论著

文章编号:1000-5404(2012)01-0070-04

高糖对视网膜色素上皮细胞 Toll 样受体 2 表达的影响

陈雪梅,张学东,宗元娟,沈 强 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科,眼科学重庆市市级重点实验室)

[摘要] **目的** 观察高糖对体外培养的 ARPE-19 细胞 Toll 样受体 2(toll-like receptor 2,TLR2)表达的影响及机制。**方法** 各组 ARPE-19(RPE 细胞系)细胞分别刺激 48 h,正常糖浓度组(5.5 mmol/L D-葡萄糖)、中度高糖组(15.5 mmol/L D-葡萄糖)、高糖组(25.5 mmol/L D-葡萄糖)、PKC-α 抑制剂组(25.5 mmol/L D-葡萄糖加 10 mmol/L Go6976 PKC-α 抑制剂)、高渗对照组(5.5 mmol/L D-葡萄糖加 20 mmol/L 甘露醇)。Western blot 检测各组 ARPE-19 细胞 TLR2 蛋白表达水平,以及 PKC-α 蛋白胞浆向胞膜的转位情况;Real-time PCR 分析各组 ARPE-19 细胞 TLR2 的 mRNA 表达水平。**结果** 与正常糖浓度组相比,高糖组和中度高糖组 TLR2 的 mRNA 和蛋白表达,以及 PKC-α 转位均增加($P<0.05$),并且高糖组高于中度高糖组($P<0.05$)。与高糖组比较,PKC-α 抑制剂组的 TLR2 蛋白表达降低($P<0.05$),PKC-α 蛋白转位显著降低($P<0.01$)。**结论** 高糖可以上调 ARPE-19 细胞 TLR2 的 mRNA 和蛋白表达,刺激 PKC-α 转位;高糖可能是通过 PKC-α 通路上调 ARPE-19 细胞 TLR2 表达。

[关键词] 糖尿病视网膜病变;ARPE-19;Toll 样受体 2;高糖

[中图法分类号] R587.202; R774.102; R362 [文献标志码] A

Effect of high glucose concentration on expression of toll-like receptor-2 in ARPE-19 cells

Chen Xuemei, Zhang Xuedong, Zong Yuanjuan, Shen Qiang (Department of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of different glucose concentrations on expression of toll-like receptor-2 (TLR-2) in ARPE-19 cells. **Methods** ARPE-19 cells were divided into 5.5 mmol/L glucose group, 15.5 mmol/L glucose group, 25.5 mmol/L glucose, 25.5 mmol/L glucose +10 mmol/L Go6976 PKC-α inhibition group, 5.5 mmol/L glucose + 20 mmol/L mannitol control group. Expression level of TLR-2 in ARPE-19 cells and translocation of PKC-α from cytoplasm to cytomembrane were measured by Western blotting, while that of TLR-2 mRNA in ARPE-19 cells was measured by real-time PCR. **Results** The expression level of TLR-2 mRNA and the translocation of PKC-α from cytoplasm to cytomembrane were higher in 25.5 mmol/L glucose group and 15.5 mmol/L glucose group than in control group ($P<0.05$). The expression level of TLR-2 protein and the translocation of PKC-α from cytoplasm to cytomembrane were significantly lower in PKC-α inhibitor inhalation group than in 25.5 mmol/L glucose group ($P<0.01$). **Conclusion** High glucose concentration can up-regulate the expression of TLR2 mRNA in ARPE-19 cells and promote the translocation of PKC-α from cytoplasm to cytomembrane through the PKC-α pathway.

[**Key words**] diabetic retinopathy;ARPE-19;toll-like receptor-2;high glucose concentration

Supported by the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-029). Corresponding author: Zhang Xuedong, Tel: 86-23-89012704, E-mail: zxued@sina.com

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)是一种慢性低度炎症性疾病,病变视网膜的炎症介质表达增加,促炎症因子和炎症细胞在视网膜微血管损伤和新生血管的形成中发挥作用[1]。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial,RPE)细胞能够分泌一系列细胞因子,调节局部免疫反应,对维持稳定的视网膜免疫环境起重要作用。近来陆续发现 DR 中 RPE 细胞在结构和分泌功能上的各种异常,RPE 细胞参与 DR 的炎症反应和新生血管的形成过程[2]。

Toll 样受体 2(toll-like receptor-2,TLR2)[3]是 Toll 样受体家族成员,属固有免疫中的模式识别受体,可以

[基金项目] 重庆市卫生局重点项目(2011-1-029)

[通信作者] 张学东,电话:(023)89012704, E-mail:zxued@sina.com

识别感染性外源配体和非感染性内源危险信号分子,激活的 TLR2 可以上调多种促炎因子的表达,启动或加强炎症反应。这一机制在多种慢性低度炎症性疾病[4-6]和缺血性疾病[7]中发挥作用。本研究观察高糖对体外培养视网膜色素上皮细胞 TLR2 表达的影响和可能的机制,为进一步探讨 TLR2 与 DR 的关系打下基础。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

ARPE-19 细胞(ATCC 公司),特级胎牛血清、胰蛋白酶、DMEM 低糖培养基(Gibco 公司),D-葡萄糖、甘露醇、Go6976(Sigma 公司),anti-TLR2 抗体(Abcam 公司),anti-PKC-α 抗体、anti-GAPDH 抗体、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、细胞膜蛋白抽提试剂盒、Beyo ECL Plus、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(碧云天公司),逆转录试剂盒、定量 PCR 试剂盒、引物(TaKaRa 公司)。

1.2 细胞培养及分组

ARPE-19 用含有 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 U/ml)的 DMEM 培养基(D-葡萄糖浓度:5.5 mmol/L),在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。取第 16 ~ 20 代的 ARPE-19 细胞用于实验。将细胞接种于 6 孔板中培养至细胞铺满板底 80% 左右时,换含有 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 24 h 后,分别用不同糖浓度的无血清 DMEM 培养基刺激 48 h(正常糖浓度组:D-葡萄糖 5.5 mmol/L;中度高糖组:D-葡萄糖 15.5 mmol/L;高糖组:D-葡萄糖 25.5 mmol/L;高渗对照组:D-葡萄糖 5.5 mmol/L + 甘露醇 20.0 mmol/L;PKC-α 抑制剂组:D-葡萄糖 25.5 mmol/L + PKC-α 抑制剂 Go6976 10.0 mmol/L)。

1.3 Real-time PCR 检测高糖对体外培养的 ARPE-19 细胞 TLR2 mRNA 表达的影响

采用 Trizol 一步法分别从各组细胞中提取总 RNA,逆转成 cDNA,采用荧光定量 PCR 分析 TLR2 mRNA 表达水平。引物由 TaKaRa 公司设计并合成,TLR2 引物序列:上游 5′-GTGTTG-CAAGCAGGATCCAAAG-3′,下游 5′-CACAAAGTATGTGGCATT-GTCCAG-3′,扩增长度为 157 bp;内参基因 ACTB 引物序列:上游 5′-TGGCACCCAGCACAATGAA-3′,下游 5′-CTAAGTCAT-AGTC-CGCCTAGAAGCA-3′,扩增长度为 186 bp。Real-time PCR 法扩增:总反应体系为 25 μl,采用两步法进行 PCR 反应,扩增条件:95 ℃预变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 35 个循环。采用 Bio-Rad MiniOpticon(Bio-Rad 公司)进行反应,由 CFX 软件生成扩增曲线和溶解曲线。

1.4 Western blot 检测各组 ARPE-19 细胞 TLR2、细胞总 PKC-α、细胞膜 PKC-α 蛋白的表达

各组 ARPE-19 细胞 PBS 清洗,加入全细胞裂解液吹打裂解,4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,提取细胞的总蛋白,用于检测 TLR2,细胞总 PKC-α。各组 ARPE-19 细胞 PBS 清洗后,加入 200 μl 胞浆蛋白提取液于玻璃匀浆器中冰上匀浆 10 min,4 ℃ 1 000 × g 离心 10 min 弃上清,沉淀加入 100 μl 胞膜蛋白提取液,反复吹打后于 4 ℃ 摇床平缓摇动 1 h,4 ℃ 16 000 × g 离心 20 min,取上清液即为胞膜蛋白成分,用于检测细胞膜 PKC-α。用 BCA 法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液煮沸 5 min。行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转膜 2 h,5% 脱脂奶粉 37 ℃封闭 2 h,一抗(抗 TLR2 抗体以 1∶1 000 稀释,兔来源;抗 PKC-α 抗体以 1∶1 000 稀释,小鼠来源)加到 PVDF 膜上 4 ℃孵育过夜,TBST 清洗。二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG;辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG)加到 PVDF 膜上 37 ℃孵育 1 h,TBST 清洗。ECL 法化学发光,X 线底片曝光显影。以 GAPDH 为内参。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对所有数据进行统计处理,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同糖浓度组和高渗对照组的各组间比较,采用多样本均数间多重比较的方差分析。PKC-α 抑制剂组分别和正常糖浓度组、高糖组比较,采用独立样本 t 检验进行统计分析。

2 结果

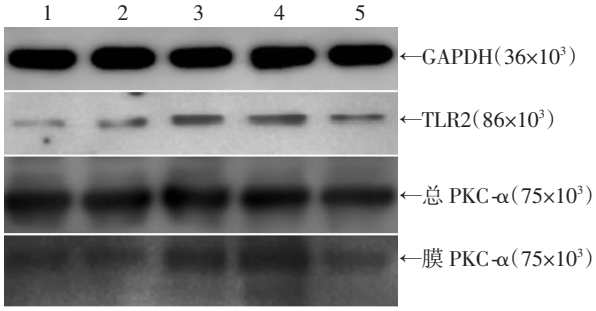
2.1 荧光实时定量 PCR 检测高糖对体外培养的 ARPE-19 细胞 TLR2 mRNA 表达的影响

与正常糖浓度组(0.571 ± 0.153)相比,中度高糖组(1.133 ± 0.069)的 TLR2 mRNA 表达增高($P < 0.05$),高糖组(2.234 ± 0.191)的 TLR2 mRNA 表达显著增高($P < 0.01$),高渗对照组(0.651 ± 0.123)的 TLR2 mRNA 表达无差异;高糖组比中度高糖组的 TLR2 mRNA 表达高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 Western blot 检测各组 ARPE-19 细胞 TLR2、总 PKC-α、膜 PKC-α 蛋白表达水平

与正常糖浓度组相比,中度高糖组的 TLR2 蛋白表达增高($P < 0.05$),高糖组的 TLR2 蛋白表达显著增高($P < 0.01$),高渗对照组 TLR2 蛋白表达无差异;高糖组比中度高糖组的 TLR2 表达高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Go6976 PKC-α 抑制剂组比高糖组的 TLR2 表达降低($P < 0.05$),然而仍然比正常糖浓度组 TLR2 表达高($P < 0.05$)。

各组细胞总的 PKC-α 蛋白表达无统计学差异($P > 0.05$)。与正常糖浓度比,中度高糖组胞膜 PKC-α 蛋白表达增高($P < 0.05$),高糖组胞膜 PKC-α 表达显著增高($P < 0.01$),高渗对照组的胞膜 PKC-α 表达无差异;高糖组比中度高糖度的胞膜 PKC-α 表达高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Go6976 PKC-α 抑制剂组比高糖组的 PKC-α 表达显著降低($P < 0.01$)。见图 1、表 1。



1:正常糖浓度组;2:高渗对照组;3:中度高糖组;4:高糖组;5:PKC-α 抑制剂组

图 1 Western blot 检测各组细胞相关蛋白表达的变化

表1 各组细胞相关蛋白相对表达量的变化($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TLR2	细胞总 PKC-α	细胞膜 PKC-α
正常糖浓度组	1.000±0.177	1.000±0.213	1.000±0.140
高渗对照组	1.030±0.100	1.230±0.238	0.998±0.166
中度高糖组	1.278±0.084[ac]	0.987±0.144	1.367±0.113[ac]
高糖组	1.549±0.132[b]	1.118±0.145	1.720±0.134[b]
PKC-α 抑制剂组	1.196±0.181[ac]	1.103±0.202	0.659±0.136[d]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常糖浓度组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与高糖组比较

3 讨论

糖尿病视网膜病变是眼科常见的致盲性眼病之一,其发病率有增加趋势,其确切的发病机理迄今为止尚不清楚。近年研究证实 DR 是一种慢性低度炎症性疾病,炎症反应以及各种炎症因子参与 DR 发生发展的全过程[1]。视网膜色素上皮细胞是介于神经视网膜和脉络膜之间的一层特殊上皮细胞,构成了外部血视网膜屏障。RPE 的主要功能如下:①转运营养物质,离子和水;②吸收光线,对抗光氧化作用,保护视神经;③参与视黄醛代谢循环;④吞噬脱落的感光细胞外节段;⑤可以分泌各种生长因子和细胞因子。RPE 细胞参与维持正常神经视网膜结构和功能,调节局部免疫反应,参与眼局部的免疫赦免。近来的研究陆续证实 DR 中 RPE 细胞结构和功能发生改变,RPE 细胞参与 DR 炎症反应、新生血管形成以及黄斑水肿的发生发展过程[2]。研究发现,高糖损害 RPE 细胞对水、葡萄糖、视黄醛的转运功能,高糖还会影响 RPE 细胞分泌的炎症因子和生长因子,从而加重 DR 的发生发展[2]。越来越多的人认为 RPE 细胞在 DR 的发病机制中起重要作用。

RPE 表达 TLRs(TLR 1-7、9)[8],ARPE-19 是一种广泛用于实验研究的 RPE 细胞系,本研究发现高糖可以增加 ARPE-19 细胞 TLR2 的 mRNA 和蛋白表达,呈现剂量依赖性,而高渗对照组 ARPE-19 细胞 TLR2 的 mRNA 和蛋白表达无增高,因此排除了高浓度葡萄糖导致渗透压增高对 TLR2 表达的影响。我们推测在糖尿病视网膜病变中,高糖可以上调表达 RPE 细胞 TLR2 的表达。Toll 样受体(toll like receptor,TLR)[3]属固有免疫中的模式识别受体,是参与非特异性免疫的一类重要分子,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁。人类的 TLR 蛋白属于Ⅰ型跨膜蛋白,由胞外区、跨膜段和胞内区 3 部分组成;胞外区由富含亮氨酸的重复序列 LRR(1eucine-rich repeats)组成,胞内区与 IL-1 受体胞内区相似,称为 TIR(Toll/IL-1 receptor)区。迄今,在人类体内发现了 11 种 TLR 家族成员(TLR-1~11)。TLR2[3]是唯一能够与 TLR1 或 TLR6 形成异二聚体的,能够对不同的配体产生反应,TLR2 可以识别各种病原相关分子模式,还可以识别各种内源性的配体,即细胞和组织损伤后释放出的危险信号分子,例如:高速涌动蛋白框 1(high mobility group box 1 proteins,HMGB1)[5]等。研究发现 HMGB1 存在于糖尿病患者的玻璃体中,且增殖性糖尿病视网膜病变患者的增殖膜中也发现有 HMGB1 表达[9]。目前认为 HMGB1 是一种内源性警告素蛋白,具有促炎症、促血管生成作用[10]。高糖上调表达 RPE 细胞 TLR2,RPE 细胞 TLR2 被其配体(HMGB1 等)激活,分泌更多的炎症因子加重糖尿病视网膜病变的炎症损害。HMGB1[10]可以激活 TLR2 信号通路,通过 NF-KB 信号通路上调各种炎症因子的表达,还上调表达 TLR2,形成正反馈作用扩大信号效应。激活 RPE 细胞 TLRs 信号通路,细胞分泌多种促炎症因子和促血管生成因子:IL-6、IL-8、MCP-1 等;还上调表达多种黏附分子 ICAM-1 等[11-13]。Fujimoto 等[14]通过小鼠玻璃体内注射肺炎衣原体,发现肺炎衣原体激活 RPE 细胞 TLR2,上调 VEGF、TNF-α、IL-6 表达,加重实验性脉络膜新生血管的形成,说明 TLR2 与新生血管的形成有内在关系。VEGF 是糖尿病视网膜病变新生血管形成过程中最重要的促血管生成因子,高糖上调 RPE 细胞 TLR2,HMGB1 激活 TLR2 使 RPE 细胞分泌更多的 VEGF,这可能在糖尿病视网膜病变新生血管形成机制中起一定的作用[15]。

二酰甘油-蛋白激酶 C(diacylglycerol-protein kinase-C,DG-PKC)系统的活化是 DR 发病机制中研究最多的一条细胞内信号通路[16-17]。高糖引起的 DAG-PKC 通路激活与糖尿病造成的多种损害有关:内皮细胞损伤、血管渗漏、新生血管形成、细胞增殖和凋亡、基底膜增厚、细胞外基质增生、多种酶活性改变、转录因子的改变等[14]。我们发现 PKC-α 蛋白抑制剂 Go6976 可以部分抑制高糖引起的上调 ARPE-19 细胞 TLR2 表达的作用,说明 PKC-α 信号通路是高糖引起 ARPE-19 细胞 TLR2 表达增高一个重要机制。PKC-α 抑制剂没有完全阻断高糖上调 TLR2 的作用,原因可能是抑制剂没有完全阻断 PKC-α 的作用,也可能是高糖还可以通过其他的途径影响 TLR2 的表达,需要更进一步的研究。并且 Go6976 对 PKC-β 也有一定的抑制作用,不能完全排除高糖通过 PKC-β 途径影响 TLR2 的表达,仍需要进一步研究。本研究发现高糖对 ARPE-19 细胞总 PKC-α 蛋白的表达并无影响,但是高糖组 ARPE-19 细胞膜 PKC-α 蛋白增加,高糖组表达的细胞膜 PKC-α 蛋白比中度高糖组高,呈现一定的剂量依赖性。说明高糖可以激活 PKC-α 蛋白,刺激 PKC-α 蛋白从细胞质向细胞膜转位。高糖刺激 PKC-α 蛋白转位的作用与高糖上调表达 ARPE-19 细胞 TLR2 蛋白的作用,两者的趋势一致,也进一步证明了高糖很可能是通过激活 PKC-α 信号通路来上调 ARPE-19 细胞 TLR2 的表达。Mohan R. 等发现高糖可以通过 PKC-α 途径上调单核巨噬细胞 TLR2 表

达,和我们的研究结果是一致的[18]。

高糖导致 RPE 细胞各种功能的改变,在 DR 中起的作用正受到越来越多的关注。我们的研究发现高糖上调 ARPE-19 细胞 TLR2 的表达,高糖可能是通过 PKC-α 途径影响 ARPE-19 细胞 TLR2 的表达。TLR2 信号通路很有可能参与到 DR 的发病机制中,RPE 细胞表达的 TLR2 识别视网膜释放的内源性危险信号分子,上调促炎症因子、促血管生成因子的表达,加重炎症损伤和血-视网膜屏障的损伤,然而 TLR2 在 DR 中的具体作用仍需要更深入的研究证实。

参考文献:

[1] Adamis A P, Berman A J. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. Semin Immunopathol, 2008, 30(2): 65 – 84.

[2] Simo R, Villarroel M, Corraliza L, *et al*. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 190724.

[3] Tsan M F, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors[J]. J Leukoc Biol, 2004, 76(3): 514 – 519.

[4] Wong F S, Wen L. Toll-like receptors and diabetes[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1150: 123 – 132.

[5] Zozulinska D, Wierusz-Wysocka B. Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2006, 74(2): S12 – S16.

[6] Drexler S K, Foxwell B M. The role of Toll-like receptors in chronic inflammation[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(4): 506 – 518.

[7] Satoh M, Ishikawa Y, Minami Y, *et al*. Role of Toll like receptor signaling pathway in ischemic coronary artery disease[J]. Front Biosci, 2008, 13: 6708 – 6715.

[8] Kumar M V, Nagineni C N, Chin M S, *et al*. Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells[J]. J Neuroimmunol, 2004, 153(1/2): 7 – 15.

[9] El-Asrar A M, Missotten L, Geboes K. Expression of high-mobility groups box-1/receptor for advanced glycation end products/osteopontin/early growth response-1 pathway in proliferative vitreoretinal epiretinal membranes[J]. Mol Vis, 2011, 17: 508 – 518.

[10] van-Beijnum J R, Buurman W A, Griffioen A W. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1)[J]. Angiogenesis, 2008, 11(1): 91 – 99.

[11] Leung K W, Barnstable C J, Tombran-Tink J. Bacterial endotoxin activates retinal pigment epithelial cells and induces their degeneration through IL-6 and IL-8 autocrine signaling[J]. Mol Immunol, 2009, 46(7): 1374 – 1386.

[12] Kaarniranta K, Salminen A. Age-related macular degeneration: activation of innate immunity system via pattern recognition receptors[J]. J Mol Med, 2009, 87(2): 117 – 123.

[13] Ebihara N, Chen L, Tokura T, *et al*. Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelial cells[J]. Ophthalmic Res, 2007, 39(3): 155 – 163.

[14] Fujimoto T, Sonoda K H, Hijioka K, *et al*. Choroidal neovascularization enhanced by Chlamydia pneumoniae *via* Toll-like receptor 2 in the retinal pigment epithelium[J]. Invest Ophthalmal Vis Sci, 2010, 51(9): 4694 – 4702.

[15] 戴超, 卞修武, 史景泉. 诺帝抑制糖尿病大鼠视网膜 VEGF 和 iNOS 的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1232 – 1235.

[16] Alghadyan A A. Diabetic retinopathy--An update[J]. Saudi J Ophthalmol, 2011, 25(2): 99 – 111.

[17] Geraldes P, King G L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications[J]. Circ Res, 2010, 106(8): 1319 – 1331.

[18] Yokoyama T, Yamane K, Minamoto A, *et al*. High glucose concentration induces elevated expression of anti-oxidant and proteolytic enzymes in cultured human retinal pigment epithelial cells[J]. Exp Eye Res, 2006, 83(3): 602 – 609.

(**收稿**:2011-09-18;**修回**:2011-10-24)

(编辑 张 维)

《第三军医大学学报》2012 年第 2 期产前诊断重点号内容预告

产前诊断和宫内治疗的技术进展与展望 …… 梁志清
新生儿中常见的 9 个耳聋基因突变位点筛查分析 …… 胡华梅
染色体倒位对妊娠结局遗传效应的回顾性研究 …… 李 娟
Turner 综合征嵌合体的临床表现和产前诊断的研究 …… 胡 华
产前诊断染色体异常与妊娠结局的临床分析 …… 姚 宏
性染色体异常胎儿畸形形态学特征与临床分析 …… 董艳玲
438 例胎儿和围产儿尸检中先天畸形的临床病理分析 …… 徐承平
中晚孕期超声检查对唐氏综合征的诊断价值 …… 张晓航
65 例胎儿水肿综合征声像图特征的回顾性分析 …… 段灵敏
30 例双胎输血综合征声像图特征的回顾性分析 …… 李 哲
胎儿先天性心脏病与染色体异常的临床分析 …… 阎 萍
53 例轻度侧脑室增宽胎儿临床评估及预后的回顾性分析 …… 严小丽
粘多糖贮积症Ⅱ型的酶学诊断、产前诊断及临床分析 …… 张雪梅