DOI:10.16016/j.1000-5404.201607109

大黄素缓解球囊损伤致大鼠颈动脉狭窄及其机制

张耀雷[1],李 昆[1],杨 炯[2],冯亚星[1],黄 伟[3],吴祥云[1],张 彦[2] (610083 成都,成都军区总医院:中心实验室[1],心内科[2],普通外科[3])

[**摘要**] **目的** 观察大黄素对颈动脉狭窄的影响,并对狭窄变化的分子机制进行初步探讨。**方法** 选取 72 只 SD 大鼠(200 g)采用随机数字表法分为 3 组:假手术组($n=24$)、损伤组($n=24$)、大黄素+损伤组($n=24$)。损伤组及大黄素+损伤组利用球囊建立颈动脉狭窄模型;假手术组除无球囊抽拉损伤外其余处理与其他两组一致。术后大黄素+损伤组灌胃大黄素(70 mg/kg);其余两组灌胃等体积溶剂(生理盐水含二甲亚砜)。于第 14 天取下 3 组颈总动脉行 HE 染色;另取第 14 天 3 组颈总动脉行二氧乙啶(dihydroethidium,DHE)测量活性氧(reactive oxygen species,ROS)含量,免疫组化染色检测平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)、Ki67 及 c-myc 表达变化,Western blot 检测 3 组胞浆 MEK1/2、p-MEK1/2、ERK1/2、p-ERK1/2 及核内 c-myc 含量变化。**结果** HE 染色显示颈动脉狭窄模型建立成功,14 d 新生内膜增殖速度为 3 个时间点最快($P<0.01$)。新生内膜成分主要为平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)。与假手术组比较,损伤组 ROS 表达量急剧升高($P<0.01$),大黄素+损伤组显著下调 ROS 水平($P<0.01$)。与损伤组比较,大黄素+损伤组显著下调增殖蛋白 Ki67 表达($P<0.01$),抑制新生内膜中 VSMCs 的增殖($P<0.01$),降低 MAPK-ERK 通路活化($P<0.01$),减少核内 c-myc 活化($P<0.01$)。**结论** 大黄素能够缓解大鼠颈动脉狭窄,其机制可能是大黄素下调 ROS/MAPK/ERK/c-myc 通路活化,降低增殖蛋白 Ki67 表达,从而抑制新生内膜中 VSMCs 的过度增殖。

[**关键词**] 大黄素;活性氧;丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节激酶;大鼠颈动脉狭窄
[**中图法分类号**] R282.71;R543.5;R969 [**文献标志码**] A

Effect and mechanism of emodin on carotid stenosis in rats after balloon injury

Zhang Yaolei[1], Li Kun[1], Yang Jiong[2], Feng Yaxing[1], Huang Wei[3], Wu Xiangyun[1], Zhang Yan[2]([1]Central Laboratory, [2]Department of Cardiology, [3]Department of General Surgery, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the therapeutic effect of emodin on carotid artery stenosis, and explore its underlying mechanism. **Methods** Seventy-two SD rats (200 g) were randomly divided into 3 groups, sham operation group ($n=24$), injury group ($n=24$), and emodin treatment group ($n=24$). For the rats from the injury group and emodin treatment group, the carotid artery stenosis model was established with a balloon catheter (2.0 mm × 12 mm). The sham operation group was in agreement with the other 2 groups except balloon injury. In the emodin treatment group, emodin (70 mg/kg) was given intragastrically, and the other 2 groups were given with the equal-volume of solvents (DMSO in normal saline). In 14 d later, the carotid arteries were isolated from the 3 groups of rats for pathological observation after HE staining, for the content of reactive oxygen species (ROS) by the dihydroethidium (DHE) measurement, and for the expression of α-smooth muscle actin (α-SMA), c-myc and Ki67 by immunohistochemical staining. Western blotting was used to measure the contents of MEK1/2, p-MEK1/2, ERK1/2, p-ERK1/2 and nuclear c-myc in the cell plasma. **Results** HE staining displayed that the model of carotid artery stenosis was successfully

[**通信作者**] 张 彦, E-mail:thiman@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161021.1700.025.html

established, and the hyperplasia of neointimal was significantly fastest in 14 d in comparison with 3 and 7 d ($P<0.01$). The main component of the neointimal was vascular smooth muscle cells (VSMCs). Compared with the sham operation group, the level of ROS was significantly increased in the injury group ($P<0.01$), while emodin treatment obviously reduced the ROS level ($P<0.01$). Compared with the injury group, emodin significantly inhibited the expression of Ki67 ($P<0.01$), reduced the activation of MAPK-ERK pathway and decreased the activation of nuclear c-myc ($P<0.01$). **Conclusion** Emodin alleviates rat carotid artery stenosis, which may be due to its down-regulation the activation ROS/MAPK/ERK/c-myc signal pathway, decrease of Ki67 protein expression, and thus suppresses the excessive proliferation of neointimal VSMCs.

[**Key words**] emodin; reactive oxygen species; MAPK/ERK; carotid artery stenosis, rats

Corresponding author: Zhang Yan, E-mail: thiman@163.com

经皮穿刺腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty,PTCA)术后导致的血管再狭窄是限制冠心病介入术远期疗效的重大难题,即使应用药物涂抹支架,再狭窄发生率仍有10%~20%,大量实验表明平滑肌细胞的过度增殖是再狭窄发生的重要机制[1]。由此,如何有效抑制平滑肌细胞的过度增殖成为当下研究的热点。

大黄素(emodin)作为蒽醌类衍生物因其抗肿瘤、抗病毒、抗炎等作用受到广泛重视[2-3],体外实验证明大黄素能够抑制平滑肌细胞的迁移和增殖[4-5]。有学者利用大黄素涂抹支架成功缓解了再狭窄的发生,但具体机制还不清楚[6]。以往的研究表明活性氧/丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节激酶(reactive oxygen species/motigen-activated protein kinase/extracelluar regulated protein kinase,ROS/MAPK/ERK)通路能够调节平滑肌细胞的迁移和增殖,且在大鼠颈动脉狭窄模型中高表达[7-8],但大黄素是否能通过干预ROS/MAPK/ERK通路抑制颈动脉狭窄发生并不清楚。本研究通过建立大鼠颈动脉狭窄模型,观察大黄素干预下颈动脉狭窄的变化。并检测大黄素干预狭窄过程中是否能够调节ROS/MAPK/ERK通路的活化,以及核内因子c-myc及增殖蛋白Ki67表达量变化,探讨大黄素缓解大鼠颈动脉狭窄的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 72只SD大鼠,体质量为(200±20)g,购自成都达硕生物科技有限公司,实验动物许可证号:SCXK(川)2008-24;雌雄不拘。应用随机数字表法分为假手术组($n=24$)、损伤组($n=24$)及大黄素+损伤组($n=24$)。按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.1.2 实验材料及设备 球囊(2.0 mm×12 mm,Baxter,USA);1、5及10 mL一次性使用无菌注射器(36 mm×0.8 mm,山东威高);显微手术器械(弯镊、直镊、剪刀,镇江新天)。

1.2 主要试剂

大黄素(Sigma,E7881,USA),DMSO(Sigma,D2650,USA),MEK1/2(Abcam,ab-217/221,UK)、p-MEK1/2(Genetex,GTX50860,USA)、ERK1/2(Proteintech,11257-1-AP,USA),p-ERK1/2(Cell Signaling Technology,CST4695P,USA)。

1.3 大鼠颈动脉狭窄模型建立

参照Hua等[9]大鼠颈动脉狭窄模型制作方法,钝性分离暴露左侧颈总动脉,颈外动脉远心端结扎,颈内动脉远心端打活结,动脉夹夹闭颈总动脉近心端。颈外动脉结扎处与颈内、颈外动脉分叉处中间切口,深度为血管横截面1/3到1/2。损伤组及大黄素+损伤组采用球囊(2.0 mm×12 mm)从颈外动脉切口进入颈总动脉近心端,2个大气压扩张球囊,而后缓慢拉回球囊至切口处,来回抽拉3次,结扎切口,打开活结及动脉夹恢复供血;假手术组暴露左侧颈总动脉、夹闭和切口血管与损伤组完全相同,但颈外动脉切口后不作内膜损伤处理(球囊抽拉),直接结扎切口,打开活结恢复供血。术后大黄素+损伤组灌胃大黄素(70 mg/kg);其余两组灌胃等体积溶剂(生理盐水含二甲亚砜)。

1.4 HE染色观察颈动脉形态学变化

选取3组大鼠术后14 d术侧颈总动脉,每组6只,生理盐水迅速冲洗血管内血液,放入10%甲醛溶液过夜。每只取6张石蜡切片(4 μm)行常规HE染色,光学显微镜200×(Leica,DM3000,德国)光镜下观察新生内膜变化,Image-Pro Plus(Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)测量新生内膜、中膜面积。

1.5 免疫组化检测 α-SMA、Ki67 及 c-myc 水平

将包埋的石蜡块,每组 6 个,每个取 6 张石蜡切片(4 μm),常规脱蜡复水,3% H_2O_2 浸泡 10 min 采用酸修复,PBS 洗 2 次,每次 5 min。5% BSA,37 ℃封闭 1 h,anti-α-SMA(博士德,BM0002,中国)1∶800、anti-c-myc(博士德,BA1284-2,中国)1∶100、Ki67(Abcam,ab15580,UK)1∶100,4℃孵育过夜,PBS 洗 2 次,每次 5 min。采用 SABC 染色法。生物素偶联羊抗兔 IgG 二抗 1∶1 000,37℃孵育 30 min,PBS 洗 2 次,每次 5 min。辣根过氧化物酶标记的 SABC(博士德,SA1020,中国),孵育20 min,PBS 洗 2 次,每次 5 min。DAB 统一显色 10 s,苏木精复染核及中性树胶封片,光学显微镜 200×(DM3000,Leica)观察血管 α-SMA、Ki67 及 c-myc 分布,Image-Pro Plus 测量 200×新生内膜面积及 α-SMA 阳性区域面积,计算阳性面积百分比;Image-Pro Plus 测量 200×血管总细胞数,并测量 Ki67 及 c-myc 阳性细胞个数,计算阳性细胞数百分比。

1.6 免疫荧光检测 ROS 水平

选取 3 组大鼠术后 14 d 术侧颈总动脉,每组 6 只,生理盐水迅速冲洗血管内血液,常规冰冻切片,每只取 6 张(8 μm)PBS 洗 2 次,每次 5 min。2% Triton-X100 室温孵育 10 min,PBS 洗 2 次,每次 5 min。5% BSA 37 ℃ 封闭 30 min,将 DHE(碧云天,S0063,中国)终浓度调整为 10 μmol/L,37℃孵育 60 min。PBS 洗 3 次,每次 5 min。荧光显微镜(奥林巴斯,IX81,日本)下波长 488 nm 激发,Image-Pro Plus 采图并计算阳性区域表达比例。

1.7 Westren blot 检测 MAPK-ERK 各因子表达水平

选取 3 组大鼠术后 14 d 术侧颈总动脉,每组 6 只,生理盐水迅速冲洗血管内血液,迅速放入液氮中保存,采用凯基蛋白提取试剂盒提取全蛋白(凯基生物,KGP2100,中国)及胞浆胞核蛋白(凯基生物,KGP150,中国),采用 BCA 法(碧云天,P0006,中国)进行蛋白定量。按 12% 分离胶,5% 浓缩胶;35 mA 恒流电泳;200 mA 转膜恒流湿转;5% 脱脂奶粉(磷酸蛋白用 5% BSA)室温封闭 120 min;一抗:兔抗鼠 MEK1/2、p-MEK1/2、ERK1/2、p-ERK1/2 及 c-myc(博士德,BA1284-2,中国)室温孵育 30 min 后 4 ℃过夜;二抗(Proteintech,SA00001-2,USA)羊抗兔 1∶4 000 室温孵育 1 h;暗室曝光,凝胶成像系统(UVP,EC3300,美国)采集图像并计算各组灰度值。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间采用独立样本 t 检验分析,检测水准 $\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 大黄素减轻颈动脉狭窄

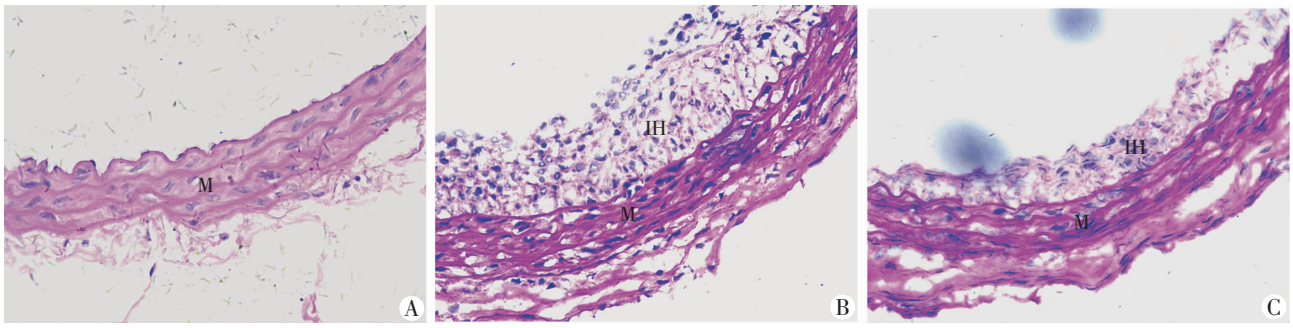
HE 染色观察到相对于损伤组[内膜/中膜(1.33 ± 0.03),大黄素(内膜/中膜)(0.76 ± 0.04)有效缓解了颈动脉新生内膜增殖($P < 0.01$)],3 组颈动脉弹性纤维(中膜内深红色条纹)完整。见图 1。

2.2 大黄素减少狭窄新生内膜中平滑肌细胞增生

免疫组化染色标记 α-SMA(胞浆棕色区域为阳性表达)。结果显示,损伤后新生内膜主要成分为平滑肌细胞。在新生内膜中,与损伤组[阳性面积百分比(23.14 ± 0.81)% 比较,大黄素(阳性面积百分比)(5.34 ± 0.25)% 干预后显著减少了新生内膜中平滑肌细胞的增生($P < 0.01$,图 2)]。

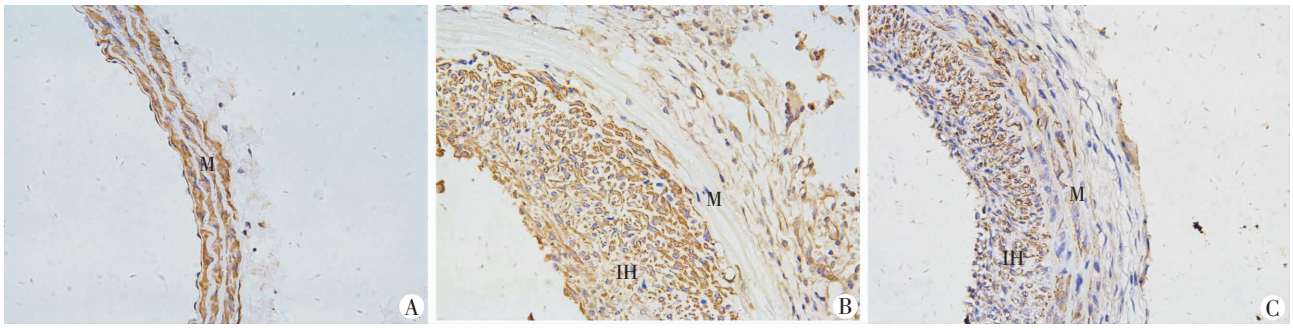
2.3 大黄素下调新生内膜中 ROS 表达

免疫荧光 DHE 染色标记 ROS(红色区域为阳性表达)。结果显示,损伤组较假手术组 ROS 显著升高($P < 0.01$);与损伤组[阳性面积比例:(4.39 ± 0.15)]比较,大黄素[阳性面积比例:(1.72 ± 0.14)显著的下调了 ROS 表达($P < 0.01$)],下调区域主要集中在新生内膜(图 3)。



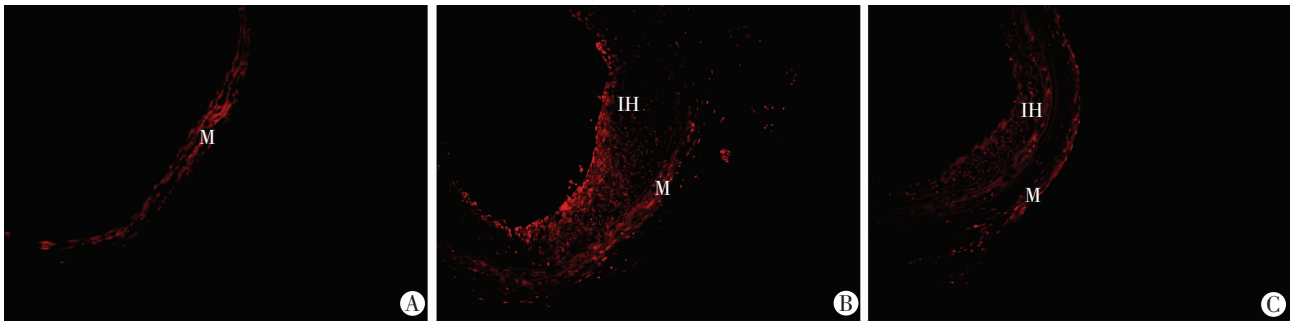
IH:内膜;M:中膜;A:假手术组;B:损伤组;C:大黄素+损伤组

图 1 3 组球囊损伤后大鼠颈动脉病理学变化 (HE ×200)



IH:内膜;M:中膜;A:假手术组;B:损伤组;C:大黄素+损伤组

图2 免疫组化染色检测3组大鼠新生内膜中平滑肌细胞成分比例 (SABC ×200)



IH:内膜;M:中膜;A:假手术组;B:损伤组;C:大黄素+损伤组

图3 免疫荧光检测3组大鼠颈动脉ROS表达含量 (×200)

2.4 大黄素减少增殖蛋白Ki67表达

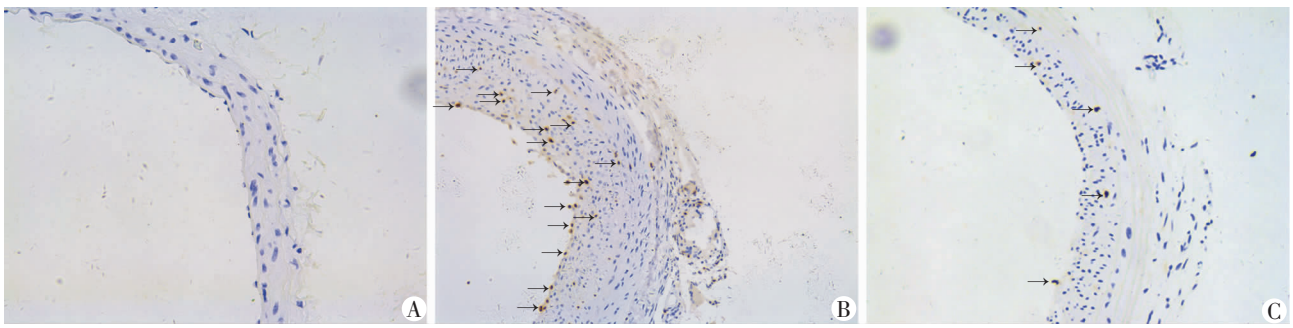
免疫组化染色标记细胞增殖蛋白Ki67(胞核棕色区域为阳性表达)。结果显示,在新生内膜中,损伤组大量表达Ki67[阳性细胞数百分比:(4.48±0.20)%],大黄素+损伤组[阳性细胞数百分比:(1.37±0.05)%]相对于损伤组能够显著减少Ki67表达($P<0.01$,图4)。

2.5 大黄素阻止MAPK-ERK通路活化

Western blot检测增殖通路MAPK-ERK因子变化。结果显示,与损伤组比较,大黄素降低了p-MEK1/2、p-ERK1/2表达($P<0.05$),而对MEK1/2及ERK1/2的表达量无显著影响(图5)。

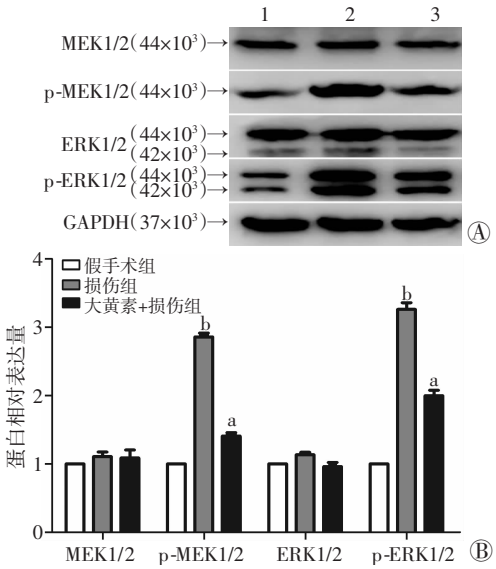
2.6 大黄素减少核内转录因子c-myc表达

免疫组化(胞核棕色区域为阳性表达)及Western blot检测结果一致:损伤组与假手术组相比,核内大量c-myc活化($P<0.01$);相对于损伤组[阳性细胞数百分比:(16.09±0.53)%],大黄素[阳性细胞数百分比:(6.77±0.23)%]能够显著的减少核内c-myc活化发挥作用($P<0.01$,图6、7)。



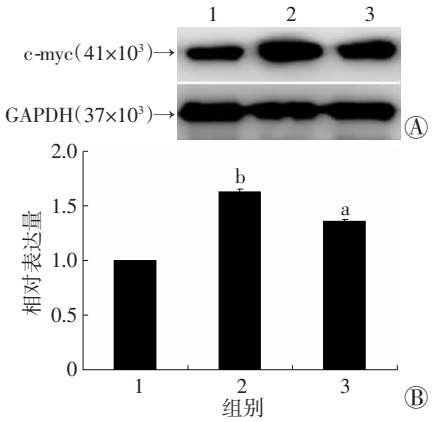
↑:Ki67阳性表达细胞区域;IH:内膜;M:中膜;A:假手术组;B:损伤组;C:大黄素+损伤组;D:半定量分析结果

图4 免疫组化检测3组大鼠颈动脉Ki67表达含量 (SABC ×200)



1:假手术组;2:损伤组;3:大黄素+损伤组;A:Western blot检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与大黄素+损伤组及假手术组比较

图5 Western blot检测3组大鼠颈动脉MAPK/ERK通路各因子变化



1:假手术组;2:损伤组;3:大黄素+损伤组;A: Western blot检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与大黄素+损伤组及假手术组比较

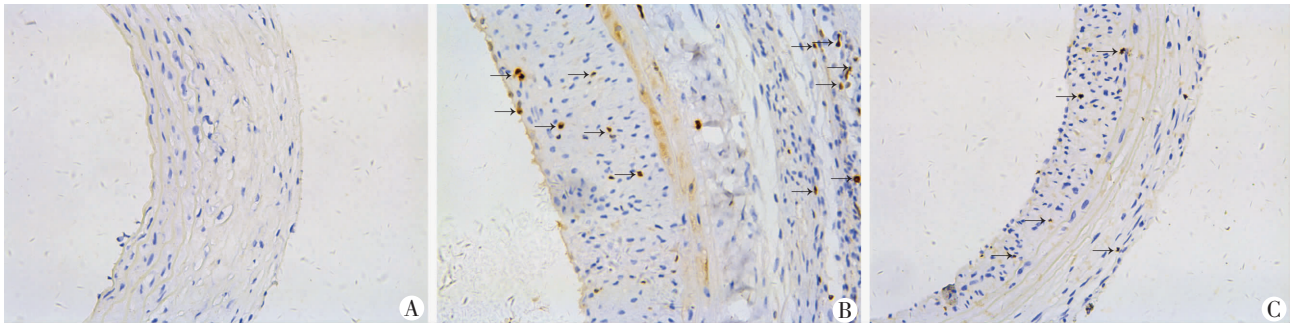
图7 Western blot检测3组大鼠颈动脉中核内因子c-myc含量变化

3 讨论

PTCA致血管内皮损伤后内膜增生的进程包括内皮损伤、炎性细胞浸润和炎症反应、血管外膜成纤维细胞迁移至内膜,其中平滑肌细胞由中膜迁移至内膜并过度增殖是新生内膜形成的重要部分[10]。因此,寻找一种能有效抑制平滑肌细胞过度增殖的药物损伤致血管内膜增生具有重要意义。

大黄素学名"1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌",分子式为C15H1005。Guo等[11]体外实验结果提示大黄素能够有效地抑制VSMCs的增殖和迁移,但调节的通路还不清楚。体外实验结果显示大黄素抑制VSMCs增殖的过程中能够显著的下调平滑肌细胞ROS表达[12],ROS能够通过激活MAPKs家族(ERK、p38MAPK、JNKs)调节平滑肌细胞增殖、迁移、炎症等功能。本实验验证了大黄素对血管的保护作用,HE及免疫组化染色显示,相对于损伤组,大黄素能够显著的抑制新生内膜中VSMCs的增殖,增殖蛋白Ki67在大黄素+损伤组中显著下调。免疫荧光结果显示,内膜损伤产生大量的ROS,大黄素能显著下调新生内膜中ROS的表达,本研究发现大黄素可能通过下调ROS表达发挥抑制VSMCs增殖的作用。

MAPK/ERK通路与细胞生长、发育、增殖、分化等生理过程密切相关[13]。有学者发现大黄素能够通过MAPK/ERK通路抑制肿瘤细胞的迁移和增殖[14-15],生长因子以磷酸化的形式激活ERK1/2后,形成经典的RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2信号通路,该通路在肿瘤的发生、发展具有重要的作用[16]。但大黄素下调ROS后是否通过介导阻止MAPK/ERK通路活化,抑制过度增殖的VSMCs并不清楚。本研究Western blot检测结果显示:大黄素处理后MAPK-ERK通路中MER1/2及ERK1/2的磷酸化被显著抑制,提示大黄素阻止MAPK-ERK通路活化进而抑制新生内膜中



↑:示c-myc阳性表达区域 A:假手术组;B:损伤组;C:大黄素+损伤组

图6 免疫组化观察3组大鼠颈动脉中核内因子c-myc含量变化 (SABC ×200)

VSMCs 的过度增殖,但 ERK1/2 入核后,引起的核内增殖相关转录因子变化还不清楚。实验利用 Western blot 检测及免疫组化染色观察到,与损伤组比较,大黄素能够显著阻止核内 c-myc 的活化。c-myc 是多个生理、病理生理(细胞增殖、炎症发生、发展)的核内下游分子,尤其是在氧化应激介导的细胞 MAPK/ERK 通路调节增殖具有重要的作用[17-18]。结果显示大黄素能够抑制核内因子 c-myc 表达进而抑制 VSMCs 增殖。

综上所述,球囊损伤致内膜增殖,成功的建立颈动脉狭窄模型,大黄素能够显著的抑制新生内膜中 VSMCs 的过度增殖,从而缓解大鼠颈动脉损伤后新生内膜的形成。其机制可能是通过下调 ROS 表达,下调增殖通路 MAPK-ERK 活化,减少通路下游核内转录因子 c-myc 表达,同时降低增殖蛋白 Ki67 表达,缓解了颈动脉狭窄的发生。本研究为扩展大黄素干预颈动脉狭窄作用的认识提供了新的实验依据。

参考文献:

[1] Lv L, Liang W, Ye M, *et al*. Thrombospondin-4 ablation reduces macrophage recruitment in adipose tissue and neointima and suppresses injury-induced restenosis in mice[J]. Atherosclerosis, 2016, 247: 70-77. DOI:10.1016/j.athero sclerosis.2016.02.005

[2] Shrimali D, Shanmugam M K, Kumar A P, *et al*. Targeted abrogation of diverse signal transduction cascades by emodin for the treatment of inflammatory disorders and cancer[J]. Cancer Lett, 2013, 341(2): 139-149. DOI:10.1016/ j.canlet. 2013.08.023

[3] Lee W, Ku S K, Lee D, *et al*. Emodin-6-O-β-D-glucoside inhibits high-glucose-induced vascular inflammation[J]. Inflammation, 2014, 37(2): 306-313. DOI: 10.1007/s10753-013-9741-9

[4] Wang S, Liu Y, Fan F, *et al*. Inhibitory effects of emodin on the proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cell-induced by angiotensin II[J]. Phytother Res, 2008, 22(2): 247-251. DOI:10.1002/ptr.2301

[5] Heo S K, Yun H J, Park W H, *et al*. Emodin inhibits TNF-alpha-induced human aortic smooth-muscle cell proliferation *via* caspase- and mitochondrial-dependent apoptosis[J]. J Cell Biochem, 2008, 105(1): 70-80. DOI:10.1002/jcb.21805

[6] 赵燕超, 龚飞荣, 葛均波, 等. 大黄素洗脱可降解涂层支架的制作及其体内外实验研究[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2008, 34(2): 242-246.

[7] Svineng G, Ravuri C, Rikardsen O, *et al*. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function[J]. Connect Tissue Res, 2008, 49(3): 197-202. DOI:10.1080/03008200802143166

[8] Taniyama Y, Griendling K K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms[J]. Hypertension, 2003, 42(6): 1075-1081. DOI:10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F

[9] Hua J Y, He Y Z, Xu Y, *et al*. Emodin prevents intima thickness *via* Wnt4/Dvl-1/β-catenin signaling pathway mediated by miR-126 in balloon-injured carotid artery rats[J]. Exp Mol Med, 2015, 47: e170. DOI:10.1038/emm.2015.36

[10] Bauters C, Meurice T, Hamon M, *et al*. Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice[J]. Cardiovasc Res, 1996, 31(6): 835-846. DOI:10.1016/ s0008-6363(96)00038-7

[11] Guo D, Xu C, Chen Y. A study on the effect of emodin on smooth muscle cell proliferation[J]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 1996, 35(3): 157-159.

[12] 李志刚, 王章阳, 刘松青. 大黄素对家兔离体主动脉平滑肌细胞增殖影响的可能途径[J]. 中国临床康复, 2005, 9(26): 134-135.

[13] Ye X, Hemida M G, Qiu Y, *et al*. MiR-126 promotes coxsackievirus replication by mediating cross-talk of ERK1/2 and Wnt/β-catenin signal pathways[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(23): 4631-4644. DOI:10.1007/s00018-013-1411-4

[14] Chambard J C, Lefloch R, Pouysségur J, *et al*. ERK implication in cell cycle regulation[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(8): 1299-1310. DOI:10.1016/j.bbamcr.2006.11.010

[15] Ding D, Li L, Song Y, *et al*. MAPK-ERK1/2 signaling pathway regulates osteogenic gene expression in rat osteoblasts *in vitro*[J]. Journal of Southern Medical University, 2013, 33(10): 1432-1436.

[16] 夏启松, 刘静维, 孙仁宇, 等. 大黄素对人肺腺癌 A549 细胞体外增殖凋亡及 VEGF 和 TNF-α 分泌的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(4): 387-391.

[17] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. Science, 2002, 298(5600): 1911-1912. DOI:10.1126/science. 1072682

[18] Lu J, Luo Q, Cheng P, *et al*. The role of matrine and mitogen-ativated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signal transduction in the inhibition of the proliferation and migration of human umbilical veins endothelial cells induced by lung cancer cells[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi. 2009; 12(7): 747-752. DOI: 10.3779/ j.issn.1009-3419.2009.07.002

(**收稿**:2016-07-16;**修回**:2016-09-21)

(编辑 郭建秀)