·基础研究·

siRNA 沉默水通道蛋白 5 基因抑制人肝癌细胞的生长作用

郭陶陶[1],韩艳珍[2*],单铁强[3],单铁英[4],聂晓进[5],刘记平[6]

【摘要】**目的** 通过采用小干扰 RNA(siRNA)靶向作用人肝癌细胞 Bel-7402 中的水通道蛋白 5(AQP5)基因,观察其对 Bel-7402 的增殖及凋亡的作用。**方法** 体外孵育 Bel-7402,采用阴性对照 siRNA(siRNA-NC)、siRNA-AQP5#1、siRNA-AQP5#2 转染细胞。实验设置细胞为对照组、siRNA-NC 组、sliRNA-AQP5#1 组、siRNA-AQP5#2 组。噻唑蓝染色检测细胞的增殖能力;流式细胞技术测定细胞的凋亡情况;蛋白免疫印迹技术和 Real time-PCR 测量细胞中 AQP5 蛋白和 mRNA 的含量。**结果** siRNA-NC 组与对照组相比,细胞的增殖、凋亡及 AQP5 蛋白和 mRNA 的含量无明显差异($P>0.05$)。与对照组相比,siRNA-AQP5#1 组、siRNA-AQP5#2 组的细胞的增殖力降低、凋亡率升高、AQP5 蛋白和 mRNA 的含量均降低(均 $P<0.05$)。**结论** siRNA 靶向作用人肝癌细胞 AQP5 基因通过降低其增殖和升高其凋亡率达到抑制癌细胞的生长作用。

【关键词】 小干扰 RNA;水通道蛋白 5;人肝癌细胞;增殖;凋亡

中图分类号:R575 **文献标志码**:A DOI:10.3969/j.issn.1672-2159.2023.04.006

Silencing aquaporin 5 gene by siRNA inhibits the growth of human hepatoma cells

GUO Tao-tao[1], HAN Yan-zhen[2], SHAN Tie-qiang[3], SHAN Tie-ying[4], NIE Xiao-jin[5], LIU Ji-ping[6]*

1. Department of laboratory medicine, Handan second hospital, Handan 056002, Hebei; 2. Department of nursing, Affiliate hospital of Hebei Engineering University, Handan 056002, Hebei; 3. Department of laboratory medicine, Qinhuangdao harbor hospital, Qinhuangdao 066000, Hebei; 4. Medical college, Hebei University of Engineering, Handan 056002, Hebei; 5. Department of thoracic surgery, Handan Central Hospital, Handan 056002, Hebei; 6. Handan Vocational College of science and technology, Handan 056002, Hebei, China

【**Abstract**】**Objective** The small interfering RNA (siRNA) targeting the aquaporin 5 (AQP5) gene in human hepatoma cell Bel-7402 was used, we observe its effects on the proliferation and apoptosis of Bel-7402. **Methods** Bel-7402 was incubated in vitro and transfected with negative control siRNA (siRNA-NC), siRNA-AQP5#1 and siRNA-AQP5#2. The cells were set as control group, siRNA NC group, siRNA-AQP5#1 group and siRNA-AQP5#2 group. The proliferation ability of cells was detected by thiazole blue staining; The apoptosis of cells was measured by flow cytometry; The contents of AQP5 protein and mRNA in cells were measured by Western blot and real time PCR. **Results** The cell proliferation, apoptosis, AQP5 protein and mRNA had not obvious difference between siRNA-NC group and control group ($P>0.05$). Marched with the control group, the proliferation of cells decreased, the apoptosis rate increased, and the contents of AQP5 protein and mRNA decreased in siRNA-AQP5#1 group and siRNA-AQP5#2 group (all $P<0.05$). **Conclusion** siRNA targeting AQP5 gene can inhibit the growth of human hepatoma cells by reducing their proliferation and increasing their apoptosis rate.

【**Key words**】siRNA; AQP5; Human hepatoma cells; Proliferation; Apoptosis

据有关数据统计,在我国的恶性肿瘤中,肝癌(以肝细胞癌为主)的发病率位居第 4 位,在肿瘤相关致死病因的排名中位居第 2 位[1]。因此,从基因、蛋白分子水平探索其发病机制将会为临床治疗此病提供有效的作用靶点,同时也为其精准治疗提供更有利的治疗措施[2]。研究表明,水通道蛋白在肿瘤细胞的增殖、侵袭和凋亡过程中起着关键作用[3-5]。水通道蛋白 5(Aquaporin 5,AQP5)在机体中多种类型的肿瘤组织中表达升高,并与癌细胞的生物学行为关系密切,参与肿瘤的病程进展、侵袭转移及预后[6-7]。但是 AQP5 与肝细胞癌关系的研究还甚为稀少,为此,我们体外孵育人肝癌细胞 Bel-7402,通过采用小干扰 RNA(siRNA)靶向作用人肝癌细胞

作者单位:1 056002 邯郸市第二医院检验科;2 056002 河北工程大学附属医院护理;3 066000 河北省秦皇岛市海港医院检验科;4 056002 河北工程大学医学院;5 056002 邯郸市中心医院胸外科;6 056002 邯郸科技职业学院

通信作者:韩艳珍,E-mal:hanyanzhen.ok@163.com

基金项目:河北省卫健委立项课题(20220653)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Bel-7402 中的水通道蛋白 5(AQP5)基因,观察其对 Bel-7402 的增殖及凋亡的作用。探索 AQP5 在肝细胞癌的病程进展中的作用,为肝细胞癌的临床诊治提供有效的作用靶点。

1　材料与方法

1.1　实验对象及药剂

人肝癌细胞株 Bel-7402 由北京大学医学部组胚教研室赠送, Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司, siRNA-NC、siRNA-AQP5#1、siRNA-AQP5#2 购自南京博研生物,提取 RNA 试剂盒、cDNA 逆转录试剂盒和 RT-PCR 试剂盒源于山东博科生物;AQP5 第一抗体购自 Abcam。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养、转染及分组　按照常规方法将 Bel-7402 置于培养箱中,2d 后细胞移植到 6 孔板中,当细胞的融合度为 60% 时,用无血清的培养液洗涤细胞,按照 Lipofectamine 2000 步骤依次转染 siRNA-NC、siRNA-AQP5,再孵育 2 d 后用于相关实验。合成 siRNA-NC、siRNA-AQP5 的序列为:siRNA-NC:5′-GGUCUCACUCCCCAUAGAGTT-3′。siRNA-AQP5#1: F, 5′-AAAACTCTGCGAACACGGCCCCTGTCTC-3′; R, 5′-AAGGC-CGTGTTCGCAGAGTTCCTGTCTC-3′。siRNA-AQP5 # 2: F, 5′-AAGAGCAGCCAGTGAAGTAGACCTGTCTC-3′; R, 5′-AATCTA-CTTCACTGGCTGCTCCCTGTCTC-3 ′。细胞被设置为对照组、siRNA-NC 组、siRNA-AQP5#1 组及 siRNA-AQP5#2 组。

1.2.2　细胞增殖能力的检测　用酶消化生长培养瓶中的 Bel-7402 细胞,将其分别移植到 96 孔板中,孵育 2 d 时,转染不同的 siRNA 后孵育 24 h、48 h、72 h,向各孔中滴入 10 μL 的噻唑蓝溶液,反应 4 h 后出现结晶物,将每孔的上清液移走,再向各孔中滴入等量的二甲基亚砜,反应 10 min 使结晶充分溶解,将 96 孔板置于酶标仪中在适当的波长下读取每孔中的吸光度值。

1.2.3　细胞凋亡率的检测　转染不同的 siRNA 后孵育 48 h,根据细胞凋亡检测盒的操作方法,用酶消化生长在 6 孔板中的 4 组 Bel-7402 细胞,漂洗 2 次后,用适量的结合缓冲液,再滴加 PI 和 Annexin-V 染液,暗室中反应 15min,放入流式细胞仪中进行 4 组的荧光检测。

1.2.4　细胞内 AQP5 mRNA 含量的检测　转染不同的 siRNA 后孵育 48 h,提取 4 组细胞中的所有 RNA。按照反转录试剂盒的步骤将 RNA 合成为 cDNA。AQP5 及 β-actin 的引物序列如下, AQP5: F,5′-CTATGACCTTCGACATCTG-3′; R, 5′-CTCAGTGCTAGATTGCACTGTCA-3′。β-actin: F, 5′-CGT-CATACTCCTGCTTGCTG-3′; R, 5′-GTACGCCAACACAGTGC-TG-3′。在 PCR 仪中扩增 cDNA,循环程序为:94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 30 s,共循环 35 次。最后分析比较各组的相对值。

1.2.5　细胞内 AQP5 蛋白含量的检测　转染不同的 siRNA 后孵育 48 h,等量的 4 组细胞放置于冰块上,加入裂解液作用 30 min 后,收集裂解物于半径为 6 cm 的离心机中,设置低温下 12 000 rpm 持续 10 min,检测悬浮液中蛋白的浓度,各取 40 μg 的蛋白经热变性后与 10 μL 上样缓冲液混匀,滴入凝胶中的加样孔中,放入电泳槽中分离目标蛋白,再将胶中蛋白转入 PVDF 膜中,膜移至封闭液中 80 min。浸入第一抗体 AQP5(1∶800),置于 4 ℃冰箱中反应过夜,洗膜,浸入第二抗体溶液中(1∶10 000)室温反应 2 h,充分洗膜后,滴加发光混合液进行发光,再置于显影仪中检测其蛋白灰度值。

1.2.6　统计学方法　所得实验数据表示为均数 ± 标均差,采用 SPSS 20.0 统计软件处理,比较多组数据采用单因素方差分析,比较两组数据用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　细胞内 AQP5 mRNA 和蛋白的含量分析

Real time-PCR 和蛋白免疫印迹技术结果显示,siRNA-NC 组与对照组相比,细胞内的 AQP5 mRNA 和蛋白的含量无明显差异($P>0.05$)。与对照组相比,siRNA-AQP5#1 组、siRNA-AQP5#2 组的细胞内的 AQP5 mRNA 和蛋白的含量均降低(均 $P<0.05$),见图 1、表 1。此结果说明我们实验中转染的 siRNA-AQP5 能有效拮抗细胞内 AQP5 mRNA 和蛋白的表达。

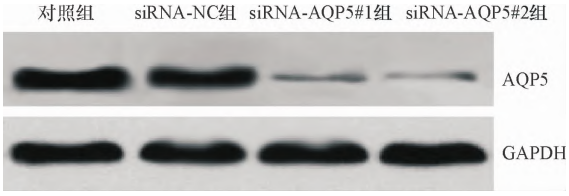

图 1　各组细胞内 AQP5 蛋白灰度的显示　注:AQP5—水通道蛋白 5,GAPDH—甘油醛-3-磷酸脱氢酶

表 1　各组细胞内 AQP5 mRNA 和蛋白的含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AQP5 蛋白	AQP5 mRNA
siRNA-AQP5#1 组	6	0.253 ± 0.009[a]	0.24 ± 0.03[a]
siRNA-AQP5#2 组	6	0.489 ± 0.014[a]	0.51 ± 0.07[a]
siRNA-NC 组	6	1.042 ± 0.037[b]	0.85 ± 0.09[b]
对照组	6	1.139 ± 0.063	1.00 ± 0.00
F 值	-	130.277	31.692
P 值	-	0.000	0.000

注:siRNA—小干扰核糖核酸,AQP5—水通道蛋白 5,[a] 与对照组相比 $P<0.01$,[b] 与对照组相比 $P>0.05$

2.2　细胞增殖能力的分析

采用噻唑蓝法检测各组细胞转染不同的 siRNA 后 24 h、48 h、72 h 的增殖能力,结果显示,siRNA-NC 组与对照组相比,细胞的增殖能力无明显差异($P>0.05$)。与对照组相比,siRNA-AQP5#1 组、siRNA-AQP5#2 组的细胞的增殖能力均降低(均 $P<0.05$),见表 2。

2.2　细胞凋亡率的分析

采用流式细胞仪检测各组细胞转染不同的 siRNA 后 48 h 的凋亡情况,结果显示,siRNA-NC 组与对照组相比,细胞的凋亡率无明显差异($P>0.05$)。与对照组相比,siRNA-AQP5#1 组、siRNA-AQP5#2 组的细胞的凋亡率均升高(均 $P<0.05$),见表 2、图 2。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 各组细胞增殖能力的分析（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	吸光度值			凋亡率
		24 h	48 h	72 h	
siRNA-AQP5#1 组	6	0.5236 ±0.0053[a]	0.5714 ±0.0069[a]	0.7734 ±0.0095[a]	27.52 ±3.76[a]
siRNA-AQP5#2 组	6	0.5342 ±0.0055[a]	0.6177 ±0.0057[a]	0.7651 ±0.0095[a]	23.31 ±3.18[a]
siRNA-NC 组	6	0.6942 ±0.0075[b]	0.9824 ±0.0089[b]	1.4815 ±0.0156[b]	10.09 ±1.60[b]
对照组	6	0.7110 ±0.0081	1.0122 ±0.0141	1.5093 ±0.0192	5.04 ±0.59
F 值	－	224.727	612.350	888.720	16.745
P 值	－	0.000	0.000	0.000	0.000

注：siRNA—小干扰核糖核酸，AQP5—水通道蛋白 5，[a] 与对照组相比 $P<0.05$，[b] 与对照组相比 $P>0.05$

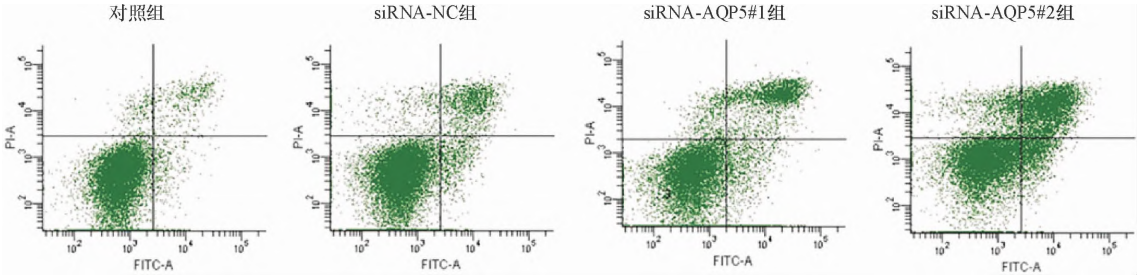

图 2 各组细胞凋亡率的显示 注：siRNA—小干扰核糖核酸，AQP5—水通道蛋白 5

3 讨论

肝细胞癌是一种全球范围最常见的恶性肿瘤，也是一种高死亡率的原发性肝癌[8-9]。由于该病具有早期发病不易发现、发展较快且治疗方法局限等特点，许多患者在此病发展的晚期阶段才被确诊，错过了最佳的手术治疗时期，因此他们的预后较差[10-11]。近年来，医学研究者们比较关注肝细胞癌病程进展的分子生物学机制，运用现代化的分子技术，发现了许多与肝细胞癌病程进展密切相关的生物分子，这对于临床上诊治该病提供了有力的作用靶点[12-13]。

水通道蛋白（AQPs）为镶嵌于细胞膜上的蛋白成分，其上含有孔道，主要是水分子高效和选择性的通道，对维持水在细胞内外的稳态具有重要的调节作用[14-15]。另外也允许其他小分子物质如甘油、尿素等进行跨膜运输。目前发现其有十几种亚型，广泛地分布于机体的各种组织、器官中，并且它们在组织、器官中的定位具有特异性，即不同的组织、器官表达不同的 AQPs[16-17]。由于肿瘤的发生和发展依赖于包括水分子在内的各种代谢过程，因此，AQPs 在肿瘤病程进展中的作用越来越受到重视。已有实验研究表明，AQPs 在不同肿瘤类型中的表达因其组织特异性定位而不同，但是发现其在不同来源的肿瘤细胞中均呈现出高水平表达，并在肿瘤的生物学中发挥关键作用，包括肿瘤相关水肿、肿瘤细胞迁移、肿瘤增殖和肿瘤血管生成等[18-19]。

水通道蛋白 5（AQP-5）AQP 属于 AQPs 中的一个亚型，AQP5 在细胞中高表达可以促进细胞增殖，抑制细胞凋亡，重置细胞周期，促进上皮－间质转化和细胞迁移[20-21]，同时它被证实是一种导致肿瘤恶性转化并促进其恶性进展的关键分子[22-23]。已有研究表明结肠癌细胞中 AQP-5 均表达上调，采用 siRNA 沉默 AQP5 后，细胞的增殖降低、凋亡率升高[24]；在结肠癌分化程度越低的组织中其表达水平越高[25]。这表明 AQP5 过度表达与结肠癌的发展密切相关。我们的实验数据显示，siRNA-NC 组与对照组的肝细胞癌的增殖能力增强、凋亡率降低、AQP5 蛋白和 mRNA 的含量升高。转染 siRNA-AQP5 后的细胞增殖能力降低、凋亡率升高、AQP5 蛋白和 mRNA 的含量均降低。这提示 siRNA 靶向作用人肝癌细胞 AQP5 基因后，通过降低其增殖和升高其凋亡率达到抑制癌细胞的生长作用。至于其借助于何种信号途径，我们将在进一步的实验中继续探索。

参考文献

[1] 黄傲，郭德镇，周俭. 靶向和免疫治疗时代的肝癌转化治疗[J]. 实用肿瘤杂志，2023，38(2)：101-104.

[2] 樊嘉，高强，黄润. 肝癌精准治疗的研究前沿[J]. 中华肝脏病杂志，2020，28(11)：897-900.

[3] 肖刚，崔光彬，等. AQP 磁共振分子成像在肿瘤中的研究进展[J]. 磁共振成像，2019，10(4)：317-320.

[4] 徐佳莹，蒙艳丽，吴秉纯. 水通道蛋白家族与人体多种脏器疾病之间关系的研究进展[J]. 黑龙江中医药，2019，48(2)：188-189.

[5] Abulizi A, Dawuti A, Yang B. Aquaporins in Tumor[J]. Adv Exp Med Biol, 2023, 1398: 303-315.

[6] Jaskiewicz L, Romaszko-Wojtowicz A, Doboszynska A, et al. The Role of Aquaporin 5 (AQP5) in Lung Adenocarcinoma: A Review Article[J]. Cells, 2023, 12(3): 468.

[7] Jang SJ, Moon C. Aquaporin 5 (AQP5) expression in breast cancer and its clinicopathological characteristics[J]. PLoS One, 18(1): e0270752. [2023-01-27]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36706090/ DOI: 10.1371/journal.pone.0270752.

[8] 王宇，李钊颖，李爽，等. 晚期肝细胞癌的免疫疗法研究进展[J]. 中西医结合肝病杂志，2023，33(1)：90-93.

（下转第 436 页）

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by targeting HDAC6[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019,23(3): 1069-1076.

[17] Hu Z, Cai M, Zhang Y, et al. miR-29c-3p inhibits autophagy and cisplatin resistance in ovarian cancer by regulating FOXP1/ATG14 pathway[J]. Cell Cycle, 2020,19(2):193-206.

[18] Han C, Mo K, Jiang L, et al. miR-183-5p promotes proliferation, invasion, and glycolysis of thyroid carcinoma cells by targeting FOXO1[J]. Mol Cell Biochem, 2022,477(4):1195-1206.

[19] Jin L, Luo Y, Zhao YC, et al. MiR-183-5p Promotes Tumor Progression of Osteosarcoma and Predicts Poor Prognosis in Patients [J]. Cancer Manag Res, 2021,13:805-814.

[20] Liu L, Bi N, Wu L, et al. MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by targeting VEGFA in lung adenocarcinoma[J]. Mol Cancer, 2017,16(1):50.

[21] Fan YC, Mei PJ, Chen C, et al. MiR-29c inhibits glioma cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis [J]. J Neurooncol, 2013,115(2):179-188.

[22] Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis [J]. J Intern Med, 2013,273(2):114-127.

[23] Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications[J]. Lancet Oncol, 2001,2(11):667-673.

[24] Zhang Q, Lu S, Li T, et al. ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019;38(1):173.

[25] Wang R, Ma Y, Zhan S, et al. B7-H3 promotes colorectal cancer angiogenesis through activating the NF-kappaB pathway to induce VEGFA expression[J]. Cell Death Dis, 2020,11(1):55.

[26] Yu H, Jiang X, Jiang L, et al. Protocadherin 8 (PCDH8) Inhibits Proliferation, Migration, Invasion, and Angiogenesis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e920665.

[27] Wang XW, Zhang W. Long non-coding RNA cancer susceptibility candidate 2 inhibits the cell proliferation, invasion and angiogenesis of cervical cancer through the MAPK pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019,23(8):3261-3269.

[28] Bausch D, Fritz S, Bolm L, et al. Hedgehog signaling promotes angiogenesis directly and indirectly in pancreatic cancer [J]. Angiogenesis, 2020,23(3):479-492.

[29] Chen QY, Jiao DM, Wu YQ, et al. MiR-206 inhibits HGF-induced epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via c-Met /PI3k/Akt/mTOR pathway[J]. Oncotarget, 2016,7(14):18247-1861.

[30] Xing X, Zhang L, Wen X, et al. PP242 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of gastric cancer through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Anticancer Drugs, 2014,25(10):1129-1140.

(收稿日期:2022-12-25)
(本文编辑:白岚)

(上接第 429 页)

[9] 黄希, 张淑怡, 孔凤瑶, 等. 术后预防性肝动脉化疗栓塞术对 CK19 阳性肝细胞癌患者预后的作用[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2023,15(1):7-12.

[10] 王涛陈, 东风. 肝细胞癌的临床诊治:从指南到临床实践[J]. 临床肝胆病杂志, 2021,37(8):1745-1747.

[11] 刘清泉, 张旭峰, 梁嘉毅, 等. TPX2 作为 c-MYC 下游靶点在肝细胞癌中的作用机制研究[J]. 江西医药, 2021,56(9): 1313-1316 + 1320.

[12] 邵一鸣, 苏力德, 郝睿, 等. 乙型肝炎病毒诱发肝细胞癌分子机制研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 2021,50(1): 113-122.

[13] 徐玉平, 谭荣, 蒋向辉. 基于加权基因共表达网络分析探讨黄芩抗肝细胞癌的相关分子机制[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2022,24(12):4659-4670.

[14] 孙爽, 张歆刚. 水通道蛋白家族在细胞内小溶质转运中的作用研究进展[J]. 人民军医, 2021,64(9):911-914.

[15] 张志平, 邢伟, 陈杰. 磁共振水通道蛋白分子成像机制及研究进展[J]. 放射学实践, 2021,36(8):1064-1068.

[16] 王笑竹, 李浩, 芮钱云, 等. 水通道蛋白家族在神经系统中的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2020,37(5):462-466.

[17] 才丽平, 赵金茹, 林庶茹, 等. 水通道蛋白研究进展[J]. 解剖科学进展, 2003,2003(2):167-170.

[18] 周园园, 李卫国. 水通道蛋白的发现历程及与人类疾病的关系概述[J]. 生物学教学, 2017,42(12):2-3.

[19] 丁婷, 付丽, 马勇杰, 等. 肿瘤与水通道蛋白的关系研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2010,2010(1):133-134.

[20] Direito I, Madeira A, Britor MA, et al. Aquaporin-5: from structure to function and dysfunction in cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2016,73(5):1623-1640.

[21] 王晓彤, 李飞娜, 申晨. 水通道蛋白 5 在免疫调控中的研究进展[J]. 标记免疫分析与临床, 2022,29(10):1777-1783.

[22] Zhang Z, Chen Z, Song Y, et al. Expression of aquaporin 5 increases proliferation and metastasis potential of lung cancer[J]. J Pathol, 2010,221(2):210-220.

[23] 曾悦翔, 文益云, 杨金凤, 等. 右美托咪定对 LPS 诱导大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞 NF-κB 及 AQP-5 表达的影响[J]. 肿瘤药学, 2020,10(2):317-320.

[24] 石晓明, 吴胜春, 唐雷, 等. 沉默 AQP-5 表达对结肠癌细胞株 HT-29 凋亡影响机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015,22(5):349-353.

[25] 石晓明, 吴胜春, 唐雷, 等. 水通道蛋白-5 与多药耐药因子在结肠癌组织中的表达及其关系[J]. 重庆医学, 2015,44(5): 644-646.

(收稿日期:2023-01-11)
(本文编辑:秘文婷)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net