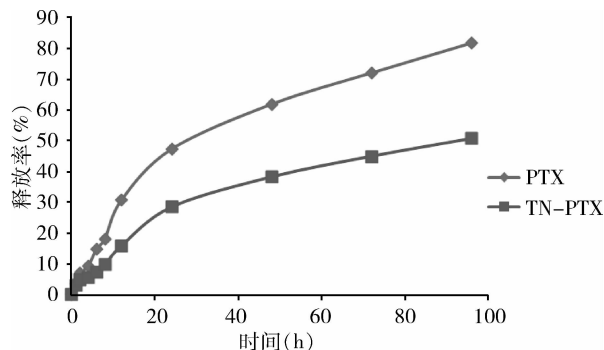


图 3 细胞穿膜-靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂的体外释放结果

5. 细胞穿膜-靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂 (TN-PTX) 的体外抗胶质瘤结果: 相同 PTX 浓度条件下作用 48h, TN-PTX 对 U251 细胞增殖的抑制作用比 PTX 高, 细胞存活率低, 说明能够降低 PTX 的有效使用剂量 (图 4)。

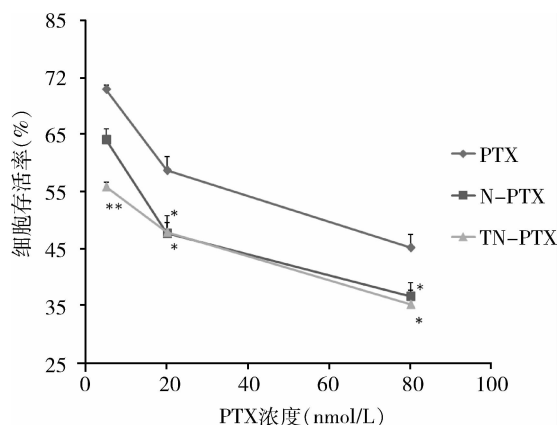


图 4 PTX、N-PTX、TN-PTX 对 U251 细胞增殖的抑制作用结果

与 DTX 相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

## 讨 论

化学治疗是利用化学药物杀死肿瘤细胞、抑制肿瘤细胞生长繁殖和促进肿瘤细胞分化的一种治疗方式。近年来,随着现代生物医药技术的日益发展,化疗在胶质瘤临床应用中越来越重要。但化疗药物在发挥作用同时,也会对机体正常细胞有不同程度毒性作用,甚至产生严重的毒性不良反应<sup>[13]</sup>。如何使药物对肿瘤细胞产生特异性杀伤作用,已成为急需解决

的问题。

本研究中,笔者选择抗微管药物紫杉醇 (PTX) 作为抗胶质瘤药物。PTX 能与微管蛋白  $\beta$  亚基结合,抑制微管蛋白解聚,使细胞在有丝分裂时不能形成纺锤体和纺锤丝,从而诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。

利用噬菌体展示技术,得到了一种能与人胶质瘤 U251 细胞特异性结合的靶向肽 HK ( $\text{NH}_2$ -HPYS TSK-COOH)。将生物素标记的靶向肽 HK 与组织病理切片相结合,再与 FITC 标记的亲合素相结合,利用生物素-亲合素系统的信号放大作用观察 FITC 的绿色荧光强弱<sup>[15]</sup>。免疫组化结果显示,靶向肽 HK 能与不同的人胶质瘤组织相结合,可见到明显的绿色荧光,而与正常人的心、肝、脾、肺、肾组织几乎没有结合或结合很弱,说明筛选得到的靶向肽 HK 特异性较好。

调研发现,界面沉淀法比超声乳化法制备的纳米粒粒径要小,所以选用界面沉淀法将抗肿瘤药物 PTX 包裹于可生物降解的高分子有机化合物 PLGA 中制备纳米粒<sup>[16]</sup>。用丙酮溶解 PLGA 和 PTX,因为丙酮能与水互溶,两相接触时界面能降低,随着丙酮向水相扩散,有机相液滴减小,PLGA 溶解度降低从水相中固化析出,形成纳米粒。载体 PLGA 含有羧基 ( $-\text{COOH}$ ),而靶向肽、细胞穿膜肽含有氨基 ( $-\text{NH}_2$ ),笔者采用酰胺缩合反应,将靶向肽、细胞穿膜肽连于紫杉醇纳米粒表面,制备细胞穿膜-靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂 (TN-PTX)<sup>[12]</sup>。

纳米粒的评价指标有粒径、Zeta 电位、载药量、外貌形态等。粒径是一个分布范围,属于正态分布,要尽可能减少其粒径跨距,使其分布趋于均一。TN-PTX 粒径主要分布于 200 ~ 400nm 之间,平均  $350.5 \pm 31.8\text{nm}$ 。多分散系数 (PDI) 表示粒径分布的范围集中与否。PDI 值为 0.08 ~ 0.70 表明体系分散度适中, PDI 越小,说明粒子大小分布越集中。TN-PTX 的 PDI 值为  $0.224 \pm 0.034$ ,表明粒径分布较集中。Zeta 电位是表征胶体分散系稳定性的重要指标。粒子越小, Zeta 电位绝对值越高,体系越稳定;反之, Zeta 电位绝对值越低,越倾向于凝聚,分散系被破坏而发生凝聚。TN-PTX 的 Zeta 电位在 -30mV 左右,绝对值较大,表明该纳米粒较稳定。与 PTX 相比, TN-PTX 的释放过程还包括了药物从 PLGA 中释放出来的过程,具有一定的缓释作用。

体外 CCK8 实验旨在探讨 TN-PTX 的细胞毒性作用。相同浓度 PTX (5 ~ 80nmol/L) 条件下, TN-

PTX 作用于 U251 细胞 48h 后的细胞存活率低于 PTX,表明此浓度范围内 TN - PTX 细胞毒性高于 PTX 单一应用,降低了有效使用剂量,使其能更好的发挥抗肿瘤作用。

综上所述,细胞穿膜 - 靶向双肽修饰的紫杉醇纳米制剂性质稳定,具有一定缓释作用,在体外能抑制人胶质瘤 U251 细胞的增殖,但其作用机制和体内动物实验水平还需要进行进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 Soejima K, Naoki K, Ishioka K, *et al.* A phase II study of biweekly paclitaxel and carboplatin in elderly patients with advanced non - small cell lung cancer [ J ]. Cancer Chemother Pharmacol, 2015, DOI 10. 1007/s00280 - 014 - 2673 - 8
- 2 Wang RH, Cao HM, Tian ZJ, *et al.* Efficacy of dual - functional liposomes containing paclitaxel for treatment of lung cancer [ J ]. Oncology Reports, 2015, 2 ( 33 ) : 783 - 791
- 3 Razi SS, Rehmani S, Li X, *et al.* Antitumor activity of paclitaxel is significantly enhanced by a novel proapoptotic agent in non - small cell lung cancer [ J ]. Journal of Surgical Research, 2014 : 1 - 9
- 4 Alzouebi M, Ramakrishnan S, Rennie I, *et al.* Use of systemic therapy in the treatment of choroidal metastases from breast cancer [ J ]. BMJ Case Rep, 2014, DOI 10. 1136/bcr - 2013 - 009088
- 5 Nance E, Zhang C, Shih TY, *et al.* Brain - penetrating nanoparticles improve paclitaxel efficacy in malignant glioma following local administration [ J ]. ACS Nano, 2014, 10 ( 8 ) : 10655 - 10664
- 6 Jiang X, Xin H, Sha X, *et al.* PEGylated poly ( trimethylene carbonate ) nanoparticles loaded with paclitaxel for the treatment of advanced glioma: in vitro and in vivo evaluation [ J ]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 2 ( 420 ) : 385 - 394
- 7 Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [ J ]. Science, 1985, 4705 ( 228 ) : 1315 - 1317

- 8 Shukla GS, Murray CJ, Estabrook M, *et al.* Towards a ligand targeted enzyme prodrug therapy: single round panning of a beta - lactamase scaffold library on human cancer cells [ J ]. International Journal of Cancer, 2007, 10 ( 120 ) : 2233 - 2242
- 9 Fu B, Zhang Y, Long W, *et al.* Identification and characterization of a novel phage display - derived peptide with affinity for human brain metastatic breast cancer [ J ]. Biotechnology Letters, 2014, 11 ( 36 ) : 2291 - 2301
- 10 Valetti S, Maione F, Mura S, *et al.* Peptide - functionalized nanoparticles for selective targeting of pancreatic tumor [ J ]. Journal of Controlled Release, 2014, 192 : 29 - 39
- 11 Yang J, Kim SE, Cho M, *et al.* Highly sensitive and selective determination of bisphenol - A using peptide - modified gold electrode [ J ]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 61 : 38 - 44
- 12 Yang N, Jiang Y, Zhang H, *et al.* Active targeting docetaxel - PLA nanoparticles eradicate circulating lung cancer stem - like cells and inhibit liver metastasis [ J ]. Molecular Pharmaceutics, 2015, 1 ( 12 ) : 232 - 239
- 13 Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics [ J ]. Nature Reviews Drug Discovery, 2003, 5 ( 2 ) : 347 - 360
- 14 Kollipara S, Bende G, Movva S, *et al.* Application of rotatable central composite design in the preparation and optimization of poly ( lactic - [ J ]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2010, 11 ( 36 ) : 1377 - 1387
- 15 Jung KH, Park JW, Paik JY, *et al.* EGF receptor targeted tumor imaging with biotin - PEG - EGF linked to ( 99m ) Tc - HYNIC labeled avidin and streptavidin [ J ]. Nuclear Medicine and Biology, 2012, 8 ( 39 ) : 1122 - 1127
- 16 Danhier F, Lecouturier N, Vroman B, *et al.* Paclitaxel - loaded PEGylated PLGA - based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation [ J ]. Journal of Controlled Release, 2009, 1 ( 133 ) : 11 - 17

( 收稿日期:2015 - 01 - 29 )

( 修回日期:2015 - 02 - 20 )

## Aurora - A 在食管鳞癌及癌前病变中的表达特点和研究意义

韩旭 薛丽燕 沈笑 程贤 詹启敏 童彤

**摘 要 目的** 探讨极光激酶 ( aurora kinases A, Aurora - A ) 在食管鳞癌及癌前病变 ( 主要为癌旁癌前病变 ) 组织样本中的表达特征及其在食管鳞癌发生、发展过程中的作用。**方法** 应用组织芯片技术和免疫组织化学方法 ( S - P 法 ) 检测 Aurora - A 在 9 例重度不典型增生组织和 122 例食管鳞癌组织以及它们的癌旁癌前病变组织中的表达情况;并使用实时荧光定量 PCR 法检测 Aurora - A 基因在 8 对癌前病变组织和 5 对早期食管癌组织中的表达水平;同时运用蛋白免疫印迹法和实时荧光定量 PCR 法检

基金项目:国家重大科学研究计划基金资助项目 ( 2010CB910703 )

作者单位:100021 北京协和医学院/中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室 ( 韩旭、沈笑、程贤、詹启敏、童彤 ); 100021 北京协和医学院/中国医学科学院肿瘤医院病理科 ( 薛丽燕 )

通讯作者:童彤,电子信箱:tongt5@ yahoo. com