

使用指南

产品：ABW[®] Matrigengel 无酚红基底膜基质，10 mL瓶

产品目录号：082706

背景：在体内，基底膜是以细胞为基础的薄层细胞外基质。ABW无酚红基底膜基质是一种可溶性的基底膜制剂，这种基质是通过基因编辑技术将多种表达胶原蛋白的基因序列插入到经永生化处理的小鼠子宫肌瘤细胞系中，并在实体肿瘤中抽提出来的。它的主要成分是层粘连蛋白，接着是胶原蛋白IV、硫酸乙酰肝素蛋白多糖和巢蛋白^{1,2}。ABW无酚红基底膜基质也含有转化生长因子 β 、表皮生长因子、类胰岛素生长因子、成纤维细胞生长因子、组织纤溶酶原激活物^{3,4} 和在肿瘤中自然出现的其他生长因子。ABW无酚红基底膜基质对正常和变换的锚着依赖性上皮样细胞和其他细胞类型的附着和分化是有效的。这些细胞类型包括神经元^{5,6}、肝细胞⁷、支持细胞^{8,9}、小鸡晶状体上皮细胞¹⁰ 和血管内皮细胞¹¹。在成年大鼠肝细胞^{12,13}、血管内皮细胞¹⁴ 以及小鼠¹⁵⁻¹⁸ 和人^{19,20} 乳腺上皮细胞的三维细胞培养中ABW无酚红基底膜基质会影响基因的表达。这是几种类型肿瘤细胞侵袭的基础^{21,22}，支持体内末梢神经再生²³⁻²⁵，并提供体外^{26,27} 和体内^{25,28-30} 血管再生研究的必需底物。ABW无酚红基底膜基质也支持在免疫抑制小鼠中人类肿瘤的增殖³¹⁻³³。ABW无酚红基底膜基质能用于未分类乳腺细胞的移植³⁴，以及分类的上皮细胞亚群嵌入ABW无酚红基底膜基质^{35,36}。这一基质也被用作为癌症干细胞模型并被证明在体内能增强肿瘤生长速率³⁷。

来源：经基因编辑的小鼠子宫肌瘤细胞

制剂：达尔伯克改良伊格尔培养基和 50 μ g/mL 庆大霉素。ABW无酚红基底膜基质适合所有的培养基。

储存：储存在-20 $^{\circ}$ C 时是稳定的。通过分装并一次性使用分装物来最小化产品的冻融。在-20 $^{\circ}$ C 冰箱中储存分装物直到准备使用。请不要储存在无霜冰箱中。请保持产品的冻结。

有效日期：ABW无酚红基底膜基质的有效日期是批次特异的，您可以在产品的分析证明书中找到，在-20 $^{\circ}$ C 条件下能储存24个月以上。

警告：因为ABW无酚红基底膜基质在10 $^{\circ}$ C 以上会开始凝胶化，所以极其重要的是ABW无酚红基底膜基质和所有的进入与ABW无酚红基底膜基质接触的培养皿或培养基都应该预冷。在实验的全部过程中请保持ABW无酚红基底膜基质处于冰上。

重构和使用：在ABW无酚红基底膜基质小瓶冻融的过程中可能会发生颜色的变化，



由于二氧化碳和碳酸氢盐缓冲液以及酚红的作用，颜色会从淡黄色变化到深红色。颜色的变化是正常的，不会影响产品的功效，颜色将会在5%CO₂ 平衡下消失。

请将小瓶淹没在冰中并放置在 4℃ 冰箱里过夜解冻 ABW[®] Matrigel[®] 基质。一旦ABW无酚红基底膜基质被解冻，请涡旋小瓶以确保材料的均匀分散。请将ABW无酚红基底膜基质全程保持在冰上。请使用无菌技术处理。请将解冻的ABW无酚红基底膜基质放置在无菌的区域，在小瓶的顶部喷洒70% 的乙醇并风干。

使用预冷的移液管轻柔的吸取ABW无酚红基底膜基质以确保其均匀性。将ABW无酚红基底膜基质分装到离心管中，每当ABW无酚红基底膜基质堵塞吸头和/或移液管测量不精确时请更换吸头。如果将材料放置在 4℃ 的冰上 24-48 个小时，凝胶化的ABW无酚红基底膜基质可能会被重新水化。

ABW无酚红基底膜基质可以被用来作薄层凝胶(0.5 mm)，细胞可以接种在其顶部。当作为 1 mm 凝胶层使用时，细胞也可以在ABW无酚红基底膜基质的内部培养。大量的稀释将会导致 1 个薄的、非凝胶化的蛋白层。这对于细胞附着是有用的，但是在分化研究中可能不起作用。

使用方法：

包被涂层方法：

ABW无酚红基底膜基质可以以几种方式使用。薄层凝胶法适用于在凝胶顶部接种细胞，厚层凝胶法允许您在三维基质内培养细胞，薄层包被法(不凝胶化)给您提供了复杂的蛋白质层，您可以在其上培养细胞。您的选择基于您想要实现的最终结果，无论是细胞生长、附着还是分化。

注意：在www.abwbio.com网页上发布了具体的应用程序*。ABW无酚红基底膜基质产品的蛋白质浓度是批次特异的并提供在分析证明书上。通过计算需要的特定蛋白浓度(mg/mL)获得了稀释ABW无酚红基底膜基质产品的一致结果。为了维持凝胶化的一致性，我们推荐不要将ABW无酚红基底膜基质稀释到少于 3 mg/mL。请使用冰冷的无血清培养基来稀释ABW无酚红基底膜基质。通过在冰上移液管上下吸液或涡旋小瓶来混合。

一、薄层凝胶法

- 1.依照推荐的方法解冻ABW无酚红基底膜基质。使用预冷的移液管，将ABW无酚红基底膜基质混合至均匀。
- 2.将培养板放置在冰上，以 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 向生长表面加入ABW无酚红基底膜基质。
- 3.将培养板放置在 37 °C，30 分钟。
- 4.如果有必要的话，请在使用无血清培养基轻柔漂洗前吸出未结合的材料。请确保移液器的吸头 不要刮擦包被的表面。培养板现在可以使用了。



二、薄层包被法

1.依照推荐的方法解冻ABW无酚红基底膜基质。使用预冷的移液管，将ABW无酚红基底膜基质混合至均匀。

使用无血清培养基将ABW无酚红基底膜基质稀释到需要的浓度。对于您的应用程序，您应该完成以经验为主的
研究来确定您的最适包被浓度。

2.向被包被的容器中加入稀释的ABW无酚红基底膜基质。加入的量应该足以容易地覆盖整个生长表面。在室温下培养 1 个小时。

3.吸出未结合的材料并使用无血清培养基轻柔地漂洗。培养板现在可以使用了。

三、厚层凝胶法

1.依照推荐的方法解冻ABW无酚红基底膜基质。使用预冷的移液管，将ABW无酚红基底膜基质混合至均匀。

2.将培养板放置在冰上。向ABW无酚红基底膜基质中加入细胞并使用预冷的移液管悬浮。以 150-200 μ l/cm² 向生长表面加入ABW无酚红基底膜基质。

3.将培养板放置在37 $^{\circ}$ C，30分钟。现在可以添加培养基了。细胞也可以培养在这一凝胶的顶部。

细胞复苏:

使用细胞复苏溶液在冰上 7 小时内解聚ABW无酚红基底膜基质能够实现将生长在ABW无酚红基底膜基质上的细胞最有效地复苏，或者使用中性蛋白酶，考虑到连续培养，中性蛋白酶作为一种金属酶可以分散细胞。

注意事项:

因为ABW无酚红基底膜基质在 10 $^{\circ}$ C 以上会开始凝胶化，所以极其重要的是ABW无酚红基底膜基质和所有的进入与ABW无酚红基底膜基质接触的培养皿或培养基都应该预冷。产品需要放置于冰上，并在 2 $^{\circ}$ C-6 $^{\circ}$ C的冰箱中或者冷室中过夜融化，蛋白浓度高时可能需要更多时间。操作ABW Matrigel matrix时，我们建议使用预冷的移液管、吸头和管子。在实验的全部过程中请保持ABW无酚红基底膜基质处于冰上。

常见问题:

1.ABW高浓度基底膜基质用于哪些实验?

ABW高浓度基底膜基质可适用于体内应用研究，如高浓度蛋白可促进肿瘤生长。高蛋白浓度同时可使ABW基底膜基质注射入小鼠皮下后保持完整，有利于注射的肿瘤细胞和/或血管生成因子保持原位，便于用于原位分析和/或以后的切除。

2.如何将ABW基底膜基质用于3D培养? 怎样制作3D胶? 需要将细胞嵌入到ABW基底膜基质中吗?



ABW高浓度基底膜基质可适用于体内应用研究，如制备厚层包被用于3D细胞培养。细胞可以嵌在ABW基底膜基质中或者接种在ABW基底膜基质表面（覆盖法）。

3.使用ABW基底膜基质时，需要将移液器吸头和离心管预冷吗？

是的。因为ABW基底膜基质在高于10°C的条件下即会开始成胶，我们推荐操作基底膜基质时使用预冷的移液管、吸头和离心管。

4.ABW基底膜基质会快速聚合吗？

ABW基底膜基质在 22°C至 35°C时会快速聚合成胶。

5.什么情况下，需要使用无酚红ABW基底膜基质？

对于涉及颜色检测的实验，推荐使用无酚红ABW基底膜基质，如使用荧光染料或 Drabkins 法计数内皮细胞成管实验。对于子宫内膜细胞培养，也需使用无酚红ABW基底膜基质。

此外，酚红和非甾体雌激素结构类似，有类雌激素效应。在实验动物体内可能具有干扰内分泌和荷尔蒙代谢的能力。

6.如何从ABW基底膜基质中收获细胞？

推荐使用中性蛋白酶或细胞回收解决方案来收获培养在ABW基底膜基质中的细胞。

中性蛋白酶相比胰酶、胶原酶或其他蛋白水解酶能够更温和有效地获得单细胞悬液，不会损伤细胞或细胞表面蛋白。对于需要继续接种培养或进行检测的细胞，使用中性蛋白酶不会产生损伤。此外中性蛋白酶也可以用于组织分离。

对于代谢研究和RNA抽提，建议在4°C使用细胞回收解决方案进行非酶反应的细胞收获。因为ABW基底膜基质中含有痕量的RNA，进行RNA分析时，应设一个ABW基底膜基质（不接种细胞）的对照组。

其它从ABW基底膜基质中收获细胞的方法：

降低温度至4°C-6°C使ABW基底膜基质解聚，需要一定的时间并且仅适合一部分应用。

离心以破坏ABW基底膜基质结构。

7. ABW基底膜基质包被过的培养皿可以储存多长时间呢？

包被过的培养皿最好当天使用，具体情况取决于实验目的。需要保存的情况下，可在37°C培养箱中最多存放7天。保存时Matrigel表面需要使用无血清培养基均匀覆盖，保持湿润。

8. 哪些情况下应该选用薄胶？什么时候用厚胶呢？ 3D培养有哪些应用？

薄胶主要用于辅助细胞贴壁，有利于细胞增殖。如原代细胞培养，需要一层薄薄的蛋白层辅助，就可以选用薄胶；厚胶主要用于3D细胞培养，如大鼠主动脉组织分化为毛细血管样结构（Ring Assay），以及进行细胞侵袭实验等；3D细胞培养实验，主要是用于研究细胞与细胞间的相互作用以及复杂结构，如生物组织等。

9. 进行内皮管形成实验，应该选用多大浓度的Matrigel呢？

进行该实验，Matrigel最低浓度应不低于10mg/mL。

10. 做细胞侵袭实验，需要使用多少ABW基底膜基质进行包被？

包被24孔通透性支持物，推荐每孔使用0.1 mL（浓度200-300 $\mu\text{g/mL}$ ），ABW基底膜基质货号为082704。

11. ABW基底膜基质的最低成胶浓度是多少？

不同的实验目的需要不同的Matrigel浓度，用户应该根据具体的实验需求确定。ABW基底膜基质最低成胶浓度为 3 mg/mL。稀释时不要简单进行体积倍比稀释，不同批次间的Matrigel浓度有差异，应该根据最终工作浓度（mg/mL）算出需要加入的稀释液体（如PBS或无血清培养基）的量。用于体内研究的Matrigel，为了避免成胶不完全，最终工作浓度不应低于 4 mg/mL。

12. ABW基底膜基质胶块在体内可以维持多长时间？

基质胶胶块可以在体内维持至少一周的时间。

13. 怎样稀释ABW基底膜基质？

使用冰上预冷的无血清培养基或者PH 7.4的PBS。

14. 应该如何对ABW基底膜基质移液操作？

推荐使用预冷的移液器或者注射器操作，移液管、枪头同样需要预冷。吸液时不要触及瓶子底部；分液时切忌过快、用力过猛。如果使用移液管（Pipets），需要分液5mL时，应该吸取6mL，分液到移液管内仍有1mL时即停止；如果使用自动移液器（Pipetman），按压到第二档位吸液，然后按压到第一档位进行分液。

15. 为什么我的ABW基底膜基质很粘稠？

基质胶的蛋白浓度越高，胶体越粘稠。如果浓度高于13.0 mg/mL，基质胶会显得非常厚重。ABW基底膜基质产品在未稀释前都会比较粘稠。粘稠的高浓度ABW基底膜基质(ABW基底膜基质 HC)不稀释也可以直接使用，如用于培养肿瘤细胞和/或血管生成因子，注射于小鼠体内后，细胞可以保持原位，便于原位分析和/或以后的切除；或者稀释后，按照标准浓度的ABW基底膜基质产品使用方法使用，具体稀释浓度根据实验需求确定。除因为产品本身浓度高而粘稠外，基质胶的状态还与运输过程中温度的变化和储藏条件有关。整个运输过程中必须使用干冰冷藏。如果储藏ABW基底膜基质的冰箱带有自动除霜功能，冰箱除霜过程中升温，可能使基质胶成胶。所以，切忌将ABW基底膜基质储藏于此类冰箱中。为保证ABW基底膜基质的使用效果，冻融次数应该尽可

能减少。拿到新的ABW基底膜基质后，请按照单次用量进行分装。每次融化操作，Matrigel基质胶都应该放置于冰上。如果Matrigel基质胶在成胶状态被冻住，再次融化时将不能成恢复液体。

16. ABW基底膜基质可以诱导ES/iPS细胞分化吗？

可以的，已经有相关文章表明ABW基底膜基质可以用于ES/iPS细胞的分化研究。

17. 为什么ABW基底膜基质在37°C成胶，而在4°C时却呈液体状态？

ABW基底膜基质是一种从小鼠骨肉瘤中提取的重组基底膜，新鲜提取的原料中主要包括以下成分：层粘连蛋白，IV型胶原，巢蛋白，基底膜聚糖、表皮生长因子、类胰岛素生长因子及其他生长因子。这些蛋白构成了Matrigel的基本结构。在22°C-37°C温度条件下，大分子间的共价键可以结合，促使Matrigel形成凝胶。而在低温条件（如4°C）下，由于没有足够的能量促使共价键结合，所以Matrigel呈现液体状态。

18. ABW基底膜基质可以反复冻融吗？

建议用户第一次融化后按照单次用量进行分装，保存。

19. 为什么细胞没有贴壁？Matrigel 也脱落了？

首先需要检查细胞的接种浓度是否过高，ABW基底膜基质的用量应等同于细胞培养体系中培养基的用量。如果ABW基底膜基质被稀释到过低的浓度，形成的胶体容易从组织培养器皿表面分离。

20. 未稀释的ABW基底膜基质中出现的沉淀应该怎么样处理？

4° C下低速离心，去除沉淀物。

21. 未使用完的ABW基底膜基质应该怎样保存的？

与细胞培养基或缓冲液混合过但未使用完的ABW基底膜基质，不建议保留再用。

22. ABW基底膜基质中含有 DNA和/或RNA吗？

是的。ABW基底膜基质没有经过DNA酶或RNA酶消化处理，可能会含有痕量的DNA、RNA。

23. ABW基底膜基质中有血管内皮生长因子（VEGF）和金属蛋白酶（MMPs）吗？

在标准浓度的ABW基底膜基质中含有 5.0-7.5 ng/mL 的血管内皮生长因子（VEGF），GFR ABW基底膜基质中VEGF含量为1.0-1.5 ng/mL。另外，可能含有老鼠肿瘤细胞来源的痕量金属蛋白酶（MMPs）。

24. ABW基底膜基质中有 LDEV吗？

没有的。ABW基底膜基质经免疫方法及PCR方法检测，并不含有乳酸脱氢酶增高病毒（LDEV）或者乳酸脱氢酶增生病毒（LDHV）。此外，我们还针对小鼠群体及肿瘤来源筛查了其他种类的病毒。详细信息请参见产品说明书。

25. ABW基底膜基质中有尿素吗？

没有的。在ABW基底膜基质生产准备过程中使用过尿素，后续流程中经过透析方法已经去除了。

26. ABW基底膜基质中使用的什么缓冲液？

低葡聚糖 DMEM (1g/L)，其中包含 50 µg/mL 庆大霉素。

27. ABW基底膜基质中含有纤维连接蛋白（Fibronectin）吗？

是的，通过使用Western Blot检验，我们在Matrigel matrix中发现了微量的纤维连接蛋白（Fibronectin）

28. ABW基底膜基质中含有玻璃体结合蛋白（ vitronectin）吗？

某些EHS组织中可能含有微量的血液，因此ABW基底膜基质中可能会有痕量的玻璃体结合蛋白（Vitronectin）。

29. ABW基底膜基质 中还有什么别的物质？

ABW基底膜基质中还可能含有浓度小于 0.02%的三氯甲烷，以及肿瘤细胞的产生的其他未知蛋白或分子。

30. 提取过程会引起层粘连蛋白变性吗？

不会的，不会引起层粘连蛋白变性。

31. ABW基底膜基质可以储存在 -70℃吗？

是的。ABW基底膜基质可以储存在-70℃。建议客户将整瓶的ABW基底膜基质进行分装，储存于聚丙烯或其他可以耐受超低温条件材质的小管中，方便保存和使用。

32. ABW基底膜基质的折射率是多少？

20° C 条件下，ABW基底膜基质的折射率是 1.3406 到 1.3407，相对折射率为1.0056（同等条件下，水的折射率为 1.333）。

33. ABW基底膜基质会有自发荧光吗？

ABW基底膜基质是一种蛋白混合物，经过透析处理后溶解在 DMEM 培养基中。为防止微生物污染，培养基中添加了庆大霉素。所以ABW基底膜基质可能引发荧光的组分包括其中的蛋白质成分，维生素成分以及庆大霉素（氨基糖苷类抗生素）。如果需要使用荧光检测细胞生长状态，建议使用者建立对照实验，在所需要的波长条件下进行对比，以便排除背景荧光。

34. 使用 Matrigel 培养的细胞，如果需要进行切片或者免疫组织化学及免疫荧光检验，该怎样固定呢？如何避免解聚？



上海诺娃医药科技有限公司

www.abwbio.com

可以使用 2%浓度的多聚甲醛进行固定。为避免固定后出现解聚的情况，可以加入 1%浓度的戊二醛。戊二醛作为固定剂，常用于电镜观察。如果用户需要进行免疫荧光检验，加入戊二醛后，会出现明显的背景荧光。为了解决这一问题，我们建议用户在固定之后，使用 NaBH_4 进行淬灭。 NaBH_4 极易气泡，进行该步骤时，必须在水平操作台上小心操作，避免晃动，尽量减少气泡的形成。另外，用户也可以尝试使用较低浓度的戊二醛进行固定，如 0.1%到 0.5%，浓度越低，背景荧光信号越少。

***注意：**获取技术资源请浏览支持页面 www.abwbio.com

致谢：上海诺娃医药科技有限公司；康宁生命科学；BD生命科学

参考文献:

1. Kleinman HK, et al, Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma, *Biochemistry* 21:6188 (1982).
2. Kleinman HK, et al, Basement membrane complexes with biological activity, *Biochemistry* 25:312 (1986).
3. Vukicevic S, et al, Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular activity related to extracellular matrix components, *Exp Cell Res* 202:1 (1992).
4. McGuire PG and Seeds NW, The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells, *J. Cell. Biochem.* 40:215 (1989).
5. Biederer T and Scheiffele P, Mixed-culture assays for analyzing neuronal synapse formation, *Nat Protoc* 2(3):670 (2007).
6. Li Y, et al, Essential Role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor, *Nature* 434:894 (2005).
7. Bi Y, et al, Use of cryopreserved human hepatocytes in sandwich culture to measure hepatobiliary transport, *Drug Metab Dispos.* 34(9):1658 (2006).
8. Gassei K, et al, Immature rat seminiferous tubules reconstructed in vitro express markers of Sertoli cell maturation after xenografting into nude mouse hosts, *Mol Hum Reprod.* 16(2):97 (2010).
9. Yu X, et al, Essential role of extracellular matrix (ECM) overlay in establishing the functional integrity of primary neonatal rat sertoli cell/gonocyte co-cultures: An improved in vitro model for assessment of male reproductive toxicity, *Toxicol Sci* 84(2):378 (2005).
10. Chandrasekher G, and Sailaja D, Differential activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling during proliferation and differentiation of lens epithelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(10):4400 (2003).
11. McGuire PG, and Orkin RW, A simple procedure to culture and passage endothelial cells from large vessels of small animals, *Biotechniques* 5(6):456 (1987).
12. Bissel DM, et al, Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver, *J. Clin Invest.* 79:801 (1987).
13. Page JL, et al, Gene expression profiling of extracellular matrix as an effector of human hepatocyte phenotype in primary cell culture, *Toxicol Sci* 97(2):384 (2007).
14. Cooley LS, et al, Reversible transdifferentiation of blood vascular endothelial cells to a lymphatic-like phenotype in vitro, *J Cell Sci.* 123(Pt 21):3808 (2010).
15. Li ML, et al, Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84:136 (1987).
16. Barcellof MH, et al, Functional differentiation and aveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane, *Development* 105:223 (1989).
17. Roskelley CD, et al, Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91(26):12378 (1994).
18. Xu R, et al, Extracellular matrix-regulated gene expression requires cooperation of SWI/SNF and transcription factors, *J. Biol. Chem.* 282(20):14992 (2007).
19. Debnath J, et al, Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures, *Methods* 30(3):256 (2003).
20. Muthuswamy SK, et al, ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini, *Nat. Cell Biol.* 3(9):785 (2001).
21. Albini A, et al, A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells, *Cancer Res.* 47:3239 (1987).

22. Poincloux R, et al, Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel, *Proc Natl Acad Sci USA*.108(5):1943 (2011).
23. Madison R, et al, Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and laminin containing gel, *Exp. Neurology* 88:767 (1985).
24. Xu XM, et al, Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord, *J. Comp. Neurol.* 351(1):145 (1994).
25. Lopatina T, et al, Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo, *PLoS One* 6(3):e17899(2011).
26. Kubota Y, et al, Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures, *J. Cell Biol.* 107:1589 (1988).
27. Ponce ML, Tube formation: an in vitro matrigel angiogenesis assay, *Methods Mol Biol.*467:183 (2009).
28. Passaniti A, et al, A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and anti-angiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor, *Lab Invest.* 67:519(1992).
29. Isaji M, et al, Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo, *Br J Pharmacol* 122:1061 (1997).
30. Adini A, et al, Matrigel cytometry: a novel method for quantifying angiogenesis in vivo, *J Immunol Method.* 342(1-2):78 (2009).
31. Albini A, et al, Matrigel promotes retinoblastoma cell growth in vitro and in vivo, *Int. J. Cancer* 52(2):234 (1992).
32. Yue W, and Brodie A, MCF-7 human breast carcinomas in nude mice as a model for evaluating aromatase inhibitors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44(4-6):671 (1993).
33. Angelucci A, et al, Suppression of EGF-R signaling reduces the incidence of prostate cancer metastasis in nude mice, *Endocr-Relat Cancer* 13(1):197 (2006).
34. Moraes RC, et al, Constitutive activation of smoothened (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia, *Development* 134:1231 (2007).
35. Zeng YA, and Nusse R, Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture, *Cell Stem Cell* 6:568 (2010).
36. Jeselsohn R, et al, Cyclin D1 kinase activity is required for the self-renewal of mammary stem and progenitor cells that are targets of MMTV-ErbB2 tumorigenesis, *Cancer Cell* 17:65 (2010).
37. Quintana E, et al, Efficient tumor formation by single human melanoma cells, *Nature* 456:593(2008).