

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.004

## 含蛋白转导域的 SARA/SBD 融合蛋白对腹膜透析大鼠 腹膜结构和功能的作用 \*

郑永 黄晨<sup>△</sup> 赵阿丽 王汉民 孙世仁 许国双

(第四军医大学西京医院肾脏内科 陕西 西安 710032)

**摘要 目的:**探讨含蛋白转导域的 SARA 融合蛋白(PTD-SAR/SBD)对腹膜透析大鼠腹膜纤维化的抑制作用。**方法:**每日腹腔注射 4.25 % 葡萄糖腹膜透析液(PDF)制备腹膜透析大鼠模型。28 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为正常对照组(n=8);腹膜透析模型组(n=10);PTD-SARA/SBD 蛋白干预组(n=10)。4 周后行腹膜平衡试验,检测超滤量、葡萄糖吸收率;留取壁层腹膜组织行 HE 染色;免疫组织化学方法检测大鼠壁层腹膜间皮细胞转分化指标 E-cadherin 和 Twist 的表达;Western blotting 测定 E-cadherin、twist,以及 Collagen I、TGF- $\beta$ 1、P-Smad3、t-Smad3 的表达。**结果:**①与正常对照组比较,模型组大鼠壁层腹膜增厚,糖转运率增加,超滤量降低(P<0.01);免疫组织化学与 western blotting 检测结果显示 E-cadherin 表达下调, Twist 表达上调;Collagen I、P-Smad3、TGF- $\beta$ 1 表达增加。②与模型组比较, PTD-SARA/SBD 蛋白干预组大鼠壁层腹膜糖转运率降低,超滤量增加(P<0.05);E-cadherin 表达上调, Twist 表达下调;Collagen I、TGF- $\beta$ 1、P-Smad3 表达减少,各组 t-Smad3 无明显变化。**结论:**PTD-SARA/SBD 融合蛋白通过抑制 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路部分逆转腹膜间皮细胞转分化从而改善腹膜结构和功能,为防治腹膜透析所致腹膜纤维化奠定基础。

**关键词:** SARA; 融合蛋白质类; 腹膜; 纤维化

**中图分类号:** Q95-3; R495.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)16-3013-05

## Effect of PTD-SARA/SBD Fusion Protein on Peritoneal Morphology and Function of Peritoneal Dialysis Rats\*

ZHENG Yong, HUANG Chen<sup>△</sup>, ZHAO A-li, WANG Han-min, SUN Shi-ren, XU Guo-shuang

(Department of Nephrology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the prevention role of PTD-SARA/SBD fusion protein on peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis in rats. **Methods:** 28 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: normal control group(n=8); peritoneal dialysis model group(n=10); PTD-SARA/SBD group(n=10). The animals were infused by intra-peritoneal injection and were killed at the end of 4 weeks. A 4 hour peritoneal equilibration test was performed after four-weeks peritoneal dialysis in each group. The dialysate samples were subjected to determination of 4h ultrafiltration volume (UF) or glucose transporion. The parietal peritoneum tissues of rats were harvested and stained with H-E for observation of the peritoneal structure. The expression of E-cadherin, Twist, TGF- $\beta$ 1, t-Smad3, P-Smad3, and Collagen I in parietal peritoneum was detected with immunohistochemistry or Western blotting assay. **Results:** Compared with the normal Control group, the UF were lower, and glucose transporion were higher in model group (P<0.01). The results of western blotting and Immunohistochemistry showed that the level of E-cadherin was down-regulated, and Twist expression was up regulation in parietal peritoneum tissues, and TGF- $\beta$ 1, P-Smad, Collagen I expression increased in the model group; Administration of PTD-SARA/SBD fusion protein improved the function and structure changes of the peritoneum, improved the level of E-cadherin and decreased the level of Twist. The expression of TGF- $\beta$ 1, P-Smad3, Collagen I in parietal peritoneum were decreased in PTD-SARA/SBD group. **Conclusion:** PTD-SARA/SBD fusion protein may reverse the epithelial mesenchymal transition by inhibiting TGF- $\beta$ /Smads signaling and improve the peritoneal morphology and function, which lays a foundation of further study on prevention and treatment of peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis.

**Key words:** SARA; Fusion proteins; Peritoneum; Fibrosis

**Chinese Library Classification:** Q95-3; R495.5 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)16-3013-05

\* 基金项目: 西京医院学科助推计划(XJZT09D06); 国家自然科学基金项目(81272621)

作者简介: 郑永(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 腹膜纤维化机制与防治,

Tel: 18792712460, E-mail: john840607@163.com

<sup>△</sup> 通讯作者: 黄晨, E-mail: huangchen@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2013-12-25 接受日期: 2014-01-21)

## 前言

腹膜透析是慢性肾功能衰竭患者的主要肾脏替代治疗方法之一,长期腹膜透析可以引起腹膜结构的改变,腹膜发生纤维化,导致腹膜功能衰竭、超滤失败而退出腹膜透析<sup>[1]</sup>。目前临床上仍缺乏较好的预防和治疗办法,研究长期腹膜透析腹膜纤维化的发生机制和防治方法是临床亟待解决的重要课题。

TGF- $\beta$ /Smads 信号通路在调节上皮-间质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程中起关键作用。研究证实,大鼠腹腔内给予腺病毒载体介导的 TGF- $\beta$ 1 基因的过表达,致上皮间质转分化相关基因,如 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 表达上调<sup>[2]</sup>。Smad 锚着蛋白(Smad anchor for receptor activation, SARA) 作为 TGF- $\beta$  信号传导通路下游必须的传导分子,可募集

Smad2/3 至 I 型 TGF- $\beta$ 1 受体发生磷酸化,Smad2/3 磷酸化后与 Smad4 结合转位入核,促进 TGF- $\beta$ 1 基因转录<sup>[3,4]</sup>。研究发现位于 SARA 羧基末端的 Smad 结合域(Smad-binding domain, SBD)可与 Smad2 的 MH2 作用域结合,阻止 Smad2/3/4 复合体形成,抑制 TGF- $\beta$ 1 表达<sup>[4,5]</sup>。

我们的前期研究发现,运用蛋白转导技术,使来源于人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)的反式激活蛋白转导域(protein transduction domain, PTD)与 SARA 羧基末端作用域结合,制备的可溶性 PTD-SARA/SBD 融合蛋白,可跨膜转导入人肾小管上皮细胞(HK2)以及腹膜间皮细胞(HPMCs)发挥作用<sup>[6,7]</sup>。本实验在此基础上,进一步验证了 PTD-SARA/SBD 融合蛋白在腹膜透析大鼠模型中抑制上皮间质转分化及改善腹膜功能的作用,为腹膜透析所致纤维化的防治提供理论和实验依据。

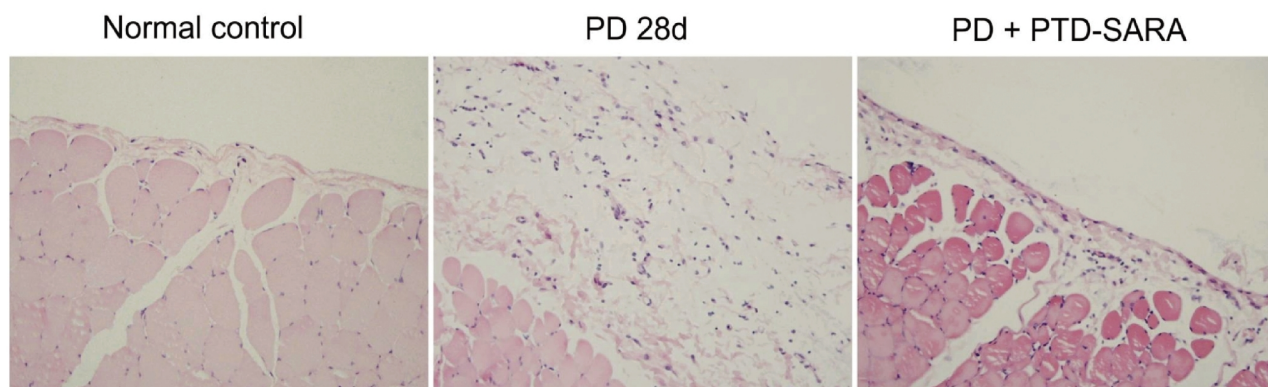


图1 壁层腹膜 HE 染色( $\times 200$ )

Fig. 1 Hematoxylin-eosin staining of parietal peritoneum original magnification ( $\times 200$ )

## 1 材料及方法

### 1.1 动物模型的建立

清洁级 Sprague-Dawley 雄性大鼠 28 只,体质量( $200 \pm 20$ ) g,由第四军医大学实验动物中心提供。随机分为 3 组,适应性喂养 1 周后,8 只大鼠做正常对照组。腹膜透析模型组(10 只):4.25%腹膜透析液(PDF)按 100 mL/kg 每日 1 次腹腔注射给药;PTD-SARA/SBD 蛋白干预组(10 只):PTD-SARA/SBD 蛋白溶于 4.25% PDF,浓度 5  $\mu$ g/mL,按 100 mL/kg 每日 1 次腹腔注射给药。各组维持透析 4 周。停止透析 48 h 后,每只大鼠腹腔注射 4.25% PDF 25 mL,4 h 后沿腹中线打开腹腔,计量腹腔内的液体量。透出液 1500 rpm 离心 5 min,取上清液 2 mL,自动生化分析仪检测葡萄糖浓度。避开注射位置留取壁层腹膜组织。超滤量计算:透出液体积 - 初始透析液体积;葡萄糖转运率计算:(初始腹透液葡萄糖浓度  $\times$  初始透析液体积) - (透出液葡萄糖浓度  $\times$  透出液体积)。

### 1.2 免疫组织化学

石蜡切片经二甲苯脱蜡,乙醇梯度水化,经枸橼酸盐缓冲液高温修复抗原,3%过氧化氢室温孵育 10 min, PBS 清洗,正常山羊血清封闭 30 min,吸去血清勿洗,分别加一抗(E-cadherin 1:100, twist 1:200),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。滴加二抗室温孵育 30 min, DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。每次染色均以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

### 1.3 Western blotting

称重各组分离的腹膜组织各 100 mg,匀浆器冰上研碎,置 EP 管,加入 500  $\mu$ L 裂解液冰上裂解 30 min,超声裂解 2 min,4 $^{\circ}$ C, 12000 r/min 离心 20 min,留上清,取 20  $\mu$ L 备蛋白定量。加 1/4 体积 5 $\times$  上样缓冲液,沸水中煮 10 min 变性。蛋白经 8% -12% 丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,室温恒流 30 mA 1 h,电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h;加一抗 E-cadherin (1:500)、twist (1:200)、TGF $\beta$ 1 (1:200)、Collagen I (1:500)、P-Smad3 (1:500)、Smad3 (1:1000),4 $^{\circ}$ C 摇床过夜;TBST 清洗 10 min  $\times$  3 次,HRP 标记的二抗室温孵育 1 h;TBST 清洗 5 min  $\times$  3 次,滴加 ECL 显色剂,成像系统显影。

### 1.4 药品和试剂

PTD-SARA/SBD 融合蛋白由第四军医大学西京医院肾脏内科实验室制备<sup>[8]</sup>。Twist 兔抗鼠多克隆抗体(santa cruz, USA); E-cadherin 兔抗鼠多克隆抗体 (bioworld, USA); P-Smad3 多克隆抗体 (abcam, HK); Smad3 多克隆抗体 (cell signaling, USA); TGF- $\beta$ 1、Collagen I 兔抗鼠多克隆抗体(北京博奥森有限公司), HRP 标记的山羊抗兔 IgG、免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);ECL Western blotting 化学发光试剂(thermo scientific, USA)。

### 1.5 统计学分析

实验数据应用 SPSS13.0 和 Graphpad Prism 5 软件分析和处理,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计

学意义。

## 2 结果

### 2.1 壁层腹膜 H-E 染色

正常对照组,壁层腹膜间皮细胞覆盖完整,基质薄,偶见成纤维细胞;模型组腹膜明显增厚,间皮细胞部分脱落,基质沉积明显,大量成纤维细胞浸润;PTD-SARA 蛋白干预组上述表现明显减轻(见图 1)。

### 2.2 免疫组化结果

正常对照组,E-cadherin 广泛表达于壁层腹膜间皮细胞,

Twist 仅微弱表达或几乎无表达;模型组 E-cadherin 表达明显减少, Twist 表达于胞核且明显增加;与模型组比较, PTD-SARA 蛋白干预组 E-cadherin 表达增加, Twist 表达减少(见图 2)。

### 2.3 腹膜功能改变

与对照组比较,模型组超滤量明显下降( $P < 0.01$ ),糖转运率增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,PTD-SARA 蛋白干预组超滤量增加( $P < 0.05$ ),糖转运率下降( $P < 0.05$ )(见图 3)。

### 2.4 E-cadherin、Twist 和 Collagen I 的检测结果

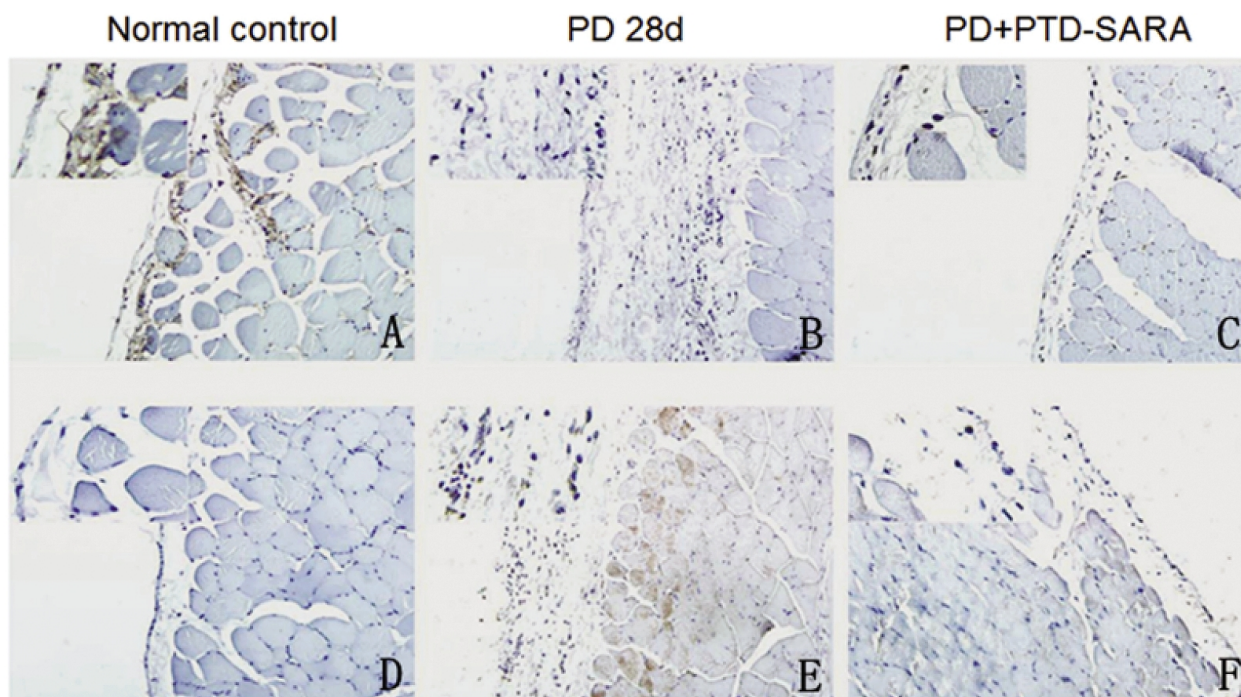


图 2 壁层腹膜 E-cadherin 和 Twist 免疫组化染色(大图:× 200;小图× 400)

A-C: E-cadherin 的表达 D-F: Twist 的表达

Fig. 2 Immunohistochemistry results of parietal peritoneum sections stained for E-cadherin and Twist.

A-C: Expression of E-cadherin D-F: Expression of Twist

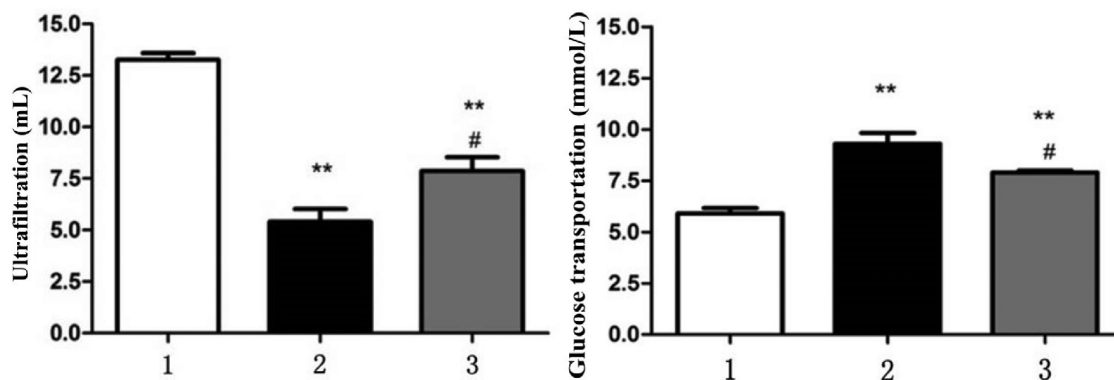


图 3 各组大鼠腹膜超滤量和葡萄糖转运率检测结果

1: 对照组; 2: 模型组; 3: PTD-SARA 干预组; 与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$

Fig. 3 The detection results of peritoneal ultrafiltration volume and glucose transportation of rats in different groups

1: control group; 2: peritoneal dialysis model group; 3: PTD-SARA/SBD group; compared with control group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with model group, #  $P < 0.05$

Western blotting 检测结果(见图 4),与正常对照组比较,模型组 E-cadherin 表达明显下降, Twist、Collagen I 表达明显增加;与模型组比较,PTD-SARA 蛋白干预组 E-cadherin 表达增加, Twist、Collagen I 表达下降。

## 2.5 TGF- $\beta$ 1、t-Smad3 和 p-Smad3 的检测结果

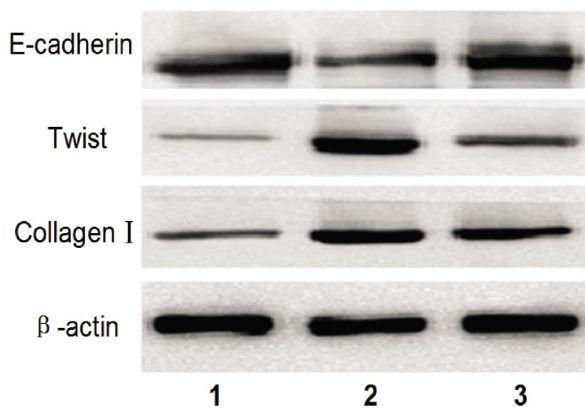


图 4 Western blotting 方法检测各组 E-cadherin、Twist 和 Collagen I 蛋白的表达

1: 对照组; 2: 模型组; 3: PTD-SARA 干预组

Fig. 4 Expression of E-cadherin, Twist and Collagen I protein in each group detected by Western blotting

1: normal control group; 2: peritoneal dialysis model group; 3: PTD-SARA/SBD group

Western blotting 结果(见图 5),与正常对照组比较,模型组 TGF- $\beta$ 1 和 P-Smad3 表达明显增加;与模型组比较,PTD-SARA 蛋白干预组 TGF- $\beta$ 1 和 P-Smad3 表达下降;各组间 t-Smad3 表达无统计学意义。

## 3 讨论

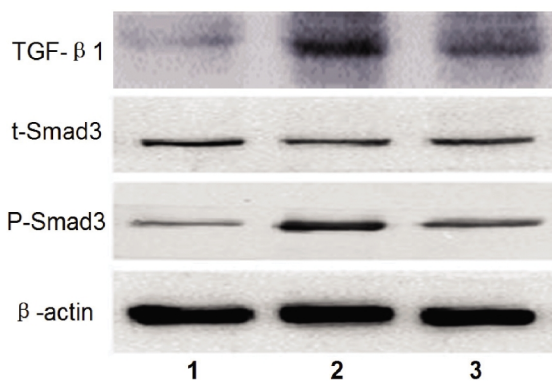


图 5 Western blotting 方法检测各组 TGF- $\beta$ 1、P-Smad3 和 t-Smad3 蛋白的表达

1: 对照组; 2: 模型组; 3: PTD-SARA 干预组

Fig. 5 Expression of TGF- $\beta$ 1, P-Smad3 and t-Smad3 protein detected by Western blotting

1: normal control group; 2: peritoneal dialysis model group; 3: PTD-SARA/SBD group

腹膜纤维化是腹膜透析最常见的一种慢性并发症,主要表现为腹膜间皮细胞脱落,细胞外基质过度沉积,成纤维细胞浸润等特点<sup>[9]</sup>。成纤维细胞在病理条件下对细胞外基质(ECM)过

度产生起主要作用。腹膜间皮细胞发生上皮-间质转分化被认为是成纤维细胞的重要来源,表现出 E-钙黏附蛋白(E-cadherin)进行性缺失,并获得了成纤维细胞样表型<sup>[10,11]</sup>。腹膜间皮细胞 EMT 是腹膜纤维化的起始和可逆环节,预防和逆转 EMT 成为阻止和延缓腹膜纤维化的靶点。

TGF- $\beta$ /Smads 信号通路在纤维化过程中起重要作用<sup>[5,12,13]</sup>。TGF- $\beta$  配体与其跨膜 I 型受体 (TGF $\beta$ RI) 和 II 型受体(TGF $\beta$ RII)结合后,激活 TGF $\beta$ RI,介导 Smad2 和 Smad3 磷酸化,磷酸化的 Smad2 或 Smad3 与 Smad4 结合后转入核启动相关基因转录<sup>[14]</sup>。SARA 是 Smad 锚着蛋白,C 末端第 665-750 氨基酸残基的 SBD 可介导 Smad2/3 至激活的 TGF- $\beta$ RI 而发生磷酸化<sup>[15]</sup>。使用 TGF- $\beta$ 1 刺激小鼠腹膜间皮细胞发现,磷酸化的 Smad2/3 表达水平在 10 min 表达即开始增多,30 min 达高峰,随后出现信号转导, $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达增多,E-cadherin 表达减少,提示 Smads 参与了 TGF- $\beta$ 1 诱导的 EMT 过程<sup>[2]</sup>。Smad3 亦可介导结缔组织生长因子(CTGF)的表达,抑制 E-cadherin 的表达,Smad2 介导基质金属蛋白酶 2(MMP2)的表达,二者共同诱导了  $\alpha$ -SMA 的表达,Smad3 和 Smad2 对 EMT 的发生起促进作用<sup>[16]</sup>。研究发现, Twist 是 EMT 过程中重要的标记物。Twist 的过表达可引起腹膜间皮细胞间粘附性减弱,促进 EMT 的发生<sup>[17]</sup>。76 例不同肾病患者肾活检结果发现, Twist 的活化与纤维化程度呈正相关<sup>[18]</sup>。

本研究发现,4.25% 腹膜透析液刺激后的模型组大鼠壁层腹膜,TGF- $\beta$ 1 与 P-Smad3 蛋白表达较对照组明显增加,提示 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路被激活。免疫组织化学和 Western blotting 结果显示,E-cadherin 表达下调, Twist 表达上调,腹膜间皮细胞发生上皮间质转分化。腹膜增厚明显, Collagen I 表达增加,细胞外基质过度沉积,这与其他报道相一致<sup>[19,20]</sup>。PTD-SARA/SBD 蛋白干预后,壁层腹膜结构和功能改善。与模型组比较,PTD-SARA/SBD 蛋白干预后,TGF- $\beta$ 1 与 P-Smad3 的表达受抑制。E-cadherin 表达上调, Twist 表达下调, Collagen I 表达减少,表明腹膜间皮细胞 EMT 发生部分逆转。体外合成的含有蛋白转导域的 PTD-SARA/SBD 竞争性抑制 SARA 对 Smad2/3 的募集和激活,阻止 Smad2/3/4 复合体形成,部分抑制了腹膜透析大鼠壁层腹膜纤维化的过程,其机制可能是通过抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 Smad3 磷酸化而发挥作用。

以 TGF- $\beta$ /Smads 信号转导的负性调节分子 SARA/SBD 为目的蛋白,运用基因工程方法成功构建、表达了可溶性 PTD-SARA/SBD 融合蛋白,验证了对腹膜透析模型大鼠腹膜纤维化的部分逆转作用,并探讨了其可能机制。为研发防治腹膜透析所致腹膜纤维化的药物奠定了基础,但临床应用价值有待进一步研究。

## 参考文献(References)

- [1] Cakir B, Kirbas I, Cevik B, et al. Complications of continuous ambulatory peritoneal dialysis: evaluation with CT [J]. Diagn Interv Radiol, 2008, 14(4): 212-220
- [2] Liu Q, Mao H, Nie J, et al. Transforming growth factor {beta}1 induces epithelial-mesenchymal transition by activating the JNK-Smad3 pathway in rat peritoneal mesothelial cells [J]. Perit Dial Int, 2008, 28(Suppl 3): S88-S95

- [3] Kuroishi S, Suda T, Fujisawa T, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta1 in mouse tracheal epithelial cells[J]. *Respirology*, 2009, 14(6): 828-837
- [4] Runyan C E, Hayashida T, Hubchak S, et al. Role of SARA (SMAD anchor for receptor activation) in maintenance of epithelial cell phenotype[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(37): 25181-25189
- [5] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 577-584
- [6] 李曼, 黄晨, 张伟, 等. 含蛋白转导域的 SARA/SBD 融合蛋白的原核表达、纯化及生物学活性鉴定 [J]. *生物技术通讯*, 2011, 22(2): 158-162
- Li Man, Huang Chen, Zhang Wei, et al. Prokaryotic Expression, Purification and Biological Activity of SARA/SBD Fusion Protein Containing Protein Transduction Domain[J]. *Letters in Biotechnology*, 2011, 22(2): 158-162
- [7] 加慧卫, 黄晨, 李晶, 等. 重组蛋白转导结构域-SARA 融合蛋白生物学功能的初步研究 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(6): 581-585
- Jia Hui-wei, Huang Chen, Li Jing, et al. Biological Function of Recombinant Protein Transduction Domain-SARA Fusion Protein[J]. *Chin J Biologicals* June, 2010, 23(6): 581-585
- [8] Huang C, Du R, Zhang P, et al. Expression, purification, and functional characterization of recombinant PTD-SARA [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43(2): 110-117
- [9] Wynn T A, Ramalingam T R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease[J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1028-1040
- [10] Lebleu V S, Taduri G, O'Connell J, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(8):1047-1053
- [11] Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(5): 403-413
- [12] Yeh Y C, Wei W C, Wang Y K, et al. Transforming growth factor-beta1 induces Smad3-dependent beta1 integrin gene expression in epithelial-to-mesenchymal transition during chronic tubulointerstitial fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(4): 1743-1754
- [13] Vincent T, Neve E P, Johnson J R, et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11 (8): 943-950
- [14] Tsukazaki T, Chiang T A, Davison A F, et al. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor [J]. *Cell*, 1998, 95(6): 779-791
- [15] Wu G, Chen Y G, Ozdamar B, et al. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation [J]. *Science*, 2000, 287(5450): 92-97
- [16] Phanish M K W N. The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of profibrotic TGF beta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells[J]. *Biochem J*, 2006, 393(Pt 2): 601-607
- [17] Li C, Ren Y, Jia X, et al. Twist overexpression promoted epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells under high glucose [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(11): 4119-4124
- [18] Sun S, Du R, Xia L, et al. Twist is a new prognostic marker for renal survival in patients with chronic kidney disease [J]. *Am J Nephrol*, 2012, 35(2): 141-151
- [19] Kihm L P, Muller-Krebs S, Klein J, et al. Benfotiamine protects against peritoneal and kidney damage in peritoneal dialysis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(5): 914-926
- [20] Aroeira L S, Lara-Pezzi E, Loureiro J, et al. Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrane[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(3): 582-592

## (上接第 3012 页)

- [18] 梁明辉, 王晓东, 夏力丁, 等. 兔后肢和肝脏接种 VX2 肿瘤方法的研究 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2011, (04): 323-326
- Liang Ming-hui, Wang Xiao-dong, Xia Li-ding, et al. Research of methods for inoculating VX2 tumors in rabbit and hindlimb and liver [J]. *Journal of Harbin Medical University*, 2011, (04): 323-326
- [19] 张贵祥, 孙诚, 魏梦琦, 等. 介绍兔 VX2 转移瘤动物模型 [J]. *实用放射学杂志*, 1998, 14(02): 59
- Zhang Gui-xiang, Sun Cheng, Wei Meng-qi, et al. Reproducible metastatic model by inoculation of the VX 2 carcinoma in rabbits [J]. *Journal of Practical Radiology*, 1998, 14(02): 59
- [20] 张贵祥, 魏梦琦, 韩月东, 等. 血源性脑及脑膜转移瘤动物模型的建立及其 MRI 研究 [J]. *中华放射学杂志*, 2000, 48(04): 11-13
- Zhang Gui-xiang, Wei Meng-qi, Han Yue-dong, et al. Establishment of Haematogenous Cerebral and Meningeal Metastasis in Rabbits and its MRI study [J]. *Chinese journal of radiology*, 2000, 48(04): 11-13
- [21] Zhang GX, Li KA, Zhao JL, et al. MRI monitoring of cerebral spinal fluid metastasis in rabbit model[J]. *Chinese Medical Journal*, 2008, 88 (47): 3369-3373
- [22] 张贵祥, 韩月东, 魏梦琦, 等. 血源性颅面转移瘤动物模型及磁共振观察 [J]. *中国医学影像技术*, 2000, 16(09): 725-727
- Zhang Gui-xiang, Han Yue-dong, Wei Meng-qi, et al. Establishment of hematogenous craniofacial metastasis and its MRI study [J]. *Chinese Journal of Medical Imaging Technology*, 2000, 16(09): 725-727
- [23] 姜露莹, 张贵祥, 杨亚汝, 等. 兔 VX2 肾癌模型的制作方法改进及超声观察 [J]. *中国医学影像技术*, 2006, 22(01): 45-47
- Jiang Lu-ying, Zhang Gui-xiang, Yang Ya-ru, et al. Improvement of building rabbit renal VX2 tumor models and ultrasonographic observation [J]. *Chinese Journal of Medical Imaging Technology*, 2006, 22(01): 45-47
- [24] 张峰. 兔门静脉癌栓形成的生物学行为和 TACE 治疗效果的影像学监测 [D]. 复旦大学, 2006
- Zhang Feng. Medical image monitoring of rabbit PVTT biological behavior and TACE treatment effect [D]. Fudan University, 2006