DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.004
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
1802 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)20-1802-04

SOCS3基因转染对低氧条件下大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖的影响

白 莉[1],余祖滨[2],钱桂生[1],李淑萍[1],关 崧[1] (第三军医大学新桥医院:[1]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,[2]胸外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨SOCS3基因对低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖的影响。方法 以脂质体为载体将pEFSOCS3和pSV2neo共转染至体外培养的PASMCs,应用RT-PCR和免疫细胞化学法测定转染前后细胞中SOCS3 mRNA和蛋白表达。低氧处理PASMCs,采用Western blot法检测转染前后常氧(N)、低氧6 h(H6)、低氧12 h(H12)PASMCs中STAT3蛋白酪氨酸磷酸化水平变化;流式细胞仪、^{3}H-TdR掺入法检测转染前后各时相点细胞增殖情况。结果 RT-PCR和免疫细胞化学证实转染后细胞中有SOCS3mRNA和蛋白稳定表达;与同时相对照组(包括未转染组和转染空载体组)相比,SOCS3基因转染组细胞中STAT3蛋白酪氨酸磷酸化水平显著下降($P<0.01$);流式细胞仪分析显示SOCS3基因转染组细胞各时相点G_0/G_1期细胞比例显著增多($P<0.01$),S+G_2/M期细胞比例显著减少($P<0.01$);SOCS3基因转染组细胞在常氧和低氧条件下^{3}H-TdR掺入量显著低于同时相点对照组细胞($P<0.01$)。结论 SOCS3蛋白可能通过降低STAT3酪氨酸磷酸化水平抑制PASMCs增殖。

关键词:低氧;细胞因子;信号传导;肺动脉;平滑肌细胞;增殖
中图法分类号:R322.121;R329.28;R394.2 文献标识码:A

Effects of transfected SOCS3 gene on proliferation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells under hypoxia

BAI Li[1], YU Zu-bin[2], QIAN Gui-sheng[1], LI Shu-ping[1], GUAN Song[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, [2]Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effects of transfected SOCS3 gene on the proliferation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) under hypoxia. Methods PASMCs were cotransfected with pEFSOCS3 and pSV2neo by liposome method. The expressions of SOCS3 mRNA and protein were detected by RT-PCR and immunocytochemistry, respectively. Tyrosine-phosphorylated Stat3 level was measured by Western blotting. Flow cytometric DNA analysis and 3H-TdR incorporation was used to detect the cell proliferation. Results The SOCS3 expression was confirmed by RT-PCR and Western blotting in PASMCs transfected with SOCS3 gene, respectively. Compared with that in the control group (non-transfected and pEF and psv2neo cotransfected A549) at the same hour under hypoxia, tyrosine-phosphorylated STAT3 level decreased greatly in PASMCs transfected with SOCS3 gene ($P<0.01$); the cells in PASMCs transfected with SOCS3 gene at G_1/G_0 phase increased and those at $G_2/M+S$ phase decreased significantly under nomoxia and hypoxia ($P<0.01$). ^{3}H-TdR incorporation in PASMCs transfected with SOCS3 gene was significantly lower than that in the control group under nomoxia and hypoxia ($P<0.01$). Conclusion SOCS3 protein may inhibit the proliferation of PASMCs by down-regulating the tyrosine-phosphorylated level of STAT3 protein.

Key words: hypoxia; cytokine; signal transduction; pulmonary artery; smooth muscle cell; proliferation

研究表明,多种细胞因子在低氧肺动脉高压形成过程中介导肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs)异常增殖,上述物质与其受体结合后,受体形成寡聚体,并激活受体酪氨酸激酶或胞浆内游离酪氨酸激酶,最终把信号传到核内,激活相应基因的表达从而发挥其生物学效应。1997年以来,相继被发现的细胞因子信号转导负调控因子(suppressors of cytokine signaling, SOCSs)家族,参与负性调节多种细胞因子介导的细胞内信号通路。这一家族包括CIS和SOCS1~7 8种亚型,目前发现其中SOCS1和SOCS3在体内分布较为广泛[1]。本研究将SOCS3基因真核表达载体转染体外培养的大鼠PASMCs,观察低氧条件下转染前后细胞内STAT3酪氨酸磷酸化水平及细胞增殖情况的变化,为进一步探讨与血管平滑肌细胞增殖相关疾病的信号转导机制提供理论基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970329)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970329)
作者简介:白 莉(1975-),女,山西省晋城市人,博士,主治医师,主要从事缺氧肺动脉平滑肌细胞增殖方面的研究。电话:(023)68774603
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603
收稿日期:2003-11-04;修回日期:2004-02-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　主要试剂

pEFSOCS3 真核表达载体和 pEF 载体由澳大利亚 Melbourne 大学 Dr. Douglas J. Hilton 博士惠赠。pSV2neo 筛选质粒由美国 New Mexico 大学 Dr. Jac Nickoloff 博士惠赠。Lipofectamine 2000 脂质体(Invitrogen 公司)。^{3}H-TdR(中国科学院上海原子核研究所)。羊抗大鼠 SOCS3 多克隆抗体、兔抗大鼠 anti-pTyr705-STAT3 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记马抗兔抗体 IgG(Santa Cruz 公司)。α-SM actin 单克隆抗体和 S-P 免疫组化试剂盒(北京中山公司), 其余试剂为国产分析纯。

1.2　PASMCs 培养

取体质量 150~200 g 2 只成年 Wistar 大鼠, 购自第三军医大学实验动物中心。10%乌拉坦腹腔注射麻醉后, 无菌条件下开胸取出肺动脉干和左右肺动脉, 组织块法培养 PASMCs, 培养液为含 10%胎牛血清 DMEM, 用 0.25%胰酶将细胞消化传代, 取第 4、5 代细胞用于实验, 按 S-P 试剂盒说明书进行 α-SM actin 免疫细胞化学染色鉴定。

1.3　实验分组与基因转染

实验分为以下 3 组: ① pEFSOCS3 和 pSV2neo 共转染组(PSN); ② 未转染组(P); ③ pEF 和 pSV2neo 空载体共转染组(PN), 后两者为对照组。低氧前后分 3 个时相点: 常氧(21% O_2)(N)和低氧(3% O_2)6 h(H6)、12 h(H12)。进行各指标检测前用含 0.4%小牛血清的 DMEM 培养基静息 48 h。按 lipofectamine 2000 说明书进行转染, 150 μg/ml G418 筛选, 经 2 周后形成阳性克隆, 扩增培养备用。

1.4　逆转录聚合酶链式反应检测 SOCS3mRNA 水平的表达

Tripure 试剂盒提取总 RNA。取 2 μg 总 RNA 进行逆转录后各取 5 μl 行 PCR 反应, β-actin 为内参照。SOCS3 引物: 上游: 5′-CCA AGA ACC TAC GCA TCA A-3′; 下游: 5′-GGA GTC CAG GTG ACC GTT G-3′; 产物长度为 341 bp。β-actin 引物: 上游: 5′-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3′; 下游: 5′-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3′; 产物长度为 587 bp。反应条件为: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 40 s, 58 ℃ 50 s, 72 ℃ 90 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。循环完成后, 取 10 μl PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳、照相。

1.5　免疫细胞化学法检测 SOCS3 蛋白表达

取出盖玻片上用于免疫细胞化学的各组细胞, 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 次, 4%多聚甲醛固定 30 min; 按 S-P 免疫组化试剂盒说明书进行。

1.6　酪氨酸磷酸化 STAT3(pTyr 705-STAT3)蛋白的检测

取生长在 100 ml 培养瓶中各时相点细胞, 弃培养液, 0.01 mol/L PBS 液清洗, 0 ℃ 500 μl 细胞裂解液(50 mmol/L pH 8.0 Tris·HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.02%叠氮钠, 100 g/L 苯甲基磺酰氟, 1 mg/L aprotinin, 1%Triton)裂解细胞, 15~30 min 后, 用细胞刮收获细胞, 于 4 ℃离心(12 000 r/min)10 min, 取上清用紫外分光光度计进行蛋白定量, 取 40 μg 总蛋白选择 8%分离胶和 5%浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 完毕后将蛋白质电转印(15 V, 1 mA, 50 min)至 PVDF 膜, 加封闭液(5%脱脂奶粉, 0.05% Tween-20, TBS 溶解)封闭 1 h, 加封闭液 1∶1 000 稀释的兔抗 STAT3 磷酸化抗体 37 ℃孵育 1 h, 4 ℃过夜后, 含 0.05% Tween-20 TBS 洗膜 3× 5 min, 然后加 HRP 标记的二抗(封闭液稀释至 1∶1 000)孵育 2 h, 于含 0.05% Tween-20 TBS 洗膜 3× 5 min, 再用 TBS 洗膜 5 min, 将膜至 DAB 显色, 直至洗出清晰条带。结果扫描存盘, AlphaImager 2200 图像分析系统测定杂交带的吸光度(A)。

1.7　流式细胞仪检测细胞周期变化

胰蛋白酶消化液消化细胞呈悬浮状, HBSS 液冲洗 2 次, 离心(1 000 r/min), 弃上清, 沉淀用少量 HBSS 液反复吹散成单一细胞, 将单细胞悬液滴入 4 ℃预冷的 70%乙醇中固定 12 h 以上, 加 RNA 酶 37 ℃反应 30 min, 冰浴终止反应, 碘化丙啶 4 ℃闭光染色 30 min, 在 300 目尼龙网过滤后用流式细胞仪以 480 nmol/L 的红色荧光测定 1 万个细胞的 DNA 含量和 G_1/G_0、S 及 G_2/M 各期的细胞比例。

1.8　^{3}H-TdR 掺入检测

计数细胞数, 调整细胞浓度为 2×10^4/ml。分别取 P 组、PN 组、PSN 组细胞各 1 ml 接种于 96 孔培养板, 每组设 3 个重复孔。培养 24 h 后, 每孔加入 1 μCi ^{3}H-TdR(1 μCi/孔), 继续培养 6 h 后弃培养基, 冷 PBS 液终止掺入, 加入 0.25% 胰酶消化细胞, 使之脱离孔壁, 用多头细胞样品收集器收集细胞于玻璃纤维膜上, 生理盐水冲洗 3 次, 然后用 10%三氯乙酸固定, 无水乙醇脱色, 80 ℃干烤 30 min, 放入闪烁液中, 于液体闪烁计数仪计数(counts/min, cpm)。

1.9　统计学处理

计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行双因素方差分析及均数间多重比较。

2　结果

2.1　转染鉴定

2.1.1　RT-PCR 检测 SOCS3mRNA 表达　　结果显示, 仅在 PSN 组检测到 341 bp 的 SOCS3 扩增产物和 587 bp 的β-actin 扩增产物。

2.1.2　免疫细胞化学检测 SOCS3 蛋白表达　　经 150 μg/ml G418 筛选的 PSN 组细胞胞浆内可见棕黄色阳性颗粒, 说明胞浆中有 SOCS3 蛋白表达; 对照组 P 和 PN 组细胞无阳性染色。见图 1。



图 1　转染 pEFSOCS3 PASMCs SOCS3 免疫细胞化学结果　(S-P× 200)

Fig 1　Immunocytochemical staining of SOCS3 in pEFSOCS3 transfected PASMCs　(S-P× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 转染后酪氨酸磷酸化STAT3(pTyr705-STAT3)蛋白的表达

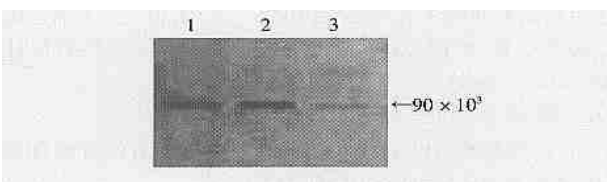
pTyr705-STAT3蛋白分子量为90×10^3。Western blot结果显示,常氧条件下P、PN、PSN组未检测到pTyr705-STAT3蛋白表达。P组和PN组于低氧6 h pTyr 705-STAT3蛋白表达量显著高于同组低氧12 h($P<0.01$)。与P组和PN组相比,PSN组低氧6、12 h pTyr705-STAT3蛋白表达量显著降低($P<0.01$),且PSN组pTyr705-STAT3蛋白表达量在低氧6、12 h无显著变化($P>0.05$),见表1,图2。

表1 低氧条件下转染SOCS3基因的PASMCs中STAT3酪氨酸磷酸化水平的变化($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of tyrosine-phosphorylated STAT3 level of PASMCs transfected with SOCS3 gene under hypoxia ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Time exposed to hypoxia	P	PN	PSN
H6	250.34±19.32	222.23±16.91	87.38±5.90 **
H12	140.67±17.67 ##	152.23±15.76 ##	76.53±6.78 **

$F_t=91.275$, $P=0.000$; $F_G=120.168$, $P=0.000$. **: $P<0.01$, *vs* P group at the same hour; ##: $P<0.01$, *vs* the same group at 6 h



1: P group; 2: PN group; 3: PSN group

图2 转染pEFSOCS3 PASMCs中STAT3酪氨酸磷酸化水平的变化

Fig 2 Changes of tyrosine-phosphorylated STAT3 level in PEFSOCS3 transfected PASMCs

2.3 细胞周期的变化

流式细胞分析显示常氧培养时,PN组与P组G_0/G_1期、S+G_2/M期细胞比例相差无显著性($P>0.05$),PSN组G_0/G_1期细胞比例显著高于PN组和P组($P<0.01$),S+G_2/M期细胞比例显著低于PN与P组($P<0.01$)。低氧培养时,与同时相点PN和P组相比,PSN组G_0/G_1期细胞比例显著增多,S+G_2/M期细胞比例显著减少($P<0.01$)。与PSN常氧组相比,PSN组G_0/G_1期细胞比例在低氧各时相点显著减少,S+G_2/M期细胞比例显著增多($P<0.01$),见表2。

表2 低氧条件下SOCS3基因转染的PASMCs细胞周期变化

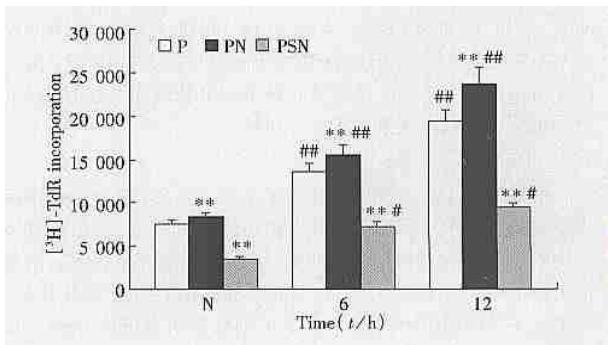
Tab 2 Changes of cell cycles of PASMCs transfected with SOCS3 gene under hypoxia

Time	Cycle(%)	P	PN	PSN
N	G_0/G_1	63.00	61.90	81.80 **
	S+G_2/M	37.00	38.10	18.20 **
H6	G_0/G_1	52.80 ##	51.90 ##	79.54 **##
	S+G_2/M	47.20 ##	48.10 ##	21.46 **##
H12	G_0/G_1	46.70 ##	45.80 ##	76.35 **##
	S+G_2/M	53.30 ##	54.20 ##	23.65 **##

**: $P<0.01$, *vs* P group; ##: $P<0.01$, *vs* N in the same group

2.4 ^{3}H-TdR掺入测定结果

常氧培养时,PN与P组^{3}H-TdR掺入量无显著差异($P>0.05$);与前二者相比,PSN组^{3}H-TdR掺入量显著降低($P<0.01$)。与PN和P组相比,PSN组在低氧各时相点^{3}H-TdR掺入量显著降低($P<0.01$);与PSN常氧组相比,PSN组低氧各时相点^{3}H-TdR掺入量显著增高($P<0.05$),见图3。



**: $P<0.01$, *vs* P group at the same hour; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* N in the same group

图3 SOCS3蛋白对低氧条件下大鼠PASMCs ^{3}H-TdR掺入的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Fig 3 Effects of SOCS3 on ^{3}H-TdR incorporation of rat PASMCs under hypoxia ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

细胞因子及其受体支持一系列广泛的生理功能,尽管它们在不同细胞中的作用不同,但均与各种细胞存活、增殖与分化过程密切相关。细胞因子与细胞因子受体介导的细胞内信号传递依赖酪氨酸激酶以及细胞内特定蛋白质的磷酸化在细胞因子诱导的细胞特异性应答中起着关键作用。

PASMCs增殖是低氧肺血管重建的主要病理生理基础。近年来随着细胞信号转导研究的进展,信号转导及转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STATs)介导的信号通路在肺血管重建过程PASMCs增殖中所起的作用受到广泛关注[2,3]。研究表明,在受损伤的动脉中膜和新生膜中JAK2、STAT3表达升高[3];α1-AT拮抗剂可诱导PASMCs JAK2、TYK2、STAT1酪氨酸磷酸化从而介导PASMCs肥大[4];Ang Ⅱ刺激血管平滑肌细胞内JAK2、TYK2过度活化,在迅速激活STAT后,STAT1,STAT2和p48形成干扰素刺激基因因子3,入核与特定DNA基序结合,刺激c-fos等立早期生长反应基因的转录[5]。我所研究发现低氧刺激体外培养的PASMCs中STAT3,5基因的表达[6]。提示血管平滑肌细胞中STATs信号转导途径的异常活化在血管性疾病如肺血管重建、高血压的发病机制中起重要作用。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

SOCS 家族是 JAK/STATs 途径的负性调节因子, 包括 CIS 和 SOCS1 ~ 7, 结构相似, 由 N 区、中央区 SH2 结构域和 C 端的 SOCS box 盒组成。细胞因子通过 STATs 信号途径诱导 SOCS 基因表达, 其表达产物 SOCS 通过以下机制负性调控细胞因子介导 JAK/STATs 通路, 构成一负反馈环路[7]。此外, SOCS 蛋白还可以作用于其他信号分子的磷酸化过程发挥负调节作用, 因此 SOCS 可能在维持细胞因子信号网络的平衡中占有重要地位。

SOCS3 是 SOCS 家族主要成员之一, 表达较为广泛, 分子量在 30×10^3 左右, 生理条件下基本检测不到其表达, 但多种细胞因子、生长因子等可诱导 SOCS 在 15 ~ 30 min 内迅速合成, 短期内可发生降解[1]。我所研究发现, 体外培养的 PASMCs 中检测不到 SOCS3 表达, 在低氧(3%)刺激 2 h 后 SOCS3 表达增高, 6 h 达高峰, 10 h 减弱, 24 h 消失(有关结论待发表)。本研究利用共转染方式将 pEFSOCS3 真核表达载体和 pSV2neo 筛选质粒导入 PASMCs, 实验过程中, 我们对转染程序进行了优化筛选, 确定目的基因质粒和筛选基因质粒的最佳比例(3∶1), 成功的将二者导入细胞内, 获得外源基因的高效表达, 并建立了稳定表达细胞系。PSN 组与对照组比较, SOCS3 蛋白可有效抑制 STAT 3 酪氨酸磷酸化活性, 与文献[8]报道相符; 流式细胞仪、^{3}H-TdR 掺入实验结果表明细胞增殖明显受到抑制。这一结果说明, SOCS3 蛋白可能通过抑制 STAT 3 酪氨酸磷酸化过程, 达到抑制缺氧 PASMCs 细胞增殖的作用, 这就为低氧肺动脉高压的治疗提供了一个新的思路和策略。但对于 SOCS3 蛋白抑制 STAT 3 活性又是通过何种下游途径来调节细胞的增殖活性, 还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Starr R, Willson T A, Viney E M, *et al*. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling[J]. Nature, 1997, 387(6636): 917－921.

[2] Vignais M L, Sadowski H B, Watling D, *et al*. PDGF induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(4): 1759－1769.

[3] Seki Y, Kai H, Shibata R, *et al*. Role of the JAK/STAT pathway in rat carotid artery remodeling after vascular injury[J]. Circ Res, 2000, 87(1): 12－18.

[4] Cui T, Nakagami H, Iwai M, *et al*. ATRAP, novel AT1 receptor associated protein, enhances internalization of AT1 receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(30): 938－941.

[5] Venema R C, Venema V J, Eaton D C, *et al*. Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 1 is regulated by Janus-activated kinase 2 and Fyn kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1[J]. J Biol Chem, 1998, 273(46): 30795－30800.

[6] 钱　频, 王关嵩, 蒙伟宗, 等. 低氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞表达信号转导及转录激活因子基因表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(2): 107－109.

[7] 白　莉, 钱桂生, 王关嵩. 细胞因子信号转导负调控因子家族[J]. 生命的化学, 2002, 22(5): 448－451.

[8] Suzuki R, Sakamoto H, Yasukawa H, *et al*. CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells[J]. Oncogene, 1998, 17(17): 2271－2278.

(编辑　陈聪连)

(上接 1798 页)

少量大小不等的灰白色沉着物, 大的呈羊脂状, 房水中偶见浮游物, 闪光弱阳性, 瞳孔轻度开大, 眼压中度升高(40~ 60 mmHg), 眼压升高与自觉症状不成正比。每次发作一般持续 3~ 5 d, 偶有延续数月者, 间歇期眼压正常, 视功能不受影响。本例患者发病年龄大, 与文献[1]报道的青睫综合征合并闭角型青光眼一致。由于就诊时有慢性闭角型青光眼的症状, 结合慢闭青病史, 早期未考虑青睫综合征。随着病情进展, 典型炎症体征出现, 故此诊断, 且抗炎治疗显效进一步证明了青睫综合征的诊断。

青睫综合征发病机制不明。一般认为眼压升高是由于房水生成增多和房水流畅系数下降所致。实验研究证明发作时房水中前列腺素含量显著增加, 导致房水生成增加; 同时由于前列腺素增加还可抑制交感神经末梢释放去甲肾上腺素或直接拮抗去甲肾上腺素的生物效应, 而去甲肾上腺素是调节房水排出的重要介质, 小梁失去正常的调节而导致房水流畅系数下降和眼压升高。Hirose 等[3]检测 1 组青睫综合征病人的 HLA-Bw54, 阳性率为 41%, 所以他们认为免疫因素在该病的发病机制中起着重要作用。

针对青睫综合征已知的发病机制, 治疗原则是在急性发作期集中使用糖皮质激素和非皮质激素类消炎药控制炎症, 点β受体阻滞剂, 口服碳酸酐酶抑制剂降眼压。因手术不能阻止复发, 且手术可能激发炎症复发, 故不主张手术治疗。合并原发性开角型青光眼的, 为防止原发性青光眼损伤视功能, 可于发作缓解期作抗青光眼手术控制原发性青光眼。

根据典型临床表现, 青睫综合征的诊断并不困难。可能国外原发性青光眼以开角型青光眼为主, 所以闭角型青光眼合并青睫综合征的病例少见报道。而国内原发性闭角型青光眼的发病率远高于开角型青光眼, 并且青睫综合征的临床症状与闭角型青光眼有相似之处, 诊断时应提高警惕, 勿漏诊合并有闭角型青光眼的青睫综合征。治疗上避免盲目手术, 确实有损视功能的闭角型青光眼, 可在青睫综合征发作间歇期行周边虹膜切除术或小梁切除术。

关键词: 青光眼-睫状体炎综合征; 原发性闭角型青光眼
中图法分类号:　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 尹金福, 吴玲玲. 青光眼睫状体炎综合征合并原发性闭角型青光眼[J]. 实用眼科杂志, 1993, 11(8): 491－492.

[2] 刘家琦, 李凤鸣. 实用眼科学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 448.

[3] Hirose S, Ohno S, Matsuda H. HLA-Bw54 and glaucomatocyclitic crisis [M]. Arch Ophthalmol, 1985, 103(12): 1837－1839.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net