

· 基础研究 ·

lncRNA TCONS-00020455 及 TCONS-00020457 在甲状腺乳头状癌中的表达及意义

刘玲, 钱潇潇, 宋斌, 谭娟, 窦开琴, 侯大卫, 尤强, 丁大法, 鲁一兵*

南京医科大学第二附属医院内分泌科, 江苏 南京 210011

[摘要] 目的:探讨长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)组织中表达量的变化和lncRNA在PTC发生发展中的作用。方法:应用微阵列芯片技术检测PTC手术切除的癌组织及癌旁组织中的lncRNA表达谱,并从中随机选取5条差异表达的lncRNA(Fold change ≥ 2 , $P < 0.05$),应用real-time PCR方法验证表达谱芯片结果。比较不同表达水平lncRNA与PTC患者临床特征、疾病分期之间的关系。结果:基因芯片结果显示,lncRNA在PTC组织及癌旁组织中的表达具有明显差异性,429个表达上调,1 449个表达下调。在41例PTC患者癌组织及癌旁组织中,real-time PCR检测结果显示,lncRNA TCONS-00020455(TCON-455)及TCONS-00020457(TCON-457)在PTC癌组织中的表达水平均显著高于癌旁组织,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。进一步分析发现,lncRNA TCON-455及TCON-457表达水平与PTC患者淋巴结转移、多发病灶和TNM分期相关(P 均 < 0.05),而与年龄、性别均无相关性(P 均 > 0.05)。结论:PTC患者的癌组织中存在lncRNA异常表达。lncRNA TCON-455和TCON-457的高表达可能与PTC转移和恶化有关。

[关键词] PTC;长链非编码RNA;表达;转移**[中图分类号]** R736.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)03-332-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190304

Expression and significance of lncRNA TCONS - 00020455 and TCONS - 00020457 in papillary thyroid carcinoma

Liu Ling, Qian Xiaoxiao, Song Bin, Tan Juan, Dou Kaiqin, Hou Dawei, You Qiang, Ding Dafa, Lu Yibing*

Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210011, China

[Abstract] **Objective:** To investigate changes of long non-coding RNA expression in papillary thyroid carcinoma (PTC) and the role of lncRNA in occurrence and development of PTC. **Methods:** The microarray chip technique was used to detect the lncRNA expression profile in cancer tissues and paracancerous tissues after PTC resection. Five randomly expressed lncRNAs were randomly selected (fold change ≥ 2 , $P < 0.05$). The real-time PCR method was used to verify expression microarray results. The different expression levels of lncRNA with the clinical features and stage of disease were compared in PTC patients. **Results:** Gene chip results showed that the expressions of lncRNAs in PTC tissues and paracancerous tissues were significantly different. There were 429 up-regulated lncRNAs and 1 449 down-regulated lncRNAs. In the tumor tissues and paracancerous tissues of 41 patients with PTC, real-time PCR results showed that expression levels of lncRNA TCONS-00020455 and TCONS-00020457 (annotated: lncRNA TCONS-00020455 and TCONS-00020457 are abbreviated as lncRNA TCON-455 and TCON-457, and the short names for these two lncRNAs are used in the article.) in PTC tissues were significantly higher than those in adjacent tissues ($P < 0.05$). Further analysis found that the expression levels of lncRNA TCON-455 and lncRNA TCON-457 were associated with lymph node metastasis, multiple lesions, and TNM stage in PTC patients ($P < 0.05$), but not correlated with age and gender ($P > 0.05$). **Conclusion:** There is abnormal expression of lncRNAs in cancerous tissues of PTC patients. High expression of lncRNA TCON-455 and TCON-457 may be associated with metastasis and progression of PTC.

[Key words] thyroid papillary carcinoma; long non-coding RNA; expression; metastasis

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(03):332-337]

[基金项目] 江苏省重点研发计划(社会发展)重点项目(BE2015723)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: luyibing2004@126.com

有研究报道,近年来全球甲状腺癌发病率逐年上升,我国肿瘤登记数据显示2011年全国甲状腺癌发病率为6.6/10万^[1-3]。虽然大部分甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)患者通过手术和放射碘治疗后预后良好,但复发或远处转移仍在部分患者中时有发生。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)从表观遗传、转录和转录后这3个层面对目的基因表达进行调控,并参与了细胞周期、细胞分化及凋亡等活动^[4-6]。大量研究证实lncRNA异常表达与多种肿瘤的发生发展密切相关^[7-8],但在PTC中的研究较少。本研究通过分析验证lncRNA在PTC组织及对应癌旁组织中的差异性表达,并结合患者的临床病理因素,探讨PTC相关lncRNA的临床病理意义,为PTC的诊断和治疗提供新的候选肿瘤标志物和分子靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

所有组织标本均从南京医科大学第二附属医院收集,所有PTC患者术前均未接受化疗、放疗和任何其他针对PTC的治疗,且均为首次发病初次手术,术中切除标本送病理科经病理检查证实。所有患者及其家属知情同意,并经临床研究伦理委员会批准。同一病例的癌旁组织经病理诊断证实为肿瘤阴性的作为对照,所有组织离体后立即置入液氮中,保存于南京医科大学第二附属医院内分泌实验室-80℃超低温冰箱中。

TRIzol试剂、Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒及96孔板均购自美国Invitrogen公司,SYBR Green RT-PCR试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司,人类Agilent lncRNA表达谱芯片由北京博奥晶典生物技术有限公司提供。本文所用lncRNA引物均由上海英潍捷基公司设计和合成,所用引物序列见表1。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取与鉴定

按TRIzol试剂说明书,分别提取41对PTC组织与对应癌旁组织中的总RNA,用紫外分光光度计测定样本在260、280 nm处的吸光度值,对总RNA进行定量,并计算 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 值,该值在1.8~2.0之间为佳。采用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,检测RNA质量及完整性。

1.2.2 lncRNA芯片检测

PTC组织及其癌旁正常组织来自4例患者并被

表1 lncRNA的引物序列

Table 1 Sequences of lncRNA gene primers

引物名称	引物序列(5'→3')
uc021ssa.1	上游 GAAGCAGCCCTCAGAAAGTTG 下游 TGAGAGAACATGGGCAAACA
ENST00000504297.1	上游 GTCCTGGCTGTGGGTCTATG 下游 CCTGTCTGATGCCTGAACCT
ENST00000355869.2	上游 CTCCTGGAAGTCCCATTGGA 下游 GTGCTGAAACATGCCTGAGA
TCONS_00020457	上游 GCTTGAACATCGTCCTCCTC 下游 TGTCTCTGTGGGAATGCAA
TCONS_00020455	上游 CAAACGCTCGTACCCTGACT 下游 TGTCTCTGTGGGAATGCAA
GAPDH	上游 GAAGGTGAAGTCGGAGTC 下游 GAAGATGGTGATGGGATTTTC

定义作为RNA-seq的发现队列,其中lncRNA来源于多个权威数据库(包括Refseq、UCSCKnowngenes、GenCode等)。样品标记和芯片杂交依据北京博奥晶典生物技术有限公司提供的实验方案执行:①合成双链cDNA:以总RNA起始,使用First Strand Enzyme Mix逆转录合成第1链cDNA,再使用Second Strand Enzyme Mix将DNA-RNA杂合体中的RNA链转化为第2链cDNA,合成双链DNA。②体外转录合成cRNA并纯化:以第2链cDNA为模板,利用T7 Enzyme Mix合成cRNA,再使用RNA纯化柱以除去反应中的盐、酶等试剂得到纯化的cRNA,并对cRNA进行定量、质控。③反转录合成cDNA并标记:接着以cRNA为模板,Random Primer为引物,CbcScript II酶进行反转录,纯化回收反转录得到cDNA并定量,并以此为模板,Random Primer为引物,用Klenow Fragment酶合成cDNA的互补链并掺入带有荧光基团的dNTP(Cy3-dCTP、Cy5-dCTP),纯化并定量标记产物。④杂交:带有荧光基团DNA即可用于芯片杂交。⑤芯片清洗及扫描:杂交结束后,取出芯片在博奥Slide Washer8芯片洗干仪进行清洗,清洗程序完成后离心甩干,使用Agilent芯片扫描仪(G2565CA)对清洗后的芯片进行扫描,得到杂交图片。⑥芯片数据分析:使用Agilent Feature Extraction(v10.7)软件对杂交图片进行分析并提取数据,再使用Agilent GeneSpring软件对数据进行归一化和差异分析。对芯片结果中差异表达较大的部分进行描述(表2)。

1.2.3 real-time PCR的验证

使用Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒将总RNA逆转录为cDNA,cDNA逆转录完成后置于-20℃保存备用。随后研究选取5条

表2 芯片中部分差异表达的lncRNA

Table 2 Partially differently expressed lncRNAs in microarray

lncRNA 名称	表达	数据库来源	P 值	倍数差异
XR_429125.1	上调	RefSeq	0.000 109	89.39
uc021ssa.1	上调	UCSC	0.000 025	43.17
ENST00000504297.1	上调	ENSEMBL	0.000 995	11.89
ENST00000355869.2	上调	ENSEMBL	0.004 126	10.83
TCONS_00020457	上调	HumanLincRNACatalog	0.005 041	15.77
TCONS_00020455	上调	HumanLincRNACatalog	0.005 561	14.41
TCONS_00013521	下调	HumanLincRNACatalog	0.001 407	24.12
ENST00000547051.1	下调	ENSEMBL	0.000 155	48.39
ENST00000570153.1	下调	ENSEMBL	0.004 218	32.60
ENST00000551729.1	下调	ENSEMBL	0.000 012	24.27

lncRNA 并按照 RT-PCR 试剂盒说明书在 41 例 PTC 组织和对应癌旁组织中进行检测。real-time PCR 反应体系(10 μ L)中含有 SYBR Green Master Mix 5 μ L, 10 μ mol/L 正、反向引物各 0.2 μ L, RNase-free ddH₂O 3.6 μ L 和稀释后的第 1 链 cDNA 1 μ L。96 孔板在循环条件(预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 共 40 个循环)下结束反应。根据熔解曲线的峰值判断引物反应的特异性。根据循环阈值(Ct 值)量化 lncRNA 的表达水平,并以 GAPDH 作为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析数据,计算两组 lncRNA 的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,PTC 组织与癌旁组织中 lncRNA 表达的差异性用两独立样本 *t* 检验统计,PTC 组织中 lncRNA 的表达水平与临床病理因素的相关性应用 Pearson's 卡方检验和连续性校正的卡方检验进行统计分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。所有数据绘图均采用 GraphPad Prism 6.0 软件完成。

2 结果

2.1 PTC 组织及癌旁组织基因芯片结果

PTC 组织中 lncRNA 的表达水平相较于癌旁正常组织存在显著差异(上调或下调),1 878 种 lncRNA 在 PTC 组织和癌旁组织中表达具有差异,占有可检测 lncRNA 的 7%。其中 429 条上调差异倍数超过 2 倍,1 449 条下调差异倍数超过 2 倍;137 条上调差异倍数超过 4 倍,297 条下调差异倍数超过 4 倍;41 条上调差异倍数超过 8 倍,65 条下调差异倍数超过 8 倍。

根据与其共表达的 mRNAs 的基因功能分析

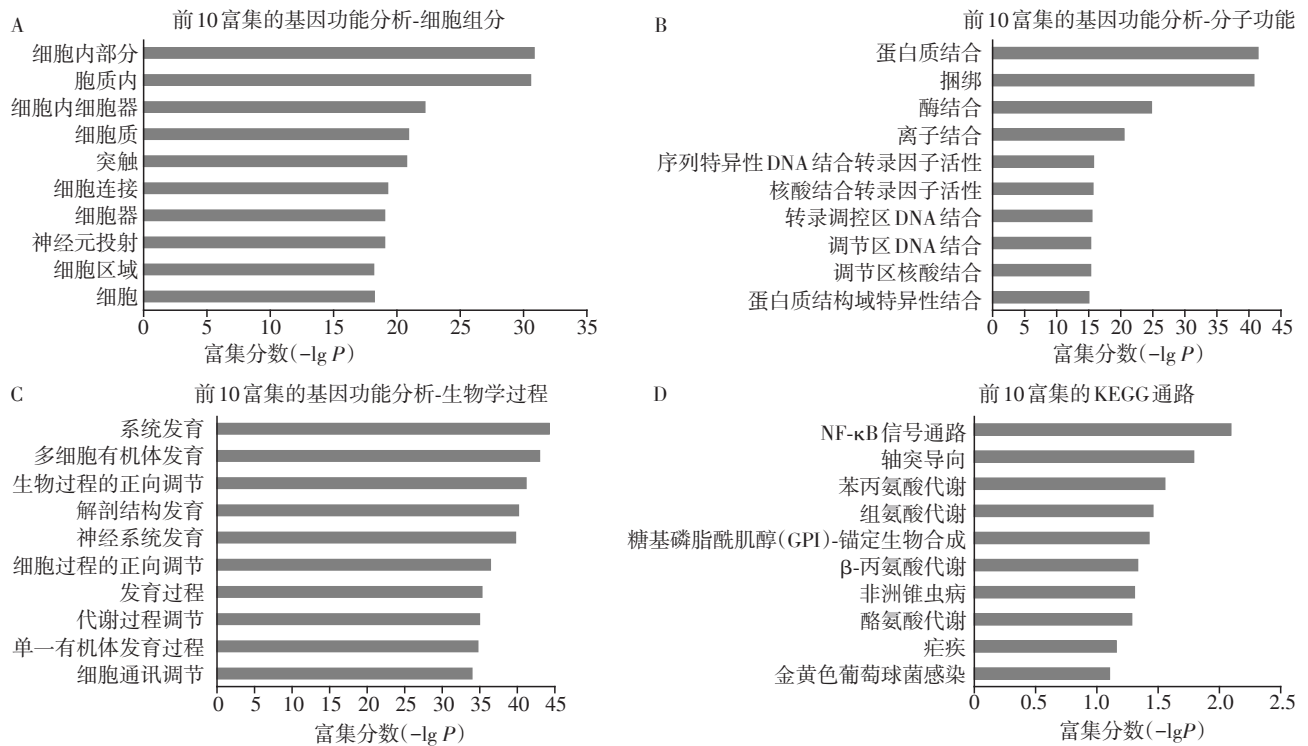
(Gene Ontology Analysis, Go)和 KEGG 代谢通路分析(KEGG Pathway)可预测差异表达 lncRNA 的生物学功能。通过分析发现最富集的 GO 注释是“细胞内部分”(GO:0044424;本体:细胞组分; $P < 0.001$)(图 1A);“蛋白质结合”(GO:0005515;本体:分子功能; $P < 0.001$)(图 1B);“系统发育”(GO:0048731;本体:生物学过程; $P < 0.001$)(图 1C)。KEGG 通路分析中最富集的路径是“NF- κ B 信号通路途径”(图 1D)。

2.2 TCON-455 和 TCON-457 在 PTC 组织中的相对表达量

从芯片中随机选取 5 条差异表达上调的 lncRNA:(uc021ssa.1、ENST00000504297.1、ENST00000355869.2、TCONS-00020457(TCON-457)和 TCONS-00020455(TCON-455),应用 qRT-PCR 技术在 41 例 PTC 组织及癌旁组织中进行验证。5 条 lncRNA 在组织中的验证结果与芯片数据比较,PTC 组织中的表达量均高于癌旁组织,与芯片结果基本相符(图 2A)。实验证实 PTC 组织中 TCON-455 的表达量为 2.33 ± 0.64 ,高于其在癌旁组织中的表达量 0.89 ± 0.30 ,两组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2B)。TCON-457 在 PTC 癌组织及癌旁组织中的表达量分别为 5.48 ± 1.17 、 1.00 ± 0.31 ,显示 PTC 组织中 TCON-457 表达显著高于癌旁组织($P < 0.001$,图 2C)。但 lncRNA uc021ssa.1、ENST00000504297.1 和 ENST00000355869.25 在 PTC 组织和配对癌旁组织中的表达差异无统计学意义(P 均 > 0.05 ,图 2D、E、F)。

2.3 TCON-455 和 TCON-457 表达水平与 PTC 患者临床病理特征之间的比较

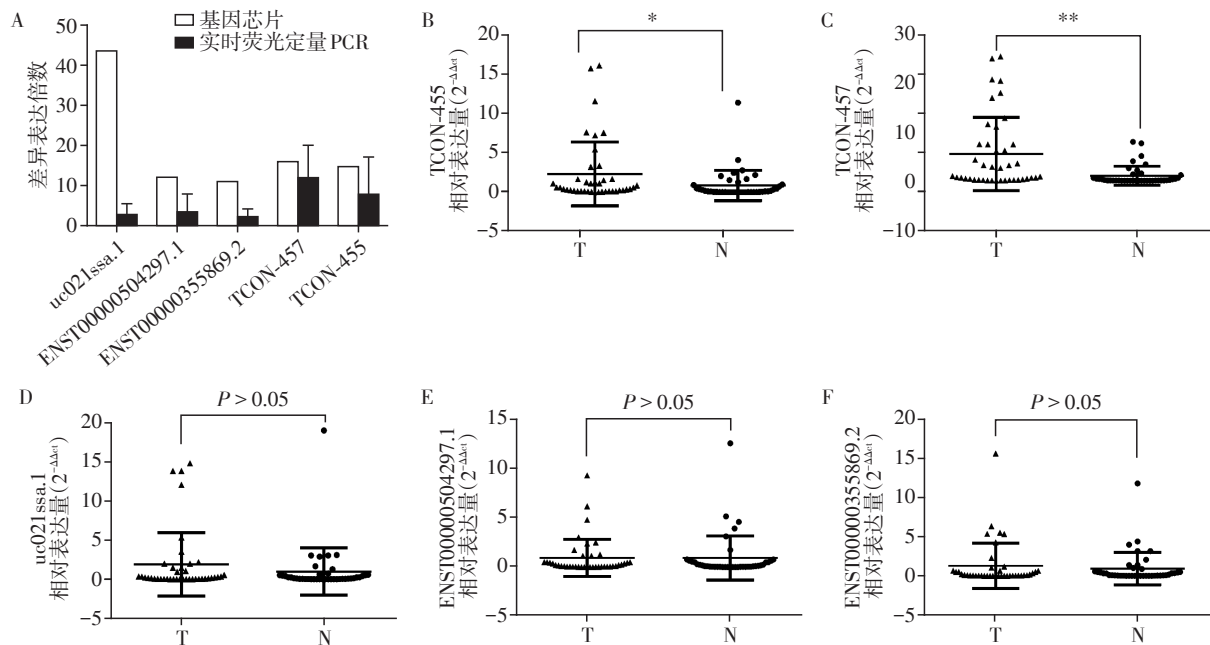
根据 PTC 组织 TCON-455 和 TCON-457 的平均表达水平将 41 例患者分为高表达组和低表达组。结合临床病理因素分析,发现这两条 lncRNA 高表



GO富集分析涵盖3个术语:A:细胞组分;B:分子功能;C:生物学过程。D:KEGG代谢通路分析。

图1 差异表达基因的GO富集分析和KEGG代谢通路分析

Figure 1 Analysis of GO terms and KEGG pathways for differentially expressed mRNAs



A: 5条随机挑选的lncRNA的组织表达倍数验证结果与芯片表达倍数比较;B:lncRNA TCON-455在PTC组织与配对癌旁正常组织中的相对表达量($n=41$);C:TCON-457在PTC组织与配对癌旁正常组织中的相对表达量($n=41$),两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$;D、E、F:lncRNA uc021ssa.1(D)、ENST00000504297.1(E)和ENST00000355869.25(F)在PTC组织与配对癌旁正常组织中的相对表达量, P 均 > 0.05 。T:PTC组织;N:癌旁组织。

图2 lncRNA的组织表达qRT-PCR验证及在PTC与配对癌旁组织中的表达

Figure 2 qRT-PCR validation of lncRNAs in PTC tissues compared with paired noncancerous thyroid tissues

达组的淋巴结转移增加、多发病灶和TNM分期越晚的发生率更高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而与年龄、性别没有显著相关($P > 0.05$,表3),提示它们可能参与PTC的发生及进展过程,可能是PTC诊断和治疗的潜在靶点。

3 讨论

PTC是甲状腺恶性肿瘤中最常见的病理组织类型,过去30年我国PTC发病率呈显著上升趋势,其发病原因和转移、恶化的可能机制目前还不清楚。

表3 TCON-455和TCON-457表达水平与41例PTC患者的临床病理特征

Table 3 Clinicopathological characteristics of 41 PTC patients according to TCON-455 and TCON-457 expression levels

临床特征	TCON-455			TCON-457		
	低表达[n(%)]	高表达 ^a [n(%)]	P值 ^b	低表达[n(%)]	高表达 ^a [n(%)]	P值 ^b
例数	20(100.0)	21(100.0)	—	21(100.0)	20(100.0)	—
年龄			0.853			0.654
<55岁	12(60.0)	12(57.1)		13(61.9)	11(55.0)	
≥55岁	8(40.0)	9(42.9)		8(38.1)	9(45.0)	
性别			0.063			0.095
男	8(40.0)	3(14.3)		8(38.1)	3(15.0)	
女	12(60.0)	18(85.7)		13(61.9)	17(85.0)	
肿瘤分期			0.029			0.019
I~II	19(95.0)	13(61.9)		20(95.2)	12(60.0)	
III~IV	1(5.0)	8(38.1)		1(4.8)	8(40.0)	
淋巴结受累			0.005			0.017
是	3(15.0)	12(57.1)		4(19.0)	11(55.0)	
否	17(85.0)	9(42.9)		17(81.0)	9(45.0)	
多发病灶			0.041			0.003
是	6(30.0)	13(61.9)		5(23.8)	14(70.0)	
否	14(70.0)	8(38.1)		16(76.2)	6(30.0)	

a:中位表达水平被用作截止值。在41例患者中,TCON-455和TCON-457低表达被定义为低于第50百分位的值,高表达被定义为高于第50百分位的值。b:皮尔逊卡方检验或连续性校正的卡方检验计算P值。

近来有一些报道lncRNA在肿瘤中存在异常表达,PTC易感候选者3(papillary thyroid carcinoma susceptibility candidate 3,PTCSC3)表达在甲状腺肿瘤组织中显著下调,体外实验发现PTC细胞中的PTCSC3 lncRNA过表达可抑制PTC细胞增殖并诱导细胞周期停滞和细胞凋亡,表明PTCSC3 lncRNA的表达增加可以减少PTC的发生发展^[9]。此外,国内有研究证实lncRNA GAS8-AS1在中国PTC患者血浆中的表达水平降低,提示血浆lncRNA GAS8-AS1水平测定可作为PTC诊断以及预测肿瘤侵袭的生物标志物^[10]。但是PTC患者中这些lncRNA小样本的研究结果未能解释lncRNA调控PTC发生发展的分子机制,因此寻找与PTC相关的新lncRNA仍十分重要。

本研究应用基因芯片比较PTC患者手术切除和病理诊断的癌组织和癌旁组织中lncRNA的表达,其中上调表达差异倍数超过2倍的429条,下调表达差异倍数超过2倍的1449条。随机选取出5条

表达上调的lncRNA,在41例PTC患者组织中进行real-time PCR验证,证实了TCON-455和TCON-457在PTC组织中表达水平上调,与芯片结果相符。lncRNA TCON-455和TCON-457在PTC患者中的表达水平及其作用,目前国内外尚没有文献报道。GO富集分析和KEGG代谢通路分析提供了将lncRNA与潜在功能联系起来的有价值的框架,通过分析发现,lncRNA TCON-455和TCON-457可能与细胞侵袭、转移有关。KEGG通路分析也表明,与lncRNA共表达的mRNA最富集的途径是“NF-κB信号通路途径”,暗示这两条差异表达的lncRNA可能通过这些信号通路对PTC的发生和发展起着重要作用。

结合real-time PCR验证结果和生物信息学分析结果,进一步分析lncRNA TCON-455和TCON-457不同表达水平和PTC患者临床特征、肿瘤分期之间的关系。结果发现这两条lncRNA高表达的PTC患者容易出现淋巴结转移,与多发病灶和TNM分期有

关,提示 lncRNA TCON-455 和 TCON-457 与 PTC 的转移、侵袭等恶化有关。lncRNA 参与肿瘤转移、侵袭的机制还不清楚,有研究发现 lncRNA 可作为 ceRNA 与 miRNAs 相互作用,影响甲状腺癌的转移和侵袭^[11-12]。

然而本研究首次发现 PTC 患者中差异高表达的 lncRNA TCON-455 和 TCON-457,并且可能与 PTC 患者的肿瘤转移、侵袭等恶化有关。下一步需要增加临床标本量来验证;其次,从细胞水平研究其对 PTC 细胞增殖、凋亡、侵袭等功能的影响并进一步探讨其作用的分子机制;同时,通过体内裸鼠肿瘤实验验证其在 PTC 发生发展中的作用。

[参考文献]

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):7-30

[2] Rosenbaum MA, Mchenry CR. Contemporary management of papillary carcinoma of the thyroid gland [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009, 9(3):317-329

[3] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1):2-12

[4] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4):629-641

[5] Fatima R, Akhade VS, Pal D, et al. Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets [J]. *Mol Cell Ther*, 2015, 3(1):5

[6] Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs in colorectal can-

cer [M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2016:3-17

[7] Sun TT, He J, Liang Q, et al. LncRNA GCInc1 promotes gastric carcinogenesis and may act as a modular scaffold of WDR5 and KAT2A complexes to specify the histone modification pattern [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(7):784-801

[8] Jiang RQ, Tang JW, Chen Y, et al. The long noncoding RNA lnc-EGFR stimulates T-regulatory cells differentiation thus promoting hepatocellular carcinoma immune evasion [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15129

[9] Fan M, Li XY, Jiang W, et al. A long non-coding RNA, PTCSC3, as a tumor suppressor and a target of miRNAs in thyroid cancer cells [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(4):1143-1146

[10] Zhang DX, Liu X, Wei BJ, et al. Plasma lncRNA GAS8-AS1 as a potential biomarker of papillary thyroid carcinoma in Chinese patients [J]. *Int J Endocrinol*, 2017(8):2645904

[11] Yuan QL, Liu Y, Fan YX, et al. LncRNA HOTTIP promotes papillary thyroid carcinoma cell proliferation, invasion and migration by regulating miR-637 [J]. *Intern J Biochem Cell Biol*, 2018, 98:1-9

[12] Liu K, Huang W, Yan DQ, et al. Overexpression of long intergenic noncoding RNA LINC00312 inhibits the invasion and migration of thyroid cancer cells by down-regulating microRNA-197-3p [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(4):BSR20170109

[收稿日期] 2018-04-10

(上接第 331 页)

[20] Kramerguth A, Quaschnig T, Greiber S, et al. Potential role of lipids in the progression of diabetic nephropathy [J]. *Clin Nephrol*, 1996, 46(4):262-265

[21] Huang J, Wang S, Zhu M, et al. Effects of genistein, apigenin, quercetin, rutin and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(9):1943-1947

[22] 韩鹏飞,李洪志,于晶,等. 姜黄素及其类似物通过抑制炎症因子对糖尿病肾病小鼠的治疗作用 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(1):77-81

[23] Zhou R, Yazdi AS, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2011, 469

(7329):221-225

[24] Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(10):1732-1744

[25] Ma CH, Kang LL, Ren HM, et al. Simiao pill ameliorates renal glomerular injury via increasing Sirt1 expression and suppressing NF- κ B/NLRP3 inflammasome activation in high fructose-fed rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 172:108-117

[26] Fu Y, Gao R, Cao Y, et al. Curcumin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(1):54-58

[收稿日期] 2018-04-12