DOI:10.16016/j.1000-5404.201502036

论著

金丝桃素光动力通过抑制 HUVECs 细胞增殖、迁移和管腔形成抑制血管生成

张 倩,李卓恒,李园园,李沉纹,管海燕,崔欢欢,李紫薇,卢来春 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所药剂科)

[摘要] **目的** 探讨金丝桃素光动力(hypericin-photodynamic therapy, HY-PDT)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)增殖、迁移及管腔形成的影响,研究抑制血管生成的作用机制。**方法** 以血卟啉为阳性药,用金丝桃素及血卟啉分别与 HUVECs 避光孵育 24 h 后,给予 585 nm 黄光照射(1.0 J/cm^2),24 h 后采用 MTT 法检测不同浓度 HY 对 HUVECs 细胞增殖的影响,细胞划痕实验观察 HUVECs 迁移情况,Matrigel 实验观察对 HUVECs 细胞管腔形成的作用,qRT-PCR 检测 Smad2 基因 mRNA 的表达,Western blot 检测 $ERK_{1/2}$、p-$ERK_{1/2}$、Smad2 表达变化。**结果** HY-PDT 能够抑制 HUVECs 细胞增殖、迁移及管腔形成;HY-PDT 使 HUVECs 中 $ERK_{1/2}$ 磷酸化比率(p-$ERK_{1/2}$/$ERK_{1/2}$)显著降低($P<0.01$),并显著下调 Smad2 mRNA 及蛋白表达($P<0.01$)。**结论** HY-PDT 通过抑制 $ERK_{1/2}$ 蛋白磷酸化活化、降低 Smad2 mRNA 表达及蛋白水平,使 HUVECs 细胞增殖、迁移管腔形成受到抑制,抑制血管的生成。

[关键词] 金丝桃素;光动力;HUVECs;增殖;迁移;血管生成
[中图法分类号] R282.71; R364.3; R454.2 [文献标志码] A

Hypericin-photodynamic therapy inhibits angiogenesis through inhibiting proliferation, migration and lumen forming in human umbilical vein endothelial cells

Zhang Qian, Li Zhuoheng, Li Yuanyuan, Li Chenwen, Guan Haiyan, Cui Huanhuan, Li Ziwei, Lu Laichun (Department of Pharmacy, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of hypericin-photodynamic therapy (HY-PDT) on the proliferation, migration and lumen forming in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and investigate the underlying mechanism of HY-PDT in anti-angiogenesis. **Methods** HUVECs were incubated in the culture medium containing HY or hematoporphyrin (HP, positive control) for 24 h in the dark, and then were irradiated by a 585 nm light at a dose of 1.0 J/cm^2. After the treatment, the cells were incubated for an additional 24 h in the dark. Cell viability was determined by MTT assay. Cell scratch test was used to determine the migration of HUVECs. Matrigel assay was implemented to detect the effect of HY-PDT on lumen forming. The mRNA expression of Smad2, and the protein levels of $ERK_{1/2}$, p-$ERK_{1/2}$ and Smad2 were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting, respectively. **Results** HY-PDT inhibited the proliferation, migration and lumen forming in HUVECs. The ratio of p-$ERK_{1/2}$/$ERK_{1/2}$ was significantly reduced in HUVECs following HY-PDT ($P<0.01$). Additionally, HY-PDT remarkably decreased the mRNA and protein expression levels of Smad2 ($P<0.01$). **Conclusion** HY-PDT inhibits the proliferation, migration and lumen forming in HUVECs by inhibiting activation of $ERK_{1/2}$ phosphorylation and Smad2 expression at both

[基金项目] 重庆市应用开发计划项目(CSTC2014yykfA110022)
[通信作者] 卢来春,电话:(023)68757098,E-mail: lulab2014@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150421.1015.012.html (2015-04-21)

the transcriptional and translational levels, and thereby leads to inhibition of angiogenesis.

[**Key words**] hypericin; photodynamic therapy; human umbilical vein endothelial cells; proliferation; migration; angiogenesis

Supported by the Project of Application and Development Plan of Chongqing (CSTC2014yykfA110022). Corresponding author: Lu Laichun, Tel: 86-23-68757098, E-mail: lulab2014@126.com

鲜红斑痣(port-wine stains, PWSs)是一种先天性难消退的真皮浅层毛细血管畸形,好发于面颈部。光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是指当光敏剂进入体内后,被特定波长的光照激活而产生的治疗作用,是治疗鲜红斑痣的有效疗法[1-2]。传统光敏剂血卟啉(hematoporphyrin, HP)在体内排泄缓慢,使用后光敏反应持续长,患者需要长时间避光[3-4],给患者的生活和工作带来很多不便。因此,急需开发新的光敏剂。金丝桃素(hypericin, HY)为萘骈二蒽酮类化合物,是贯叶金丝桃中提取的新型天然光敏剂,具有半衰期短、代谢快、光活性强等特点[5-7]。前期研究表明,金丝桃素光动力(hypericin-photodynamic therapy, HY-PDT)对罗曼鸡鸡冠血管(PWSs在体模型)具有明显的抑制作用[8-9],但其作用机制尚不清楚。为此,本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为PWSs体外模型,HP为阳性对照药,考察HY对HUVECs细胞增殖、迁移及管腔形成的影响,探讨其抑制血管形成的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

人脐静脉内皮细胞(HUVECs,美国ATCC公司),金丝桃素(hypericin, HY;成都普瑞法科技开发有限公司,批号081204,纯度99.1%),血卟啉(hematoporphyrin, HP;上海红绿光敏剂研究所,批号20090225),MTT、DMSO(美国Sigma公司),Matrigel基质胶(美国BD公司),胎牛血清、青链双抗、RPMI1640培养基(美国HyClone公司),兔抗鼠$ERK_{1/2}$单克隆抗体(英国Abcam公司),p-$ERK_{1/2}$、Smad2、GAPDH单克隆抗体(美国CST公司),RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、qRT-PCR试剂盒(日本TaKaRa公司),山羊抗兔二抗(北京中杉金桥公司),0.22 μm微孔滤膜(美国Millipore公司);YK-LED-PDT黄光585 nm光动力美容仪(江西新余顺兴科技开发有限公司),酶标仪(美国Molecular Devices公司),qRT-PCR基因扩增仪(瑞士Roche公司,LightCycler96),垂直凝胶电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 溶液的配制

1.2.1 完全培养基 于RPIM1640培养基中加入热灭活胎牛血清(10%)、青链霉素双抗(1%),混匀。

1.2.2 HY溶液配制 精密称取HY于DMSO中完全溶解制得3.2 mmol/L储备液,0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,分装于-20 ℃保存。临用前取出储备液,用完全培养基稀释至0.031 25、0.062 5、0.125 μmol/L。

1.2.3 HP溶液配制 精密称取HP于DMSO中完全溶解制得1.6 mmol/L储备液,0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,分装于-20 ℃保存。临用前取出储备液,用完全培养基稀释至2 μmol/L。

1.3 HUVECs细胞培养及PDT治疗

HUVECs用完全培养基在37 ℃、5% CO_2条件下培养,待其贴壁生长至80%~90%融合时,用0.25%胰酶消化后接种于细胞培养板中。实验分组为光照对照组(Control组)、阳性对照组(HP组)及HY组,细胞过夜贴壁后,加入含药培养基(Control组加入等量完全培养基),避光孵育24 h,给予585 nm黄光照射(光能量:1.0 J/cm^2[10]),光照结束后避光孵育24 h,收集细胞用于后续实验。

1.4 MTT检测细胞增殖情况

用96孔板接种细胞,每组设5个复孔,PDT各组按1.3方法处理细胞,非PDT组细胞处理方法同1.3但不进行585 nm光照。加入5 mg/mL MTT 20 μL/孔,放入37 ℃孵箱继续培养4 h后,吸弃各孔内培养基,加入150 μL DMSO,振荡后酶标仪在波长570 nm处测定各孔光密度值[$D(570)$]。

1.5 划痕实验观察HUVECs迁移情况

实验分为5组:Control组,HP组,HY低、中、高剂量组,每组3个复孔。HUVECs接于6孔板中,每孔约2×10^5个细胞。培养板底部预先做十字形标记。细胞贴壁后,无菌黄色枪头在细胞层上垂直划痕,PBS缓缓冲洗划痕时脱落下的细胞,加入含药低血清培养基(低血清培养基:含1%血清,Control组加入等量低血清培养基),立即进行PDT治疗。于光照后立即、光照后4 h镜下观察细胞迁移情况。

1.6 Matrigel实验观察HUVECs体外成管能力

实验分为5组:Control组,HP组,HY低、中、高剂量组,每组3个复孔。Matrigel基质胶置于4 ℃过夜溶解。次日在冰浴上每孔加入50 μL Matrigel胶包被96孔板,37 ℃放置60 min使其凝固。每孔接种约15 000个细胞(由含5%胎牛血清的RPMI1640培养基作为稀释

液,制得含不同药物浓度重悬细胞,Control 组使用等量5%胎牛血清培养基),立即进行 PDT 治疗。于光照后立即、光照后 4 h 镜下观察各组成管情况。

1.7 qRT-PCR 检测 Smad2 基因 mRNA 的表达

按 1.3 方法处理并收集 HUVECs 细胞,采用 TRIzol 法提取总 RNA,微量检测仪测定 RNA 浓度,计算逆转录 RNA 用量,立即逆转录得到 cDNA;以新合成的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 检测 Smad2 mRNA 水平。Smad2 扩增上游引物序列:5′-CTGGCTCAGTCTGTCAACCA-3′;Smad2 扩增引物下游序列:5′-CTGCCTCCGATATTCTGCTC-3′。内参基因 GAPDH 扩增引物上游序列:5′-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3′;内参基因 GAPDH 扩增引物下游序列:5′-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3′。

1.8 Western blot 检测 $ERK_{1/2}$、p-$ERK_{1/2}$、Smad2 蛋白的表达

按 1.3 方法处理并收集 HUVECs 细胞,提取总蛋白,取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,湿转至 0.22 μm 的 PVDF 膜,6% 脱脂牛奶粉 4 ℃封闭过夜,滴加一抗[$ERK_{1/2}$、p-$ERK_{1/2}$(Thr202/Thr204)按 1∶2 000 稀释;Smad2 按 1∶1 000 稀释;GAPDH 按 1∶15 000 稀释]4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 8 min×4 次,滴加二抗(1∶5 000)37 ℃孵育 1 h,TBST 洗膜 8 min×4 次,ECL 进行显色,GelDoc 凝胶成像仪采集图像,采用 AlphaEaseFC 4.0 软件分析获得各条带灰度值。以目的蛋白/内参蛋白 GAPDH 光密度比值表示蛋白表达量,以光照对照组为 100% 计算各组蛋白相对表达量。

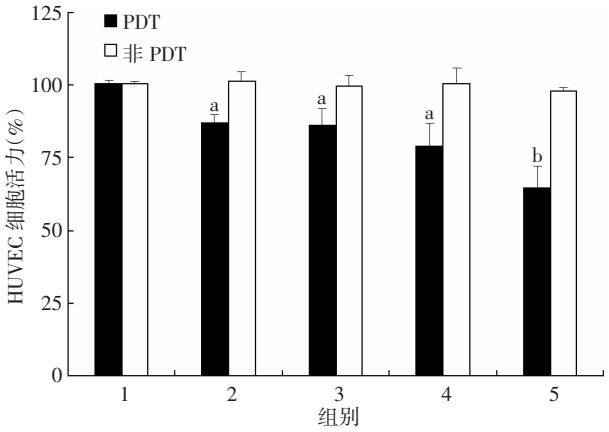
1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 HY-PDT 抑制 HUVECs 细胞增殖

MTT 结果显示(图 1),非 PDT 各组 HUVECs 细胞活力无显著性差异;与同浓度非 PDT 细胞相比,经过 PDT 治疗的 HUVECs 生长受到明显抑制。PDT HP 及 HY 组 HUVECs 细胞增殖受到明显抑制($P<0.05$),当 HY 浓度为 0.125 μmol/L 时抑制作用尤其显著($P<0.01$)。



1:Control 组;2:2 μmol/L HP 组;3:0.031 25 μmol/L HY 组;4:0.062 5 μmol/L HY 组;5:0.125 μmol/L HY 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Control 组比较

图 1 MTT 检测 HY-PDT 抑制 HUVECs 细胞增殖

2.2 HY-PDT 抑制 HUVECs 细胞迁移

如图 2 所示,PDT 治疗 4 h 后,Control 组与 HP 组细胞向划痕处迁移。HY 组细胞迁移则受到抑制,抑制作用具有明显的浓度依赖性,0.125 μmol/L HY 组细胞基本无迁移行为。

2.3 HY-PDT 抑制 HUVECs 细胞管腔形成

如图 3 所示,光照后立即观察各组细胞均均匀分布。光照后 4 h,Control 组与 HP 组形成了完整的闭合管腔样结构,一个个环状结构组成了蜂窝状结构。HY 组随着给药浓度增加,管腔结构逐渐减少并断裂,0.125 μmol/L HY 组基本无完整管腔结构,细胞聚集成团。

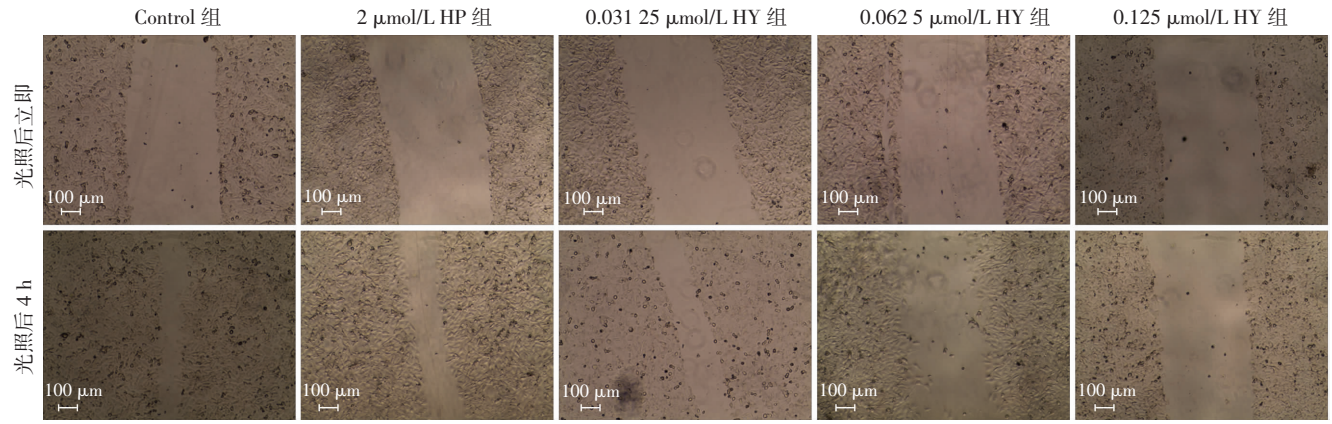


图 2 划痕实验观察 HY-PDT 抑制 HUVECs 细胞迁移

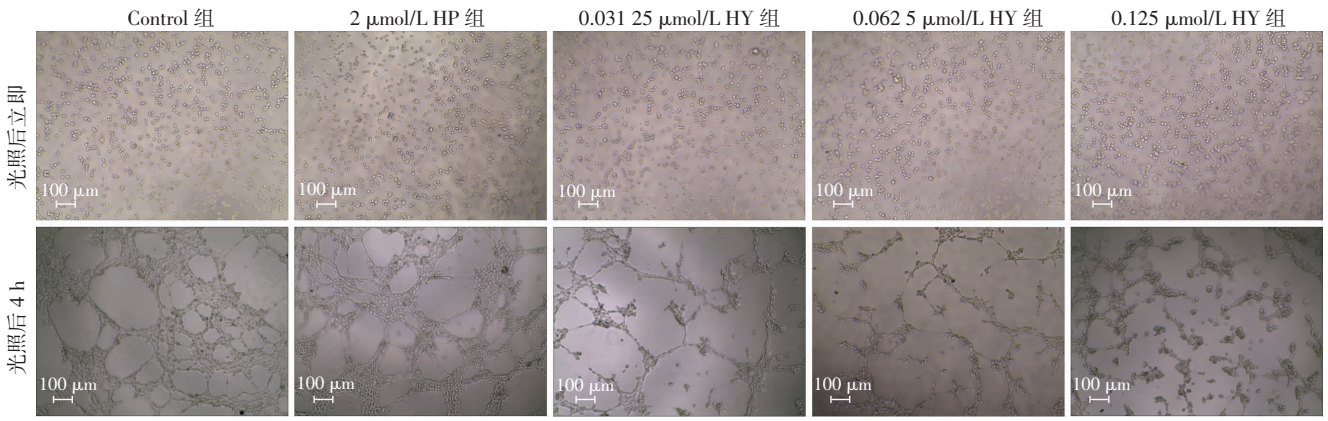
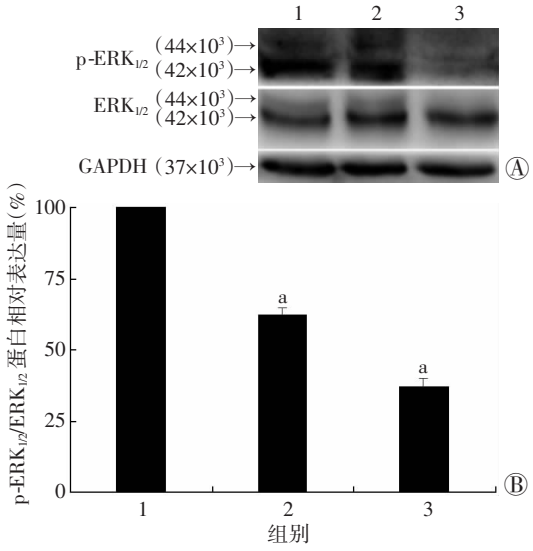


图 3 Matrigel 体外成管实验观察 HY-PDT 抑制 HUVECs 细胞管腔形成

2.4 HY-PDT 抑制 HUVECs $ERK_{1/2}$ 蛋白的磷酸化活化

为了探究 HY-PDT 抑制 HUVECs 细胞增殖的分子机制，Western blot 检测结果显示，Control 组、HP 组、HY 组 $ERK_{1/2}$ 总蛋白表达无差异（图 4A）。与 Control 组相比，HP 组和 HP 组 $ERK_{1/2}$ 的磷酸化水平明显降低（$P<0.01$，图 4B）。这表明 HP-PDT 和 HY-PDT 均能明显抑制 $ERK_{1/2}$ 蛋白的磷酸化激活，并且 HY-PDT 的抑制作用强于 HP-PDT。



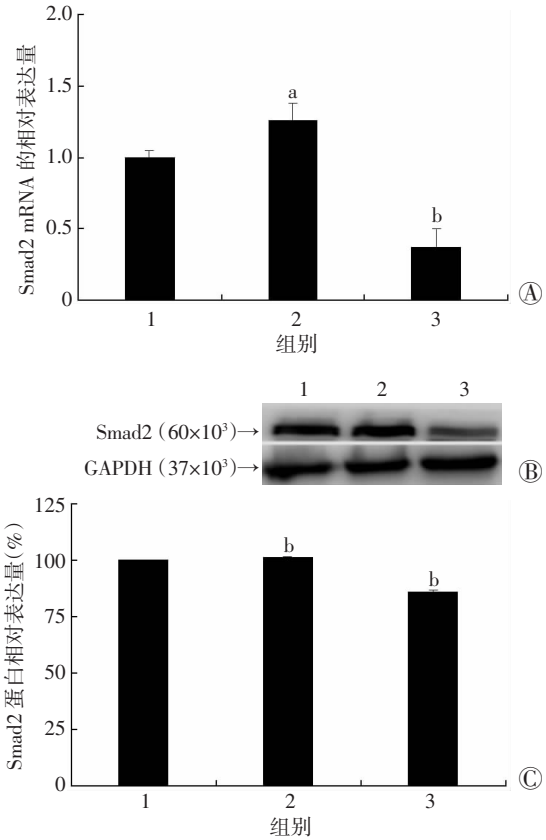
1：Control 组；2：2 μmol/L HP 组；3：0.125 μmol/L HY 组；a：$P<0.01$，与 Control 组比较

A：Western blot 检测 $ERK_{1/2}$ 蛋白的磷酸化水平；B：p-$ERK_{1/2}$/$ERK_{1/2}$ 蛋白相对表达水平

图 4 Western blot 检测 HY-PDT 抑制 HUVECs 中 ERK1/2 蛋白的磷酸化活化

2.5 HY-PDT 抑制 HUVECs 中 Smad2 的表达

为探究 HY-PDT 是否影响 HUVECs 中 Smad2 的表达与激活，qRT-PCR 检测与 Western blot 检测结果分别显示（图 5），与 Control 组比较，HY 组细胞内 Smad2 在 mRNA 和蛋白水平均显著下降（$P<0.01$），而 HP 组细胞内均明显上调（$P<0.05$，$P<0.01$）。这表明 HY-PDT 能明显下调 Smad2 的 mRNA 和蛋白表达，而 HP-PDT 可以增强 Smad2 的 mRNA 和蛋白表达。



1：Control 组；2：2 μmol/L HP 组；3：0.125 μmol/L HY 组；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 Control 组比较

A：qRT-PCR 检测 Smad2 的 mRNA 水平；B：Western blot 检测 Smad2 的蛋白表达水平；C：Smad2 蛋白相对表达水平

图 5 HY-PDT 抑制 HUVECs 中 Smad2 的 mRNA 及蛋白表达

3 讨论

PWSs是一种先天性难消退的真皮浅层毛细血管畸形。PDT是治疗鲜红斑痣的有效疗法。前期研究表明,金丝桃素光动力治疗(HY-PDT)对罗曼鸡鸡冠血管(PWSs在体模型)具有明显的抑制作用[8]。HUVECs是研究血管生成的主要细胞,通过检测血管内皮细胞的增殖、迁移及管腔形成能力来评价药物对血管生成的作用。本研究为探讨HY-PDT抑制血管的作用机制,以HUVECs为PWSs体外模型,HP为阳性对照药,考察其对HUVECs细胞增殖、迁移及管腔形成的影响。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是丝氨酸/苏氨酸激酶,可磷酸化其他细胞质蛋白,并从胞浆移位至细胞核而调节转录因子的活性,是信号从细胞表面传递到细胞核内部的重要传递者,主要介导细胞的增殖和分化等过程[11]。$ERK_{1/2}$信号通路是MAPK信号通路的重要组成部分,$ERK_{1/2}$信号通路可被多种细胞外刺激所活化,从而激活转录因子和其他激酶,介导细胞的增殖和分化等[12-13]。TGF-β/Smad信号通路是介导细胞迁移的重要通路,既往研究表明TGF-β/Smad通路激活,细胞迁移能力增加[14-15]。本研究通过对$ERK_{1/2}$磷酸化水平及Smad2的表达水平的检测,考察HY-PDT是否通过$ERK_{1/2}$信号通路和TGF-β/Smad信号通路对HUVECs细胞增殖及迁移产生影响。

HY-PDT明显抑制HUVECs细胞增殖,抑制作用随着给药浓度的增加而增强。与HP-PDT(HP: 2 μmol/L)相比,HY在较高浓度下(HY: 0.125 μmol/L)表现出较强的抑制作用($P<0.01$,图1),表明HY可能降低用药副作用。值得注意的是,非PDT各组对HUVECs细胞增殖与Control组差异无统计学意义,表明HY在PDT治疗下才能发挥治疗作用。这与文献[16]报道的HY在非光照条件下几乎无生物活性一致。$ERK_{1/2}$对细胞增殖具有重要影响,Western blot检测结果显示,HY-PDT组和HP-PDT组$ERK_{1/2}$总蛋白表达未受影响,但其磷酸化水平均受到明显抑制($P<0.01$,图4),抑制作用HY-PDT明显强于HP-PDT。HY-PDT通过抑制$ERK_{1/2}$磷酸化水平以抑制HUVECs细胞增殖。

HY-PDT抑制HUVECs细胞迁移,抑制作用随着给药浓度的增加而增强。体外划痕实验显示(图2),HY-PDT能够抑制HUVECs细胞迁移,高浓度0.125 μmol/L HY抑制作用表现最强,细胞基本无迁移,而HP-PDT组细胞发生明显迁移。分子水平上,HY-PDT抑制Smad2表达,其抑制作用在mRNA水平与蛋白表达水平一致(图5)。

Smad2对细胞迁移具有重要的影响,HY-PDT能显著抑制Smad2的表达,说明HY-PDT通过抑制Smad2的表达抑制HUVECs细胞迁移。实验结果显示(图2、5),HP-PDT组细胞迁移明显,Smad2的mRNA及蛋白表达增强,说明HP-PDT可能促进细胞迁移。这与Matrigel实验结果一致,即HP-PDT组HUVECs细胞迁移未受抑制,能形成完整的环状蜂窝状结构。

体外血管形成实验是血管内皮细胞在基质胶上形成具有管腔的环状结构,涉及内皮细胞的黏附、迁移、蛋白酶活性和管样形成等多个步骤,十分接近体内血管新生的机制[17]。该方法可用于参与血管形成的基因和信号通路的研究及内皮细胞的鉴定[18]。Matrigel实验中(图3),与Control组所形成的较完整的环状结构相比,HY-PDT组在管腔形成方面受到明显的抑制作用,其抑制作用随着浓度的增加而增强。而HY-PDT组与Control组相同,形成完整的环状结构,其成管未受到抑制。

综上所述,HY-PDT能够抑制$ERK_{1/2}$蛋白磷酸化及Smad2的mRNA与蛋白表达,提示HY-PDT可能通过抑制$ERK_{1/2}$信号通路和TGF-β/Smad信号通路对细胞增殖、迁移产生抑制作用,从而抑制血管的生成。HY-PDT(HY: 0.125 μmol/L)在较低浓度下抑制血管生成的作用明显强于HP-PDT(HP: 2 μmol/L)。这表示HY作为光敏剂在PDT中具有比HP更强的光活性,并以期代替HP进入临床应用。此外,本研究只对HY-PDT抑制血管生成进行了初步的机制研究,在之后的研究中将进行更深入的探讨。

参考文献:

[1] Yuan K H, Li Q, Yu W L, *et al*. Photodynamic therapy in treatment of port wine stain birthmarks--recent progress[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2009, 6(3/4): 189-194.

[2] Yuan K H, Li Q, Yu W L, *et al*. Comparison of photodynamic therapy and pulsed dye laser in patients with port wine stain birthmarks: a retrospective analysis[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2008, 5(1): 50-57.

[3] Bellnier D A, Greco W R, Loewen G M, *et al*. Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizers porfimer sodium (Photofrin), 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-induced protoporphyrin IX

[J]. Lasers Surg Med, 2006, 38(5): 439 – 444.

[4] Zalar G L, Poh-Fitzpatrick M, Krohn D L, *et al*. Induction of drug photosensitization in man after parenteral exposure to hematoporphyrin[J]. Arch Dermatol, 1977, 113(10): 1392 – 1397.

[5] Luksiene Z, de-Witte P A. Hypericin as novel and promising photodynamic therapy tool: studies on intracellular accumulation capacity and growth inhibition efficiency[J]. Medicina (Kaunas), 2002, 39(7): 677 – 682.

[6] Ritz R, Wei H T, Dietz K, *et al*. Photodynamic therapy of malignant glioma with hypericin: comprehensive *in vitro* study in human glioblastoma cell lines[J]. Int J Oncol, 2007, 30(3): 659 – 667.

[7] Brockmoller, Reum J, Bauer T, *et al*. Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans[J]. Pharmacopsychiatry, 1997, 30(Suppl 2): 94 – 101.

[8] 孟德胜, 鲁元刚, 傅若秋, 等. 注射金丝桃素并525 nm激光照射对鲜红斑痣模型罗曼鸡鸡冠的血管损伤作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(10): 1055 – 1058.

[9] Li Z H, Meng D S, Li Y Y, *et al*. Hypericin damages the ectatic capillaries in a Roman cockscomb model and inhibits the growth of human endothelial cells more potently than hematoporphyrin does through induction of apoptosis[J]. Photochem Photobiol, 2014, 90(6): 1368 – 1375.

[10] Garg A D, Krysko D V, Verfaillie T, *et al*. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death[J]. EMBO J, 2012, 31(5): 1062 – 1079.

[11] Marshall C J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation[J]. Cell, 1995, 80(2): 179 – 185.

[12] Pan M R, Chang H C, Hung W C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs suppress the ERK signaling pathway *via* block of Ras/c-Raf interaction and activation of MAP kinase phosphatases[J]. Cell Signal, 2008, 20(6): 1134 – 1141.

[13] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades[J]. Nature, 2001, 410(6824): 37 – 40.

[14] 朱淑珍. IGFBP-rP1在结直肠癌细胞上皮间质转化中的作用及相关机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.

[15] 吴也平. MDM2通过正性调控Smad2信号通路促进EMT的发生及肿瘤细胞的迁移[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.

[16] Kim Y W, Bae S M, Battogtokh G, *et al*. Synergistic antitumor effects of combination of photodynamic therapy and arsenic compound in cervical cancer cells: *in vivo* and *in vitro* studies[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38583.

[17] 高润娣, 曹婕, 卢珊, 等. 小鼠肺微血管内皮细胞的培养鉴定及其血管形成功能的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(1): 186 – 188, 192.

[18] Chen S, Gao X, Sun Y, *et al*. Analysis of HK-2 cells exposed to oxalate and calcium oxalate crystals: proteomic insights into the molecular mechanisms of renal injury and stone formation[J]. Urol Res, 2010, 38(1): 7 – 15.

(**收稿**:2015-02-05;**修回**:2015-03-04)

(编辑 张 维)