

*Originalni rad/
Original article*

KI-67 PROLIFERATIVNI INDEKS I EKSPRESIJA VIMENTINA KOD BHK-21/C13, MCF-7 I MRC-5 KONTINUIRANIH ĆELIJSKIH LINIJA
KI-67 PROLIFERATION INDEX AND EXPRESSION OF VIMENTIN IN BHK-21/C13, MCF-7 AND MRC-5 CONTINUOUS CELL LINES

Dejan Miljković¹, Jovana Drljača², Aleksandra Popović³, Kristina Veljkov², Dragica Bulajić², Milan Popović¹

Correspondence to:

Asist. dr Dejan Miljković

Katedra za histologiju i embriologiju,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Srbija
e-mail: dejan.miljkovic@mf.uns.ac.rs
tel: +381642165216

¹ Katedra za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

² Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

³ Katedra za fiziologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

Ključne reči

kultura ćelija; imunofluorescencija; Ki-67; vimentin

Key words

cell culture; immunofluorescence; Ki-67; vimentin

Sažetak

Uvod: Ki-67 je nuklearni protein koji je neophodan za proliferaciju ćelija. Vimentin se koristi kao marker za dokazivanje ćelija mezenhimalnog porekla. Ekspresija ovih markera može da doprinese boljoj interpretaciji proliferacije tumorskih ćelija i u ispitivanju njihove citoarhitektonike. **Cilj:** Utvrditi Ki-67 proliferativni indeks i ekspresiju vimentina uz pomoć indirektno imunofluorescencije kod BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5 kontinuiranih ćelijskih linija. **Materijal i metode:** Istraživanje je sprovedeno na kontinuiranim ćelijskim linijama BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5. Ćelijske linije su održavane u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO₂ tokom 48h. Sve ćelije su podvrgnute imunofluorescentnom bojenju na Ki-67 i vimentin antigen. Nakon toga, svaka ćelijska linija je fotografisana i fotografije su obrađene u *Fiji* softverskom programu. U okviru programa, određen je Ki-67 proliferativni indeks i jačina intenziteta imunofluorescencije za antitelo vimentin. **Rezultati:** U sve tri ćelijske linije može se primetiti prisustvo Ki-67 antigena. Kod BHK-21/C13 proliferativni indeks je iznosio 97,01%; kod MCF-7 90,43%; kod MRC-5 90,58%. Intermedijarni filament vimentin je prisutan u citoplazmi svih ispitivanih ćelijskih linija. Jačina intenziteta imunofluorescencije za antitelo vimentin je pokazala najveće vrednosti kod BHK-21/C13, dok je najmanje vrednosti pokazala kod MCF-7. **Zaključak:** Ki-67 predstavlja dobar pokazatelj ćelijske proliferacije, dok vimentin dobro opisuje citoarhitektoniku ispitivanih ćelijskih linija.

UVOD

BHK (*Baby Hamster Kidney*) kulture ćelija su jedne od najčešće korišćenih ćelijskih linija. Prvi put su izolovane iz ćelija hrčaka koje su bile transformisane Polyoma virusom, a danas se široko koriste kao supstrati za razmnožavanje virusa u cilju spravljanja vakcina^(1, 2, 3). BHK 21 (BHK soj 21) linija diploidnih fibroblasta hrčka se koristi često u istraživanju virusa i neoplastične transformacije. Ćelije potiču iz kulture bubrega Sirijskih zlatnih hrčaka (*Mesocricetus auratus*), starih jedan dan, iz legla 21.

Najčešće korišćena ćelijska linija BHK 21 je subklon (klon) 13, označavan kao BHK-21/C13, koji se koristi za komercijalnu proizvodnju vakcina protiv bolesti slinavka i šap (*foot and mouth disease* ili *aphthae epizooticae*) u periodu od 20 godina⁽¹⁾. Koristi se i za spravljanje vakcina protiv besnila, mada neke literature navode da se BHK ćelije ne koriste za spravljanje vakcina za ljude⁽⁴⁾.

MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) je ćelijska kultura porekla tumorskih ćelija dojke. Izolovana je 1970. godine kao prva ćelijska kultura porekla sisara koja je mogla da živi duže od nekoliko meseci. Vodi poreklo od žene stare

69 godina kod koje se javio adenokarcinom sa pleuralnim izlivom, iz kog je uzeto tkivo koje je kasnije iskorišćeno za pravljenje MCF-7 ćelijske linije. Našla je široku primenu u istraživanjima tumora, a smatra se da je izvor većine podataka koji govore o tumorima dojke (5). Ove ćelije su zadržale pojedine karakteristike diferenciranih epitelnih ćelija dojke uključujući sposobnost obrade estradiola preko citoplazmatskih receptora za estrogen (6).

MRC-5 (*Medical Research Council-5*) ćelijske kulture su porekla humanih fetalnih fibroblasta pluća dobijene iz 14 nedelja starog fetusa. Ćelije su izolovane 1966. godine (7). Koriste se za pravljenje virusnih vakcina za virus boginja, mumpsa, rubele, poliomijelitisa, herpes simplex i virus vezikularnog stomatitisa (7,8). MRC-5 ćelije su svoju najvažniju ulogu pokazale za spravljanje vakcine protiv virusa velikih boginja (*Variola major*) jer ovaj virus predstavlja potencijalno biološko oružje, a vakcine su više nego uspešne za postizanje imunosti (7).

Ki-67 antigen se detektuje u proliferišućim ćelijama u svim fazama ćelijske deobe. Tokom mitoze, Ki-67 antigen se nalazi na svim hromozomima, formirajući mrežastu strukturu koja okružuje hromozome u metafazi. Tokom većeg dela interfaze, Ki-67 antigen se nalazi unutar nukleolusa. Tokom rane G1 faze, Ki-67 antigen je detektovan u velikom broju izolovanih nakupina u nukleoplazmi i proteže se do jedarne membrane. Tokom S i G2 faze, antigen se nalazi u nukleolusu. Ki-67 antitelo se koristi za procenu rasta ćelija u kliničkim uzorcima humane neoplazme ili normalnih ćelija u kulturi, pa ima prognostički značaj (9).

Vimentin je filamentozni protein, deo citoskeleta. Karakterističan je za mezenhimalne ćelije, dok se u epitelijalnim ćelijama njegova ekspresija obično ne uočava (10). Marker je epitelijalno-mezenhimalne tranzicije, što je od ključnog značaja za tumorigenezu, metastaziranje, invaziju i otpornost na lekove kod mnogih tumora (11). Iako je pojava vimentina u karcinomima povezana sa većim malignim potencijalom *in vitro*, klinički značaj vimentina u karcinomima je i dalje nejasan (12).

Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi proliferativni indeks Ki-67 i ekspresija vimentina uz pomoć indirektno imunofluorescencije na BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5 kontinuiranim ćelijskim linijama.

MATERIJAL I METODE

Gajenje kontinuiranih ćelijskih linija BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5

Istraživanje je sprovedeno na tri kontinuirane ćelijske linije: BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5. Korišćene ćelijske linije su rasle zalepljene za površinu suda; BHK-21/C13 i MCF-7 u medijumu DMEM sa 4,5 g/l glukoze (*DMEM HA, Capricorn Scientific*), dok je MRC-5 ćelijska linija gajena u medijumu DMEM/Ham's F12, uz suplementaciju oba medijuma 10% fetalnim goveđim serumom (*FBS, Capricorn Scientific*), 2 mM glutaminom (*Capricorn Scientific*) i 1% penicilin/streptomycinom (*Pen/Strep, Capricorn Scientific*).

Za potrebe histološkog bojenja, uzorci ćelijskih linija su zasejani u petri šolje prečnika 35mm, sa pokrovnicom prečnika 12 mm (*Marienfeld*), u koncentraciji od 100 000 ćelija u 2 ml medijuma (sa 10% FBS, 2 mM glutaminom i

1% Pen/Strep-om). Ćelijske linije su održavane u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO₂. Po dostizanju 70-80% konfluentnosti nakon perioda od 48h po zasejavanju sprovedeno je histohemijsko i imunofluorescentno bojenje na pokrovnica.

Citohemijska i imunofluorescentna tehnika bojenja

Medijum za rast ćelija je odliven i ćelije su isprane tri puta u PBS-u. Potom su fiksirane u 4% paraformaldehidu rastvorenem u PBS-u u trajanju od 10 minuta. Pokrovnice za potrebe histohemijskog bojenja su nakon fiksacije isprane sa PBS-om i naknadno bojene standardnim hematoksilin i eozin bojenjem (*HE*). Za potrebe indirektnog imunofluorescentnog bojenja (*IF*), pokrovnice su nakon fiksacije i ispiranja sa PBS-om, permeabilizovane uz pomoć 0,3% Triton X-100 (*Alfa Aesar, A16046*) u trajanju od 5 minuta. Pokrovnice su zatim prebačene u vlažnu komoru i tretirane 10% normalnim kozijim serumom rastvorenim u 1% BSA radi blokiranja nespecifičnog bojenja, u trajanju od 30 minuta na 25 °C. Potom su na pokrovnice za imunofluorescenciju aplikovana primarna antitela Ki67 (*Thermo Scientific, RB-9043-P0*) u razblaženju 1:300 i Vimentin (*Abcam, ab92547*) u razblaženju 1:500. Primarna antitela su inkubirana na temperaturi od 25 °C u periodu od 60 minuta. Sekundarna imunofluorescentna antitela Alexa Fluor 555 (*Abcam, ab150078*) i Alexa Fluor 488 (*Abcam, ab150077*), aplikovana su u mračnoj komori, u periodu od 30 minuta, na temperaturi od 25 °C. Pokrovnice su montirane na predmetno staklo uz pomoć DAPI medijuma (*Abcam, ab104139*).

Analiza mikroskopskih preparata

Predmetna stakla sa pokrovnica su analizirana na svetlosnom i imunofluorescentnom mikroskopu marke Leica DMLB 100T i fotografisani kamerom marke Leica MC 190 HD. Na svakoj pokrovnici je uslikano nasumično odabranih 10 vidnih polja na uveličanjima 400x i 630x. Na mikrofotografijama je određen proliferativni indeks za Ki67 i ukupni intenzitet fluorescencije vimentina.

Ki-67 proliferativni indeks

Podaci potrebni za dobijanje proliferativnog indeksa su obrađeni u kompjuterskom programu *Fiji* u kome su uz pomoć *Plugin-a Cell Counter* izbrojana DAPI i Ki-67 pozitivna jedra ćelija. Ki-67 proliferativni indeks je izračunat uz pomoć formule:

$$\text{Ki-67 proliferativni indeks} = \frac{\text{Ki-67 pozitivna jedra}}{\text{DAPI pozitivna jedra}} \times 100 (\%)$$

Određivanje ukupnog intenziteta fluorescencije vimentina

Mikrofotografije preparata tretiranih sa vimentin antitelom su obrađene u kompjuterskom programu *Fiji* pomoću specijalnog kodiranog dodatka pod nazivom *Batch-Macro*, gde je određen intenzitet fluorescencijnog signala pomenutih antitela na sivo-beljoj slici (*Grayscale*) u odnosu na signal pozadine slike. Nakon dobijanja rezultata (integrisana gustina, ukupna površina ispitivanih ćelija i pozadinska fluorescencija), ukupni intenzitet fluorescencije je izračunat uz pomoć sledeće formule:

$$\text{Ukupan intenzitet fluorescencije} = \text{integrisana gustina} - (\text{ukupna površina ispitivanog polja} \times \text{srednja pozadinska fluorescencija})$$

Statistička obrada podataka

Rezultati dobijeni imunofluorescentnim bojenjem su obrađeni uz pomoć deskriptivne statistike i predstavljeni u vidu grafika i mikrofotografija.

REZULTATI**Kvalitativne karakteristike ispitivanih ćelijskih linija - citoheмиjska tehnika**

Na citoheмиjskim preparatima obojenih hematoksilin i ezoin bojenjem BHK-21/C13 ćelije su prilično krupne, vretenastog izgleda i velikog euhromatičnog jedra sa velikim

brojem jedaraca. Ćelije MCF-7 su manje od BHK-21/C13 ćelija, poligonalnog su oblika i imaju euhromatično jedro sa 2-3 naglašena jedarceta. MRC-5 ćelije su vretenasto-poligonalnog oblika sa heterohromatičnim jedrom. Sa njihovih tela se pruža više citoplazmatskih produžetaka preko kojih ćelije komuniciraju (Slika 1).

Kvalitativne karakteristike ispitivanih ćelijskih linija - imunofluorescentna tehnika

Posmatranjem imunofluorescentnog bojenja na preparatima sve tri kontinuirane ćelijske linije može se primetiti prisustvo Ki-67 proteina isključivo u jedrima ćelija. Njegova ekspresija je uočljiva u velikoj većini ćelija prisutnih na mikrofotografijama. U zavisnosti od ciklusa u kojem se ćelije nalaze, Ki-67 protein se eksprimira u okviru jedarca u vidu crvenih tački unutar jedra ili se eksprimira tako da u potpunosti zauzima čitavu površinu jedra (Slika 2).

Kvalitativnom analizom mikroskopskih preparata, dobijenih imunofluorescentnim bojenjem, uočavaju se razlike u rasporedu i izgledu vimentinskih filamenata između sve tri ćelijske linije. Kod BHK-21/C13 vimentinska vlakna su difuzno raspoređena po citoplazmi ćelije. Vimentinska vlakna kod MCF-7 ćelijske linije imaju sličan raspored kao i BHK-21/C13 sa pojedinačnim ćelijama u kojima se najveći intenzitet fluorescencije uočava u predelu oko jedra. Kad je u pitanju MRC-5 ćelijska linija, najjači intenzitet fluorescencije označenih vimentinskih vlakana se uočava u obliku haloa oko jedarca ćelija i u citoplazmatskim nastavcima (Slika 3).

Ki-67 proliferativni indeks

Primenom Ki-67 imunofluorescentnog bojenja na kontinuiranim ćelijskim linijama BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5 izračunat je proliferativni indeks. Srednje vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa kod BHK-21/C13 su veće nego kod MRC-5 i MCF-7 ćelijske kulture (Grafikon 1).

Određivanje ukupne fluorescencije za vimentin

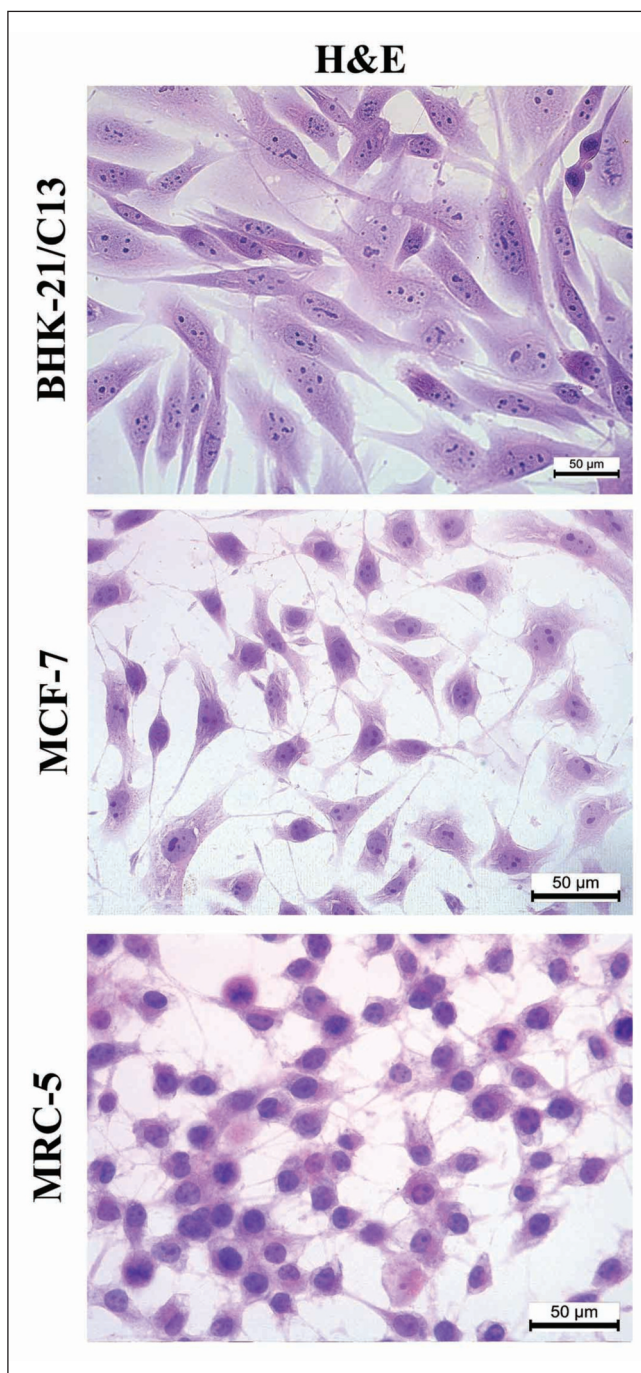
Utvrđena je ukupna fluorescencija sekundarnog antitela vezanog za antigen vimentin na kontinuiranim ćelijskim linijama BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5. Iz Grafikona 2. možemo uočiti da je ukupna fluorescencija vimentina znatno visoka kod BHK-21/C13 ćelijske linije, kod MRC-5 je znatno niža, dok je kod MCF-7 najniža.

DISKUSIJA

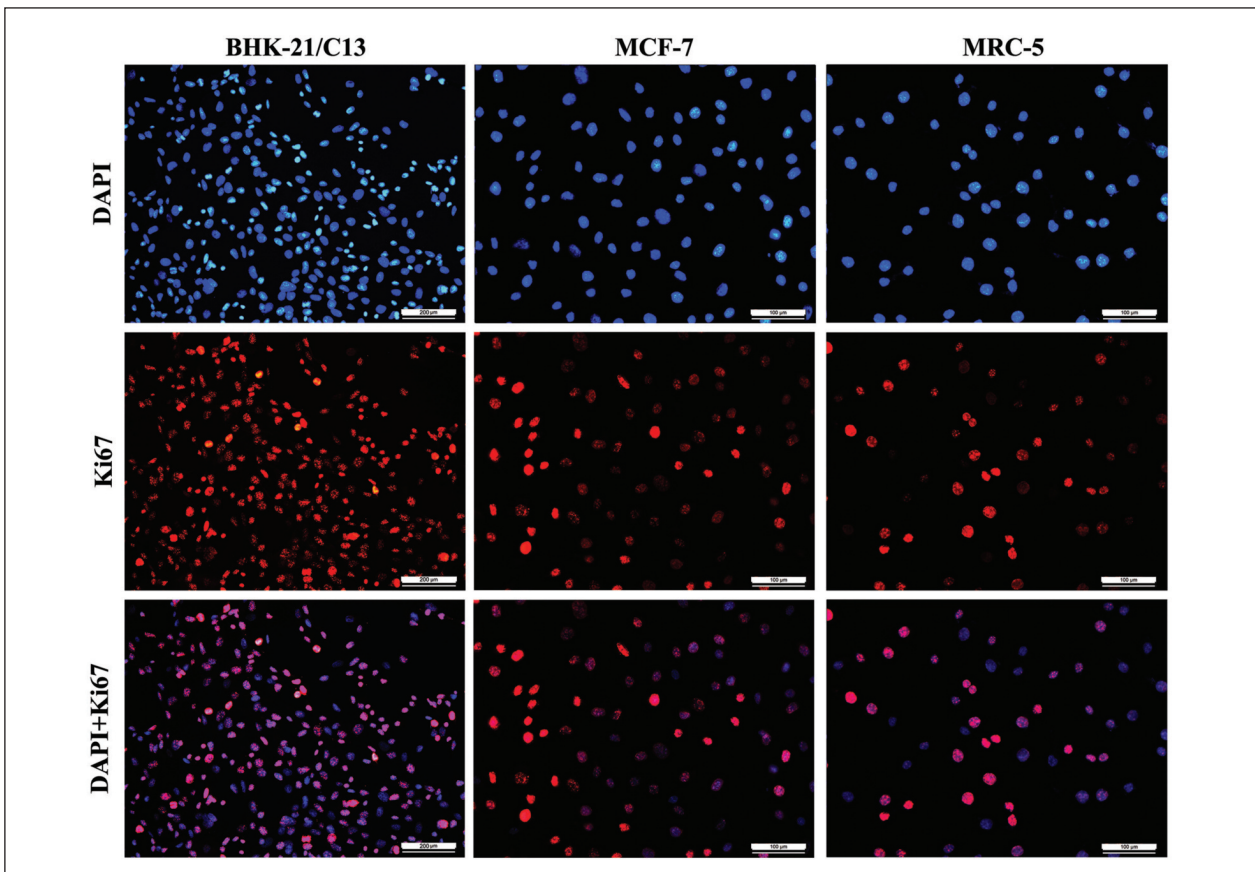
Citoheмиjskim i imunofluorescentnim analizama kontinuiranih ćelijskih linija mogu se utvrditi različiti molekularni profili ćelija u zavisnosti od prisustva ili odsustva određenih antigena. U našoj studiji imunofluorescentnim metodama ispitana je ekspresija Ki-67 i vimentina u BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5 ćelijskim linijama.

Kad je u pitanju BHK-21 ćelijska kultura, u istraživanjima Verheijen-a i saradnika se navodi da ove ćelije porekla fibroblasta hrčka ne pokazuju pozitivnu ekspresiju Ki-67 antigena koristeći indirektnu imunofluorescentnu tehniku (13,14). U okviru našeg istraživanja, dokazano je suprotno tj. da postoji prisustvo Ki-67 antigena u BHK-21/C13 kontinuiranim ćelijskim linijama.

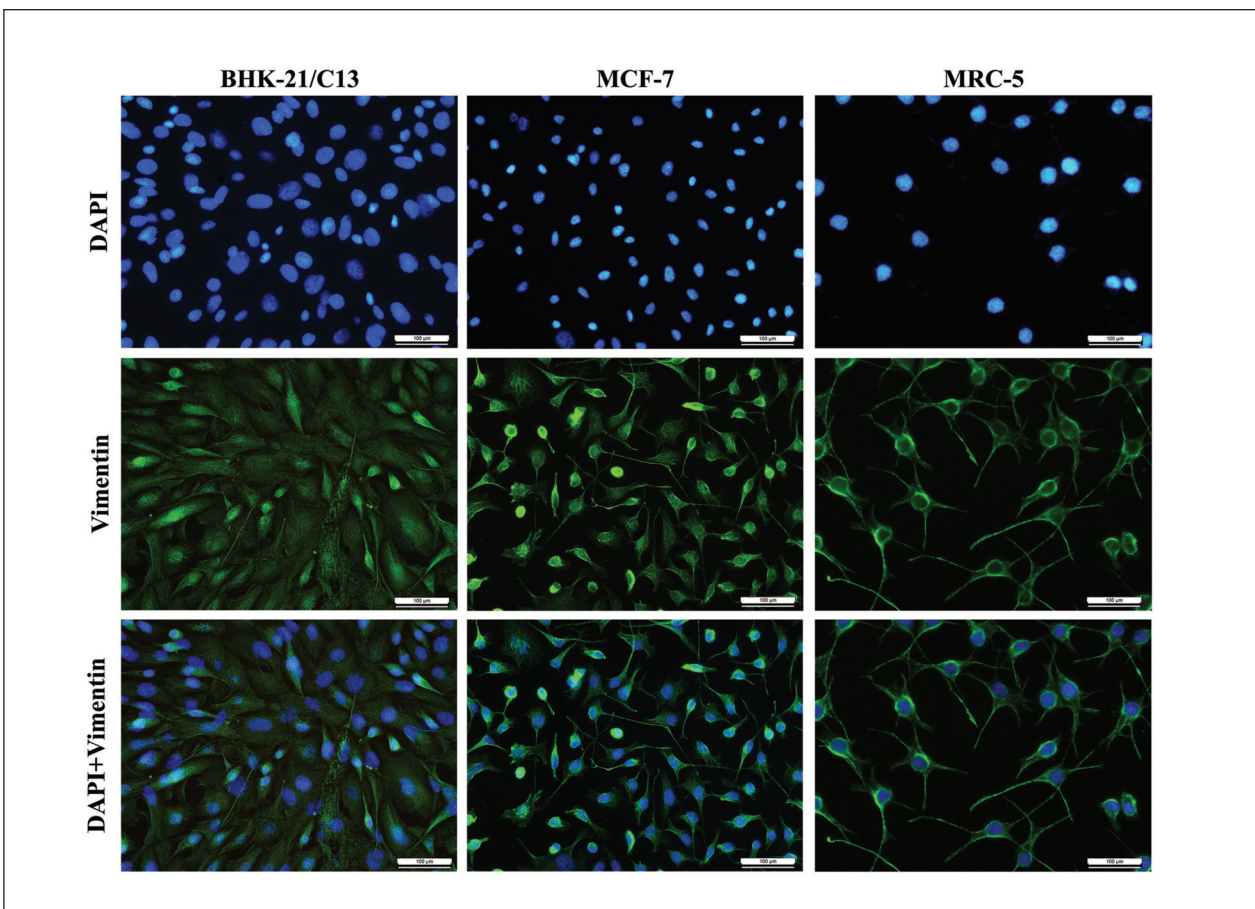
U istraživanjima sprovedenim na MCF-7 ćelijskoj liniji je pokazano da se Ki-67 proliferativni marker može detekto-



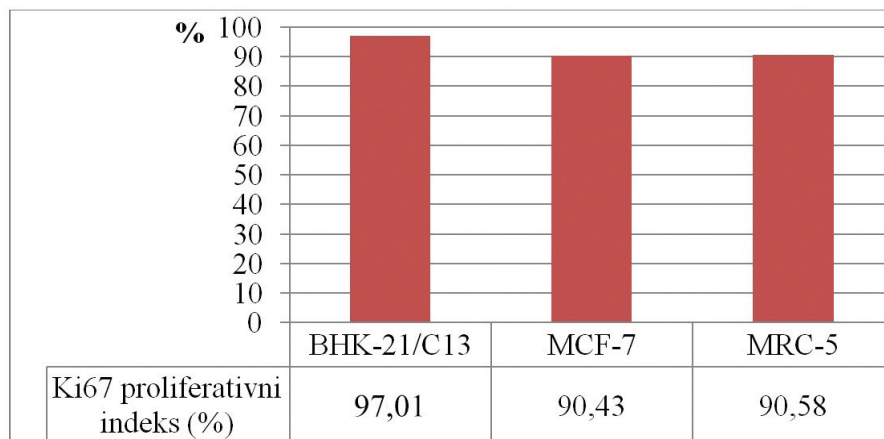
Slika 1: . Morfološke karakteristike ispitivanih ćelijskih linija; H&E, skala 50 µm



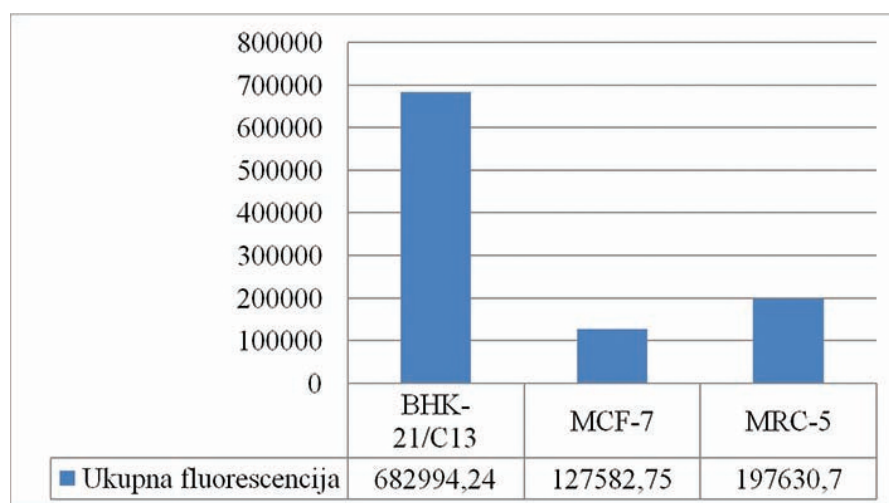
Slika 2. Kontinuirane ćelijske linije BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5; Ki-67 IF; skala 100 µm



Slika 3. Kontinuirane ćelijske linije BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5; Vimentin IF; skala 100 µm



Grafikon 1. Ki-67 proliferativni indeks ćelija u ispitivanim ćelijskim linijama



Grafikon 2. Kontinuirane ćelijske linije BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5 - kontrolna i eksperimentalne grupe

vati u kasnoj G1, S, G2 i M fazi ćelijskog ciklusa u MCF-7 kontinuiranim ćelijskim linijama⁽¹⁵⁾. *Du Manoir* i saradnici su takođe u svojim rezultatima prikazali da postoji povećana pojava Ki-67 antigena tokom ćelijskog ciklusa i da postoje varijacije u načinu unutarjedarne raspodele. Procenat Ki-67 pozitivnih ćelija u MCF-7 kontinuiranim ćelijskim linijama u okviru ove studije je iznosio 92,9%⁽¹⁶⁾, dok je u našem istraživanju Ki-67 proliferativni indeks približan njihovoj studiji i iznosi 97,01%.

U svojoj studiji *Guillaud* i saradnici su dokazali porast nivoa antigena Ki-67 tokom ćelijske deobe u MCF-7 i MRC-5 kontinuiranim ćelijskim linijama. Taj porast antigena je povezan sa promenom topografske distribucije Ki-67, što daje specifičan šablon bojenja svakoj fazi ćelijskog ciklusa⁽¹⁷⁾.

Pozitivna ekspresija vimentinskih vlakana u našim rezultatima se poklapa sa tvrdnjama studije *Knapp* i saradnika. Oni su opisali BHK-21/C13 kao ćelijsku liniju koja vodi poreklo od glatkih mišića vaskularnog porekla (mezangijalni tip), a do ovog zaključka su došli nakon utvrđivanja ekspresije dezmina i vimentina⁽¹⁸⁾.

Istraživači Nacionalnog instituta za rak (NCI) iz SAD su u svojem istraživanju ispitivali ekspresiju intermedijarnih

filamenata, epitelijalnih ćelijskih spojeva i adhezionih molekula u ćelijskoj liniji MCF-7, gde su dokazali nepostojanje ekspresije vimentina⁽¹⁹⁾. Za razliku od njihove studije, ćelije iz MCF-7 kontinuirane ćelijske linije u našem istraživanju su pokazale pozitivnu ekspresiju vimentina na imunofluorescentnom bojenju. Intenzitet te imunofluorescencije kod MCF-7 ćelija je pokazao najniže vrednosti od sve tri ćelijske linije koje smo ispitivali, što i ima smisla, s obzirom da su MCF-7 ćelije epitelnog porekla i intermedijarni filament kao što je vimentin ne bi trebao da bude prisutan u citoplazmi epitelnih ćelija u velikoj količini. U okviru studije istih autora iz Nacionalnog instituta za rak, ispitivana je specijalna ćelijska linija MCF-7 koja je bila modifikovana tako da je stekla rezistenciju na adriamicin. Tek ovako modifikovana ćelijska kultura je pokazala ekspresiju vimentina⁽¹⁹⁾. Visoka ekspresija vimentina je takođe potvrđena kod tri MCF-7 ćelijske linije koje su rezistentne na određene citostatike (paklitaksel, docetaksel i doksorubicin) što je objašnjeno postojanjem epitelno mezenhimalne transformacije i pojavom vimentina u tumorskim ćelijama⁽²⁰⁾.

Pri analizi MRC-5 kontinuirane ćelijske linije u našem eksperimentu je uočeno postojanje ekspresije vimentina koji je dokazan i u drugim istraživanjima. *Sugawara* i saradnici su kultivisali endometrijalne i MRC-5 ćelije i analizirali ih imunofluorescentnim bojenjem i protočnom citometrijom. Dobijeni rezultati su pokazali da su MRC-5 ćelije pozitivne na vimentin i negativne na citokeratin⁽²¹⁾.

ZAKLJUČAK

Kod BHK-21/C13, MCF-7 i MRC-5 kontinuiranih ćelijskih linija postoji ekspresija Ki-67 markera proliferacije. Ki-67 proliferativni indeks se pokazao najveći kod BHK-21/C13 ćelijske linije dok je kod MCF-7 i MRC-5 ćelijskih linija manji i ima slične vrednosti. Sve tri ispitivane kontinuirane ćelijske linije su pozitivne na marker vimentin. Intenzitet fluorescencije antitela vimentina je najviši kod BHK-21/C13 ćelijske linije, dok je najniži kod MCF-7 ćelijske linije. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da Ki-67 predstavlja dobar pokazatelj ćelijske proliferacije, dok vimentin dobro opisuje citoarhitektoniku ispitivanih ćelijskih linija.

Abstract

Introduction: Ki-67 is a nuclear protein which is necessary for cell cycle proliferation, while vimentin is often used as a marker of mesenchymally-derived cells. Expression of these markers can contribute to better interpretation of tumour cell proliferation and cytoarchitecture during both normal development and metastatic progression. **Objectives:** Determining Ki-67 proliferation index and vimentin expression by means of indirect immunofluorescence in BHK-21/C13, MCF-7 and MRC-5 continuous cell lines. **Methods:** The research was conducted on continuous cell lines BHK-21/C13, MCF-7 and MRC-5. The cell lines were held in incubator on 37 °C, in atmosphere with 100% humidity and 5% CO₂ during the 48h. The cells were subjected to immunofluorescence for Ki-67 and vimentin antigen. Afterwards, every cell line was photographed and the photos were processed in *Fiji* software. Ki-67 proliferation index and the immunofluorescence intensity of vimentin antibody have been determined. **Results:** Expression of Ki-67 antigen was noticed in all three cell lines. Proliferation index in BHK-21/C13 was 97.01%; in MCF-7 was 90.43%; in MRC-5 was 90.58%. Vimentin intermediate filament was present in the cytoplasm of all examined cell lines. Highest values of immunofluorescence intensity for vimentin antibody were shown in BHK-21/C13, while the lowest values were shown in MCF-7. **Conclusion:** Ki-67 antigen represents a good cell proliferation indicator while vimentin refers well to cytoarchitecture of examined cell lines.

LITERATURA

1. Stoker M, Macpherson I. syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivates. *Nature*. 1964;203(4952):1355-7.
2. Macpherson I, Stoker M. Polyoma transformatio of hamster cell clones-an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*. 1962;16(2):147-51.
3. Macpherson I. Characteristics of a hamster cell clone transformes by polyoma virus. *J Natl Cancer Inst*. 1963;30(4):795-815.
4. Genzel Y. Designing cell lines for viral vaccine production: Where do we stand?. *Biotechnol J*. 2015;10(5):728-40.
5. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells-changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(7):djv073.
6. Fagan DH, Fetting LM, Avdulov S, Beckwith H, Peterson MS, Ho YY, et al. Acquired tamoxifen resistance in MCF-7 breast cancer cells requires hyperactivation of eIF4F-mediated translation. *Horm Cancer*. 2017;8(4):219-29.
7. Micro.magnet.fsu.edu. [homepage on the Internet]. Tallahassee: The Florida State University. 2004 [updated 2015 November 13; cited 2019 January 11]. Available from <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells.html>.
8. Keshavarz M, Shafiee A, Rasekhi M, Abdesah M, Mohammadi A, Tarigi G, et al. Development of indirect immunofluorescence technique for the identification of MRC-5 working seed cell. *Arch Razi Inst*. 2018;73(1):39-44.
9. Kill I. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*. 1996;109(6):1253-63.
10. Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S, Kashiwagi S, Matsuoka J, Doi Y, et al. Clinical significance of vimentin-positive gastric cancer cells. *Anticancer Res*. 2010;30(12):5239-43.
11. Ye Z, Zhang X, Luo Y, Li S, Huang L, Li Z, et al. prognostic values of vimentin expression and its clinicopathological significance in non-small cell lung cancer: A meta-analysis of observational studies with 4118 cases. *PLoS One*. 2016;11(9): e0163162.
12. Verheijen R, Kujipers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AI, van Driel R; Brakenhoff GJ, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci*. 1989;92(1):123-30.
13. Verheijen R, Kujipers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendocnk JH, Brakenhoff GJ, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci*. 1989;92(4):531-40.
14. Tan H, Zhong Y, Pan Z. Autocrine regulation of cell proliferation by estrogen receptor-alpha in estrogen receptor-alpha-positive-breast cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2009;9:31.
15. Du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G. Ki-67 labeling in post-mitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry*. 1991;12(5):455-63.
16. Guillaud P, du Manoir S, Seigneurin D. Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mammary tumor cell lines (MCF-7). *Anal Cell Pathol*. 1989;7(1):25-39.
17. Knapp AC, Bosch FX, Hergt M, Kuhn C, Winter-Simanowski S, Schmid E, et al. Cytokeratins and cytokeratin filaments in subpopulations of cultured human and rodent cells of nonepithelial origin: modes and patterns of formation. *Differentiation*. 1989;42(2):81-102.
18. Sommers C, Heckford SE, Skerker JM, Worldand P, Torri JA, Thompson EW, et al. Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin and vinblastine resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 1992;52(19):5190-7.
19. İşeri OD, Kars MD, Arpacı F, Atalay C, Pak I, Gündüz U. Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern. *Biomed Pharmacother*. 2011 Feb;65(1):40-5.
20. Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamijo S, Kuji N, et al. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. *Sci Rep*. 2014;4:4599.