

人肝细胞肝癌MHCC97H裸鼠移植模型的建立 及索拉菲尼的药效研究

杨璐 吴燕华*

(复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

摘要 索拉菲尼是靶向血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、B-Raf原癌基因(B-Raf proto-oncogene)等多种酪氨酸激酶的抑制剂, 能有效延长晚期肝细胞肝癌(简称肝癌)患者的生存时间。该研究利用人肝癌细胞MHCC97H成功建立了裸鼠皮下异位移植模型以及原位移植模型, 并评估了索拉菲尼对MHCC97H移植瘤的治疗作用。结果表明, MHCC97H可以在裸鼠皮下形成异位移植瘤, 每天灌胃30 mg/kg索拉菲尼可显著抑制肿瘤生长。同时, MHCC97H也可以在裸鼠肝脏形成原位移植瘤。每天灌胃30 mg/kg索拉菲尼可以显著抑制裸鼠的血清甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)水平及原位瘤生长。综上所述, MHCC97H是构建皮下异位移植以及原位移植模型的一个理想肝癌细胞系, 灌胃索拉菲尼在这两种移植瘤模型中都表现出显著的肿瘤抑制效果。

关键词 索拉菲尼; MHCC97H; 异位皮下移植模型; 原位移植模型

Establishment of Human Hepatocellular Carcinoma Cell MHCC97H Xenografts in BALB/c Nude Mice and Evaluation of Sorafenib in MHCC97H Xenografts

Yang Lu, Wu Yanhua*

(School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract Sorafenib, the inhibitor of multiple tyrosine kinase including vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and B-Raf, can effectively prolong the survival time of patients with advanced liver cancer. Our study successfully established human hepatocellular carcinoma cell MHCC97H subcutaneous and orthotopic xenograft models in BALB/c nude mice, and further evaluated the therapeutic effect of sorafenib on the 2 xenograft models. Our results showed that MHCC97H cells grew well after subcutaneously transplanted into BALB/c nude mice. Sorafenib in 30 mg/kg *per os* (p.o.) daily significantly inhibited tumor growth. Moreover, MHCC97H cells could also form orthotopic xenografts in the liver of BALB/c nude mice. Sorafenib in 30 mg/kg p.o. daily significantly reduced the AFP level in serum and suppressed tumor growth in mice liver. In conclusion, MHCC97H is an ideal liver cancer cell line in establishment of subcutaneous and orthotopic xenografts models. Sorafenib showed significant anti-tumor effect on the 2 xenograft models.

Keywords sorafenib; MHCC97H; subcutaneous xenograft model; orthotopic xenograft model

收稿日期: 2016-05-06 接受日期: 2016-07-18

上海市教委“晨光”计划(批准号: 12CG03)和复旦大学“卓学计划”资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-51630593, E-mail: yanhuawu@fudan.edu.cn

Received: May 6, 2016 Accepted: July 18, 2016

This work was supported by “Cheng Guang” Project of Shanghai Municipal Education Commission (Grant No.12CG03) and Zhuoxue Program of Fudan University

*Corresponding author. Tel: +86-21-51630593, E-mail: yanhuawu@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2016-09-13 15:02:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160913.1502.008.html>

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)(简称肝癌)是威胁人类健康的常见肿瘤之一,并且在肿瘤相关性死亡中排第3位^[1]。我国是肝癌的高发国,每年有11万人死于肝癌,占全世界肝癌死亡总数的45%。目前,人们对肝癌的研究多集中于细胞模型和临床患者^[2-4],对动物模型的研究较少^[5]。建立适宜的人肝癌动物模型可以为深入研究肝癌的发生发展、侵袭转移机制以及为寻找新的治疗策略提供有效的手段。理想的肝癌动物模型应具备以下特征:(1)与人类大多数肝癌病理组织类型相一致,模型材料和方法与人体肝癌相关性越密切越好;(2)具有合适的肿瘤体积及生长速度,荷瘤动物有足够的存活时间可供连续观察;(3)肿瘤的组织类型、生物学特点(生长速度、宿主生存情况及宿主反应等)应相对稳定,动物模型中的肿瘤组织与人的肿瘤组织较为一致,影响实验结果的因素较少;(4)操作技术简便、复制迅速、成功率高、重复性好。

多靶点抗肿瘤药物索拉菲尼具有抗多种肿瘤的作用,在临床上对肾细胞癌、肝癌、胰腺癌、结肠癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌等实体瘤均有较好疗效。索拉菲尼是一种小分子化合物,能够抑制细胞内的多种酪氨酸激酶[如血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、血小板衍生生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)、B-Raf(B-Raf proto-oncogene, 编码丝氨酸/苏氨酸激酶)等]的活性^[6]。临床前的动物实验发现,索拉菲尼能够通过抑制细胞增殖、促进细胞凋亡等途径抑制肿瘤细胞生长,同时能够通过抑制血管生成抑制肿瘤微环境中的血管形成^[7]。更重要的是,临床研究揭示,索拉菲尼能够显著延长晚期肝癌患者的存活时间^[8-9]。但是,目前肝癌的动物模型及药效评价的基础研究相对较少,另一方面,临床可用的肝癌靶向药物亦非常有限。

本研究建立了MHCC97H肝癌细胞株的皮下异位及原位移植肝癌裸鼠模型,评估了索拉菲尼的抑瘤作用,为抗肿瘤药物的研究提供了动物模型参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株(MHCC97H)购自上海复旦大学附属中山医院。BALB/c裸鼠(5~6周龄)购自上海斯莱克实验动物有限公司,全部动物实验的相关操作

通过复旦大学生命科学学院伦理审查委员会批准。索拉菲尼(粉剂)购自济南伟都化工技术有限公司。溶剂配方为5%蓖麻油与5%乙醇的水溶液。

1.2 试剂及仪器

细胞培养基(RPMI-1640)购自Corning公司,胎牛血清、胰蛋白酶购自Gibco公司。人甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)酶联免疫试剂盒Quantikine购自R&D公司。

1.3 细胞培养

MHCC97H细胞培养于DMEM培养基中,内含10%胎牛血清及100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素,置于37 °C、5.0% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。MHCC97H细胞在细胞培养室经数次传代培养,使其能够提供足够数量的肿瘤细胞。

1.4 皮下接种模型及索拉菲尼药效评价

1.4.1 造模方法 取雄性裸鼠38只(5~6周龄),在无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级的层流架中饲养。1周后在裸鼠右侧背部靠近腋下进行皮下接种。取生长状态良好的MHCC97H细胞,离心收集,用无血清培养基调整细胞浓度为 3×10^7 /mL。每只裸鼠注射0.1 mL细胞悬液(即 3×10^6 /只)。接种后,所有裸鼠继续在SPF条件下饲养。

1.4.2 观察指标 接种7 d后,取30只皮下瘤体形态规则,大小接近的裸鼠进行后续实验,随机分成2组,每组15只。1组每天灌胃索拉菲尼的溶剂;另1组每天灌胃索拉菲尼,剂量为30 mg/kg,灌胃体积为10 mL/kg。1周对肿瘤体积和裸鼠体重进行2次测量。4周后处死裸鼠(所有裸鼠经CO₂窒息后脱颈椎处死),剥离肿瘤组织,进行肿瘤重量的测量。

1.5 原位接种模型及索拉菲尼药效评价

1.5.1 造模方法 在生物安全柜内继续将MHCC97H皮下移植瘤的肿瘤组织取出,切成1 mm×1 mm×1 mm大小的瘤块,取30个形态规则的瘤块备用。另取28只裸鼠(雄性,6~7周龄)麻醉,开腹,小心地将肝左叶拖出,用套管针直接往肝内插入切好的瘤块。将拖出的左肝叶放回腹腔,缝合关腹。

1.5.2 观察指标 原位植入瘤块7 d后,挑选20只健康小鼠,按体重随机分成2组,每组10只。1组每天灌胃索拉菲尼的溶剂,另1组每天灌胃索拉菲尼,剂量为30 mg/kg,灌胃体积为10 mL/kg,1周测量体重2次。给药5周后,从裸鼠眼眶的静脉丛采血,取血清,按照酶联免疫试剂盒的说明书进行操作,测量鼠血清中

的AFP水平。同时处死裸鼠,开腹,从肝脏上剥离原位肿瘤组织,拍照并进行称重。

1.6 数据统计

实验数据用SPSS 11.5软件进行分析,数据以 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ 形式表示,实验组数据和对照组数据之间利用学生 t 检验评价差异, $P<0.05$ 表示统计学差异显著, $P<0.01$ 表示统计学差异极显著。

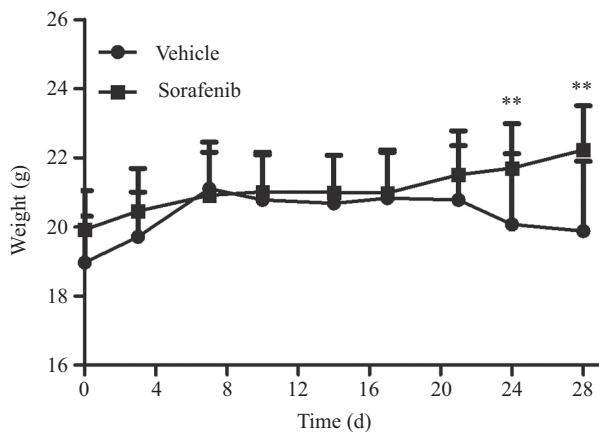
2 结果

2.1 MHCC97H皮下异位移植模型的建立以及索拉菲尼药效评价

为了构建MHCC97H皮下异位移植模型,我们将体外扩大培养的MHCC97H细胞以每只小鼠 3×10^6 的数量接种到裸鼠的右侧背部皮下。接种7 d后皮下瘤触摸手感比较硬实,说明皮下成瘤良好。测量结果显示,瘤体平均体积为 32 mm^3 。

为了利用MHCC97H皮下异位移植瘤进行索拉菲尼的药效研究,我们将实验动物在此基础上进行分组给药,每组15只,1组灌胃 30 mg/kg 索拉菲尼,另一组以 10 mL/kg 的剂量灌胃溶剂。

连续给药28 d后终止实验,评估动物的各项指标。体重分析显示,溶剂组动物体重平稳,索拉菲尼



将携带皮下移植瘤的裸鼠随机分组之后灌胃索拉菲尼或者溶剂,1周记录小鼠的体重2次,取各组的平均值绘制曲线,利用学生 t 检验进行显著性检测,** $P<0.01$,与溶剂组比较。

Mice bearing xenografts were randomly divided into 2 groups and each group received either sorafenib or the solvent control (vehicle). Mice weights were recorded 2 times every week and the average body weights were calculated. The student t -test was applied to analyze the difference between the 2 groups, ** $P<0.01$ compared with vehicle group.

图1 灌胃索拉菲尼对MHCC97H皮下异位移植裸鼠体重的影响

Fig.1 Effects of sorafenib on body weight of mice in the MHCC97H subcutaneous xenograft model

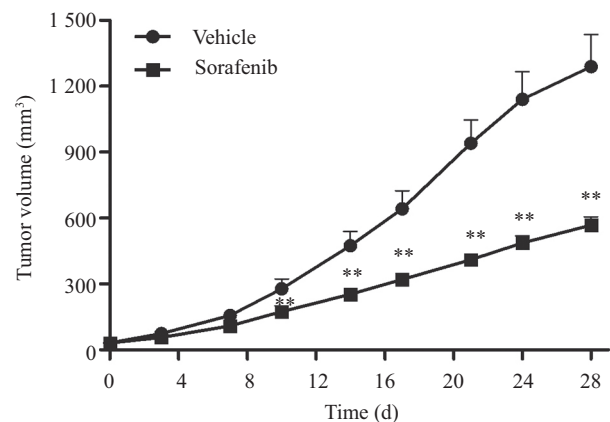
治疗组体重略微升高(图1),提示索拉菲尼未产生明显副作用。

进一步对比动物瘤体的生长曲线,和溶剂组相比,给予索拉菲尼后,肿瘤生长速度减缓,从给药后第7 d肿瘤体积出现显著性差异(图2)。分组后第28 d溶剂组的平均瘤体体积达到 $(1\ 289.42\pm 108.50)\text{ mm}^3$ 。而索拉菲尼组仅为 $(568.34\pm 72.94)\text{ mm}^3$ 。给药28 d后处死裸鼠,取出肿瘤组织进行称重,溶剂组的平均瘤重为 $(1.63\pm 0.65)\text{ g}$,索拉菲尼组平均瘤重为 $(0.71\pm 0.32)\text{ g}$,有极显著性差异(图3和图4)。

2.2 原位接种模型及索拉菲尼药效评价

为了构建MHCC97H原位移植瘤模型,我们利用皮下异位移植瘤模型中的裸鼠,在肿瘤体积达到 800 mm^3 左右的时候,将裸鼠处死,在生物安全柜内将肿瘤组织取出,切成 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 大小备用。另外,麻醉健康裸鼠,开腹,将切好的肿瘤组织植入肝脏内,缝合关腹。共接种28只裸鼠,在接种后2 d内死亡了2只裸鼠,手术成功率达到92.8%。从中挑选了20只表型健康的裸鼠进行后续实验。

为了评价索拉菲尼对原位移植瘤的抑制作用,在接种后7 d分组,每组10只裸鼠,分别灌胃索拉菲尼和溶剂。由于肝原位移植瘤在活体动物上不可

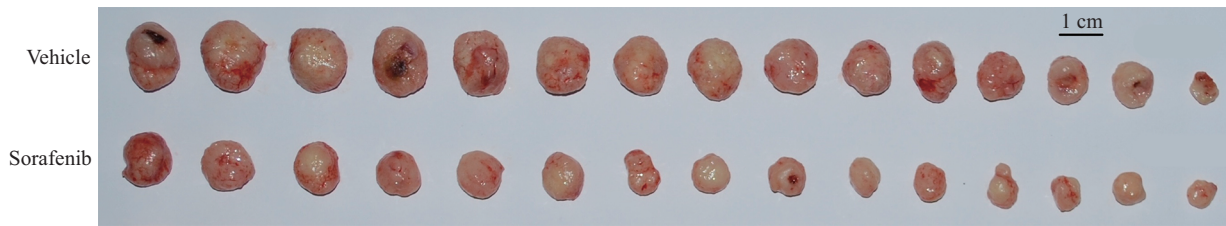


将携带皮下移植瘤的裸鼠随机分组之后灌胃索拉菲尼或者溶剂,1周记录瘤体体积2次,取各组的平均值绘制曲线,利用学生 t 检验进行显著性检测,** $P<0.01$,与溶剂组比较。

Mice bearing xenografts were randomly divided into 2 groups and each group received either sorafenib or the solvent control (vehicle). Tumor volumes were recorded 2 times every week and the average volumes were calculated. The student t -test was applied to analyze the difference between the 2 groups, ** $P<0.01$ compared with vehicle group.

图2 索拉菲尼对MHCC97H皮下异位移植瘤生长的影响

Fig.2 Effects of sorafenib on the growth of MHCC97H subcutaneous xenograft tumor

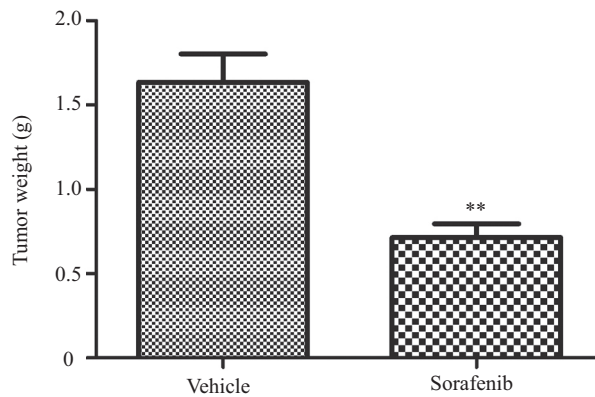


在灌胃索拉菲尼或者溶剂28 d后终止实验, 取瘤体并拍摄照片。

Mice were sacrificed after received either sorafenib or the solvent control for 28 days. Xenograft tumors were resected and photographed.

图3 MHCC97H皮下异位移植瘤的瘤体

Fig.3 Photo of MHCC97H subcutaneous xenograft tumors

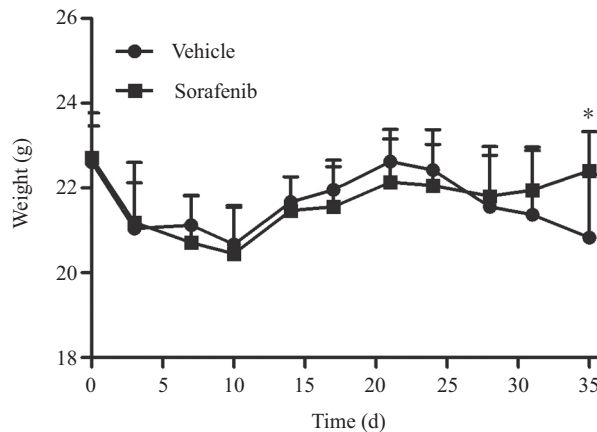


在灌胃索拉菲尼或者溶剂28 d后终止实验, 取瘤体并记录瘤体体重, 利用学生t检验进行显著性检测, ** $P < 0.01$, 与溶剂组比较。

Mice were sacrificed after received either sorafenib or the solvent control (vehicle) for 28 days. Xenograft tumors were resected and weighted. The student *t*-test was applied to analyze the difference between the 2 groups, ** $P < 0.01$ compared with vehicle group.

图4 索拉菲尼对MHCC97H皮下异位移植瘤瘤重的影响

Fig.4 Effects of sorafenib on the weight of MHCC97H subcutaneous xenograft tumor



将携带原位移植瘤的裸鼠随机分组之后灌胃索拉菲尼或者溶剂, 1周记录小鼠的体重2次, 取各组的平均值绘制曲线, 利用学生t检验进行显著性检测, * $P < 0.05$, 与溶剂组比较。

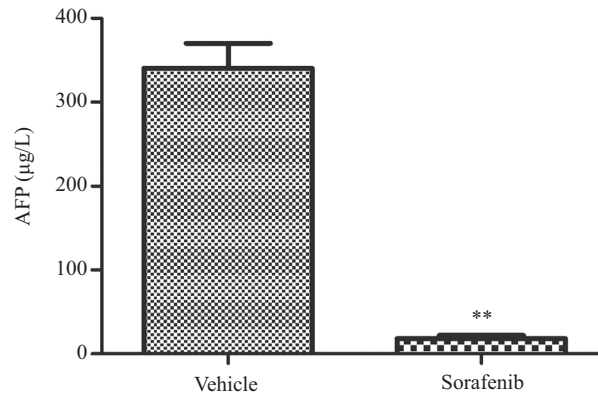
Mice bearing xenografts were randomly divided into 2 groups and each group received either sorafenib or the solvent control (vehicle). Mice weights were recorded 2 times every week and the average body weights were calculated. The student *t*-test was applied to analyze the difference between the 2 groups, * $P < 0.05$ compared with vehicle group.

图5 灌胃索拉菲尼对MHCC97H原位移植裸鼠体重的影响

Fig.5 Effects of sorafenib on body weight of mice in the MHCC97H orthotopic xenograft model

见, 在连续给药的过程中监控动物的体重。如图5所示, 动物的体重曲线揭示, 溶剂组动物体重在前期较为平稳, 后期有所下降, 索拉菲尼治疗组体重整体平

稳。这一结果初步提示, 溶剂组动物可能因为肿瘤生长的消耗, 体重下降。同时, 这一数据也初步证明, 此剂量的索拉菲尼对动物没有明显的毒性作用。

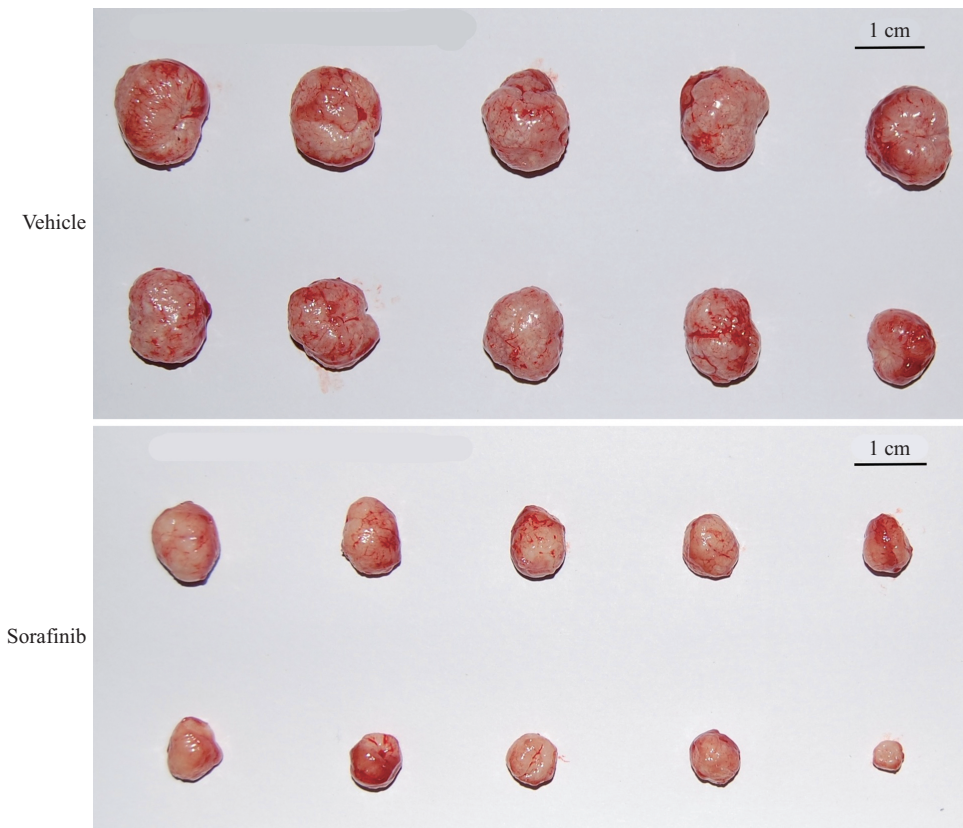


携带原位移植瘤的裸鼠随机分组之后灌胃索拉菲尼或者溶剂35 d, 取血检测AFP表达水平, 利用学生*t*检验进行显著性检测, ** $P < 0.01$, 与溶剂组比较。

Mice bearing xenografts were randomly divided into 2 groups and each group received either sorafenib or the solvent control (vehicle) for 35 days. Serum AFP level was evaluated and the student *t*-test was applied to analyze the difference between the 2 groups, ** $P < 0.01$ compared with vehicle group.

图6 索拉菲尼对MHCC97H原位移植裸鼠的血清AFP水平的影响

Fig.6 Effects of sorafenib on serum AFP level of mice in the MHCC97H orthotopic xenograft model



对携带原位移植瘤的裸鼠进行灌胃索拉菲尼或者溶剂35 d后终止实验, 取瘤体并拍摄照片。

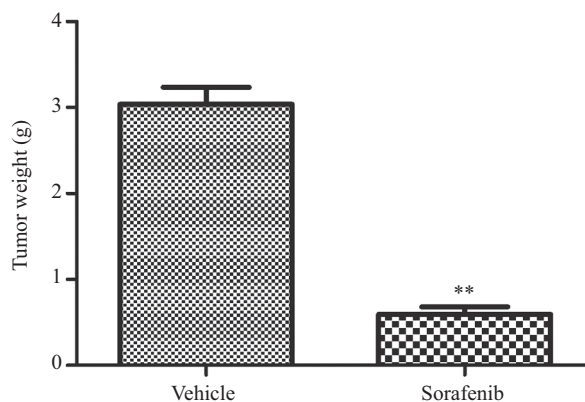
Mice bearing orthotopic xenograft were sacrificed after received either sorafenib or the solvent control for 35 days. Xenograft tumors were resected and photographed.

图7 MHCC97H原位移植瘤的瘤体

Fig.7 Photos of MHCC97H orthotopic xenograft tumors

我们同时采用监测血清AFP水平预估瘤体生长情况。在分组、给药后35 d, 眼眶后静脉丛采血, 收集血清做AFP检测, 结果显示, 与溶剂组裸鼠相比, 接受索拉菲尼灌胃的裸鼠在AFP表达水平上显著下

降(图6)。为此, 在连续给药35 d后终止实验, 处死裸鼠, 开腹从肝上取出肿瘤组织, 可见索拉菲尼组的原位瘤大小显著小于溶剂组的瘤体(图7), 对瘤体进行剥离和称重, 溶剂组的平均瘤重为(3.04±0.20) g, 索拉菲



对携带原位移植瘤的裸鼠进行灌胃索拉菲尼或者溶剂35 d后终止实验,取瘤体并记录瘤体体重,利用学生 t 检验进行显著性检测, $**P<0.01$,与溶剂组比较。

Mice bearing orthotopic xenograft were sacrificed after received either sorafenib or the solvent control (vehicle) for 35 days. Xenograft tumors were resected and weighted. The student t -test was applied to analyze the difference between the 2 groups, $**P<0.01$ compared with vehicle group.

图8 索拉菲尼对MHCC97H原位移植瘤重量的影响

Fig.8 Effects of sorafenib on the weight of MHCC97H orthotopic xenograft tumor

尼组平均瘤重仅为 (0.60 ± 0.09) g,有极显著差异(图8)。

3 讨论

1999年, Tian等^[10]从人肝癌组织的皮下移植瘤中分离得到了一株能够在体外传代培养的肝癌细胞系,取名为MHCC97,该细胞携带多种染色体数量变异和结构变异,并丢失了肿瘤抑制基因[如肿瘤抑制蛋白p53(tumor protein p53, TP53)]的表达。随后,研究者又从MHCC97中分离得到了高转移性的MHCC97H细胞克隆,肝脏原位接种后的肺转移率为100%^[11]。因此, MHCC97H细胞适用于构建肝癌发病机制和治疗方法研究的动物模型。本研究成功地建立了MHCC97H细胞的皮下异位瘤模型和原位瘤模型,发现细胞的类型和接种量对于皮下异位移植瘤模型的成瘤率非常重要,我们通过多次预实验,最终确定了MHCC97H细胞的适宜接种量为 3×10^6 /只。在这个接种条件下,瘤体既不会长得太快,又不会过小以至于无法观察和检测。我们也成功地建立了MHCC97H细胞的原位移植模型。由于小鼠肝脏小且薄,不易操作,直接注射细胞悬液的接种方法容易出现接种数量不均、肝脏破裂、裸鼠死亡等问题。所以我们采用了用套管针直接往肝脏插入瘤块的方法来建立原位移植模型。瘤块修剪成比较均一的大小并插入到裸鼠肝脏内,有利于得到差异较小的原位生长的肿瘤。建立一个适宜的体内药效模型对肝癌的研究具有重要意义。本研究利用索拉菲尼灌胃方法进行了药效模型的验证。在异位移植模型中

索拉菲尼对异位移植的MHCC97H的抑瘤率达到了58%,在原位移植模型中的抑瘤率为80%,且两种模型下均无明显的药物毒副作用。

AFP主要来自胚胎的肝细胞,胎儿出生约2周后AFP从血液中消失,因此正常人血清中AFP的含量低于 $20\ \mu\text{g/L}$ 。当肝细胞发生癌变时,会恢复产生这种蛋白的能力,而且随着病情恶化在血清中的含量会急剧增加^[12-13]。因此,临床上AFP可作为诊断原发性肝癌的一个特异指标。在连续灌胃索拉菲尼35 d后,用ELISA方法检测裸鼠血清中AFP水平,发现模型组的AFP水平达到了 $340\ \mu\text{g/L}$,而索拉菲尼给药的AFP水平才 $19\ \mu\text{g/L}$,远远低于模型组。结合动物体重的变化,我们推测药物已经对肝脏上的原位移植瘤产生了作用,决定进行解剖观察。最后的观察结果不仅证明了索拉菲尼的抑瘤效果,还证明了利用血清AFP水平可以较好地监测肝脏瘤体的生长变化。

肝肿瘤切除、局部消融和肝移植是目前临床上肝细胞癌患者获得长期生存的最主要途径,但术后复发与转移是限制治疗效果提升的主要问题。随着分子遗传学的发展,以肿瘤细胞特异性高表达分子为靶标的靶向药物在肿瘤治疗中的作用日益凸显。目前,美国、欧洲几个国家和中国都已批准将索拉菲尼列为晚期肝细胞癌患者的一线治疗药物。但是,由于靶向药物的针对性强,而肿瘤患者的遗传异质性高,单独或少数几种靶向药物不可能解决日益严峻的癌症问题。在肝癌治疗领域,目前全球还有百余项靶向药物在进行临床I期~IV期的实验工作,期望

能够开发出适用于不同遗传背景的肿瘤患者的其他有效靶向药物^[14]。我们的研究工作利用MHCC97H细胞作为造模细胞,成功构建了可用于临床肝癌治疗新药筛选的动物模型,优化了给药方式及药效评估方法,为肝癌的新药筛选提供了良好的动物实验体系的参考。

参考文献 (References)

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94(2): 153-6.
- 2 Lelunann U, Wingen LU, Brakensiek K, Wedemeyer H, Becker T, Heim A, *et al.* Epigenetic defects of hepatocellular carcinoma are already found in non-neoplastic liver cells from patients with hereditary haemochromatosis. *Hum Mol Genet* 2007; 16(11): 1335-42.
- 3 Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, *et al.* Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2007; 117(9): 2713-22.
- 4 Absood A, Hu B, Bassily N, Colletti L. VIP inhibits human HepG2 cell proliferation *in vitro*. *Regul Pept* 2008; 146(1/2/3): 285-92.
- 5 张东昌, 马勇, 俞媛, 陈立军. 人肝癌细胞MHCC-97H裸小鼠原位移植模型的建立. *武警医学院学报*(Zhang Dongchang, Ma Yong, Yu Yuan, Chen Lijun. Establishment of the orthotopic transplantation nude mouse model with human primary hepatocarcinoma cells MHCC-97H. *ACTA Academiae Medicinae CPAF*) 2009; 18(7): 580-3.
- 6 Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, Bollag G. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8(3): 219-25.
- 7 Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, *et al.* BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64(19): 7099-109.
- 8 Feng YX, Wang T, Deng YZ, Yang P, Li JJ, Guan DX, *et al.* Sorafenib suppresses postsurgical recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma in an orthotopic mouse model. *Hepatology* 2011; 53(2): 483-92.
- 9 龚新雷, 华海清, 秦叔逵, 王琳, 陈映霞, 钱军. 索拉非尼治疗国人晚期肝癌的临床观察. *临床肿瘤学杂志*(Gong Xinlei, Hua Haiqing, Qin Shukui, Wang Lin, Chen Yingxia, Qian Jun. Clinical observation of sorafenib in Chinese patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Chinese Clinical Oncology*) 2009; 14(8): 708-11.
- 10 Tian J, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Lin ZY, Chen J, *et al.* New human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line with highly metastatic potential (MHCC97) and its expressions of the factors associated with metastasis. *Br J Cancer* 1999; 81(5): 814-21.
- 11 Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, *et al.* Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol* 2001; 7(5): 630-6.
- 12 李玮, 白云, 李云婷, 许素菊. 甲胎蛋白的临床应用及实验室评价. *临床误诊误治*(Li Wei, Bai Yun, Li Yunting, Xu Sujun. Clinical application and laboratory evaluation of alpha fetoprotein. *Clinical Misdiagnosis & Mistherapy*) 2007; 20(8): 97-9.
- 13 王菡, 杨江民. 甲胎蛋白含量测定的临床意义. *青海医药杂志*(Wang Han, Yang Jiangmin. The clinical significance of determination of AFP content. *Qinghai Medical Journal*) 2011; 41(11): 78-80.
- 14 周俭, 肖永胜, 樊嘉. 分子靶向药物对肝癌复发转移防治作用. *中国实用外科杂志*(Zhou Jian, Xiao Yongsheng, Fan Jia. Prevention and treatment of recurrence of liver cancer metastasis for molecular targeted drugs. *Chinese Journal of Practical Surgery*) 2012; 32(10): 860-4.