

· 论著 ·

PI3K/AKT/mTOR 信号通路在肝癌细胞自体吞噬中的作用研究

史颖弘 樊嘉 周俭 邱双健 殷晓鸣 汤钊猷

【摘要】 目的 探讨在肝癌细胞中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在氨基酸缺乏诱导的自体吞噬中的作用。**方法** 观察 HCCLM3、MHCC97L 及 SMMC-7721 肝癌细胞在氨基酸缺乏情况下及与 PI3K 抑制剂 3-MA、Wortmannin 及 LY294002, mTOR 抑制剂雷帕霉素协同作用下细胞活力变化。GFP-LC3 荧光法观察细胞内自噬体的形成。Western 印迹检测 LC3-II 蛋白的表达。**结果** 经无氨基酸培养液 EBSS 处理后 48 h, HCCLM3、MHCC97L 及 SMMC-7721 细胞存活率分别为 $(78.9 \pm 3.8)\%$ 、 $(57.2 \pm 13.1)\%$ 及 $(3.4 \pm 3.0)\%$ ($P < 0.01$)。与 HCCLM3、MHCC97L 相比, 细胞中的自噬体在 SMMC-7721 细胞中明显增多, 分别为 $(13.1 \pm 3.5)\%$ 、 $(20.0 \pm 1.1)\%$ 及 $(48.9 \pm 4.5)\%$ ($P < 0.01$)。Western 印迹显示在 EBSS 处理后早期即有 LC3-II 蛋白的明显表达。在 EBSS 基础上雷帕霉素 $20 \mu\text{mol/L}$ 处理 24 h, 3 种细胞株活力明显下降。3-MA、Wortmannin 及 LY294002 处理也加速 EBSS 诱导的细胞死亡。**结论** 高转移潜能肝癌细胞比较耐受自噬样细胞死亡。PI3K/AKT/mTOR 信号通路对自噬样细胞死亡可能起重要调节作用。

【关键词】 肝肿瘤; 自体吞噬; mTOR

【中图分类号】 R735.7; R730.3

【文献标识码】 A

Role of PI3K/AKT/mTOR pathway in autophagy of hepatocellular carcinoma cells SHI Ying-hong, FAN Jia, ZHOU Jian, QIU Shuang-jian, YIN Xiao-ming, TANG Zhao-you. Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective To evaluate the role of PI3K/AKT/mTOR pathway in autophagy of hepatocellular carcinoma cells induced by amino acid starvation. **Methods** The cell viability was measured after amino acid starvation, PI3K inhibitors (3-MA, Wortmannin, LY294002) and mTOR inhibitor Rapamycin treatments in hepatocellular carcinoma cell lines with different metastatic potentials. The autophagosome in hepatocellular carcinoma cells was observed by using GFP-LC3 fluorometric method and LC3-II protein expression by Western blotting. **Results** The cell viability after amino acid starvation for 48 hours was $(78.9 \pm 3.8)\%$ for HCCLM3, $(57.2 \pm 13.1)\%$ for MHCC97L and $(3.4 \pm 3.0)\%$ for SMMC-7721, with statistical difference ($P < 0.01$). The autophagosome in HCCLM3 was significantly lower than in MHCC97L and SMMC-772 ($P < 0.01$), which was $(13.1 \pm 3.5)\%$, $(20.0 \pm 1.1)\%$ and $(48.9 \pm 4.5)\%$ respectively. Western blotting showed that LC3-II protein was highly expressed in SMMC-7721 cell early after amino acid starvation. After 24 hours of treatment with rapamycin at $20 \mu\text{mol/L}$ on EBSS, 3 cell lines showed marked decrease of viability. The mTOR inhibitor Rapamycin and PI3K inhibitor 3-MA, Wortmannin and LY294002 could obviously accelerate amino acid starvation induced cell death in all 3 cell lines. **Conclusions** The hepatocellular carcinoma cells with high metastatic potential is more resistant to amino acid starvation induced autophagic cell death. The PI3K/AKT/mTOR pathway may regulate the autophagic cell death in Hepatocellular carcinoma cells.

【Key words】 Liver tumors; Autophagy; mTOR

自体吞噬以细胞内双层或多层膜样结构包裹胞质或细胞器形成囊泡样自噬体为形态学特征。自噬体通过与细胞内溶酶体融合而降解囊泡内容物。在正常细胞中, 自体吞噬的主要生理功能为降解蛋白质、RNA 及其他大分子, 是细胞非常重要的降解体

系, 维持自身的稳定^[1]。营养缺乏、缺氧、激素刺激及其他应激情况下可以诱导自体吞噬 (autophagy) 产生, 这最初是细胞的一种保护机制, 但过度的刺激, 自体吞噬的持续存在也将导致细胞死亡。自体吞噬样细胞死亡 (autophagic cell death) 是非 caspases 依赖的另一类重要的程序化细胞死亡方式。自体吞噬在肿瘤发生、发展中的作用尚未明确, 总体认为多数肿瘤细胞有不同程度自体吞噬的缺陷, 诱导细

基金项目: 本课题受上海市自然科学基金资助 (05ZR14027)

作者单位: 200032 上海, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所

胞自噬样细胞死亡是新的抗肿瘤治疗策略。磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3Ks) 及下游的激酶 AKT、mTOR (mammalian target of Rapamycin) 信号通路不但参与肿瘤细胞的迁移、黏附、细胞基质的降解,也是细胞凋亡、自体吞噬的重要调节分子。本实验将研究肝癌细胞对自噬应激的反应,PI3K/AKT/mTOR 信号通路的调节对自噬样细胞死亡的影响,阐明对此信号通路的干预以及肿瘤转移与自噬之间的联系在肝癌治疗及预防转移中的潜在意义。

1 材料与方法

1.1 细胞株

转移能力逐级递增的人高转移潜能肝癌细胞株 MHCC97L、HCCLM3 由本研究所构建,低转移人肝癌细胞株 SMMC-7721 由上海第二军医大学构建。所有细胞均生长在 DMEM 培养基中,其中加入 100 u/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、10% 胎牛血清,在 5% CO₂、37 °C 温箱中培养。

1.2 试剂

LC3-GFP 质粒由 Noboru Mizushima (National Institute for Basic Biology, Japan) 友情提供^[2]。抗 LC3 兔血清由 Tamotsu Yoshimori (National Institute of Genetics, Japan) 友情提供^[3]。无血清无氨基酸培养液 EBSS (Earle's Balanced Salt Solutions) 购自 Hyclone 公司。PI3K 抑制物 3-MA、Wortmannin 购自 Sigma 公司。LY294002 购于 Cayman Chemical 公司。雷帕霉素购自 LKT Laboratory 公司。碘化丙啶 (PI) 购自 Molecular Probe。

1.3 细胞活力检测

碘化丙啶染色法。细胞培养液中加入 PI,终浓度为 5 μ g/ml,放置约 5 min,在荧光显微镜 (Nikon Eclipse TE 200) 下计数,红色荧光细胞计数为死细胞,阴性细胞为活细胞。

1.4 自噬检测

在细胞自体吞噬反应中有自噬体的形成,LC3 (ATG8) 从胞质转移到自噬体膜上。用 GFP-LC3 质粒转染细胞后,正常细胞 GFP 绿色荧光在细胞内成弥散分布,在自噬体形成时,将形成点状或环状荧光,这类细胞定义为 GFP-LC3 阳性细胞。按常规方法转染细胞,经自体吞噬诱导剂处理后,在荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光,数码相机记录图像,SPOT 软件 (4.0.2 版本, SPOT, Diagnostics Instruments, Inc) 分析计数 GFP-LC3 阳性细胞与总的 GFP 阳性细胞比例。

1.5 Western 印迹

收集样本,定量蛋白。通常 30 μ g 蛋白加入缓冲液,沸水煮 5 ~ 10 min,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,125 V 电泳约 1.5 h,将凝胶在 transfer buffer 中平衡 5 ~ 15 min,25 V 2 h 或 7 V 过夜湿转至聚二氟乙烯膜。室温下 5% 的脱脂奶封闭 1 h,4 °C 一抗振荡孵育过夜,在 TBST 中洗膜。室温下在二抗中孵育 1 h。用 ECL 法显色,暗室中对 X 线胶片曝光,洗片机洗片。

1.6 统计学分析

计量资料组间差异用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高转移潜能肝癌细胞株耐受氨基酸缺乏诱导的细胞死亡

将细胞培养液更换成无氨基酸的平衡盐溶液 EBSS,观察在氨基酸缺乏条件下的细胞反应。SMMC-7721 细胞在 EBSS 处理后,细胞活力及细胞数目呈快速下降趋势,大量细胞死亡,至 48 h 后只有极少量细胞存活。而 HCCLM3 及 MHCC97L 细胞则比较耐受,细胞活力及数目呈缓慢下降,至 48 h 时 HCCLM3 有 (78.9 $\pm$ 3.8)% 的细胞仍存活, MHCC97L 有 (57.2 $\pm$ 13.1)% 的细胞存活,而 SMMC-7721 细胞中只有 (3.4 $\pm$ 3.0)%,差异有统计学意义 ($P \leq 0.01$)。见图 1。

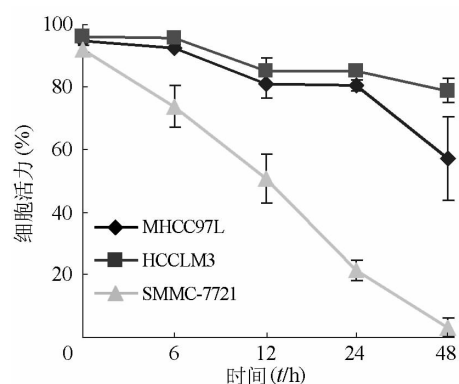
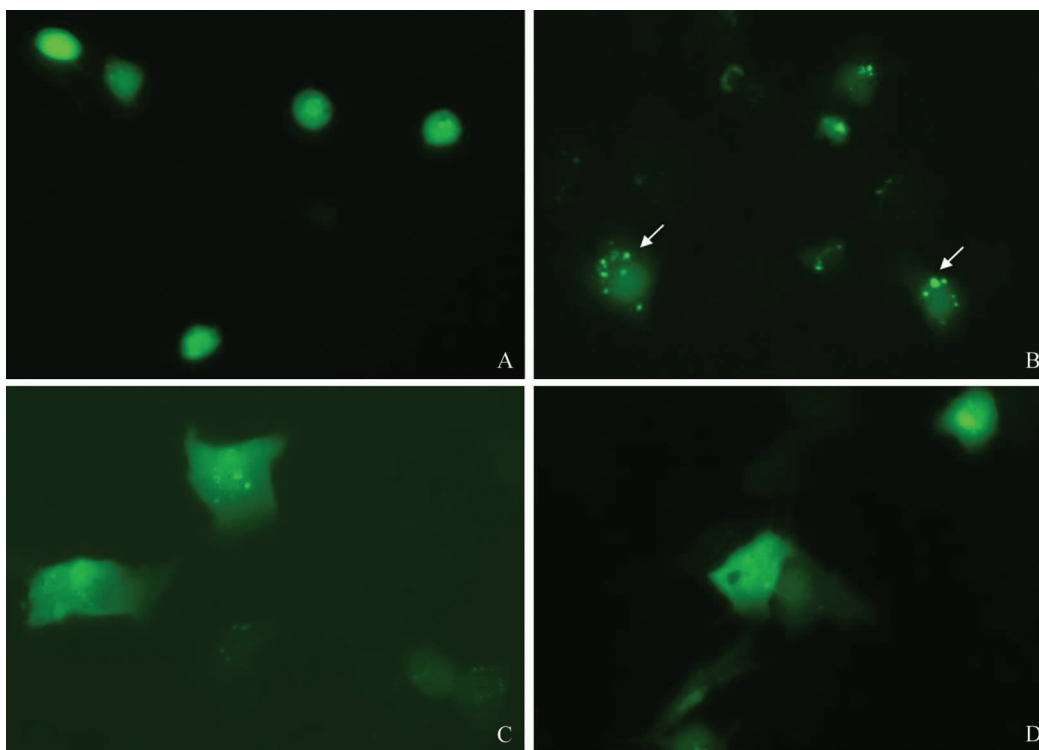


图 1 高转移潜能肝癌细胞株耐受氨基酸缺乏诱导的细胞死亡

2.2 氨基酸缺乏诱导的细胞死亡与细胞自体吞噬相关

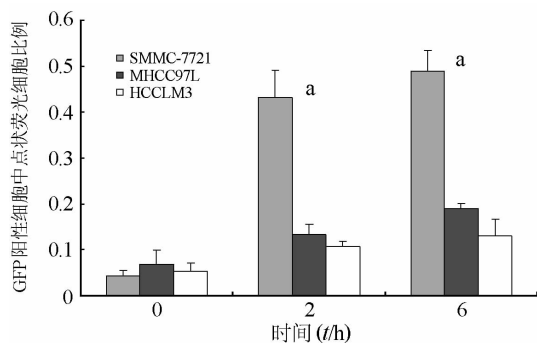
GFP-LC3 质粒转染 3 种细胞株后 24 h,再使用 EBSS 处理细胞,SMMC-7721 细胞中 6 h 后即有较多的点状 GFP 荧光 (标志自噬体形成) 产生,在 HCCLM3 及 MHCC97L 细胞中则较少 (图 2)。经计数



A: SMMC-7721 细胞 EBSS 处理后 0 h; B: SMMC-7721 细胞 EBSS 处理后 6 h; C: HCCLM3 细胞 EBSS 处理后 0 h; D: HCCLM3 细胞 EBSS 处理后 6 h

图 2 氨基酸缺乏后肝癌细胞株中 GFP-LC3 点状荧光分布

GFP-LC3 点状阳性细胞占有 GFP 阳性细胞的比例, 发现 EBSS 处理后 6 h SMMC-7721 中点状 GFP-LC3 阳性细胞明显增多, HCCLM3 细胞中则很少 (图 3), 分别为 $(48.9 \pm 4.5)\%$ 、 $(20.0 \pm 1.1)\%$ 及 $(13.1 \pm 3.5)\%$, 3 种细胞株间差异有统计学意义 ($P \leq 0.01$)。



a: $P < 0.01$, SMMC-7721、MHCC97L、HCCLM3 3 种细胞间比较

图 3 氨基酸缺乏后 GFP-LC3 阳性细胞计数

2.3 氨基酸缺乏情况下 LC3 蛋白的表达

Western 印迹显示在 SMMC-7721 中 EBSS 处理后 6 h LC3-II 蛋白表达 (反应自体吞噬水平, 16 000) 很高, 并随时间有下降趋势 (图 4)。在 HCCLM3 及 MHCC97L 细胞中则表达较晚, 尤其是 HCCLM3 细胞 24 h 后才有明显表达。提示自噬反应在 SMMC-7721 细胞中反应较早且较剧烈。

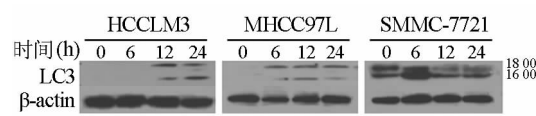
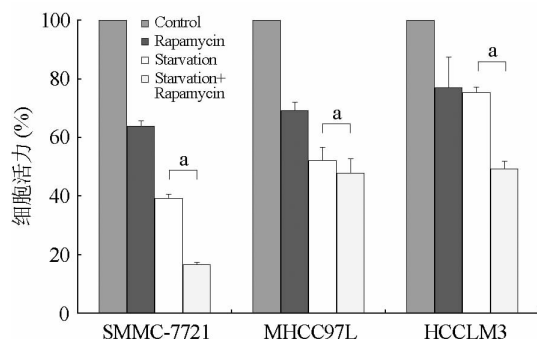


图 4 氨基酸缺乏情况下 LC3 蛋白的表达

2.4 mTOR 抑制剂雷帕霉素及 PI3K 抑制剂促进氨基酸缺乏诱导的细胞死亡

已知雷帕霉素可以通过对 mTOR 活性的抑制来诱导细胞自体吞噬。EBSS 加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素后 24 h, 相对于单纯氨基酸缺乏, 加入雷帕霉素后大量细胞死亡, SMMC-7721 及 HCCLM3 细胞中均很明显 (图 5)。与 EBSS 或 20 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素单独处理有明显区别 ($P \leq 0.05$)。提示在氨基酸缺乏情况下, 进一步诱导自体吞噬可以促进细胞死亡。有研究表明 PI3K 通路调控细胞自体吞噬过程, 阻断 PI3K 的活性可以抑制自体吞噬的发生。经氨基酸缺乏处理后, 加入 PI3K 抑制剂 3-MA (20 $\mu\text{mol/L}$)、LY294002 (10 nmol/L)、Wortamanin (50 $\mu\text{mol/L}$) 并未观察到对细胞的保护, 相反促进细胞死亡。Wortomanin 效果最为明显, 3-MA 稍差, 24 h 后 SMMC-7721 细胞中 EBSS 组死亡率为 40%, 而 3-MA、LY294002、Wortamanin 组细胞死亡率分别为 76%、97%、98%, 差异有统计学意义 ($P \leq 0.01$)。HCC-

LM3 细胞中 EBSS 组死亡率为 7%, 3-MA、LY294002、Wortmannin 组细胞死亡率分别为 21%、16%、20%, 差异有统计学意义 ($P \leq 0.01$)。3-MA、LY294002、Wortmannin 本身对细胞活性并没有明显影响 (图 6)。



a: $P < 0.05$, Starvation 与 Starvation + Rapamycin 比较

图 5 mTOR 抑制剂雷帕霉素促进肝癌细胞自噬样细胞死亡

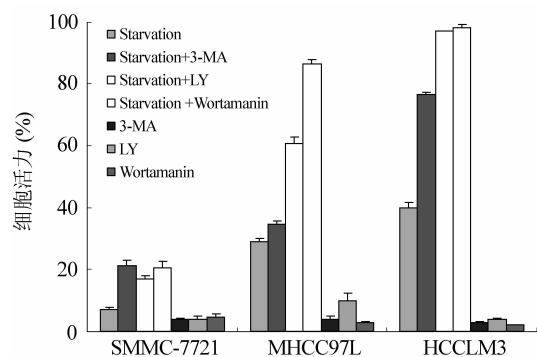


图 6 PI3K 抑制剂促进氨基酸缺乏诱导的细胞死亡

3 讨论

自体吞噬是一种进化保守的蛋白质及细胞器降解机制,细胞中有膜样结构包裹胞质结构形成囊泡,进而与溶酶体融合而降解。所以自体吞噬是正常的生理过程,以维持细胞内物质的转换及自身的稳定。最近对自体吞噬的研究提示这种蛋白降解过程也参与细胞死亡调节,称自噬性细胞死亡^[4]。大量研究证实细胞在营养缺乏或氨基酸缺乏条件下诱导细胞自体吞噬,是细胞的保护机制^[5]。不同转移潜能的 3 种肝癌细胞株在氨基酸缺乏条件下,有 GFP-LC3 阳性细胞出现、LC3-II 的表达增高,而 caspases 的活性并不是很高(资料未显示),均提示有自体吞噬反应的存在。但在转移能力不同的肝癌细胞株中有明显差异,在转移很低的 SMMC-7721 细胞中,自体吞噬发生很早且较剧烈,在高转移潜能的 HCCLM3 细胞中,自体吞噬发生较晚、较弱。提示相对于低转移潜能肝癌细胞来说,高转移潜能肝癌可能有一定程度的自体吞噬的缺陷。

自体吞噬在肿瘤细胞中的作用一直有争议,究

竟是细胞死亡或生存机制尚无定论。比较一致的观点:在不利的生存环境下,自体吞噬最初是一种细胞的应激机制,以维持内环境的稳定,提高生存率。但这种反应超过了某种界限,细胞即死亡。所以如果自体吞噬是细胞在不利生存条件下的保护反应,那么自体吞噬样细胞死亡可以认为是自体吞噬无法终止的后果。最近有研究表明自体吞噬相关基因 Beclin1 (ATG6) 参与自噬体的形成,在多种恶性肿瘤中表达很低且突变率高,Beclin1 缺失的老鼠中自体吞噬囊泡的形成有缺陷而且恶性肿瘤的发生率明显增高。因此认为 Beclin1 是一种新的肿瘤抑制基因^[6]。此外,诱导肿瘤细胞发生自体吞噬样死亡成为抗肿瘤的新方向,三氧化二砷、替莫唑胺及白藜芦醇等都可以诱导肿瘤细胞发生自体吞噬而死亡^[7]。在肿瘤转移过程中,自体吞噬的作用及机制尚不清楚。不利环境下的各种刺激诱导凋亡,肿瘤细胞尤其是转移潜能细胞将耐受凋亡而形成远处转移。但持续的缺氧、低营养等也可能诱导细胞自体吞噬而死亡。观察氨基酸缺乏后细胞的死亡,发现 HCCLM3 细胞明显耐受, SMMC-7721 较为敏感,而且在 HCCLM3 及 MHCC97L 细胞经氨基酸缺乏处理后 96 h,存活的细胞仍能恢复细胞增殖能力。提示高转移潜能肝癌细胞株可能较为耐受自噬性细胞死亡。

使用 mTOR 的抑制剂雷帕霉素诱导自体吞噬产生,在氨基酸缺乏情况下,3 种细胞株中细胞死亡均明显加快,但在 SMMC-7721 细胞中最明显, HCCLM3 仍相对较弱^[8]。同样说明在明显诱导自体吞噬情况下, HCCLM3 细胞可能拮抗自噬样细胞死亡而体现生存优势。已知 PI3K 参与对自体吞噬的调节, PI3K 抑制物能够抑制自体吞噬的产生^[9]。但 3 种肝癌细胞株中,在氨基酸缺乏情况下,使用 PI3K 抑制物 3-MA、LY294002、Wortmannin 抑制自体吞噬并没有保护氨基酸缺乏诱导的细胞死亡,相反加剧了细胞死亡,在其他细胞的研究中也有类似发现^[10]。可能是因为在氨基酸缺乏这样的特殊情况下,自体吞噬作为细胞最初的防御反应,抑制自体吞噬削弱了细胞保护机制而加速细胞死亡。但同样过度的自体吞噬或刺激持续存在时,自体吞噬代偿最终转换为细胞死亡。因此,与细胞凋亡类似,自噬样细胞死亡可能与肿瘤转移潜能相关。了解自体吞噬样细胞死亡在肿瘤及肿瘤转移中的作用将有很重要的意义。

从本文的研究可以看出, PI3K/AKT/mTOR 信号通路在肝癌细胞在氨基酸缺乏情况下的自噬反应

有明显的调节作用,雷帕霉素与氨基酸缺乏协同作用时,无论肝癌细胞的转移能力如何,都有很好的肿瘤抑制作用。提示我们针对 PI3K 和其下游分子所转导的抗细胞死亡信号是很有希望的药物研究靶点。其中多种激酶的小分子抑制物如 3-MA、LY294002、Wortmannin 作用明显,但因对细胞的毒性作用目前还都限于体外研究。雷帕霉素通过对 mTOR 激酶的抑制作用而调节细胞死亡通路已引起大家的研究兴趣,雷帕霉素已在体内外实验中表现出良好的抗肿瘤效能。另一种 mTOR 抑制剂 RAD001 通过对自体吞噬的诱导来增强抗肿瘤效能已被证实^[11]。

总之,肝癌转移的过程中,肿瘤细胞将遭遇多种不利生存的因素。其中营养缺乏、缺氧等因素可能诱导细胞自噬反应。对自噬样细胞死亡的敏感性可能会影响肿瘤转移灶的形成。对 PI3K/AKT/mTOR 通路在自体吞噬中的调节作用的理解将为开发新的小分子药物提供有效的干预靶点。

参 考 文 献

- [1] Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(2): 453-458.
- [2] Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, *et al*. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on

form-II formation. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 13): 2805-2812.

- [3] Kuma A, Hatano M, Matsui M, *et al*. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 2004, 432(7020): 1032-1036.
- [4] Edinger A L, Thompson C B. Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell*, 2003, 4(6): 422-424.
- [5] Droge W. Autophagy and aging—importance of amino acid levels. *Mech Ageing Dev*, 2004, 125(3): 161-168.
- [6] Yue Z, Jin S, Yang C, *et al*. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(25): 15077-15082.
- [7] Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, *et al*. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(9): 726-734.
- [8] Castedo M, Ferri KF, Kroemer G. Mammalian target of Rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ*, 2002, 9(2): 99-100.
- [9] Blommaert E F, Krause U, Schellens J P, *et al*. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 1997, 243(1/2): 240-246.
- [10] Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, *et al*. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(12): 1221-1228.
- [11] Lane H A, Leibold D. Future directions in the treatment of hormone-sensitive advanced breast cancer: the RAD001 (Everolimus)-letrozole clinical program. *Semin Oncol*, 2006, 33(2 Suppl 7): S18-25.

(收稿日期: 2006-11-03)

(本文编辑: 张玉琳)

(上接 38 页)

3.2 避免右半结肠癌误诊的措施探讨

首先重视病史,诊断前多做鉴别。诊断为功能性疾病前一定要排除器质性疾病。对于结肠癌高危人群,腹腔内器官良性疾病在给予相应治疗后无好转或病情经常反复,必须坚持尽早肠镜检查排除恶性疾病。这样绝大部分误诊病例可得到早期发现和治疗。黄家骊外科明确 30 岁以上患者有以下症状时要考虑结肠癌的可能:(1)近期出现持续腹部不适、隐痛、胀气等,经一般治疗症状无好转;(2)排便习惯由正常变为腹泻或便秘、腹泻和便秘交替;(3)粪便带血、黏液或脓液而无痢疾或其他肠道炎症病史;(4)原因不明的贫血、乏力或体重减轻;(5)结肠部位有可疑肿块。

其次手术中遗漏结肠癌的因素为:阑尾炎麦氏切口影响手术探查;手术者经验不足。目前急性阑尾炎手术者多是低年资医师。临床上往往多是急性阑尾炎手术遗漏右半结肠癌。笔者经历回盲部癌、升结肠癌、结肠肝曲癌各 1 例患者,术中阑尾均为慢性炎症表现,回盲部癌合并回盲部肿块,升结肠癌、结肠肝曲癌回盲部明显增厚伴扩张,进一步探查明确诊断而改变手术方案。胆囊切除近年基本采用腹腔镜手术,术中不常规探查是遗漏右半结肠癌的主要原因。笔者报道中 2 例患者 6 个月前在外院行腹腔镜胆囊切除术后又在本院接受右半结肠癌根治手术。

综合文献及笔者体会:临床上重视病史采集、鉴别诊断、

结肠癌高危人群结肠镜检查;急诊阑尾手术时,仔细探索阑尾炎症情况;回盲部肿块或异常扩张警惕右半结肠癌的可能;其他如胆囊等腹部手术必须规范探查,可以减少右半结肠的误诊。

参 考 文 献

- [1] 张雪梅,高建军,王朝晖,等. 结肠癌误诊为急性阑尾炎的临床分析. *中华胃肠外科杂志*, 2005, 8(1): 66.
- [2] 李五生,唐红,周小娜,等. 161 例右半结肠癌误诊原因分析. *泸州医学院学报*, 2004, 27(4): 340-341.
- [3] 徐伟栋,叶锋,腾理送. 右半结肠癌 65 例误诊原因分析. *浙江医学*, 2004, 26(5): 374-375.
- [4] 杨勇. 右半结肠癌误诊 19 例原因分析. *腹部外科*, 2004, 17(6): 382.
- [5] 于滨,崔宏伟. 升结肠癌漏诊 74 例原因分析. *临床误诊误治*, 2004, 17(8): 563.
- [6] 刘彦峰. 右半结肠癌误诊 36 例临床分析. *医师进修杂志*, 2004, 27(7): 61-62.
- [7] 刘洪俊,李迅庚. 急性阑尾炎并存结肠癌漏诊 22 例分析. *诊断学理论与实践*, 2004, 3(1): 41-42.
- [8] 谢经武,郑秀珍. 急性阑尾炎与结肠癌并存漏诊结肠癌分析. *临床误诊误治*, 2005, 18(6): 416.
- [9] 高卫东,何国杰,姚礼庆. 右半结肠癌延误诊断的原因分析. *中国临床医学*, 2004, 11(6): 1035-1036.
- [10] 梁军荣. 结肠癌误漏诊 19 例分析. *中国误诊学杂志*, 2004, 4(11): 1772.

(收稿日期: 2006-10-23)

(本文编辑: 陈敏)