

张娜,刘学芳,冯妍妍,等. 肺转移灶源性 Lewis 肺癌在 C57BL/6 小鼠体内生长及转移特性的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 12-17.

Zhang N, Liu XF, Feng YY, et al. Study on the growth and metastasis characteristics of Lewis lung cancer derived from lung metastases in C57BL/6 mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 12-17.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.002

## 肺转移灶源性 Lewis 肺癌在 C57BL/6 小鼠体内生长及转移特性的研究

张娜<sup>1</sup>,刘学芳<sup>2</sup>,冯妍妍<sup>3</sup>,郭凤悦<sup>3</sup>,冯素香<sup>2\*</sup>

(1.河南中医药大学医学院,郑州 450046;2.河南中医药大学中医药科学院,郑州 450046;  
3.河南中医药大学药学院,郑州 450046)

**【摘要】** 目的 研究肺转移灶源性 Lewis 肺癌在 C57BL/6 小鼠体内成瘤及转移情况。方法 取发生肺转移的 Lewis 肺癌荷瘤小鼠,解剖并分离肺转移灶制成细胞悬液,右前肢腋窝皮下接种于 C57BL/6 小鼠体内,制备肺转移灶源性 Lewis 肺癌小鼠模型,记为肺癌组。同时设皮下移植瘤传代小鼠,记为皮下组。定期测量各组小鼠肿瘤直径,计算肿瘤体积;绘制生存曲线;解剖观察肺和肝的病变;HE 染色检测肺和肝的病理变化;透射电镜观察肿瘤细胞的超微结构。结果 肺癌组小鼠肿瘤体积小于皮下移植瘤组 ( $P>0.05$ );观察期内肺癌组小鼠存活率较皮下组高;解剖可见肺癌组肺转移率为 37.5%,肝转移率为 25.0%,皮下组肺转移率为 20.0%,无肝转移;HE 染色显示肺癌组肺和肝转移灶体积大,染色深,外观近似圆形,与周围组织分界明显,皮下组肺转移灶体积小,无典型肝转移;透射电镜下可见转移灶内肿瘤细胞出现典型的奇异型核和病理性核分裂象。结论 肺癌源性小鼠较皮下移植瘤小鼠肿瘤生长缓慢,在相同观察期内存活率更高,在小鼠体内表现出更强的远处转移特性。

**【关键词】** Lewis 肺癌;肺转移灶;皮下接种;形态学观察

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0012-06

### Study on the growth and metastasis characteristics of Lewis lung cancer derived from lung metastases in C57BL/6 mice

ZHANG Na<sup>1</sup>, LIU Xuefang<sup>2</sup>, FENG Yanyan<sup>3</sup>, GUO Fengyue<sup>3</sup>, FENG Suxiang<sup>2\*</sup>

(1. College of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Academy of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046.

3. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

**【Abstract】** **Objective** To study the tumorigenesis and metastasis of Lewis lung cancer derived from lung metastases in C57BL/6 mice. **Methods** Lewis lung cancer tumor-bearing mice with lung metastasis were dissected, and lung metastases were isolated to prepare a cell suspension, which was inoculated subcutaneously into the axilla of the right forelimbs of C57BL/6 mice. A mouse model of Lewis lung cancer derived from lung metastases was established and designated as the lung tumor group. Subcutaneously transplanted tumor passaged mice were used as the subcutaneous group. The tumor diameter of mice was measured periodically, the tumor volume was calculated, and a survival curve was

[基金项目] 国家自然科学基金(82003986)。

[作者简介] 张娜(1982—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤动物模型研究。E-mail: 616621312@qq.com

[通信作者] 冯素香(1971—),女,教授,博士生导师,研究方向:中药新药研究。E-mail: fengsx221@163.com

drawn. Anatomical observation was performed on lung and liver lesions, and HE staining was used to detect pathological changes in the lungs and liver. The ultrastructure of tumor cells was observed by transmission electron microscopy. **Results** The tumor volume of the lung tumor group was less than that of the subcutaneous group ( $P>0.05$ ). The survival rate of the lung tumor group was higher than that of the subcutaneous group during the observation period. Anatomic observation showed the lung and liver metastasis rates to be 37.5% and 25% in the lung tumor group and 20% and no liver metastasis in the subcutaneous group, respectively. In HE staining, lung and liver metastases in the lung tumor group were large, darkly stained, approximately round in appearance, and demarcation from surrounding tissues was obvious. Lung metastases in subcutaneous group were small, and no typical liver metastases were seen. Tumor cells in the metastases showed typical bizarre nuclei and pathological mitosis under transmission electron microscopy. **Conclusions** Compared with subcutaneous tumor mice, lung tumor mice showed slower tumor growth, a higher survival rate within the same observation period, and stronger distant metastatic properties.

**【Keywords】** Lewis lung cancer; lung metastases; subcutaneous transplant; morphologic observation

肺癌目前是中国发病率和死亡率最高的肿瘤性疾病<sup>[1]</sup>,随着中国人口老龄化加剧、污染环境暴露、吸烟等众多癌症危险因素的累加,肺癌发病率与死亡率呈现上升的趋势<sup>[2]</sup>,针对早中期肺癌患者,根治性手术切除是最佳治疗手段,但仍有约 30%~55% 的患者术后出现复发转移,而且发生在对侧肺、淋巴结、肝等器官的远处转移比例高于同侧胸壁、同侧胸膜或同侧肺等局部复发的比例<sup>[3]</sup>,因此研究肺癌远处转移具有重要意义。

Lewis 肺癌 C57BL/6 小鼠模型是肺癌研究的常用模型,以“小鼠 Lewis”和“肺癌”为主题词在中国知网检索,可搜索出 2590 余条文献,以“Lewis lung cancer”为检索词在 Pubmed 网站检索,可搜索出 571 余条文献,该模型广泛应用于肿瘤学<sup>[4]</sup>、免疫学<sup>[5]</sup>、药理学<sup>[6]</sup>、中药学<sup>[7]</sup>等领域。Lewis 细胞最早是从小鼠肺腺癌中分离得到的体外培养株,Lewis 细胞皮下接种 C57BL/6 小鼠体后仍具有高致瘤性<sup>[8]</sup>,随着生存周期的延长,也表现出肺转移性。但关于肺转移发生率,目前没有统一的标准,肺转移灶能否再次皮下成瘤,也无明确的定论。鉴于肺癌易发生远处转移的特点,故建立具有高转移性的 Lewis 肺癌小鼠模型具有重要的研究价值,本研究采集肺转移灶源性的 Lewis 肿瘤细胞皮下接种于 C57BL/6 小鼠,观察皮下成瘤和肺转移情况,结合解剖学和病理学方法对肺转移灶源性的 Lewis 肿瘤的远处转移情况进行评估,以期为肺癌抗转移研究提供更加理想的动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,雄性,5 周龄,体重 18~

19 g,30 只,购自河南省华兴实验动物养殖场[SCXK(豫)2019-0002],饲养于河南中医药大学动物实验中心[SYXK(豫)2020-0004]。饲养环境温度( $20\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度约 40%,昼夜各半循环照明,饲料、垫料、饮水均为无菌处理,动物实验方案符合 3R 原则,获得河南中医药大学实验动物伦理委员会的批准(DWLL202003222)。

#### 1.1.2 细胞

小鼠 Lewis 肺癌细胞株(Lewis lung cancer cell line, LLC)购自中国科学院生命科学研究院细胞库,细胞目录号:TCM 7。

### 1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(20120705)购自中国四季青公司;DMEM 培养液(AE29005267)购自美国 Hyclone 公司;0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液(20200906)购自中国 Solarbio 公司;4%多聚甲醛固定液(21342511)购自中国 Biosharp 公司;2.5%戊二醛固定液(20210911)购自中国 Solarbio 公司;其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

游标卡尺购自中国美奈特公司;CO<sub>2</sub> 培养箱购自美国 Thermo 公司;微量移液器购自德国 Eppendorf 公司;超净工作台购自中国苏州苏洁公司;分析天平购自瑞士 Mettler toledo 公司;石蜡包埋机、病理组织切片机、光学显微镜购自德国 Leica 公司;透射电子显微镜购自日本电子公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 首代荷瘤鼠 Lewis 皮下移植瘤模型制备

取体对数生长期的 Lewis 细胞,用 PBS 调整细胞浓度为每毫升  $1\times 10^7$  个,取 10 只 C57BL/6 小鼠,右前肢腋下沿右腋前线斜行刺入皮下,每只注射 0.1 mL 细胞悬液,制备首代 Lewis 皮下移植瘤荷瘤鼠。

### 1.3.2 肺转移灶源性 Lewis 肺癌小鼠模型制备

选取发生典型肺转移的荷瘤鼠,解剖分离双肺,生理盐水清洗至无血污,解剖镜下使用手术刀片精准分离肺转移灶,组织匀浆,生理盐水悬浮,400 目细胞网筛过滤,细胞计数,调整细胞浓度为每毫升  $1 \times 10^7$  个,右腋前线斜行刺入小鼠皮下,每只注射 0.1 mL,共 8 只,制备肺转移灶源性 Lewis 肺癌小鼠模型,简称为肺癌组。

### 1.3.3 皮下移植瘤 Lewis 肺癌小鼠模型制备

选取皮下移植瘤直径在 1.0~1.4 cm 左右的首代荷瘤鼠,解剖分离皮下移植瘤,生理盐水清洗至无血污,称重、剪碎、匀浆,按 1:3 的比例用生理盐水悬浮,400 目细胞网筛过滤,调整细胞浓度为每毫升  $1 \times 10^7$  个,小鼠接种方法同 1.3.2,共 10 只,制备皮下移植瘤 Lewis 肺癌小鼠模型,简称为皮下组。

### 1.3.4 皮下移植瘤体积计算

使用游标卡尺每周定期测量小鼠腋下肿瘤直径,包括长径(L)和短径(W),根据公式:瘤体积 =  $(L \times W^2 / 2)$ ,计算瘤体积。

### 1.3.5 生存曲线的绘制

记录各组小鼠发生死亡的时间点,观察周期至接种后 35 d,绘制生存曲线。

### 1.3.6 解剖学与病理学观察

将自然死亡的小鼠解剖观察肺和肝的病变,将生存期大于 35 d 的小鼠脱颈椎处死,快速分离双肺和肝,生理盐水冲洗血污,观察并记录双肺和肝转移灶的形成情况,后用 4% 多聚甲醛中固定,经梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片、HE 染色及封片等常规步骤处理,显微镜下观察肺和肝的病理学变化。同时取 2 只正常小鼠,作为空白组。

### 1.3.7 透射电镜标本处理及观察

肺癌组选取出现典型肺转移的小鼠,快速分离双肺,生理盐水冲洗血污,解剖镜下使用手术刀片精准分离肺转移灶,修成体积约为  $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  的组织块,快速置于 2.5% 戊二醛固定液中,固定时间 4 h 以上,经 1% 锇酸后固定,梯度乙醇脱水,渗透、环氧树脂 812 包埋等步骤处理后,进行超薄切片,使用饱和醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后,透射电镜观察拍照。

## 1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 20.0 软件和 GraphPad Prism 5 软件统计处理,计量数据用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间数值比较采用独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$

差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肿瘤体积比较

肺癌组和皮下组小鼠在接种后 7 d,接种部位均可触及体积较小的肿瘤包块,成瘤率 100%,接种后 14~21 d,两组皮下肿瘤生长迅速;28 d 时肺癌组肿瘤体积( $4.62 \pm 2.00$ )  $\text{cm}^3$ ,皮下组( $5.45 \pm 2.46$ )  $\text{cm}^3$ ,组间差异不显著( $P > 0.05$ )(图 1)。

### 2.2 生存周期比较

肺癌组和皮下组小鼠的生存曲线如图 2 所示,结果显示,截至接种后 35 d,肺癌组死亡 3 只,存活率 62.5%;皮下组死亡 7 只,存活率 30.0%。

### 2.3 肺转移形态学观察

解剖学观察显示,肺癌组小鼠出现 3 例肺转移,转移率 37.5%,小鼠肺表面可见多个直径约 2~4 mm 的圆形半透明转移灶,周围有出血,与周围组织界限清晰;皮下组出现 2 例肺转移,转移率 20.0%,皮下组肺转移灶小,呈点状;空白组小鼠肺结构纹理正常,呈现粉红色外观。病理学结果显示肺癌组小鼠肺内可见典型转移灶,转移灶体积大,外观近

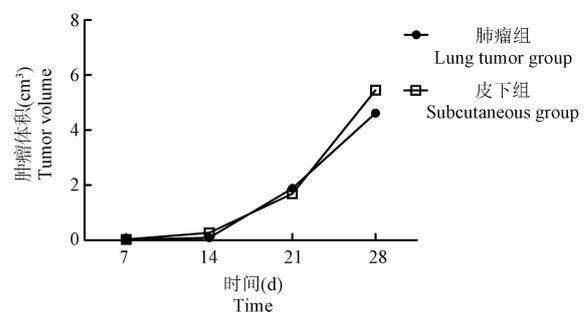


图 1 小鼠肿瘤生长曲线图

Figure 1 Tumor growth curve in mice

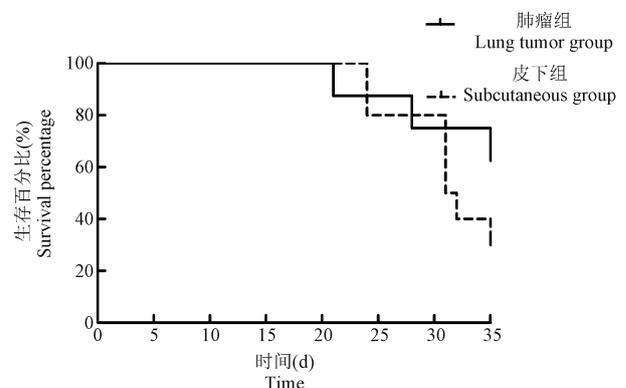


图 2 小鼠生存曲线图

Figure 2 Survival curve in mice

似圆形,边缘多有突起,向周围肺结构延伸,转移灶呈深蓝色着染,内部肿瘤细胞排列紧密;皮下组小鼠肺转移灶体积小,多分布于小气道周边;空白组小鼠肺组织结构清晰,形态正常(图 3)。

### 2.4 肝转移形态学观察

解剖学观察显示肺癌组小鼠出现 2 例肝转移,转移率 25.0%,小鼠肝表面出现多个直径约 2 mm 的圆形白色转移灶,与周围组织界限清晰;皮下组无肝转移,皮下组与空白组小鼠肝外观无明显差异。病理学结果显示肺癌组小鼠肝内可见转移灶,

转移灶外观近似圆形,染色深,与周围肝组织界限清楚;皮下组与空白组小鼠肝组织结构正常(图 4)。

### 2.5 肺转移灶超微结构观察

肺转移灶超微形态显示,其内部肿瘤细胞具有显著的异型性,细胞核体积大、核质比高,核多形性明显,可观察到奇异型核(图 5A),核内染色质呈粗颗粒状,分布不均匀,同时可观察到病理性核分裂象,肿瘤细胞核呈不对称分裂(图 5B),肿瘤细胞胞质内线粒体数量多,同时可见粗面内质网和糖原颗粒。

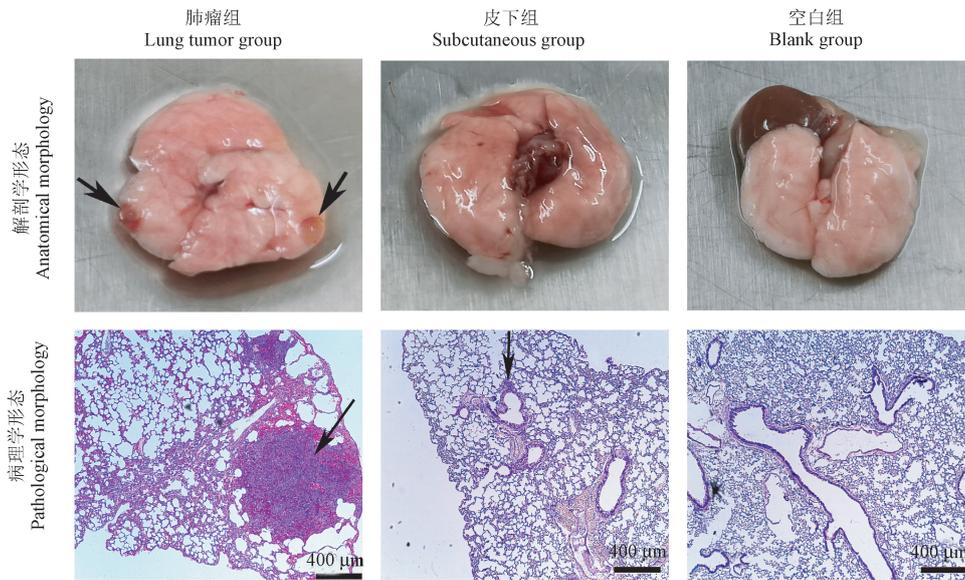


图 3 小鼠肺解剖学与病理学观察

Figure 3 Anatomical and pathological observation of lung in mice

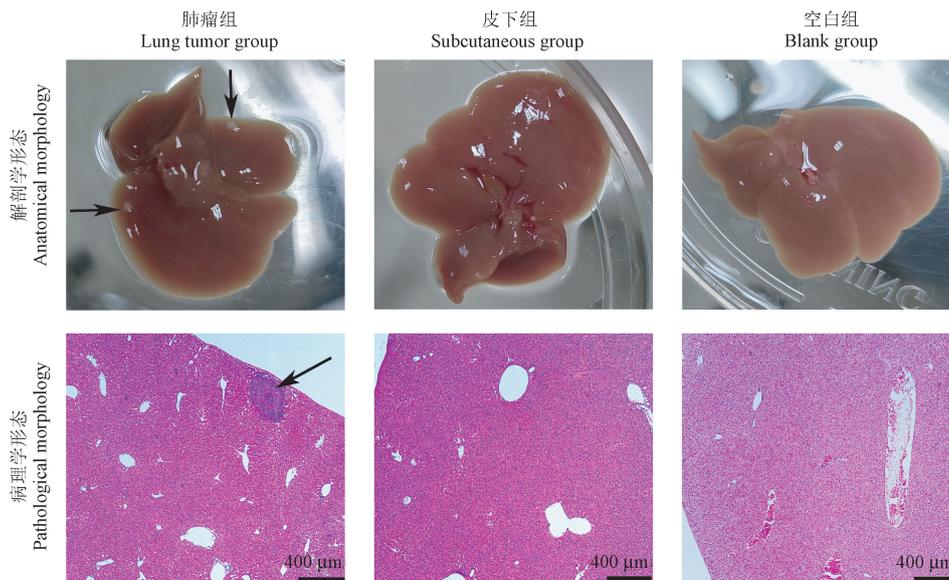
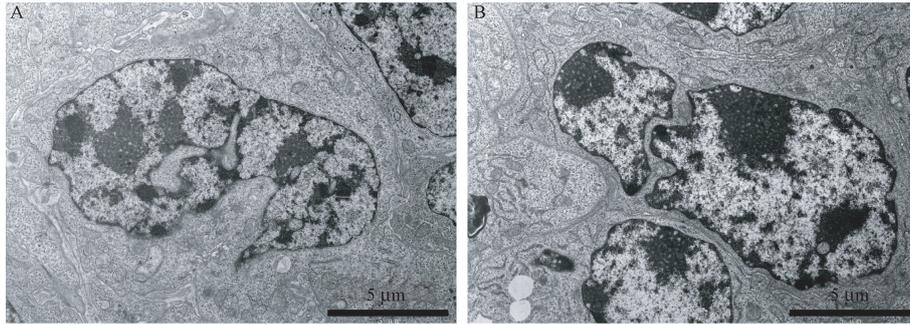


图 4 小鼠肝解剖学与病理学观察

Figure 4 Anatomical and pathological observation of liver in mice



注:A:肿瘤细胞内可见奇异性细胞核;B:肿瘤细胞核呈不对称分裂。

图5 小鼠肿瘤细胞透射电镜观察

Note. A, Bizarre nuclei can be seen in tumor cell. B, The nuclei of tumor cell divide asymmetrically.

Figure 5 Transmission electron microscope observation of cancer cells in mice

### 3 讨论

皮下注射、胸腔原位种植、左心室注射、颈内动脉注射、尾动脉注射都是建立肺癌小鼠模型的常用方法<sup>[9]</sup>。其中皮下注射法操作最为简单、方便观察成瘤情况,但皮下移植瘤生长速度较快,易在皮下形成纤维性包膜,虽然可自然发生肺转移,但转移率低,时间长。大部分荷瘤小鼠由于荷瘤体积过大,还未发生转移而死亡<sup>[10]</sup>。胸腔原位种植是将肿瘤细胞经胸腔注射的方法进行原位建模,该方法能够模拟肿瘤的形成和发展过程,但是小鼠易出现气胸、血胸及胸腔广泛种植等不良反应,平均4~6周出现恶液质,转移发生在胸腔,如肋骨、胸膜,无肝、脑、肾转移<sup>[11]</sup>。左心室注射和颈内动脉注射都可以很好的模拟肿瘤细胞经血道转移的过程,该模型用于制备肺癌脑转移模型,该小鼠模型3周开始体重下降,开始出现恶液质,病理检测显示脑转移灶明显,而无肺转移灶<sup>[12]</sup>。尾动脉注射是将肺癌细胞经尾动脉注射进入小鼠体内,注射后30 min即可在后肢骨髓中检测到荧光,7 d后肺癌骨转移病灶数目的增加,小鼠生存超过32 d,该方法多用于制备肺癌骨转移模型<sup>[13]</sup>。研究报道显示,皮下注射仍是Lewis肺癌小鼠模型最常用的接种方法<sup>[14]</sup>,肺转移率是一个重要的检测指标<sup>[4]</sup>。因此建立一种操作方便、成瘤率高、肺转移明显、给药窗口期长并且便于观察的Lewis肺癌小鼠模型是非常必要的。

姚明等<sup>[10]</sup>使用NOD/SCID小鼠,通过“肺转移灶-皮下移植-肺转移灶-皮下移植”的方式进行鼠间反复筛选,建立了一个人肺癌细胞株SPC-A-1皮下移植瘤高转移模型,随着筛选次数的增加,发生肺转移的动物数也随之增加,而且成瘤的时间相应

缩短。鉴于以上思路,本实验以C57BL/6小鼠Lewis肺癌模型为研究对象,采用肺转移灶再次皮下接种的方法验证皮下成瘤的可行性,并与传统的皮下移植瘤模型进行对比。鉴于NOD/SCID小鼠是T、B、NK细胞联合免疫功能缺陷小鼠<sup>[15]</sup>,肺转移灶皮下移植成功概率高,而C57BL/6小鼠是免疫功能正常的小鼠,肺转移灶肿瘤细胞能否再次皮下成瘤,目前并无相关报道。本实验结果显示肺癌组小鼠皮下移植瘤生长速度较常规传代的皮下组慢,但小鼠存活率较皮下组高;解剖学观察显示肺癌组肺转移率为37.5%,肝转移率为25%;皮下组小鼠肺转移率为20%,无肝转移。

肺转移灶肿瘤细胞是从皮下移植瘤原发位点脱落下来的肿瘤细胞,经血道或者淋巴道转移至肺,在此过程中形成外周血中循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)<sup>[16]</sup>,Fitzgerald等<sup>[17]</sup>使用了一种名为“弥散体内流式细胞术”(Diffusion *in vivo* flow cytometry, DiFC)的新技术来动态检测小鼠皮下注射Lewis肺癌模型中CTC的数量,结果显示只有其中3/11(27.27%)的小鼠表现出“高脱落”(high shedding),CTC数量随时间和皮下瘤体积增加而增加,但对于大多数小鼠8/11(72.73%)而言,CTC数量并未表现出随时间和肿瘤体积的增加而增加,并且CTC数量与肿瘤体积的相关性较差。这与本实验结果基本吻合,皮下组小鼠肺转移率为20%,而肺癌组的肺转移率(37.5%)略高于文献中的肺转移率(27.27%),肺转移灶内的肿瘤细胞再次接种到皮下表现出较强的转移性。Alino等<sup>[18]</sup>将Lewis肿瘤细胞注射到C57BL/6小鼠尾静脉或脾内,分别产生实验性肝和肺转移,本实验采用皮下注射的方法也可以形成肝转移,肺癌组的肝转移率

为 25%, 肺转移灶内的肿瘤细胞表现出向多器官转移的特性。

综上所述, 肺转移灶源性的肿瘤细胞再次皮下接种于 C57BL/6 小鼠腋下, 小鼠可 100% 成瘤, 在相同时间内, 肺癌组小鼠的存活率较皮下组高, 肺癌组表现出更高的向远器官的转移的特点, 综上所述, 使用“肺转移灶-皮下移植-肺转移灶-皮下移植”的方案在 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型是可行的, 后续继续传代观察, 以期获得一株可以实现皮下接种操作并且具有较高远处器官转移率的 Lewis 肺癌细胞瘤株。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 赫捷, 李霓, 陈万青, 等. 中国肺癌筛查与早诊早治指南 [J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(3): 243-268.
- [ 2 ] 陈宏达, 郑荣寿, 王乐, 等. 2019 年中国肿瘤流行病学研究进展 [J]. 中华疾病控制杂志, 2020, 24(4): 373-379.
- [ 3 ] 刘显平, 李晓, 杨帆. 非小细胞肺癌根治性切除术后复发转移模式研究进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2022, 25(1): 26-33.
- [ 4 ] Chumak AV, Fedosova NI, Cheremshenko NL, et al. Macrophage polarization in dynamics of Lewis lung carcinoma growth and metastasis [J]. *Exp Oncol*, 2021, 43(1): 15-20.
- [ 5 ] Orlandi P, Banchi M, Ali G, et al. Active metronomic vinorelbine schedules decrease plasma interleukin-2 levels in mice with Lewis lung carcinoma [J]. *J Chemother*, 2021, 33(3): 198-202.
- [ 6 ] Xiao X, Li Y, Wang Y, et al. Dihydroartemisinin inhibits Lewis lung carcinoma progression by inducing macrophages M1 polarization via AKT/mTOR pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 103: 108427.
- [ 7 ] Zhang Z, Wang J, Duan H, et al. Traditional chinese medicine xihuang wan inhibited Lewis lung carcinoma in a syngeneic model, equivalent to cytotoxic chemotherapy, by altering multiple signaling pathways [J]. *In Vivo*, 2021, 35(4): 2005-2014.
- [ 8 ] Bertram JS, Janik P. Establishment of a cloned line of Lewis lung carcinoma cells adapted to cell culture [J]. *Cancer Lett*, 1980, 11(1): 63-73.
- [ 9 ] 张娜, 田燕歌, 刘学芳, 等. 小鼠移植性肺癌转移模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 557-562.
- [ 10 ] 姚明, 闫明霞, 刘蕾, 等. 人肺癌高转移动物模型的筛选及其细胞系的建立 [J]. *肿瘤*, 2007, 27(11): 866-869.
- [ 11 ] 陈愉生, 涂洵崑, 俞梅娥, 等. 胸腔原位种植与经左心室注射建立肺癌脑转移动物模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(5): 490-494.
- [ 12 ] 陈愉生, 涂洵崑, 俞梅娥, 等. 裸鼠肺癌脑转移模型中血脑屏障超微结构的观察 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(5): 494-498.
- [ 13 ] Kuchimaru T, Kataoka N, Nakagawa K, et al. A reliable murine model of bone metastasis by injecting cancer cells through caudal arteries [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2981.
- [ 14 ] Gao Q, Jiang Y, Li X, et al. Intratumoral injection of anlotinib hydrogel combined with radiotherapy reduces hypoxia in Lewis lung carcinoma xenografts; assessment by micro fluorine-18-fluoromisonidazole positron emission tomography/computed tomography hypoxia imaging [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 628895.
- [ 15 ] Miao M, Masengere H, Yu G, et al. Reevaluation of NOD/SCID mice as NK cell-deficient models [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8851986.
- [ 16 ] Chong Y, Jung YC, Hwang E, et al. Circulating tumor cell detection in lung cancer animal model [J]. *J Chest Surg*, 2021, 54(6): 460-465.
- [ 17 ] Fitzgerald JE, Byrd BK, Patil RA, et al. Heterogeneity of circulating tumor cell dissemination and lung metastases in a subcutaneous Lewis lung carcinoma model [J]. *Biomed Opt Express*, 2020, 11(7): 3633-3647.
- [ 18 ] Alino SF, Rodeno E, Simon J, et al. Morpho-functional study of vascular fluorochrome delivery to lung and liver metastases of Lewis lung carcinoma (3LL) [J]. *Tumori*, 1991, 77(3): 206-211.

[ 收稿日期 ] 2022-04-08