

· 基础研究 ·

黄芪甲苷促进缺氧损伤后人主动脉内皮细胞血管新生的研究

卢飞艳,丁燕子,陈相健,卞智萍,吴恒芳*,杨 笛*

南京医科大学第一附属医院心脏科,江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**研究黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)对缺氧损伤后人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAECs)的保护作用及对血管生成的影响及可能机制。**方法:**体外培养HAECs, 8% O₂制备缺氧模型,实验分为对照组、缺氧组、AS-IV治疗组, 50 μg/mL。观察AS-IV对缺氧损伤后HAECs的保护作用及对细胞迁移能力、增殖活性和体外成环的影响以及自噬在血管生成过程中的作用。**结果:**缺氧损伤后与对照组比较,HAECs细胞上清释放的损伤标志物乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)浓度增加[(25.33 ± 1.70)U/L vs. (5.33 ± 1.25)U/L],细胞活力降低[(81.12 ± 0.72)% vs. (100 ± 3.07)%],细胞迁移能力降低,增殖能力降低,体外成环数下降[(30.91 ± 3.78)个 vs. (62.10 ± 7.56)个],自噬相关蛋白Beclin及LC3-II表达下调($P < 0.05$)。加入AS-IV治疗后,与缺氧组比较,细胞上清LDH释放量减少[(18.33 ± 1.25)U/L],细胞活力提高[(85.71 ± 2.48)%],细胞迁移能力增强、增殖活性增加,基质胶体外成环数增加[(48.64 ± 4.80)个],自噬相关蛋白Beclin及LC3-II表达上调($P < 0.05$)。**结论:**AS-IV可减轻缺氧对HAECs的损伤,可能通过激活自噬通路促进HAECs血管新生。

[关键词] 黄芪甲苷;人主动脉内皮细胞;缺氧;血管新生

[中图分类号] R363.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)08-1124-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20190806

Astragaloside IV promoted angiogenesis of human aortic endothelial cells after hypoxic injury

Lu Feiyan, Ding Yanzi, Chen Xiangjian, Bian Zhiping, Wu Hengfang*, Yang Di*

Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** The present study was designed to investigate the protection of astragaloside IV (AS-IV) on human aortic endothelial cells (HAECs) after hypoxia injury and underlying mechanism. **Methods:** HAECs were cultured in 8% O₂ to form hypoxic injury models. The cells were divided into control group (C), hypoxic group (H) and AS-IV treatment group (AS-IV, 50 μg/mL). The protective effect of AS-IV on HAECs after hypoxia was observed, and the migration, proliferation and tube formation of the cells were analyzed. Autophagy related proteins were also identified. **Results:** Compared with the C group, the cells with hypoxia presented increased supernatant lactic dehydrogenase (LDH) concentration (25.33 ± 1.70 U/L vs. 5.33 ± 1.25 U/L), decreased cell viability (81.12% ± 0.72% vs. 100.00% ± 3.07%), cellular migration and proliferation ability and tube formation (30.91 ± 3.78 vs. 62.1 ± 7.56). Furthermore, the protein expression of Beclin and LC3-II of the injured cells were decreased. After AS-IV treatment, compared with the H group, decreased LDH release (18.33 ± 1.25 U/L), increased cell viability (85.71% ± 2.48%), cellular migration and proliferation ability, and tube formation (48.64 ± 4.80) were observed. And the protein expression of Beclin and LC3-II increased. **Conclusion:** AS-IV can alleviate hypoxia-induced damage and may promote angiogenesis of HAECs by the autophagy signaling pathway.

[Key words] astragaloside IV; HAECs; hypoxia; angiogenesis

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08): 1124-1129]

[基金项目] 科技部国家重点研发计划(2016YFA0201304);江苏自然科学基金(BK20151587)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wuhengfang@njmu.edu.cn, diyang@njmu.edu.cn

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是由各种原因引起的冠状动脉血流灌注减少或中断导致相应心肌细胞缺血缺氧而引起的心肌细胞坏死,是世界范围内引起死亡的主要原因之一,其发病率正逐年增加并有年轻化的趋势。AMI是一个日益严重的公共卫生问题,尽管经皮冠脉介入治疗可快速、有效恢复心肌血液灌注,但经皮冠脉介入治疗术后部分患者会出现“无复流”现象,并且心肌血管生成缺失,导致心肌灌注不足^[1]。治疗性血管生成作为一种促进侧支循环的替代疗法,可增加冠状动脉微血管横截面积,增加血液灌注,从而恢复缺血组织的功能^[2]。

血管生成是指在血管床基础上形成血管的过程,有许多分子参与调控血管的萌发、成熟及功能性血管的形成,是一个复杂的病理生理过程。具有正常功能的内皮细胞(endothelial cells, ECs)是血管新生的关键因素,ECs在血管萌发过程中经历增殖、分化、凋亡和迁移等多个过程^[3]。急性或慢性缺氧均可损伤ECs功能,引起血管生成障碍。

黄芪是传统中药中重要的补气调理药,具有悠久的历史,黄芪及其复方制剂在中国被广泛用于抗肿瘤、增强免疫力及糖尿病和心血管等疾病的治疗^[4]。黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)是黄芪中的主要活性成分,具有抗衰老、抗炎症、抗纤维化、保护内皮、促进伤口愈合、改善脂质代谢等多种药理作用^[5]。AS-IV可促进线粒体自噬和线粒体生物合成,保护线粒体功能,抑制氧化应激^[6]。此外AS-IV可通过血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导血管生成提高随意皮瓣移植的存活率^[7],局部注射AS-IV可促进肌肉组织缺血区域的血管生成^[8]。本课题组前期研究发现AS-IV可促进AMI小鼠梗死边缘区血管新生,改善心肌梗死后小鼠心功能^[9]。

自噬对维持正常的ECs功能具有重要作用,自噬过程在ECs体内和体外血管新生中具有重要作用^[10],本研究利用离体培养的人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAECs),研究AS-IV对缺氧损伤后HAECs的保护作用及AS-IV是否可通过激活自噬信号通路促进缺氧损伤后HAECs血管新生。

1 材料和方法

1.1 材料

HAECs保存于南京医科大学第一附属医院心血管病研究所,该细胞由实验室原代分离、培养并

鉴定,复苏后第3~8代用于实验。AS-IV(南京春秋生物工程公司),胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)(Gibco公司,美国),明胶(Sigma公司,美国),内皮细胞培养基ECM(1001)(ScienCell,美国),基质胶(BD公司,美国),碘化丙啶(PI)(Sigma公司,美国)、CCK-8试剂盒(上海翊圣公司),anti-GAPDH(ab9485)、anti-LC3(ab48394)、anti-Beclin(#3495s),4×Tris-HCl(pH=8.8)、4×Tris-HCl(pH=6.8)(上海双螺旋生物科技有限公司),30% Acr-Bis(29:1)(上海生工生物工程股份有限公司),ECL发光液等。

倒置显微镜(Olympus公司,日本),细胞超净台,恒温水浴锅,酶标仪,流式细胞仪,离心机,细胞培养箱、三气培养箱(Thermo公司,美国)、Bio-Rad电泳、转膜及曝光装置等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含5%FBS的ECM完全培养基于37℃、5%CO₂、21%O₂条件下培养细胞。

1.2.2 实验分组

在预实验中,将HAECs置于8%O₂的三气培养箱中,收集不同时间(12、16、20、24、36、40、48 h)的细胞培养上清,检测培养上清中的乳酸脱氢酶(LDH)确定干预时间(16 h),CCK-8法检测药物毒性确定AS-IV干预浓度(50 μg/mL)。本实验将HAECs分为3组:对照组、缺氧组、AS-IV组。干预过程中各组细胞均更换为低血清(1%FBS)的ECM培养,将对照组置于正常培养箱(21%O₂)培养,同时将缺氧组及AS-IV组置于8%O₂的三气培养箱中先缺氧16 h制备缺氧损伤模型,再将AS-IV组更换为含有50 μg/mL的AS-IV溶液继续缺氧24 h,同时将缺氧组及对照组更换为1%FBS的ECM培养基继续培养24 h,干预结束后同时处理各组细胞。

1.2.3 LDH浓度检测

常规消化呈对数生长期的HAECs,以1×10⁵个/孔接种于24孔板,长至80%~90%融合,置于8%O₂的三气培养箱培养,实验结束后收集各组细胞培养上清液,4℃3 000 r/min离心10 min,收集上清,用全自动生化分析仪检测LDH浓度(本院检验科),每组设置3个复孔,实验重复3次。

1.2.4 细胞活力检测

常规消化呈对数生长期的HAECs,以1×10⁴个/孔接种于96孔板,48 h后放于各自培养箱,实验结束后吸出各孔原培养基,并于每孔中重新加入100 μL内皮培养基+10 μL CCK-8试剂,37℃孵育2.5 h,酶

标仪测定 450 nm 吸光度值,细胞活力=处理组吸光度值/对照组吸光度值×100%。

1.2.5 划痕实验

以 2×10^5 个/孔将 HAECs 接种于 6 孔板,长至 80%~90% 融合,置于 8% O_2 的三气培养箱缺氧 16 h 或常规培养箱中培养 16 h 后,用 100 μ L 无菌枪头沿直尺于 6 孔板中央底部轻柔划一条直线,用 PBS 轻柔清洗 2 次,各组再加入对应培养基,倒置显微镜下观察划痕 0 h 细胞并拍照($\times 40$),将各组细胞放至对应的培养箱中继续培养 24 h 后显微镜下观察并拍照($\times 40$),计算细胞迁移率,细胞迁移率=(初始划痕宽度-终末划痕宽度)/初始划痕宽度×100%。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期

采用上述方法培养细胞,干预结束后用不含 EDTA 的胰酶消化收集各组细胞,将细胞于 70% 乙醇-20 $^{\circ}C$ 过夜固定,1 500 r/min 离心 5 min,除去上清液,PBS 洗涤 2 次,根据细胞量加入适量 PBS 重悬细胞,并加入终浓度为 50 μ g/mL 的 PI 常温染色 30 min,上机检测,各组设置 3 个复孔,实验重复 3 次,检测所得数据进行平方根反正弦变换使其符合正态分布,再进行统计分析。

1.2.7 基质胶成环实验

HAECs 接种于 6 孔板,长至 80%~90% 融合,干预方法同前,将基质胶铺于 96 孔板,每孔 60~70 μ L,37 $^{\circ}C$ 培养箱中凝聚 1 h 后,处理结束后胰酶消化收集的各组细胞用新鲜培养基重悬,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,将各组细胞接种于铺有基质胶的 96 孔板中,每孔 200 μ L,每组设置 3 个复孔,置于各自培养箱中,6~8 h 后显微镜下观察并拍照($\times 100$)。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析计数成环个数,并据此推算各样本血管生成情况,实验重复 3 次。

1.2.8 Western blot

细胞干预方法同前,干预结束后,收集各组细胞,RIPA+PMSF 裂解收集蛋白,BCA 法测蛋白浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳检测自噬相关蛋白的表达水平,使用 Bio-RAD 公司 ChemiDoc XR 化学发光成像系统显影并分析各条带灰度,利用目的蛋白灰度/内参蛋白灰度,计算相对灰度值。

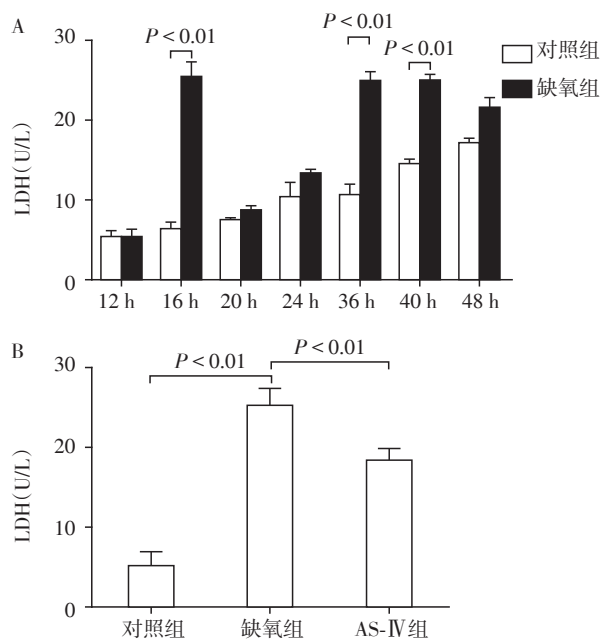
1.3 统计学方法

使用 SPSS23.0 统计分析软件对相关数据进行统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析(ANOVA),多重比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义,作图采用 Graphpad Prism5.0 软件。

2 结果

2.1 AS-IV 减少 HAECs LDH 的释放

LDH 是存在于细胞质中的蛋白酶,当细胞膜完整性受到破坏时可释放入培养上清,因此可检测上清液中 LDH 含量作为细胞损伤的标志。测定不同时间段细胞上清 LDH 含量,当干预 16 h 后缺氧组上清液中 LDH 含量较对照组明显升高(图 1A),故选择 16 h 做为缺氧损伤的时间;干预 40 h 后 3 组培养上清 LDH 含量的比较,与对照组 [$(5.33 \pm 1.25) U/L$] 相比,缺氧组 LDH 释放增加 [$(25.33 \pm 1.70) U/L$],加入 AS-IV 治疗后 LDH 释放减少 [$(18.33 \pm 1.25) U/L$],差异有统计学意义($P < 0.01$,图 1B)。



A:不同缺氧时间细胞培养上清LDH含量;B:缺氧40 h不同组细胞上清LDH含量。

图1 缺氧后各组细胞培养上清LDH含量

Figure 1 LDH concentrations in cultured supernatant of each group after hypoxia

2.2 AS-IV 改善缺氧损伤后细胞活力

CCK-8 是一种基于 2-(2 甲氧基-4-硝基)-3-(4-硝基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐(WST-8)的细胞活力检测试剂,可被活细胞线粒体内的脱氢酶还原成水溶性的橙黄色甲瓚产物,生成的甲瓚产物的数量与活细胞数量呈正比。与对照组 [$(100.00 \pm 3.07)\%$] 相比,缺氧损伤后细胞活力明显降低 [$(81.12 \pm 0.72)\%$];AS-IV 治疗后细胞活力提高 [$(85.71 \pm 2.48)\%$],差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

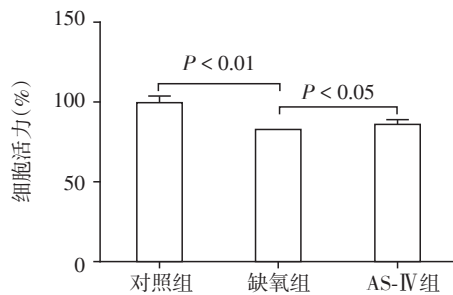


图2 不同组细胞活力检测

Figure 2 Cell viability of different groups

2.3 AS-IV促进内皮细胞迁移

倒置显微镜下观察6孔板划痕区域发现,划痕24 h后对照组划痕区域几乎完全愈合,细胞贴壁较牢,胞间连接紧密;缺氧组的划痕区域细胞迁移较少,细胞连接不紧密,间隙较宽;AS-IV治疗组与缺氧组相比,细胞迁移明显增加,细胞连接较紧密,间隙较小。划痕实验显示AS-IV可促进缺氧损伤后人内皮细胞迁移(图3)。

2.4 AS-IV促进HAECs细胞增殖

细胞周期由G0/G1、S、G2/M期组成,G2期即

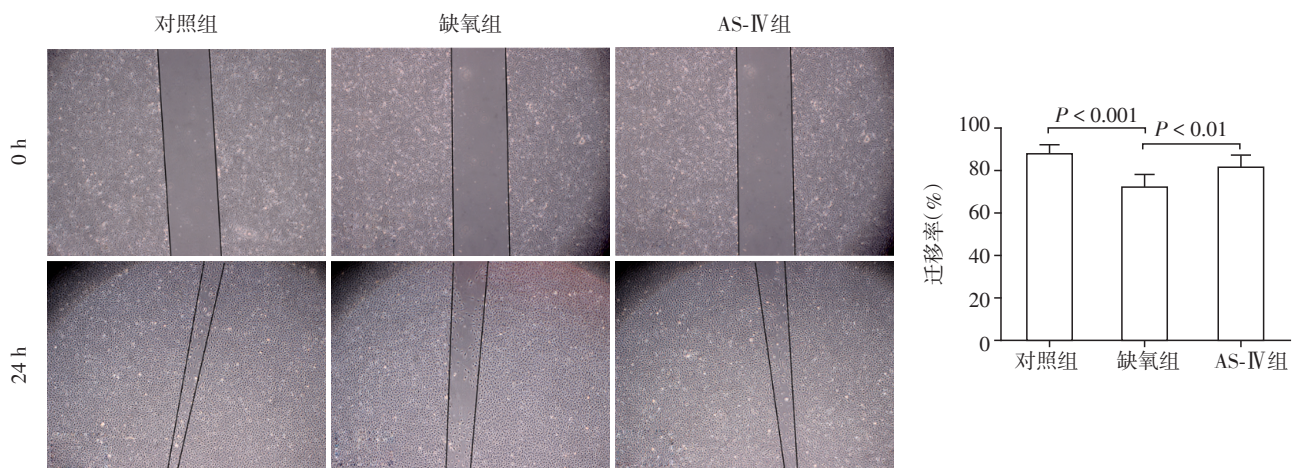


图3 不同组细胞迁移率检测($\times 40$)

Figure 3 Cell migration of different groups($\times 40$)

DNA复制为四倍体,表示细胞处于增殖状态,用流式细胞术检测缺氧对细胞周期的影响,缺氧导致HAECs细胞周期停滞于G0/G1期[(0.94 ± 0.11)%],加入AS-IV后可改善缺氧导致的细胞周期阻滞现象,促进缺氧后HAECs细胞向S期及G2/M期转化,促进细胞增殖(表1)。

表1 不同组细胞周期分布

Table 1 Distribution of cell cycle in different groups (%)

组别	G0/G1期	S期	G2/M期
对照组	0.75 ± 0.20	0.54 ± 0.06	0.55 ± 0.22
缺氧组	0.94 ± 0.11*	0.44 ± 0.07	0.29 ± 0.12*
AS-IV组	0.83 ± 0.20	0.43 ± 0.09	0.56 ± 0.26*

与对照组比较,* $P < 0.01$;与缺氧组比较,* $P < 0.01$ ($n=3$)。

2.5 AS-IV促进HAECs体外成环

ECs在离体基质胶上可形成二维网格状结构,图像分析软件可对小管结果进行定量分析以推测ECs的体外成环能力。本实验在倒置显微镜下观察96孔板基质胶层面发现,对照组HAECs形成完整

的网状管道结构,成管面积较大,成环数目较多,成环数约为(62.10 ± 7.56)个;缺氧组的HAECs形成松散的管腔状排列,细胞间连接松散、断裂,血管成环个数较C组显著降低[(30.91 ± 3.78)个];AS-IV治疗组完整的管状结构较缺氧组明显增多,血管成环的个数较缺氧组相比出现明显提升[(48.64 ± 4.80)个, $P < 0.01$]。基质胶体外成环实验显示AS-IV可增加缺氧损伤后HAECs体外血管的形成(图4)。

2.6 AS-IV对自噬相关蛋白表达的影响

Neclin及LC3-II是重要的自噬相关蛋白,自噬激活时上述蛋白表达水平增高;相反,抑制自噬过程,则其表达水平降低。本实验发现,缺氧损伤后自噬相关蛋白Beclin及LC3-II表达减少,加入AS-IV治疗后,上述蛋白表达增加(图5)。

3 讨论

治疗性血管生成是一种促进动脉侧支循环的有效替代疗法,在缺血性疾病治疗中起着重要作用,可有效恢复血液灌注,改善缺血区域的功能。

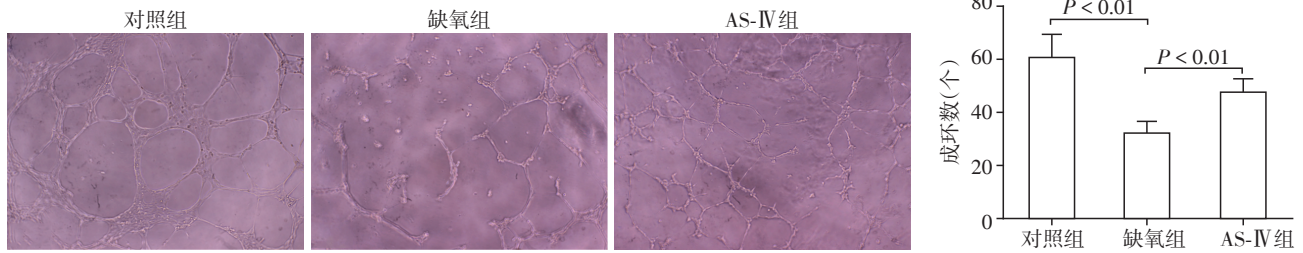


图4 基质胶培养不同组细胞成环情况(×100)

Figure 4 Tube formation in matrigel of different groups (×100)

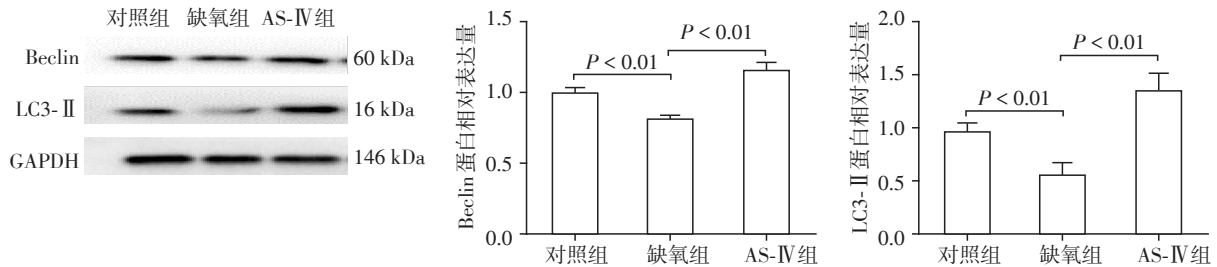


图5 自噬相关蛋白在各组中的表达

Figure 5 Expression of autophagy related proteins in different groups

治疗性血管新生的方法主要有细胞疗法、促血管生成因子疗法以及基因疗法,鉴于上述疗法各自存在一系列未知问题,且需要较高的经济基础,故不具备普遍适用性。越来越多的中药已用于心血管疾病的治疗,AS-IV是黄芪主要活性成分,具有抗炎、抗氧化应激、调节血脂、抑制心室重塑、降低血糖等多种药理学作用。对缺血后肢给予注射负载AS-IV的纳米材料可促进缺血区域微血管的形成^[8],一项对484只缺血再灌注损伤动物实验的Meta分析显示,AS-IV可能通过改善循环、抗炎、抗凋亡以及促进血管生成等途径显著降低AMI的梗死面积^[11]。在AMI实验中发现,AS-IV可通过促进VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、shh及shh信号通路分子的表达诱导心脏血管的生成^[1,12-13],此外,AS-IV可通过上调缝隙连接蛋白CX37、CX40、CX43表达促进间充质干细胞源性内皮样细胞的增殖和血管形成^[14],在动物伤口愈合实验中发现,AS-IV可通过EGFR/ERK信号通路、VEGF通路促进皮肤细胞的增殖和迁移,通过促进血管生成方式促进伤口愈合。Lin等^[7]研究发现AS-IV可通过减少炎症因子表达,抑制氧化应激,刺激自噬及诱导血管生成等方式促进大鼠随意皮瓣移植的存活率。综上所述,AS-IV可通过多种信号通路促进血管新生,维持机体组织生理功能。

缺氧虽是血管新生的重要刺激因素,但缺血组织对低氧应激的反应能力有限,在许多慢性缺血/缺

氧条件下,代偿性血管生成不足及细胞对长时间缺氧刺激的血管生成因子上调能力减弱,需要外加药物或其他干预方式以促进更多的血管新生,恢复缺血区域的血流灌注。在本实验中观察到缺氧可损伤HAECs,抑制细胞迁移、增殖及血管新生,此外利用缺氧培养后的细胞上清液培养正常细胞,并不能增加细胞的迁移和血管形成(具体数据未列出),说明缺氧刺激的促血管生成因子表达极微量,尚不足以产生促进血管生成的作用。本实验还观察到缺氧损伤后加入AS-IV治疗可减轻缺氧对HAECs的损伤效应,改善HAECs功能,促进HAECs迁移、增殖和体外血管形成,提示AS-IV可减轻缺氧导致的HAECs损伤,并且可增加缺氧后HAECs体外血管的新生,恢复缺氧组织的功能。自噬在维持ECs功能及促进血管新生中具有重要作用,生理情况下自噬促进胚胎形成过程中的血管发育,在慢性缺血组织中,自噬可维持内皮祖细胞的血管生成功能^[15-16],在缺血心肌组织中,激活自噬可促进血管新生,利用自噬抑制剂可降低血管生成效应,自噬在血管新生中具有重要作用。本研究发现缺氧可抑制自噬相关蛋白的表达,抑制自噬反应,血管新生减少,加入AS-IV治疗后自噬相关蛋白表达增高,自噬通路被激活,血管新生增加。

AS-IV作为黄芪中天然存在的化合物,可减轻缺氧导致的细胞损伤,可能通过激活自噬信号通路

促进缺氧损伤后内皮细胞血管新生,自噬将为治疗心血管疾病提供新方向,为临床治疗心血管疾病提供新方法。

[参考文献]

- [1] Hausenloy DJ, Botker HE, Engstrom T, et al. Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: trials and tribulations [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(13):935-941
- [2] Caporali A, Back M, Daemen MJ, et al. Future directions for therapeutic strategies in post-ischaemic vascularization: a position paper from European Society of Cardiology Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(11):1411-1421
- [3] Liu Y, Zheng Q, He G, et al. Transmembrane protein 215 promotes angiogenesis by maintaining endothelial cell survival [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(6):9525-9534
- [4] Fu J, Wang Z, Huang L, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi) [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(9):1275-1283
- [5] Li L, Hou X, Xu R, et al. Research review on the pharmacological effects of astragaloside IV [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2017, 31(1):17-36
- [6] Lu Y, Li S, Wu H, et al. Beneficial effects of astragaloside IV against angiotensin II-induced mitochondrial dysfunction in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(5):1223-1232
- [7] Lin R, Chen H, Callow D, et al. Multifaceted effects of astragaloside IV on promotion of random pattern skin flap survival in rats [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(9):4161-4172
- [8] Li H, Wan H, Xia T, et al. Therapeutic angiogenesis in ischemic muscles after local injection of fragmented fibers with loaded traditional Chinese medicine [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(30):13075-13087
- [9] 孙东岳,卢飞艳,丁燕子,等. 黄芪甲苷联合依那普利治疗改善小鼠急性心肌梗死后心功能[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(7):945-949
- [10] Zhou P, Tan YZ, Wang HJ, et al. Hypoxic preconditioning-induced autophagy enhances survival of engrafted endothelial progenitor cells in ischaemic limb [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(10):2452-2464
- [11] Zheng Q, Zhu JZ, Bao XY, et al. A Preclinical systematic review and meta-analysis of astragaloside iv for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Front Physiol*, 2018, 9:795
- [12] Yu JM, Zhang XB, Jiang W, et al. Astragalosides promote angiogenesis via vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in a rat model of myocardial infarction [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5):6718-6726
- [13] Wang C, Li Y, Yang X, et al. Tetramethylpyrazine and astragaloside IV synergistically ameliorate left ventricular remodeling and preserve cardiac function in a rat myocardial infarction model [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 69(1):34-40
- [14] Li Z, Zhang S, Cao L, et al. Tanshinone IIA and Astragaloside IV promote the angiogenesis of mesenchymal stem cell-derived endothelial cell-like cells via upregulation of Cx37, Cx40 and Cx43 [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2):1847-1854
- [15] Dai X, Zeng J, Yan X, et al. Sitagliptin-mediated preservation of endothelial progenitor cell function via augmenting autophagy enhances ischaemic angiogenesis in diabetes [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1):89-100
- [16] Sciarretta S, Yee D, Nagarajan N, et al. Trehalose-induced activation of autophagy improves cardiac remodeling after myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(18):1999-2010

[收稿日期] 2019-03-03