

· 研究论文 ·

乳腺癌细胞-干细胞共培养上清液对乳腺癌细胞的
体外抗肿瘤作用研究郑良栋^{1,2}, 冯涛^{1,2}, 何雪梅¹, 张婷^{1,2}, 刘梦楠¹, 廖红^{2*}

(重庆医科大学 1. 分子医学与肿瘤研究中心; 2. 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016)

摘要: 研究人胚胎干细胞 H9 与肿瘤细胞 MDA-MB-231 共培养上清液对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用。建立人胚胎干细胞 H9 与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞接触式共培养体系, 收集共培养上清液。以单独培养的 H9 细胞上清为对照, 显微镜下观察共培养上清液对肿瘤细胞生物行为学的影响, 用 MTT 法检测上清液对 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响, Hoechst 染色及流式细胞术检测上清液对肿瘤细胞的凋亡影响; transwell 小室法检测上清液对肿瘤细胞迁移及侵袭的影响。结果显示, 共培养上清液能抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 促进其凋亡, 抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移, 而单独培养的 H9 细胞上清液对 MDA-MB-231 细胞几乎没有影响。因此得出结论, 人胚胎干细胞 H9 与人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共培养的上清液对 MDA-MB-231 有一定的体外抑癌效应。

关键词: 胚胎干细胞; 共培养; 乳腺癌; 凋亡

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2016) 04-0552-06

Antitumor effect of supernatant from co-culture of human embryonic stem cells and breast cancer cells on MDA-MB-231 cells *in vitro*ZHENG Liang-dong^{1,2}, FENG Tao^{1,2}, HE Xue-mei¹, ZHANG Ting^{1,2}, LIU Meng-nan¹, LIAO Hong^{2*}

(1. Research Center of Molecular Medicine and Cancer, 2. Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: This study was designed to investigate the inhibitory effect of supernatant from co-culture of human embryonic stem cells and tumor MDA-MB-231 cells on the breast cancer. The direct co-culture system of human embryonic stem cells H9 and breast cancer MDA-MB-231 cells was established, and the supernatant was tested in the inhibition of MDA-MB-231 cells. The inhibitory effects were examined in tumor cell morphology using microscope, cell proliferation with MTT assay, and cell apoptosis using the Hoechst staining and flow cytometry. Transwell assay was used to detect the migration and invasion of tumor cells. The results suggest that the supernatant significantly inhibited the proliferation, invasion and migration, and promoted cell apoptosis of MDA-MB-231 cells. However, the supernatant of H9 cells alone had little effect on MDA-MB-231 cells. Therefore, we conclude that the supernatant of co-culture cells had an inhibitory effect on tumor cells *in vitro*.

Key words: embryonic stem cell; co-culture; breast cancer; apoptosis

国际癌症研究中心 (IRAC) 的报告显示, 2012 年全球新增癌症患者数超过 1 400 万, 因癌症死亡的

人数高达 820 万^[1,2]。癌症已经成为全球威胁人类健康的首要疾病之一, 但放疗、化疗和手术治疗三大常规疗法效果仍不明显。肿瘤免疫治疗成为第四类已被证明的、具有显著临床疗效及优势的抗肿瘤治疗方法。它通过调动或激发机体自身的免疫功能, 增强肿瘤周围微环境中各种免疫因子抗肿瘤的能力, 从而

收稿日期: 2015-08-31; 修回日期: 2015-11-17.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81071770).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-23-68485161, E-mail: 724549980@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2015-0760

抑制和杀伤肿瘤细胞。

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 是从早期胚胎或原始性腺细胞中分离出来的一类原始细胞, 具有无限增殖、自我更新能力和多向分化潜能等生物学特性, 在临床和基础研究中具有广泛的应用前景^[3, 4]。已经有相关研究显示, 胚胎干细胞能在体外环境中诱导分化成一些抗癌相关的效应细胞^[5-7]并分泌可溶性的抗肿瘤因子^[8], 具有抑制多种肿瘤细胞生长的作用。

然而, 关于胚胎干细胞抗肿瘤的体外研究, 胚胎干细胞与肿瘤细胞共培养上清液体外抗癌效应的研究少见。作者猜测, 肿瘤细胞与胚胎干细胞共培养的上清液中存在一定的上述抗肿瘤因子和其他抗癌有效成分, 可能对肿瘤治疗有效。

基于此猜想, 本研究收集胚胎干细胞 H9 与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共培养上清液, 探究上清液对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞是否有体外抑制效应, 以验证上清液是否具有体外抗癌效果, 以期为开发抗肿瘤的免疫制剂开辟一种新的思路。

材料与方法

材料和试剂 人胚胎干细胞系 H9 细胞购自北京赛贝生物技术有限公司, 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株由重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心保存; PSCeasy 人多潜能干细胞培养基 (北京赛贝生物技术有限公司); 胎牛血清、RPMI-1640 培养基 (美国 HyClone 公司); MTT 试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司); Hoechst 33258 (碧云天生物技术研究); transwell 小室 (Coster), matrigel 基质胶 (Sigma 公司)。

细胞培养 MDA-MB-231 细胞用含 10% 胎牛血清、青霉素 $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、链霉素 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 RPMI 1640 完全培养基在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 3~4 天传代一次, 取对数期细胞进行实验。人胚胎干细胞系 H9, 参考说明书, 培养于 matrigel 上, 培养液为胚胎干细胞完全培养液。每天换液 1 次, 细胞汇合度达到 80% 时, 用 EDTA 37°C 消化 5 min, 离心细胞去上清液, 用 PSCeasy 完全培养基重悬, 按 1:5~1:10 的比例传代。

上清液的制备 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 以每孔 5×10^5 个接种于已经铺满 70% 胚胎干细胞 H9 的 6 孔板中, 每孔加入 1640 完全培养基 3 mL 于细胞培养箱内共培养。共培养 48 h 后收集上清, $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 以除去细胞碎片, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, -20°C 保存备用。使用时将上清与 1640

完全培养基分别制成 20%、40%、60% 和 80% 体积分数共培养上清液。体积分数 (%) = $V_{\text{上清液}} / V_{\text{培养基}} \times 100$ 。单独培养的 H9 细胞和 MDA-MB-231 细胞, 传代培养 48 h 后收集上清液, 依共培养上清液的制备方法, 分别制成不同体积分数的 H9 上清液和 MDA-MB-231 上清液 (以下简称 231 上清液)。

细胞形态学观察 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板中 (每孔 $100 \mu\text{L}$), 每孔细胞数为 5×10^3 个。待细胞恢复贴壁生长状态后, 进行以下细胞处理: 共培养上清液处理组细胞每孔分别加入 20%、40%、60% 或 80% 体积分数上清液 $200 \mu\text{L}$, H9 上清液处理组细胞加入 80% 体积分数的 H9 培养液。将处理 48 h 后的 MDA-MB-231 细胞于倒置显微镜下观察细胞形态的变化并拍照记录。

MTT 检测细胞增殖 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 按每孔细胞数 3×10^3 个接种于 96 孔板中。当细胞长到 70% 汇合度后进行处理, 实验分组及处理: 共培养上清液处理组细胞分别加入 0%、20%、40%、60%、80% 体积分数共培养上清液 $100 \mu\text{L}$, H9 上清液处理组细胞分别加入 0%、20%、40%、60%、80% 体积分数 H9 单独培养的上清液 $100 \mu\text{L}$; 231 上清液处理组细胞分别加入 0%、20%、40%、60%、80% 体积分数 231 单独培养的上清液 $100 \mu\text{L}$ 。每组设 3 个复孔, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。细胞处理 24 或 48 h 后, 每孔加入 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT $10 \mu\text{L}$, 继续培养 4 h 后弃上清液, 向每孔中加入 DMSO $100 \mu\text{L}$, 振荡 10 min, 在酶标仪上检测 490 nm 波长处的吸光度 A。根据上述实验方法重复 3 次。细胞存活率 (%) = $(A_{\text{加药组细胞}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组细胞}} - A_{\text{空白组}}) \times 100$ 。

Hoechst 33258 染色 细胞处理同“细胞形态学观察”。处理 48 h 后的细胞, 用 PBS 清洗 3 次, 加入细胞固定液室温固定 5 min, PBS 清洗 3 次, 加入 Hoechst 33258 染液, 37°C 染色 30 min, 荧光显微镜下观察细胞核形态。实验重复 3 次。

流式细胞术检测细胞凋亡 取对数期生长的细胞, 以每孔 2×10^5 个种植于 6 孔板中, 设共培养上清液处理组 (细胞分别加入 0%、20%、40%、60%、80% 体积分数的共培养上清液 2 mL) 和 H9 上清液处理组 (细胞加入 80% 体积分数的 H9 上清液 2 mL)。细胞处理 24 h 后, 收集各组细胞, 用预冷 PBS 洗涤 3 次, 胰酶消化后, 收集所有细胞于离心管中, PBS 洗涤 3 次, $800 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 将细胞悬液置于 EP 管中, 采用 AnnexinV-PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡率。重复实验 3 次。

细胞侵袭实验 Matrigel (4 °C) 放置过夜使之溶解, 用 4 °C 预冷的无血清 RPMI 1640 培养液稀释至 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取稀释的 matrigel $100 \mu\text{L}$ 加入到 transwell 的上室, 将 transwell 小室在 37 °C 温育至少 4~5 h, 使凝胶形成^[9]。对数期细胞用无血清 1640 培养基, 饥饿培养 24 h 后胰酶消化离心收集, 用不含血清培养基重悬细胞 (每毫升细胞数 6×10^6 个, 取 $50 \mu\text{L}$ 入上室, 同时分别加入不同体积分数 (0%、20%、40%、60% 和 80%) 的共培养上清液和 80% 体积分数的 H9 上清液 (此处上清液稀释液是由上清液与无血清 RPMI 1640 培养基按相应体积比配制) 各 $150 \mu\text{L}$ 。下室加入含 20% FBS 的完全培养基 $800 \mu\text{L}$ 。于细胞培养箱培养 24 h 后取出 transwell 小室, 弃去剩余培养基, PBS 清洗 2 遍, 棉签擦去上室表面细胞, 甲醇固定 15 min, PBS 洗 2 遍, 0.1% 结晶紫室温下染 30 min, PBS 洗净, 将 transwell 晾干, 倒置显微镜下观察拍照。每个小室随机选取 5 个视野, 统计视野内细胞数, 求均值。

细胞迁移实验 实验分组和操作步骤同侵袭实验方法, 区别仅在于所使用的 transwell 小室未经 matrigel 包被。

统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为统计学具有显著性。

结果

1 细胞形态学观察

共培养上清液处理 MDA-MB-231 细胞后, 在倒置相差显微镜下观察到其形态学发生明显变化, 与

空白对照组 (即 0% 体积分数的上清液处理, 下同) 细胞相比, 共培养上清液处理组 MDA-MB-231 细胞数量增加缓慢, 且随着共培养上清液浓度增加, 细胞数量逐渐减少, 甚至出现负增长。部分细胞出现老化甚至凋亡迹象, 细胞边缘逐渐皱缩变形, 细胞形态不规则且变小。而单独培养的 H9 上清液处理组, 细胞形态学无明显变化。结果显示, 共培养上清液对细胞生长有抑制作用, 可诱导癌细胞凋亡, 且其抑制作用呈浓度依赖性。见图 1。

2 MTT 检测上清液对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

如图 2A 所示, 同一处理时间, 随着共培养上清液浓度的增加 (20%、40%、60% 和 80%), 细胞生存率逐渐降低。相同浓度下, 共培养上清液处理 48 h 的细胞生存率低于 24 h 的生存率。而单独培养的 H9 上清液处理的细胞 (图 2B) 和单独培养的 231 上清液处理的细胞 (图 2C), 各浓度组细胞生存率无显著差异 ($P > 0.05$)。可知, 共培养上清液能抑制 MDA-MB-231 细胞增殖且其抑制作用呈浓度依赖性和时间依赖性, 而单独培养的 H9 上清液对 MDA-MB-231 细胞增殖无抑制作用。利用 SPSS 统计软件求得共培养上清液处理 24 h 的 MDA-MB-231 细胞半数抑制浓度为 44.1% 体积分数的, 处理 48 h 的 MDA-MB-231 细胞半数抑制浓度为 42.9% 体积分数的, 可知共培养上清液处理 48 h 对细胞的增殖抑制效果更好。

3 Hoechst 33258 染色

Hoechst 33258 染色后荧光显微镜下观察, 发现空白对照组细胞和 H9 上清处理组的细胞均只发出较弱的蓝色荧光, 细胞核大小较均一, 呈圆形或椭圆,

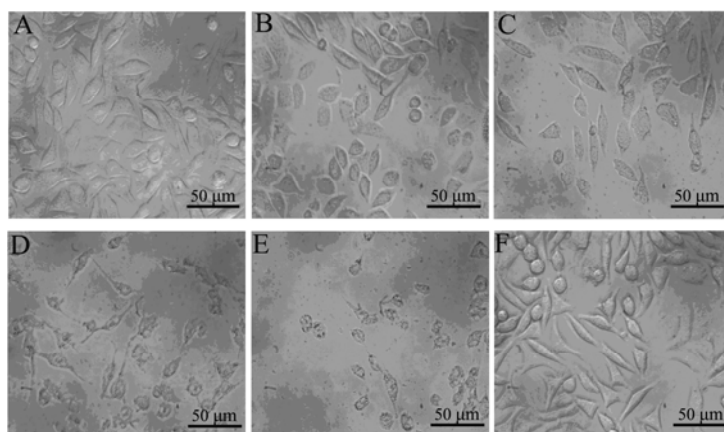


Figure 1 Effect of co-culture supernatant on morphological changes of MDA-MB-231 cells (magnification 400 \times) by inverted phase contrast microscope. A: Co-culture supernatant of 0% volume fraction; B: Co-culture supernatant of 20% volume fraction; C: Co-culture supernatant of 40% volume fraction; D: Co-culture supernatant of 60% volume fraction; E: Co-culture supernatant of 80% volume fraction; F: H9 supernatant of 80% volume fraction

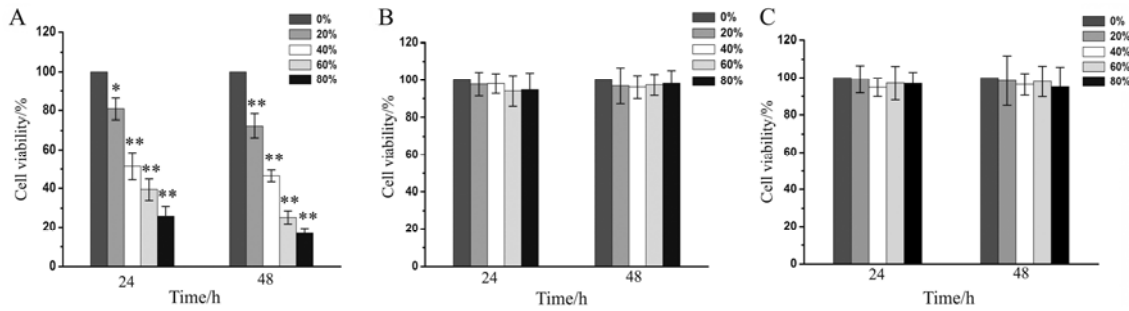


Figure 2 Effect of supernatant on the proliferation of MDA-MB-231 cells. The cells were treated with various of concentrations of supernatant for 24 h and 48 h. The proliferation of MDA-MB-231 cells was analyzed by using MTT assay. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group. A: The cells were treated with co-culture supernatant; B: The cells were treated with H9 supernatant; C: The cells were treated with MDA-MB-231 supernatant

染色质分布均一。而共培养上清液组有细胞发出亮蓝色荧光, 出现典型的细胞凋亡形态学改变, 表现为核缩小、核碎裂, 形态不规则, 大小不一, 偶可见核碎片游离形成的空泡。且随着共培养上清浓度增大, 凋亡程度加剧 (图 3)。

4 流式细胞术检测细胞凋亡

采用 AnnexinV-PI 双染法分析不同浓度上清液对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响。如图 4 所示, 与空白对照组相比, 各浓度共培养上清液均能诱导 MDA-MB-231 细胞发生不同程度的凋亡, 且呈现一定的浓度依赖关系。随着共培养上清液浓度的增加, 细胞凋亡率逐渐升高 ($P<0.05$)。20%、40%、60% 和 80% 体积分数共培养上清液作用于 MDA-MB-231 细胞 24 h 后, 其凋亡率分别为 6.91%、11.77%、14.48% 和 22.66%, 而空白对照组的细胞仅为 5.6%。80% H9 上清处理组细胞凋亡率为 5.89%, 与空白对照组相比, 没有显著性差异 ($P>0.05$)。

5 细胞侵袭实验

Matrigel 铺于 transwell 上室, 研究共培养上清液

对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响。细胞侵袭实验显示, 共培养上清液各浓度组穿膜细胞数均减少, 且随着共培养上清液浓度的升高, 穿膜细胞数逐渐减少, 与空白对照组相比具有统计学意义 ($P<0.05$)。而 H9 上清液处理组细胞穿膜细胞数与空白对照组接近, 无显著性差异 ($P>0.05$), 见图 5。实验证明共培养上清液能一定程度抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力, 且其抑制能力呈浓度依赖性。

6 细胞迁移实验

MDA-MB-231 细胞直接接种于 transwell 上室, 研究共培养上清液对 MDA-MB-231 细胞迁移运动能力的影响。实验显示, 共培养上清液各浓度组跨膜细胞数均减少, 且随着共培养上清液浓度的升高, 穿膜细胞数逐渐减少, 与空白对照组相比具有统计学意义 ($P<0.05$)。而 H9 上清处理组细胞穿膜细胞数与空白对照组接近, 无显著性差异 ($P>0.05$), 见图 6。实验证明共培养上清液一定程度上可抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移运动能力, 且其抑制迁移的能力呈浓度依赖性。

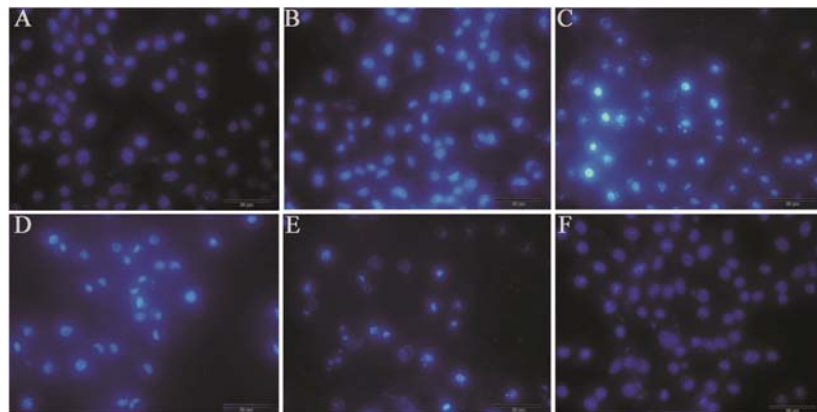


Figure 3 Effect of co-culture supernatant on apoptotic morphological changes of MDA-MB-231 cells detected with fluorescent microscope (magnification 400 \times). A: Co-culture supernatant of 0% volume fraction; B: Co-culture supernatant of 20% volume fraction; C: Co-culture supernatant of 40% volume fraction; D: Co-culture supernatant of 60% volume fraction; E: Co-culture supernatant of 80% volume fraction; F: H9 supernatant of 80% volume fraction

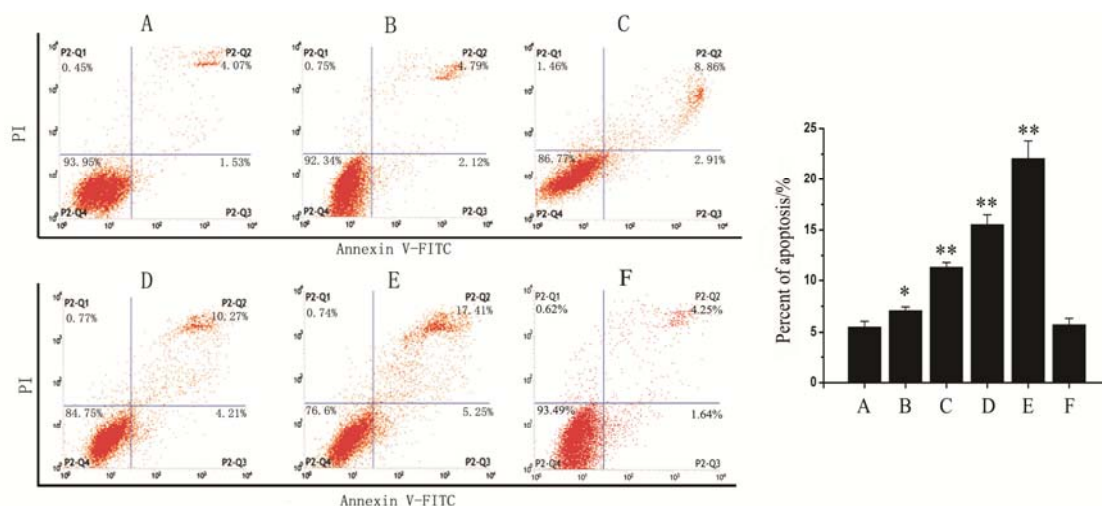


Figure 4 Effect of co-culture supernatant on the apoptosis of MDA-MB-231 cells. A: Co-culture supernatant of 0% volume fraction; B: Co-culture supernatant of 20% volume fraction; C: Co-culture supernatant of 40% volume fraction; D: Co-culture supernatant of 60% volume fraction; E: Co-culture supernatant of 80% volume fraction; F: H9 supernatant of 80% volume fraction. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

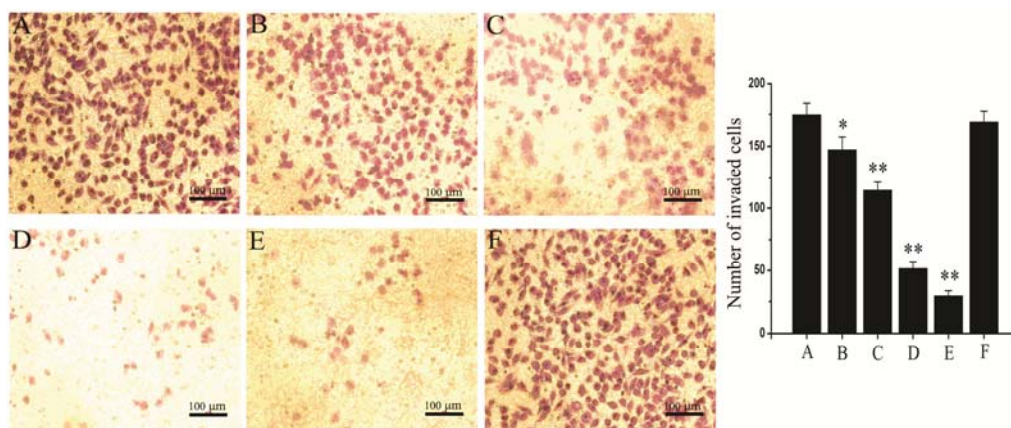


Figure 5 Effect of co-culture supernatant on the invasion of MDA-MB-231 cells (magnification 200 \times). A: Co-culture supernatant of 0% volume fraction; B: Co-culture supernatant of 20% volume fraction; C: Co-culture supernatant of 40% volume fraction; D: Co-culture supernatant of 60% volume fraction; E: Co-culture supernatant of 80% volume fraction; F: H9 supernatant of 80% volume fraction. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

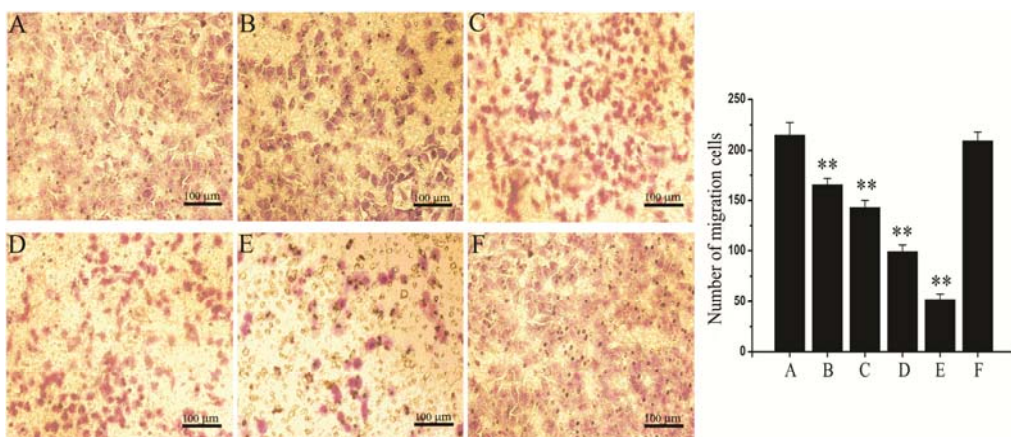


Figure 6 Effect of co-culture supernatant on the migration of MDA-MB-231 cells (magnification 200 \times). A: Co-culture supernatant of 0% volume fraction; B: Co-culture supernatant of 20% volume fraction; C: Co-culture supernatant of 40% volume fraction; D: Co-culture supernatant of 60% volume fraction; E: Co-culture supernatant of 80% volume fraction; F: H9 supernatant of 80% volume fraction. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group

讨论

源自胚胎组织或胚胎干细胞抗原诱导的抗肿瘤作用研究已经进行了多年。Yaddanapudi 等^[10]研究证实, 这种由胚胎干细胞诱导的抗肿瘤免疫并不是一种机体的“异物反应”, 而有可能是由多种效应细胞和细胞因子参与构成的针对胚胎干细胞表面抗原的特异性免疫应答。Giuffrida 等^[8]研究发现, 胚胎干细胞在体外环境中能够分泌一些可溶性的抗肿瘤因子, 具有抑制多种肿瘤细胞生长的作用, 并且能够阻滞肿瘤细胞的细胞周期。Lee 等^[11]的研究证实胚胎干细胞微环境能够改变肿瘤细胞的生长方式, 诱导恶性肿瘤细胞获得一定的良性表型, 从而具有抗肿瘤作用。

根据以上研究者已有的研究结论, 作者推测肿瘤细胞与胚胎干细胞共培养的上清液中存在上述抗肿瘤因子和其他抗癌有效成分可能对肿瘤治疗有效。因此, 本研究用人胚胎干细胞 H9 与人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞直接接触式共培养的上清液处理 MDA-MB-231 细胞, 并以单独培养的 H9 上清液和单独培养的 231 上清液作为对照组, 探究上清液对肿瘤细胞是否有体外抑制作用。

实验结果显示, 共培养上清液处理组肿瘤细胞的增殖受到一定程度抑制, 而单独培养的 H9 或 231 上清液对肿瘤细胞的增殖基本无影响。在细胞形态学观察中, 发现共培养上清液处理组 MDA-MB-231 细胞数量逐渐减少, 部分细胞出现老化甚至凋亡迹象, 细胞边缘逐渐皱缩变形, 细胞形态不规则且变小; 而对照组细胞形态学无明显变化。Hoechst 33258 染色后观察到共培养上清液处理组凋亡细胞出现核浓缩、碎片等一些列典型凋亡态, 发出亮蓝色荧光, 而对照组细胞只发出较弱的蓝色荧光, 细胞核无明显的形态学改变。流式细胞术检测细胞凋亡结果也显示共培养上清液处理组细胞凋亡率明显多于对照组。细胞侵袭和迁移实验结果显示共培养上清液组细胞侵袭和迁移率均低于对照组。因此, 结果表明共培养上清液可以抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖、侵袭和迁移, 促进肿瘤细胞的凋亡。

共培养上清液表现出的抗癌效应其机制可能是在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的刺激下, 具有多向分化潜能的干细胞被诱导分化并分泌一些抗肿瘤因子, 从而对肿瘤细胞产生一定的抑制作用。至于这些抗癌因子具体成分待进一步研究。

综上所述, 本研究初步证实了人胚胎干细胞 H9

与人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共培养的上清液有一定的体外抑癌效应, 可以抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖、侵袭和迁移, 促进肿瘤细胞的凋亡。然而其抗肿瘤效应的机制和有效成分有待进一步研究验证。

References

- [1] International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [EB/OL]. [2014-01-09]. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- [2] Bray F, Jemal A, Grey N, et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13: 790-801.
- [3] Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine [J]. *Genes Dev*, 2005, 19: 1129-1155.
- [4] Sun Y. New milestone in the development of clinical oncology-molecular targeted therapy [J]. *Anti-tumor Pharm (肿瘤药学)*, 2011, 1: 1-5.
- [5] Woll PS, Grzywacz B, Tian X, et al. Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent *in vivo* antitumor activity [J]. *Blood*, 2009, 113: 6094-6101.
- [6] Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C, et al. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth *in vivo* and *in vitro* in gelatin matrix [J]. *Exp Mol Pathol*, 2003, 75: 248-255.
- [7] Mohib K, Wang L. Differentiation and characterization of dendritic cells from human embryonic stem cells [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2012, Chapter 22: Unit 22F.11.
- [8] Giuffrida D, Rogers IM, Nagy A, et al. Human embryonic stem cells secrete soluble factors that inhibit cancer cell growth [J]. *Cell Prolif*, 2009, 42: 788-798.
- [9] Zheng YB, Gong JH, Li Y, et al. Inhibition of tumor cell invasion and induction of apoptosis by ubenimex [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 1593-1598.
- [10] Yaddanapudi K, Mitchell RA, Putty K, et al. Vaccination with embryonic stem cells protects against lung cancer: is a broad-spectrum prophylactic vaccine against cancer possible? [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e42289.
- [11] Lee LM, Seftor EA, Bonde G, et al. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation [J]. *Dev Dyn*, 2005, 233: 1560-1570.