

## 线粒体解偶联蛋白 2 在京尼平促进肾癌细胞抑制作用中的研究

杨永安<sup>1</sup>, 谷江<sup>1\*</sup>, 张永春<sup>1</sup>, 王楠<sup>1</sup>, 朱致晖<sup>1</sup>, 杨清涛<sup>1</sup>, 祝庆亮<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 贵阳医学院附属医院泌尿外科, 贵州 贵阳 550004; <sup>2</sup> 江都人民医院泌尿外科, 江苏 扬州 225200)

**[摘要]** 目的:探讨京尼平(Genipin)对肾癌是否有治疗作用,该治疗作用是否与线粒体解偶联蛋白 2(UCP2)相关。方法:将 0、40、80 和 120  $\mu\text{mol/L}$  4 种浓度的 Genipin 溶液分别浸染肾癌细胞 48 h, MTT 法和流式细胞术检测细胞的增殖和凋亡情况;聚合酶链反应和 ELISA 方法检测 UCP2 的基因和蛋白表达;使用荧光探针检测细胞内钙离子和活性氧分子(ROS)含量。结果:Genipin 在中、高剂量组能明显抑制肾癌细胞的增殖并促进细胞的凋亡,随着给药浓度的增加,细胞增殖抑制作用及细胞凋亡率逐渐增高( $P < 0.005$ )。Genipin 能抑制肾癌细胞中 UCP2 的表达,在中、高剂量给药组,UCP2 的基因及蛋白的表达显著抑制( $P < 0.05$ )。Genipin 能提高细胞内钙离子和 ROS 的含量,在中、高剂量给药组出现了显著提高( $P < 0.05$ )。结论:Genipin 能明显抑制肾癌细胞的增殖,促进其凋亡,UCP2 可能参与其作用机制。

**[关键词]** 线粒体解偶联蛋白 2;京尼平;肾癌细胞株

**[中图分类号]** R737.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)04-444-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130405

## The effect of mitochondrial uncoupling protein 2 on suppression of genipin on renal cell carcinoma

Yang Yong'an<sup>1</sup>, Gu Jiang<sup>1\*</sup>, Zhang Yongchun<sup>1</sup>, Wang Nan<sup>1</sup>, Zhu Zhihui<sup>1</sup>, Yang Qingtao<sup>1</sup>, Zhu Qingliang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Urologic Surgery, Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang 550004; <sup>2</sup>Department of Urologic Surgery, Jiangdu People's Hospital, Yangzhou 225200, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the therapeutic effect of genipin on renal cell carcinoma, and the relationship of UCP2. **Methods:** Renal carcinoma cells were treated with different concentrations (0, 40, 80, 120  $\mu\text{mol/L}$ ) of genipin. Cell growth inhibition and apoptosis were detected by assay of MTT and flow cytometry. Expression of UCP2 was detected by PCR and ELISA. Contents of ROS and  $\text{Ca}^{2+}$  were tested by fluorescence probe. **Results:** Genipin significantly suppressed the growth and promoted apoptosis rate of renal carcinoma cells, statistical significance were found in 80 and 120  $\mu\text{mol/L}$  groups. Expression of UCP2 was significantly increased in 80 and 120  $\mu\text{mol/L}$  groups. Genipin improved contents of ROS and  $\text{Ca}^{2+}$ , and statistical significance were found in 80 and 120  $\mu\text{mol/L}$  groups also. **Conclusion:** Genipin can suppress renal carcinoma cells growth, and UCP2 may be involved in its mechanism.

**[Key words]** UCP2; genipin; renal cell carcinoma strain

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 444-448]

晚期肾癌对放、化疗均不敏感,其发病率逐年升高<sup>[1]</sup>。目前,免疫<sup>[2]</sup>和靶向<sup>[3]</sup>治疗是转移性肾癌的主要处理手段,但其临床疗效尚不能令人满意<sup>[4]</sup>,且存

在一定的不良反应<sup>[5]</sup>。近年来,中医药在癌症治疗中的作用日益受到重视,而线粒体除作为细胞的能量来源外,已发现其参与肿瘤发生发展在内的多种病理生理过程<sup>[6]</sup>。因此,从线粒体层面对肾癌的发病机制进行研究,找到对肾癌具有治疗作用的中药单药就显得较为重要。线粒体解偶联蛋白 2(UCP2)定位于线粒体内膜,可通过改变细胞内钙离子和 ROS 含量影响肿瘤生长<sup>[7]</sup>,而 UCP2 的特异性阻断剂京尼平(Genipin)主要存在于梔子、杜仲等我国的多产植

**[基金项目]** 贵州省科技厅社会攻关计划项目(黔科合 sy 字[2011]3060);贵阳市科技计划项目(筑科合同[2011]103 26 号)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: gj0851@yahoo.com.cn

物中,其本身就对肿瘤有抑制作用<sup>[8]</sup>。目前尚无 Genipin 对肿瘤细胞作用机理的研究报道,本研究使用不同剂量 Genipin 干预肾癌细胞(GRC-1),观察细胞生长情况和 UCP2 的表达,并结合细胞内钙离子、ROS 含量的改变探讨 Genipin 对肾癌的治疗作用及 UCP2 是否参与其治疗机制中。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人类肾癌细胞(GRC-1)购自上海弗雷堡生物公司,Genipin 购自临川之信生物科技有限公司,提纯于茜草科 Rubiaceae 植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实,分子式: $C_{11}H_{14}O_5$ ,CAS 号 6902-77-8,本品为白色结晶粉末(纯度 $\geq 98\%$ )溶于二甲基亚砜,避光 4℃保存。MTT 购自美国 Sigma 公司,RIMP 1640 购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,逆转试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,PCR MasterMix 购自美国 Fermentas 公司,UCP2 Elisa 试剂盒购自美国 R&D 公司。 $Ca^{2+}$ 荧光探针及活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞干预及分组

GRC-1 于 5%CO<sub>2</sub>、37℃条件下培养,培养基为含有 10%胎牛血清和 1%青霉素、链霉素的 RPMI 1640 培养基。细胞种板后,汇合度达 70%~80%后更换无血清培养基,分别使用低、中、高 3 种浓度(40、80、120 μmol/L)的 Genipin 浸染细胞培养基对 GRC-1 进行干预,相应称为低、中、高剂量组。

#### 1.2.2 MTT 法检测 Genipin 对细胞生长的作用

细胞接种于 96 孔板中,10<sup>4</sup> 个/孔,培养 24 h 后用含高、中、低 3 种浓度 Genipin 的无血清培养基进行干预,每组复孔 5 个,干预时间为 48 h。小心吸取孔内培养基,每孔加入 80 μl 无血清培养基和 20 μl MTT 溶液(5 μg/L),继续培养 4 h。小心吸取孔内液体,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜,与摇床上震荡 10 min,待蓝紫色结晶充分溶解后,用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度值,并根据公式计算:细胞抑制率(%)=[(对照组-调零孔)-(干预组-调零孔)]/(对照组-调零孔 OD 值)×100%。

#### 1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞在 Genipin 干预 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化后离心收集细胞,每样本细胞数约为 2.5 × 10<sup>6</sup> 个,弃去培养基,使用 PBS 洗涤细胞 2 次,分别依次加入 500 μl Binding buffer、5 μl Annexin V-FITC、

5 μl Propidium Iodide 混匀,室温避光反应 15 min 后,使用流式细胞仪进行检测。

#### 1.2.4 RT-PCR 检测细胞 UCP2 及 Caspase 3 mRNA 的表达量

使用总 RNA 提取试剂盒提取 GRC-1 细胞总 RNA,使用分光光度计和凝胶电泳检测 RNA 的浓度与完整性,取 1 μg 进行逆转,合成 cDNA。引物序列:β-actin:正向:5'-CCCTGGACTTCGAGCAAGAGAT-3',反向:5'-ATAGGTGACGAACATCACCACG-3',退火温度 53℃;UCP2:正向:5'-GACCTATGACCTCATCAAGG-3',反向:5'-GTTTTCTGCGCAAGT-TAGG-3',退火温度 56℃;Caspase 3:正向:5'-GTG-GTGACAGACAGAGTTACGG-3',反向:5'-GCA-CAAAGCGACTGGATGAACC-3',退火温度:58℃。RT-PCR 反应条件:预变性 94℃ 3 min,变性 94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,72℃ 5 min,35 个循环,以 β-actin 作为内参照。所得 PCR 产物于 2%琼脂糖凝胶进行电泳。

#### 1.2.5 ELISA 法检测 UCP2 蛋白表达量

使用 PMSF 与细胞裂解液裂解干预组与对照组细胞,12 000 r/min 转离心 5 min,取上清滴加于酶标包被板中,每孔 50 μl,分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。按照说明书操作。

#### 1.2.6 荧光探针检测细胞内 Ca<sup>2+</sup>含量

取生长良好的细胞接种于 6 孔板中,待细胞汇合度为 80%时,3 种剂量 Genipin 与细胞作用 48 h 后消化成细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min;弃上清,用含 0.2%小牛血清白蛋白的 D-Hanks 液重悬细胞,细胞计数调整细胞数为 8×10<sup>5</sup> 个/ml。加入 Fura-2/AM,使其终浓度为 3.89 μmol/L,37℃避光孵育 45 min。孵育结束后,用含 0.2%小牛血清白蛋白的 D-Hanks 液洗涤细胞 2 次,3 ml D-Hanks 液重悬细胞。荧光分光光度计激发波长分别为 340、380 nm,发射波长 510 nm 双波长测定负载探针细胞的荧光强度。加入 2%Triton-100,5 min 后测定细胞双波长荧光强度。

#### 1.2.7 荧光探针检测细胞内 ROS 含量

培养细胞至汇合度为 80%时,3 种浓度 Genipin 与细胞作用 48 h 后消化成细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min;弃上清,1 ml 稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞。使 DCFH-DA 终浓度为 10 μmol/L,于 37℃培养箱中孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒混匀一下。探针孵育结束后,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,3 ml PBS 重悬细胞,荧光分光光度计测定 DCF 的

荧光强度。检测条件:激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,激发和发射波长的光栅宽度均为 5 nm。

### 1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS19 统计学软件分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间均数采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 Genipin 对 GRC-1 细胞增殖的影响

3 种剂量 Genipin 干预肾癌细胞 48 h 后,经检测,低剂量组与对照组吸光度值比较无统计学差异( $P > 0.05$ ),中、高浓度组细胞增殖均被抑制,吸光度值与对照组相比有显著统计学差异( $P < 0.05$ )。行组间两两比较,除对照组与低浓度组外,其余各组均有显著性差异( $P < 0.01$ ),细胞抑制率随着给药浓度增加而逐渐升高(表 1)。

表 1 Genipin 对 GRC-1 增殖的影响

Table 1 Influence of inhibition rate of GRC-1 effected by genipin ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	抑制率(%)
对照组	5	6.62 ± 9.46
低剂量组	5	7.02 ± 6.04
中剂量组	5	27.51 ± 8.16 <sup>△</sup>
高剂量组	5	65.63 ± 6.90 <sup>△*</sup>

与对照组和低剂量组相比,<sup>△</sup>  $P < 0.05$ ;与中剂量组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.01$ 。

### 2.2 不同浓度 Genipin 对 GRC-1 细胞凋亡的影响

流式细胞仪数据提示,对照组肾癌细胞凋亡率为 6.93%,低剂量组凋亡率为 9.35%,中剂量组凋亡率为 19.87%,高剂量组凋亡率为 19.96%。低剂量组凋亡率与对照组比较差异无显著性( $P > 0.05$ ),中、高浓度组细胞凋亡率显著提高,与对照组相比,有显著性差异( $P < 0.05$ )。组间两两比较,中剂量组较之低剂量组出现显著差异,高剂量组虽出现凋亡率的升高,但较之中剂量组差异不明显( $P > 0.05$ ,表 2、图 1)。

表 2 Genipin 对 GRC-1 凋亡的影响

Table 2 Influence of apoptosis of GRC-1 effected by genipin ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	凋亡率(%)
对照组	5	6.93 ± 1.78
低剂量组	5	9.35 ± 3.10
中剂量组	5	19.87 ± 2.04 <sup>△*</sup>
高剂量组	5	19.96 ± 1.94 <sup>△*</sup>

与对照组相比,<sup>△</sup>  $P < 0.05$ ;与低剂量组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ 。

### 2.3 Genipin 干预 GRC-1 后 UCP2 的基因表达

随着给药浓度的增高,UCP2 的表达逐渐减低。与对照组相比,低、中剂量组未出现明显减低( $P > 0.05$ ),在高剂量组出现显著性减低( $P < 0.05$ ,图 2)。

### 2.4 Genipin 干预 GRC-1 后 Caspase3 的基因表达

随着 Genipin 剂量的增加,Caspase 3 的表达逐渐增强。与对照组相比,低剂量组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),中、高剂量组表达量增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。组间比较,中、高剂量组间差异无统计学差异( $P > 0.05$ ,图 3)。

### 2.5 Genipin 干预 GRC-1 后 UCP2 的蛋白表达

随着给药浓度的增高,UCP2 的蛋白表达逐渐减低。与对照组相比,低剂量组改变无统计学差异( $P > 0.05$ ),中剂量组和高剂量组 UCP2 表达量下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 3)。

### 2.6 Genipin 干预后 GRC-1 内 $Ca^{2+}$ 和 ROS 的含量

随着给药浓度的增高,GRC-1 内  $Ca^{2+}$  和 ROS 含量逐渐增加。与对照组相比,低剂量组 GRC-1 内  $Ca^{2+}$  和 ROS 含量虽出现升高趋势,但无统计学差异( $P > 0.05$ );中、高剂量组细胞内  $Ca^{2+}$  含量和 ROS 含量较之相应对照组出现了显著增高( $P < 0.05$ ,表 4)。

## 3 讨论

临床上对晚期肾癌的治疗多使用免疫和分子靶向药物治疗,但难以避免其毒性反应,且总缓解率较低。周爱萍等<sup>[9]</sup>在一项多中心临床研究中,对 62 例转移性晚期肾癌并接受索拉非尼治疗的患者进行追踪随访,发现其治疗总缓解率仅为 19.4%。中药因其资源丰富且不良反应小,在抗肿瘤药物的筛选上备受关注。随着分子生物学和分子药理学对肿瘤发生发展及其作用机制的阐述,中药抗癌的研究水平也有了显著提高并展示出广阔的前景<sup>[10]</sup>。线粒体是真核细胞中一种重要的细胞器,除作为能量产生的场所外,已发现其参与包括肿瘤细胞发生发展在内的多种病理生理过程<sup>[6]</sup>。因此,从线粒体层面对肾癌的发生机制和治疗途径进行研究显得较有意义。

UCP2 只定位于线粒体内膜<sup>[11]</sup>,在 5 种 UCPs 中分布较为广泛,高表达于肾、胰岛、肺以及脑组织等,其分布的差异提示着它在生理功能上的组织特异性,其过表达与肿瘤适应性机制的形成有关<sup>[12]</sup>。Genipin 来源于栀子、杜仲等我国多产中药,是栀子类在体内发挥药效作用的主要形式,具有抗肿瘤、抗炎、治疗糖尿病等功用,是 UCP2 的特异性阻断剂。所以本实验将 Genipin 和 UCP2 一并纳入肾癌的发

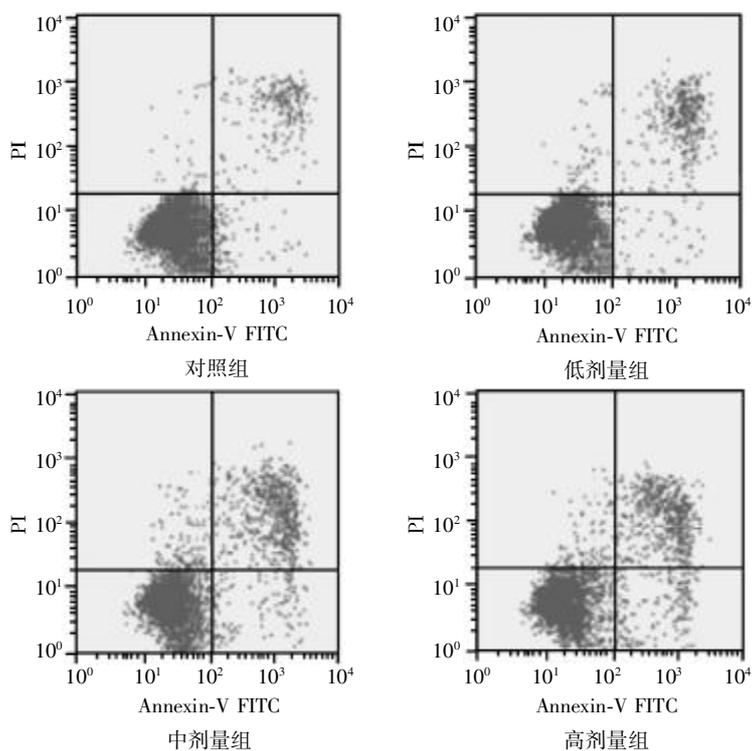
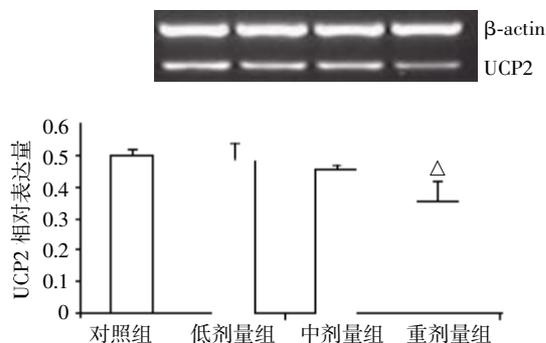


图 1 Genipin 对 GRC-1 凋亡影响的 Annexin V-FITC/PI 双染结果

Figure 1 Result of stain of annexin V-FITC/PI of GRC-1 effected by genipin



与对照组相比,  $\Delta P < 0.05 (n = 3)$ 。

图 2 各组细胞 UCP2 mRNA 表达水平

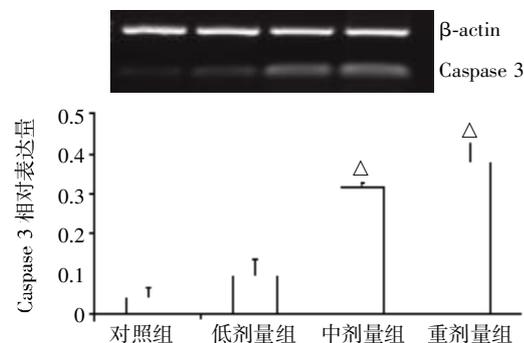
Figure 2 The relative expression of UCP2 mRNA in each group

表 3 各组细胞 UCP2 蛋白表达水平

Table 3 The expression of UCP2 protein in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	蛋白表达量
对照组	5	10.62 ± 2.06
低剂量组	5	10.42 ± 0.74
中剂量组	5	7.08 ± 1.92 <sup>Δ</sup>
高剂量组	5	5.28 ± 0.53 <sup>Δ</sup>

与对照组相比,  $\Delta P < 0.05$ 。



与对照组相比,  $\Delta P < 0.05 (n = 3)$ 。

图 3 各组细胞 Caspase 3 mRNA 表达水平

Figure 3 The relative expression of Caspase 3 mRNA in each group

表 4 各组细胞内 Ca<sup>2+</sup>和 ROS 的水平

Table 4 The level of Ca<sup>2+</sup>, ROS in each group

组别	样本数	Ca <sup>2+</sup> 含量 (nmol/L)	ROS 含量
对照组	5	136.90 ± 0.53	33.85 ± 0.47
低剂量组	5	167.23 ± 0.46	40.43 ± 0.36
中剂量组	5	347.21 ± 0.21 <sup>Δ</sup>	52.57 ± 0.51 <sup>Δ</sup>
高剂量组	5	645.46 ± 0.19 <sup>Δ</sup>	64.91 ± 0.88 <sup>Δ</sup>

与对照组相比,  $\Delta P < 0.05$ 。

生和治疗机制的研究,以期拓展肾癌的基础研究领域和治疗途径。

本实验首先将不同浓度的京尼平侵染肾癌细胞后发现,随着给药浓度的升高,GRC-1 的生长逐

渐受到抑制,在中、高剂量组出现了明显抑制,说明在体外实验层面上 Genipin 对肾癌细胞具有治疗作用。为此,本研究对给药干预后的肾癌细胞进行了流式细胞术检查,发现 Genipin 对肾癌细胞的抑制主要是通过促进细胞的凋亡来完成的,并且与 MTT 实验的结果吻合,即在中、高剂量的 Genipin 作用下,凋亡相关基因 Caspase 3 表达上调,同时, GRC-1 的凋亡率出现了明显提高。Genipin 是 UCP2 的阻断剂,那么,随着 Genipin 给药浓度的增加,UCP2 的表达应该逐渐减小。本实验 RT-PCR 和 ELISA 结果分别在基因和蛋白层面验证了实验预先设计的 UCP2 的表达趋势,既随着给药浓度的增加,UCP2 的表达逐渐减小,在中、高剂量组出现了显著变化,这也与实验第一部分 MTT 和流式的检查相一致。

ROS 是指一类化学性质活泼的含氧物质,ROS 产生的增多或被清除减弱,可造成机体的损伤,而 UCP2 表达增高可减少 ROS 的形成<sup>[13]</sup>,而线粒体内 Ca<sup>2+</sup>的沉积与 ROS 的产生是相互联系在一起的<sup>[14]</sup>,UCP2 能够减少由 LPC 和亚油酸引起的线粒体膜电位的变化和减少线粒体内 Ca<sup>2+</sup>蓄积,以及 ROS 的产生、PTP 的开放和细胞色素 C 释放的减少。这也表明 UCP2 可抑制线粒体 Ca<sup>2+</sup>的超载<sup>[15]</sup>。此次实验结果提示,随着 Genipin 给药浓度的增加,GRC-1 内 ROS 和 Ca<sup>2+</sup>含量逐渐增加,在中、高剂量组两者的含量显著提高。这也部分说明 ROS 和 Ca<sup>2+</sup>可能参与到 Genipin 抑制肾癌细胞的机制中。

以上实验结果提示,在体外试验中,Genipin 对肾癌细胞有较为明显的抑制作用,该抑制作用可能与其特异性阻断物 UCP2 表达的减少有关。其具体的参与机制可能由提高细胞内 ROS、Ca<sup>2+</sup>的含量来完成。但是本实验尚不能说明 Genipin 对肾癌细胞的抑制作用是 Genipin 直接作用于肾癌细胞,还是通过 UCP2 的改变间接影响肾癌细胞的增殖,并且也不能说明 ROS、Ca<sup>2+</sup>的改变具体是由哪种蛋白干预完成的。因此,还需在下一步的研究中使用基因干预技术,使肾癌细胞高表达或不表达 UCP2,观察 Genipin 对基因干预后的细胞的影响,并利用基因芯片技术,观察 Genipin 作用于肾癌细胞后,各原癌、抑癌基因的表达情况等,以资深入探讨 Genipin 及其特异性阻断物在肾癌发生和治疗机制中的作用。

#### [参考文献]

[1] Patel PH,Chaganti RS,Motzer RJ. Targeted therapy for

metastatic renal cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*,2006,94 (5):614-619

- [2] Bleumer I,Oosterwijk E,De Mulder P,et al. Immunotherapy for renal cell carcinoma [J]. *Eur Urol*,2003,44(1): 65-75
- [3] Escudier B,Eisen T,Stadler WM,et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2007,356(2):125-134
- [4] 马建辉. 晚期肾癌靶向治疗临床研究现状 [J]. *实用肿瘤杂志*,2010,25(3):257-260
- [5] Eisen T,Oudard S,Szczylik C,et al. Sorafenib for older patients with renal cell carcinoma:subset analysis from a randomized trial [J]. *J Natl Cancer Inst*,2008,100(20): 1454-1463
- [6] Maximo V,Lima J,Soares P,et al. Mitochondria and cancer[J]. *Virchows Archiv*,2009,454(5):481-495
- [7] Kitano H. Cancer as a robust system:implications for anticancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*,2004(4):227-235
- [8] Hong HY,Kim BC. Mixed lineage kinase 3 connects reactive oxygen species to c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase induced mitochondrial apoptosis in genipin-treated PC3 human prostate cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2007(362):307-312
- [9] 周爱萍,何志崇,于世英,等. 索拉非尼治疗转移性肾癌的临床研究[J]. *中华泌尿外科杂志*,2009,30(1): 10-14
- [10] 曹蕊,吴雄志. 中药对肿瘤细胞周期影响的研究进展 [J]. *中国肿瘤临床*,2012,39(10):749-752
- [11] Pecqueur C,Alves-Guerra MC,Gelly C,et al. Uncoupling protein 2,in vivo distribution,induction upon oxidative stress,and evidence for translational regulation[J]. *J Biol Chem*,2001,276(12):8705-8712
- [12] Brand MD,Affourtit C,Estevés TC,et al. Mitochondrial superoxide:production,biological effects,and activation of uncoupling proteins [J]. *Free Radic Biol Med*,2004,37 (6):755-767
- [13] Wang X,Axelsson J,Nordfors L,et al. Changes in fat mass after initiation of maintenance dialysis is influenced by the uncoupling protein 2 exon 8 insertion/deletion polymorphism[J]. *Nephrol Dial Transplant*,2007,22(1): 196-202
- [14] Kashemsant N,Chan CB. Impact of uncoupling protein 2 over-expression on proinsulin processing [J]. *J Mol Endocrinol*,2006,37(3):517-526
- [15] 施宏华,孙雅文,李稻. UCP2 与细胞凋亡[J]. *现代肿瘤医学*,2008,16(12):2227-2229

[收稿日期] 2012-11-26