

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.018

· 技术方法 ·

## 人喉癌 5-氟尿嘧啶耐药细胞株的建立及其生物学特性

陈婕<sup>1,2</sup>, 王家东<sup>1,2</sup> (1. 上海交通大学医学院附属仁济医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200001; 2. 上海交通大学耳鼻咽喉研究所, 上海 200001)

**[摘要]** **目的:** 建立人喉癌 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)耐药细胞系, 为喉癌的耐药机制研究提供模型。 **方法:** 以高剂量浓度递增间歇给药的方法诱导筛选人喉癌 Hep-2 的多药耐药细胞株 Hep-2/5-FU, 比较两组细胞的形态和倍增时间; MTT 法确定细胞的 IC<sub>50</sub> 及其耐药指数; 流式细胞仪检测两组细胞的细胞周期分布以及细胞内的罗丹明聚集; 实时定量 PCR 法检测 MDR1 mRNA 的表达, Western blotting 检测相应 MDR1-P 蛋白的表达。 **结果:** 建成性能稳定的 Hep-2/5-FU 耐药细胞株, 并与顺铂及长春新碱有不同程度的交叉耐药性, 且 Hep-2/5-FU 细胞倍增时间较 Hep-2 细胞延长 [ (31.25 ± 4.37) h vs (25.62 ± 3.53) h, *P* < 0.05 ]。 Hep-2/5-FU 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例升高 [ (45.6 ± 3.4)% vs (30.5 ± 1.2)% , *P* < 0.05 ], 而 S 期比例明显降低 [ (32.1 ± 4.2)% vs (52.4 ± 3.6)% , *P* < 0.05 ]; Hep-2 细胞内的罗丹明较 Hep-2/5-FU 细胞明显升高 [ (89.83 ± 0.52)% vs (14.38 ± 0.48)% , *P* < 0.01 ]; Hep-2/5-FU 细胞 MDR1 mRNA [ (13.69 ± 1.12) vs (17.82 ± 0.61) , *P* < 0.05 ] 及其编码的 MDR1-P 蛋白水平高于 Hep-2 细胞。 **结论:** Hep-2/5-FU 细胞株具有明确及稳定的多药耐药性, 为喉癌的耐药机制提供了研究的模型。

**[关键词]** 喉肿瘤; 5-FU; 耐药细胞株

**[中图分类号]** R739.65; Q279

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)02-0201-05

## Establishment of a 5-fluorouracil-resistance laryngeal cancer cell line and its biology characteristics

CHEN Jie<sup>1,2</sup>, WANG Jia-dong<sup>1,2</sup> (Institution of Otorhinolaryngology, Department of Otolaryngology, Affiliated Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a multidrug resistance cell line from human laryngeal cancer cells by 5-fluorouracil (5-Fu), and provide a research model of drug resistance mechanisms of laryngeal cancer. **Methods:** A multidrug resistance cell line from human laryngeal Hep-2 cancer cells (Hep-2/5-FU) was established by a high dosage intermittent increase gradient method. The morphology and cell doubling time of Hep-2 and Hep-2/5-FU cells was compared; the IC<sub>50</sub> and drug resistance fold was detected by MTT assay; the cell cycle distribution and rhodamine accumulation in Hep-2 and Hep-2/5-Fu cells was studied by flow cytometry; and the MDR1 mRNA and the corresponding MDR1-P protein expressions were detected by real-time quantitative RT-PCR or Western blotting. **Results:** Hep-2/5-Fu cells was established, which had a stable resistance to 5-Fu; Hep-2/5-Fu cells exhibited cross resistance to chemotherapeutic agents like cisplatin and vincristine, and its doubling time was prolonged as compared with Hep-2 cells ( [31.25 ± 4.37] h vs [25.62 ± 3.53] h, *P* < 0.05 ). The proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase was increased ( [45.6 ± 3.4]% vs [30.5 ± 1.2]% , *P* < 0.05 ), while decreased in S phase ( [32.1 ± 4.2]% vs [52.4 ± 3.6]% , *P* < 0.05 ) in Hep-2/5-Fu cells as compared with those in Hep-2 cells; rhodamine accumulation in Hep-2 cells was much higher than that in Hep-2/5-Fu cells ( [89.83 ± 0.52]% vs [14.38 ± 0.48]% , *P* < 0.01 ); and the expressions of MDR1 mRNA ( [13.69 ± 1.12] vs [17.82 ± 0.61] , *P* < 0.05 ) and the corresponding MDR1-P protein were increased in Hep-2/5-Fu cells than those in Hep-2 cells. **Conclusion:** The Hep-2/5-Fu cell line shows the typical and stable multidrug resistance, and may serve as

**[基金项目]** 上海仁济医院科研培育基金项目资助( No. RJPY10-011 )。 Project supported by the Science Research Development Foundation of Shanghai Renji Hospital ( No. RJPY10-011 )

**[作者简介]** 陈婕( 1981 - ), 上海市人, 硕士, 主要从事耳鼻咽喉头颈外科的头颈部肿瘤的基础及临床研究。 E-mail: chen\_jie\_jj@hotmail.com

**[通信作者]** 王家东( WANG Jia-dong, corresponding author ), E-mail: drjiadongw@yahoo.com.cn

a research model of laryngeal cancer resistance mechanism.

[ **Key words** ] laryngeal cancer; 5-fluorouracil; drug resistance cell line; MDR1

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19(2): 201-205 ]

喉癌是耳鼻咽喉头颈外科常见的肿瘤,其治疗主要是手术,化疗则可减少其复发和提高生存率<sup>[1-3]</sup>。但以 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)为主的化疗疗效不能令人满意<sup>[4]</sup>,喉癌对化疗药物产生耐药性是化疗失败的主要原因,因此喉癌的耐药机制成为众多学者研究的热点。肿瘤的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性的同时<sup>[5-6]</sup>,对其他多种抗肿瘤药物产生交叉耐药性,因此逆转 MDR 成为肿瘤研究的关键。建立多药耐药细胞系是研究肿瘤多药耐药性的基础。本实验采用 5-FU 大剂量浓度逐渐递增间歇给药法诱导建立人喉癌多药耐药细胞系,以 Hep-2 细胞为亲本细胞,用 5-FU 诱导产生耐药细胞株 Hep-2/5-FU,比较和分析两者之间的特性差异,进一步了解 5-FU 对喉癌的细胞毒机制及其耐药机制提供研究模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

细胞株人喉癌 Hep-2 细胞系由中科院细胞室提供。人喉癌 Hep-2 细胞加入含 10% 小牛血清、青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 μg/ml 的 RPMI 1640 培养液中,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养,0.25% 的胰蛋白酶消化传代。

长春新碱(vincristine, VCR)、顺铂(cisplatin, DDP)、二甲基四氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、碘化丙啶(PI)及罗丹明(Rhodamine 123)购自 Sigma 公司,5-FU 购自 Lic 公司,RPMI 1640 培养基、小牛血清及胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司,MDR1 抗体购自 Chemicon 公司。PVDF 膜购自 Millipore 公司,实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 CapitalBio 公司。实验中所有引物均在 Invitrogen 公司合成。

### 1.2 人喉癌 5-FU 耐药细胞系的建立

选取对数生长期 Hep-2 细胞,调整密度至 5 × 10<sup>4</sup>/ml,接种于 96 孔板,每孔 100 μl,再分别加入 5-FU 每孔总体积 200 μl,每个药物质量浓度(10、20、25、30 μg/ml)设 6 个重复孔,一个空白对照,培育 72 h。每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,继续培养 4 h,每孔加 200 μl DMSO,以 490 nm 检测波长测定各孔的光密度值(D),计算每一种浓度的抑制率。抑制率(%)=(1 - 加药组 D 值/细胞对照组 D 值) ×

100%。

采用反复大剂量冲击联合逐步递增药物浓度法,将喉癌细胞株在其相应 10% 胎牛血清培养基中培养。根据以上 MTT 试验结果,估计出各个质量浓度下细胞株(10、20、25、30 μg/ml)的 5-FU 半数抑制药物浓度。将 5-FU 加入培养基中,使其最终质量浓度达到其半数细胞生存的浓度。杀死绝大多数细胞而剩下少数耐药细胞,再撤去化疗药物,用 PBS 液清洗 3 遍,在无药培养液中继续培养,使剩余细胞恢复到正常生长状态并传代。再次加入同一浓度化疗药物共 3 ~ 5 次,再进行下一浓度的诱导。如此反复间歇加药,逐渐增加药物浓度,经过不同浓度(10 μg/ml、24 h、5 次 → 20 μg/ml、24 h、5 次 → 25 μg/ml、24 h、4 次 → 30 μg/ml、24 h、3 ~ 4 次)的加药处理,以建立具有耐药性的喉癌细胞株 Hep-2/5-FU, Hep-2/5-FU 细胞可在含 5-FU 浓度为 30 μg/ml 的培养液中生长。

### 1.3 MTT 法测定药物的敏感性

选取对数生长期 Hep-2 细胞及 Hep-2/5-FU 细胞,调整密度为 5 × 10<sup>4</sup>/ml,接种于 96 孔板,每孔 100 μl,再分别加入 5-FU、长春新碱及顺铂 3 种化疗药物,每孔总体积 200 μl;每组细胞设 5 个倍比浓度梯度,一个空白对照,各种药物浓度作 3 个平行孔。按常规 MTT 法操作,计算每一种浓度的抑制率。抑制率(%)=(1 - 加药组 D 值/细胞对照组 D 值) × 100%。根据直线回归法计算 5-FU、顺铂及长春新碱的半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>及耐药指数 RI, RI = IC<sub>50</sub>(耐药细胞)/IC<sub>50</sub>(亲本细胞)。

### 1.4 倍增时间的测定及细胞形态学的观察

取对数生长期 Hep-2 及 Hep-2/5-FU 细胞,调整密度为 5 × 10<sup>4</sup>/ml,取 2 ml 细胞悬液接种至 24 孔培养板,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养。每日取 3 孔细胞计数,计算均值,连续观察 7 d。按 Patterson 公式计算群体倍增时间(doubling time, TD), TD =  $t \times \log 2 / (\log N_t - \log N_0)$ ; N<sub>0</sub>: 初始细胞数, N<sub>t</sub>: 终末细胞数, t: N<sub>t</sub>-N<sub>0</sub> 时间。倒置显微镜下观察耐药细胞 Hep-2/5-FU 和亲本细胞 Hep-2 的形态学变化。

### 1.5 流式细胞术分析 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞周期及细胞内罗丹明的蓄积变化

取含 1 × 10<sup>6</sup>/ml 细胞的 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞的单细胞悬液,12 000 × g 离心 5 min 后,弃去

培养基,加入 300  $\mu\text{l}$  含 5% 新生牛血清的 PBS 和 700  $\mu\text{l}$  无水乙醇,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 24 h,离心去上清,1 ml PBS 清洗离心,去上清后加入 1 mg/ml 的 RNaseA 100  $\mu\text{l}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min,加入 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 PI 300  $\mu\text{l}$ ,暗处放置 20 min,以流式细胞术进行细胞周期分析。

取 1 ml 含  $2 \times 10^6$  个细胞的单细胞悬液,加入 5 mmol/L 的罗丹明 2.5  $\mu\text{l}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,  $12\ 000 \times g$  离心 5 min,弃去培养液,以新鲜培养液洗去细胞外的罗丹明染料,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min,再以新鲜培养基洗涤 1 次,细胞重悬于预冷的培养基,在流式细胞仪上检测细胞内的罗丹明蓄积。

### 1.6 Real-time PCR 检测 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞中 *MDR1* mRNA 的表达

用 TRIzol 提取 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞的总 RNA,紫外分光光度计定量 RNA 浓度。反转录过程后进行 PCR。*MDR1* 引物<sup>[7]</sup>: forward 5'-GCACTA-AAGTAGGAGACAAAGGAA-3', reverse 5'-TGACTCT-GCCATTCTGAAACAC-3'。*Actin* 引物: forward 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', reverse 5'-CTCCT-TAATGTCACGCACGAT-3'。PCR 反应条件为  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 s,  $64\text{ }^{\circ}\text{C}$  20 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  31 s,共 40 个循环。以 *Actin* 为内参。PCR 反应的特异性通过产物溶解曲线进行确认,*MDR1* mRNA 的相对含量根据公式  $2^{-\Delta(\Delta\text{Ct})}$  计算。

### 1.7 Western blotting 检测 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞 *MDR1* 基因编码的 P 糖蛋白的表达

用蛋白裂解液于冰上裂解 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞 30 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   $12\ 000 \times g$  离心 40 min,取上清  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  储存备用,上清用 Bradford 法测定蛋白浓度,样品  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 5 min 后,每孔上样 60  $\mu\text{g}$ , SDS-PAGE 后转膜于 PVDF 膜上,用 4% 脱脂奶粉/TBST 室温下封闭抗原 1.5 h。鼠抗 P 蛋白一抗(1:1 000)用 4% 脱脂奶粉/TBST 稀释后  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 PVDF 膜过夜 (*MDR1*/P-gp 1:400)。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,然后加入兔抗鼠二抗(1:2 000),室温下摇床孵育 1 h,再次 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。ECL 曝光显影,图像分析仪定量分析表达蛋白相对值。

### 1.8 统计学处理

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS10.0 统计学软件,两样本均数比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Hep-2 及 Hep-2/5-FU 细胞的倍增时间及细胞

形态的变化

亲本细胞 Hep-2 及耐药细胞 Hep-2/5-FU 的倍增时间分别为(  $25.62 \pm 3.53$  )h 和(  $31.25 \pm 4.37$  )h,耐药细胞的生长较亲本细胞减慢,细胞倍增时间延长(  $P < 0.05$  )。由此可见,Hep-2/5-FU 细胞生长增殖速度明显减慢,倍增时间越长,对化疗药物的敏感性亦降低。光镜下耐药细胞及亲本细胞均贴壁生长,Hep-2/5-FU 细胞胞体变大变圆,细胞内的颗粒增多,贴壁能力较亲本细胞减弱(图 1)。

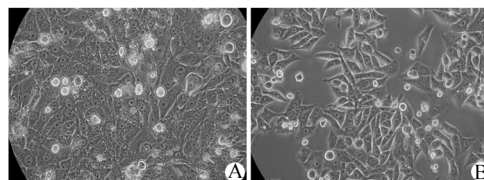


图 1 Hep-2 细胞和 Hep-2/5-FU 细胞形态的比较(  $\times 250$  )  
Fig. 1 Morphology of Hep-2 and Hep-2/5-FU cells(  $\times 250$  )  
A: Hep-2 cells; B: Hep-2/5-FU cells

### 2.2 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞的耐药情况

Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞的耐药情况见表 1。5-FU、长春新碱及顺铂的耐药指数分别是 25.97、5.23 及 8.02,说明 Hep-2/5-FU 细胞对 5-FU 有高度耐药性,且对长春新碱、顺铂等结构及作用机制不同的抗癌药也产生了不同程度的耐药性。结果说明,Hep-2/5-FU 细胞具有 MDR 特性。

表 1 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞的耐药情况(  $\bar{x} \pm s$  )

Tab. 1 Multidrug resistance of Hep-2 and Hep-2/5-FU cells(  $\bar{x} \pm s$  )

Cell	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )		
	5-FU	Vincristine	Cisplatin
Hep-2	$0.38 \pm 0.023$	$1.13 \pm 0.031$	$0.36 \pm 0.049$
Hep-2/5-FU	$9.87 \pm 0.021^*$	$5.91 \pm 0.040^*$	$2.89 \pm 0.110^*$

\*  $P < 0.05$  vs Hep-2 cell group

### 2.3 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞细胞周期及细胞内罗丹明的蓄积

细胞周期检测结果(表 2)显示,Hep-2/5-FU 细胞较 Hep-2 细胞的  $G_0/G_1$  期细胞比例升高(  $P < 0.05$  ),而 S 期细胞比例明显降低(  $P < 0.05$  )。由此可见,Hep-2/5-FU 细胞较 Hep-2 细胞生长速度变慢。

流式细胞仪检测到 Hep-2 细胞的罗丹明阳性细

胞率远高于 Hep-2/5-FU 细胞[ ( 89. 83 ± 0. 52 )% vs ( 14. 38 ± 0. 48 )% ,  $P < 0. 01$  ], 可见 Hep-2/5-FU 细胞内罗丹明的蓄积低于 Hep-2 细胞, 表明 Hep-2/5-FU 细胞能够将更多的罗丹明由细胞内排出, 其结果导致相应细胞毒药物在细胞内蓄积减少, 致使抗癌效应丧失。

表 2 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞的细胞周期分布( % )  
Tab. 2 Cell cycle distribution of Hep-2 and Hep-2/5-FU cells( % )

Cell	Cell cycle distribution		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Hep-2	30.5 ± 1.2	52.4 ± 3.6	17.1 ± 2.1
Hep-2/5-FU	45.6 ± 3.4*	32.1 ± 4.2*	20.3 ± 2.3*

\*  $P < 0. 05$  vs Hep-2 cell group

#### 2.4 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞 MDR1 mRNA 及其编码 P 蛋白的表达

Real-time PCR 结果显示( 图 2 ), Hep-2/5-FU 细胞 *MDR1* mRNA 的 Ct 值明显低于 Hep-2 细胞中 *MDR1* mRNA 的 Ct 值[ ( 13. 69 ± 1. 12 ) vs ( 17. 82 ± 0. 61 ) ,  $P < 0. 05$  ]。因为 Ct 值越低, mRNA 的相对表达量越高, 所以 Hep-2/5-FU 细胞中 *MDR1/actin* mRNA 的相对表达量明显高于 Hep-2 细胞。由此可见, Hep-2/5-FU 细胞 *MDR1* mRNA 明显高于 Hep-2 细胞中 *MDR1* mRNA 的表达。

Western blotting 法验证 *MDR1* 编码的 P 糖蛋白水平, 结果表明( 图 2 ), *MDR1* 编码的 P 糖蛋白在 Hep-2/5-FU 细胞内的表达高于 Hep-2 细胞。由此可见 *MDR1* 编码的 P 糖蛋白的表达水平与 *MDR1* PCR 水平相一致, 再次证实, Hep-2 和 Hep-2/5-FU 两者间 MDR1 编码的 P 糖蛋白表达有差异。

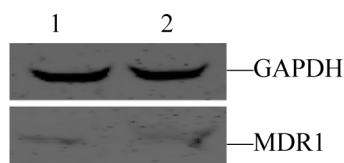


图 2 Hep-2 及 Hep-2/5-FU 细胞中的 *MDR1* 编码的 P 糖蛋白的表达

Fig. 2 P-glycoprotein of *MDR1* expression in Hep-2 and Hep-2/5-FU cells

1: Hep-2 cells; 2: Hep-2/5-FU cells

### 3 讨论

喉癌是耳鼻咽喉头颈外科常见恶性肿瘤之一<sup>[8]</sup>, 早期诊断、成功的根治性手术切除及手术为主的综合治疗是提高喉癌患者治愈率的关键。但患者临床就诊时多数已是中晚期, 预后不佳, 其主要原因之一是化疗的失败, 其中肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性是化疗失败的主要原因<sup>[9]</sup>, 因此肿瘤细胞耐药机制成为学者们研究的重点。在体外建立肿瘤耐药细胞株是研究肿瘤耐药的有效方法, 通过对 MDR 发生机制的研究, 以指导临床医生选择合理的化疗方案和化疗药物具有重要意义。

建立肿瘤耐药细胞株具有研究样品均匀、研究效果易于观察和检测、条件便于控制、临床相关性好、实验方法简便等优点, 已成为目前研究耐药的最佳模型。已往的喉癌耐药细胞株采用长春新碱及紫杉醇, 因 5-FU 对肿瘤细胞敏感, 诱导较困难, 报道不多, 且都为小剂量逐渐增加持续给药法建株。

本实验采用大剂量浓度逐渐递增间歇给药建立了性能稳定的喉癌 5-FU 耐药细胞系 Hep-2/5-FU 细胞, 且对长春新碱、顺铂等结构及作用机制不同的抗癌药也产生了不同程度的耐药性, 说明 Hep-2/5-FU 细胞具有 MDR 特性, 是研究喉癌耐药性的理想模型。本研究表明, Hep-2/5-FU 细胞的倍增时间较 Hep-2 细胞延长, Hep-2/5-FU 细胞生长增殖速度明显减慢, 显示其对化疗药物的敏感性亦降低。通过流式细胞仪检测 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞罗丹明的蓄积情况, 显示 Hep-2 细胞的罗丹明阳性率远高于 Hep-2/5-FU 细胞。本研究利用 Real-time PCR 及 Western blotting 分别在基因及蛋白质水平检测 Hep-2 和 Hep-2/5-FU 细胞中 *MDR1* 编码的 P 糖蛋白表达情况。结果再次证实, Hep-2 和 Hep-2/5-FU P 糖蛋白表达有显著差异。因此抑制或阻断 *MDR1* 编码的 P 糖蛋白的表达是逆转喉癌多药耐药的关键。国外亦有相关文献报道<sup>[10]</sup>, 喉癌细胞中抑制 *MDR1* 编码的 P 糖蛋白的表达, 可以降低细胞的耐药性, 并提高化疗药物的疗效。

目前国内外对 MDR 已进行了广泛、深入的研究<sup>[11]</sup>, 证明其机制包括: *MDR1* 基因及其编码的 P-糖蛋白过度表达; 多药耐药相关蛋白( multidrug resistance-associated protein, MRP )表达增加; 谷胱甘肽( glutathione, GSH )依赖性解毒酶系统活性增加; 蛋白激酶 C 变化; DNA 修复机制增强; DNA 拓扑异构酶含量减少或性质发生改变等。多数学者<sup>[12]</sup>认为, P-糖蛋白是一种 ATP 能量依赖泵, 能够将药物由细

胞内排出,其结果导致相应细胞毒药物在细胞内蓄积减少,致使抗癌效应丧失,这是耐药细胞产生耐药的重要途径。故任何降低细胞中药物外流的物质可使细胞内药物聚集增加,从而有效杀伤喉癌细胞。

但肿瘤细胞产生耐药性的机制是多方面的, Hep-2/5-FU 细胞的多药耐药机制除 MDR1/P-gp 过度表达外,还有待于其他机制的深入研究。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Kardasz-Ziomek M, Scierski W, Namysłowski G, et al. Long term results of partial laryngectomies in patients suffering from laryngeal cancer [ J ]. *Otolaryngol Pol*, 2012, 66( 1 ): 46-50.
- [ 2 ] Szyfter W, Leszczyńska M, Wierzbicka M. Outcome after supracricoid laryngectomies in the material of ENT department, poznan university of medical sciences [ J ]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2011, 268( 6 ): 879-883.
- [ 3 ] Eckel H E. Recent advances in the treatment of laryngeal and hypopharyngeal carcinoma [ J ]. *HNO*, 2012, 60( 1 ): 6-18.
- [ 4 ] Rampino M, Bacigalupo A, Russi E, et al. Efficacy and feasibility of induction chemotherapy and radiotherapy plus cetuximab in head and neck cancer [ J ]. *Anticancer Res*, 2012, 32( 1 ): 195-199.
- [ 5 ] Wang SJ, Bourguignon LY. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance [ J ]. *Am J Pathol*, 2011, 178( 3 ): 956-963.
- [ 6 ] 李莉,董频,万夷,等. 人喉癌紫杉醇耐药细胞株的建立及其生物学特性 [ J ]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 21( 9 ): 843-846.
- [ 7 ] 尹万忠,王莘,祝威. 人喉癌长春新碱耐药细胞株的建立及其生物学特性 [ J ]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26( 2 ): 129-135.
- [ 8 ] Bezerra de Souza DL, Jerez Roig J, Bernal MM. Laryngeal cancer survival in Zaragoza ( Spain ): A population-based study [ J ]. *Clin Transl Oncol*, 2012, 14( 3 ): 221-224.
- [ 9 ] Liu HC, Chen GG, Vlantis AC, et al. Chemotherapy for laryngeal cancer-an apoptotic approach [ J ]. *Curr Dug Targets*, 2008, 9( 10 ): 878-886.
- [ 10 ] Zhigang H, Qi Z, Jugao F, et al. Reverse multidrug resistance in laryngeal cancer cells by knockdown MDR1 gene expression [ J ]. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009, 38( 4 ): 440-448.
- [ 11 ] Li L, Jiang AC, Dong P, et al. MDR1/P-gp and VEGF synergistically enhance the invasion of Hep-2 cells with multidrug resistance induced by taxol [ J ]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16( 5 ): 1421-1428.
- [ 12 ] Dai Y, Xie CH, Neis JP, et al. MicroRNA expression profiles of head and neck squamous cell carcinoma with docetaxel-induced multidrug resistance [ J ]. *Head Neck*, 2011, 33( 6 ): 786-791.

[ 收稿日期 ] 2011 - 11 - 13

[ 修回日期 ] 2012 - 02 - 27

[ 本文编辑 ] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》关于抵制学术不端行为的声明

中国广大科技工作者坚持严谨求实、刻苦钻研、勇于创新的科学精神,取得了举世瞩目的科技成果,代表了中国科技工作者的主流。然而,近年来少数科技人员出现了抄袭剽窃、伪造数据、篡改数据、虚假署名、一稿多投等学术不端行为,影响了科技期刊的正常出版工作,给作者及其所在单位甚至我们国家带来非常负面的影响。《中国肿瘤生物治疗杂志》是中国肿瘤生物治疗领域惟一的高级学术刊物,一贯坚持“学术至上,质量第一”的原则,坚决抵制学术不端行为,努力维护学术纯洁性。为维护学术道德、保证期刊质量和学术声誉,本刊特作以下声明:

1. 作者投稿时须作出稿件无学术不端行为的声明。

2. 稿件审查过程中,本刊编辑部将采用“学术不端文献检测系统”,通过大量国内外学术文献的全文比对,对稿件进行学术不端行为的检查。

3. 本刊已加入“《中国学术文献网络出版总库》删除学术不端文献系统”,该系统协助本刊对已发表论文的学术不端行为进行全面复核。

4. 已发表的论文一经查实有学术不端行为,本刊将立即删除,第一时间刊登撤销声明,终止该论文在各相关数据库、文摘库中的传播,尽快消除不良影响。同时,视情节轻重给该文作者以下处理:书面警告,通知作者所在单位,在本领域相关期刊通报,2年内本刊不刊登有其署名的稿件,相关学术责任人(通讯作者)署名的其他稿件延缓审稿和刊登等。

( 本刊编辑部 )