

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.28.018

二甲双胍抑制 Foxp3 的表达诱导乳腺癌细胞凋亡*

黄文君, 陈 健, 田 晶[△]

(桂林医学院生理学教研室, 广西桂林 541004)

摘要:目的 研究二甲双胍对于人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖与凋亡的效应,并探讨 Foxp3 在其中的作用。方法 分别以二甲双胍(5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L)干预人乳腺癌细胞 MCF-7 48 h 后,采用 MTT 法检测细胞增殖抑制率;Hoechst 33258 染色和流式细胞仪分析细胞凋亡;实时(real-time)PCR 检测 Foxp3 和 caspase-3 mRNA 表达水平;Western blot 法检测 Foxp3 蛋白的表达。结果 与对照组(未经二甲双胍处理)相比,二甲双胍作用 MCF-7 细胞 48 h 后,对细胞增殖有明显抑制作用($P < 0.05$);并可明显诱导 MCF-7 细胞凋亡,早期凋亡率分别为 3.76%、8.96% 和 18.67%;经二甲双胍处理后,MCF-7 细胞中 caspase-3 mRNA 表达水平显著上调($P < 0.05$),而 Foxp3 mRNA 和 Foxp3 蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。结论 二甲双胍有抑制 MCF-7 增殖并诱导其凋亡的作用,其机制可能与 Foxp3 表达下调有关。

关键词:二甲双胍;乳腺肿瘤;细胞凋亡;Foxp3

中图分类号:R736.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)28-3749-04

Metformin induced apoptosis in breast cancer cell by decreasing the expression of Foxp3*

Huang Wenjun, Chen Jian, Tian Jing[△]

(Department of Physiology, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004, China)

Abstract: Objective To research the effects of metformin on proliferation and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells and investigate the role of Foxp3 in the effect. **Methods** The inhibit rate of MCF-7 cells was measured by MTT assay after 48 h metformin treatment(5 mmol/L, 10 mmol/L, 20 mmol/L). Metformin-induced cell apoptosis was measured by Hoechst 33258 staining and flow cytometry. The expression levels of Foxp3 and caspase-3 mRNA were detected by real-time PCR. Expression of Foxp3 protein was detected by Western blot. **Results** Metformin markedly inhibited proliferation of MCF-7($P < 0.05$) compared with control group. And the early apoptotic rates increased to 3.76%, 8.96%, and 18.67% with 5 mmol/L, 10 mmol/L, 20 mmol/L metformin treatment, respectively. Metformin increased caspase-3 mRNA expression levels, and decreased the expression levels of Foxp3 mRNA and protein expression levels($P < 0.05$, vs. control). **Conclusion** Metformin could inhibit the proliferation and induce apoptosis of MCF-7, and its mechanism maybe related to down-regulated expression of Foxp3.

Key words: metformin; breast neoplasms; apoptosis; Foxp3

近年来研究发现,用于 2 型糖尿病治疗的一线药物二甲双胍不仅能有效降低血糖和改善胰岛素抵抗,甚至还能降低糖尿病患者肿瘤的发病率和病死率^[1]。据报道,从临床病例的回顾性研究^[2]与体内体外实验^[3-4]的结果来看,二甲双胍具有抑制乳腺癌的效应,有应用于临床抗肿瘤的前景。叉头/翼状螺旋转录因子(forkhead box protein 3, Foxp3)曾被认为高度特异性表达于 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)。但在 2007 年 Hinz 等^[5]首次报道,人胰腺癌细胞同样存在 Foxp3 表达,随后人乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、胃癌以及黑色素瘤等也相继被检测出有 Foxp3 表达^[6-8]。Karnikas 等^[9]体外分别检测了 25 种癌细胞株中 Foxp3 表达,结果所有细胞株中均有不同水平的 Foxp3 表达,并以乳腺癌细胞株 MCF-7 中表达水平最高,提示 Foxp3 可能与多种肿瘤的发生发展有关,特别是与乳腺癌的关系更为密切。而二甲双胍是否能通过调节 Foxp3 的表达以诱导乳腺癌细胞凋亡,目前国内外尚未见有报道。因此,本研究观察了二甲双胍对人乳腺癌细胞株 MCF-7 体外增殖、细胞凋亡的影响,并初步探讨其与 Foxp3 相关的分子机制。

1 材料与与方法

1.1 材料 人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中科院上海细胞库。

细胞培养用 RPMI1640 培养基、双抗及胎牛血清购自美国 Gibco 公司。二甲双胍、噻唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司。Hoechst 染色试剂盒、蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司。绿色荧光蛋白标记的膜连蛋白(Annexin V-FITC)流式细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。Trizol 购自美国 Takara 公司。逆转录试剂盒和 SYBR 实时(real-time)PCR 试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司。PCR 引物由美国 Invitrogen 公司合成。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。小鼠抗人 Foxp3 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。小鼠抗人 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶山羊抗小鼠 IgG 购自北京中衫金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在 5% CO₂、37 °C 的无菌条件下, MCF-7 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液中。细胞培养至 70%~80% 融合时,用 0.25% 胰酶消化传代继续培养。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率 取对数生长期的 MCF-7 细胞以 4×10^3 /孔的细胞数接种于 96 孔培养板中,在 37 °C 条件下继续培养 24 h。实验分别设对照组、二甲双胍干预组(5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L),每组设 6 个复孔。

培养 48 h 后每孔加入 20 μ L MTT (5 mg/mL), 再继续孵育 4 h。每孔内加入 150 μ L 二甲基亚砜 (DMSO), 避光震荡 10 min, 用酶标仪检测光密度 OD_{490} 值, 并以公式: 抑制率 = (对照组 OD_{490} - 二甲双胍组 OD_{490}) / 对照组 $OD_{490} \times 100\%$, 计算出各组的细胞增殖抑制率。

1.2.3 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡 取对数生长期的细胞以 3×10^5 / 孔细胞数接种于 6 孔培养板中, 细胞贴壁生长 24 h。实验设置对照组 (未经二甲双胍处理)、二甲双胍干预组 (二甲双胍 5 mmol/L 组、二甲双胍 10 mmol/L 组、二甲双胍 20 mmol/L 组)。培养 48 h 后以 PBS 洗涤细胞, 固定 10 min, PBS 洗涤细胞, Hoechst 33258 染色液染色 5 min, 通过荧光倒置显微镜观察细胞凋亡情况。每张切片取 10 个高倍视野, 计数 100 个细胞, 以其中凋亡细胞占的百分比作为细胞凋亡率。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期细胞以 3×10^5 / 孔细胞数接种于 6 孔培养板中, 每组设 3 个复孔。培养 48 h 后分别收集各组细胞于 EP 管中, PBS 洗涤 2 次, 分别以 5 μ L Annexin V-FITC 染料和 5 μ L 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染料避光染色 15 min, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.5 Real-time PCR 检测 Foxp3 和 caspase-3 mRNA 表达水平 采用 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA。取 2 μ g RNA 逆转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板用 Real-time PCR 检测 Foxp3 和 caspase-3 mRNA 表达水平, 以 β -actin 为内参照。Foxp3 引物: 上游: 5'-GAA ACA GCA CAT TCC CAG AGT TC-3'; 下游: 5'-ATG GCC CAG CGG ATG AG-3'。caspase-3 引物: 上游: 5'-TGC TAT TGT GAG GCG GTT GT-3'; 下游: 5'-GCA GGG CTC GCT AAC TCC-3'。 β -actin 引物: 上游: 5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG T-3'; 下游: 5'-GGG ATA GCA CAG CCT GGA T-3'。

1.2.6 Western blot 法检测 Foxp3 蛋白的表达 提取蛋白质后以 BCA 法测定其总蛋白含量。分别取各组 40 μ g 总蛋白上样, 随后将蛋白转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后, 加入抗 Foxp3 抗体 (1:1 000) 或 β -actin 抗体 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗 (1:4 000) 室温孵育 2 h, 采用 ECL 发光液

发光, X 线片压片、显影、定影。 β -actin 为内参照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 分析以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对 MCF-7 细胞增殖的影响 MTT 结果显示, 二甲双胍各浓度组作用 48 h 后, 其对 MCF-7 细胞增殖具有抑制效应, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并呈现剂量依赖性, 见表 1。

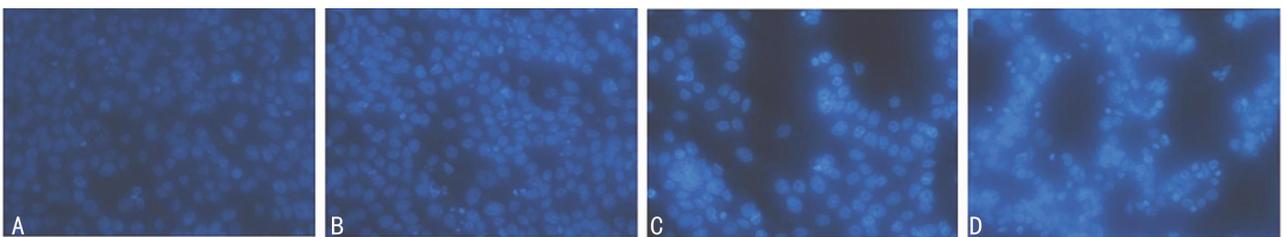
2.2 二甲双胍对 MCF-7 细胞凋亡的影响 Hoechst 33258 染色结果显示, 对照组细胞数量较多, 呈均一蓝色。经二甲双胍处理后, 细胞数量减少, 而细胞核呈致密浓染或呈碎块状的凋亡细胞增多, 见图 1。流式细胞仪凋亡分析结果显示, 对照组早期凋亡率为 0.66%, 而二甲双胍 5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L 各组处理可明显诱导 MCF-7 细胞凋亡, 早期凋亡率分别升高到 3.76%、8.96% 和 18.67%, 呈现剂量依赖性, 见图 2。

2.3 二甲双胍对 MCF-7 细胞 caspase-3 和 Foxp3 mRNA 表达水平的影响 Real-time PCR 结果显示, 二甲双胍各浓度组作用 48 h 后, MCF-7 细胞的 caspase-3 基因表达水平上调, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并呈现剂量依赖性 (图 3B); 与其相反, MCF-7 细胞的 Foxp3 基因表达水平下调, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并呈现剂量依赖性 (图 3C)。

表 1 不同浓度二甲双胍对 MCF-7 细胞的生长抑制作用

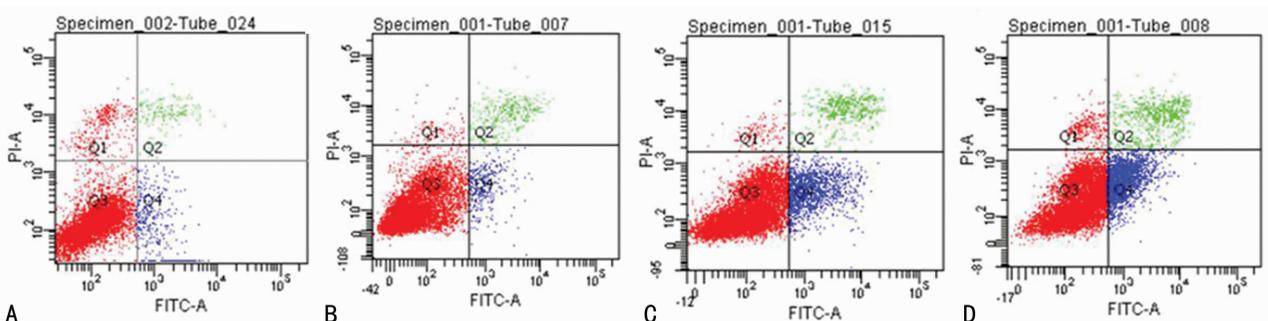
组别	OD_{490} 值	抑制率 (%)
对照组	0.66 ± 0.05	0
二甲双胍 5 mmol/L 组	0.57 ± 0.08^a	13.90
二甲双胍 10 mmol/L 组	0.54 ± 0.08^a	18.79
二甲双胍 20 mmol/L 组	0.48 ± 0.06^a	28.16

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。



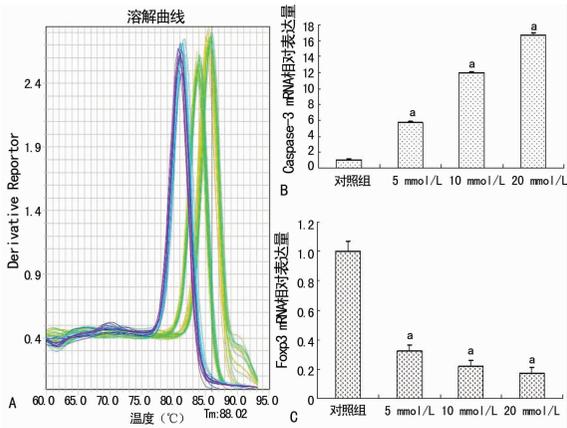
A: 对照组; B、C、D: 分别为二甲双胍 5 mmol/L 组、10 mmol/L 组、20 mmol/L 组。

图 1 Hoechst 33258 染色观察二甲双胍干预后的 MCF-7 细胞凋亡 ($\times 200$)



A: 对照组; B、C、D: 分别为二甲双胍 5 mmol/L 组、10 mmol/L 组、20 mmol/L 组。

图 2 流式细胞仪分析二甲双胍干预后的 MCF-7 细胞凋亡率

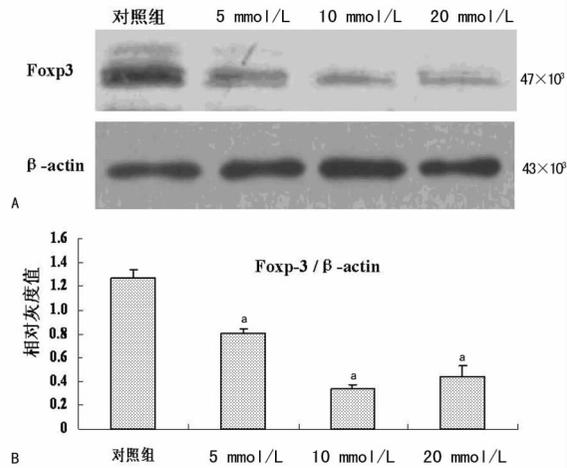


a: $P < 0.05$, 与对照组比较。A: 扩增 Foxp3、caspase-3 和 β -actin 基因的溶解曲线; B: caspase-3 mRNA 表达分析图; C: Foxp3 mRNA 表达分析图。

图 3 二甲双胍对 MCF-7 细胞 Foxp3 和 caspase-3 mRNA 表达水平的影响

2.4 二甲双胍对 MCF-7 细胞 Foxp3 蛋白表达水平的影响

Western blot 结果显示,二甲双胍(5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L)作用 48 h 后,MCF-7 细胞的 Foxp3 蛋白表达水平下调,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。但是二甲双胍 10 mmol/L 组和二甲双胍 20 mmol/L 组比较,细胞的 Foxp3 蛋白表达水平差异无统计学意义,见图 4。



a: $P < 0.05$, 与对照组比较; A: Western blot 图; B: Foxp-3 蛋白相对表达量分析图。

图 4 二甲双胍对 MCF-7 细胞 Foxp3 蛋白表达水平的影响

3 讨论

作为一线降糖药,二甲双胍治疗糖尿病的机制与抑制肝脏的糖异生,促进肌肉和脂肪组织对葡萄糖的摄取,改善机体对胰岛素的敏感性有关^[10]。而近年来关于二甲双胍抗肿瘤效应及其机制的研究却已形成新热点。临床研究显示^[2],对于乳腺癌患者,不管是是否伴有糖尿病,如同时接受二甲双胍和全身化疗,其化疗有效性将显著提高。而动物实验结果也指出,二甲双胍与阿霉素联合用于治疗乳腺癌的异位移植裸鼠模型,可抑制肿瘤生成,预防复发^[3]。而作为体外实验,本研究结果显示,经不同浓度二甲双胍处理后,乳腺癌细胞 MCF-7 的生长抑制率和凋亡率均随着药物浓度的增加而升高;同时作为细胞凋亡执行者的 caspase-3 基因表达水平呈剂量依赖性上调,提示二甲双胍具有抑制乳腺癌增殖与诱导细胞凋亡的作用,可为二甲双胍应用于乳腺癌治疗提供一定的实验依据。为进一步探讨

二甲双胍抗肿瘤效应的机制,本实验同时检测了二甲双胍作用后 MCF-7 细胞中 Foxp3 基因和蛋白的表达情况,结果表明二甲双胍可下调 Foxp3 基因和蛋白的表达,提示 Foxp3 可能参与二甲双胍诱导癌细胞凋亡的过程。

二甲双胍抗肿瘤作用的最关键机制之一是激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)。AMPK 是真核细胞内与细胞能量代谢有关的激酶,其可抑制其下游的磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(protein-serine-threonine kinase, AKT)信号通路^[11],进而下调 Foxp3^[12]和细胞核因子- κ B(NF- κ B)^[13]的表达,最终抑制肿瘤生长,促进肿瘤凋亡,同时在癌细胞中阻断 NF- κ B 信号通路则也可使 Foxp3 的表达下调^[14]。因此,我们推测以上信号网络可能为 Foxp3 参与二甲双胍诱导癌细胞凋亡的机制之一。本实验发现二甲双胍作用 48 h 后,MCF-7 细胞的 Foxp3 基因表达水平下调呈现剂量依赖性。而 10 mmol/L 二甲双胍组和 20 mmol/L 二甲双胍组间,Foxp3 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。分析原因,这可能与观察时间不长,蛋白质表达还不够充分有关。

Foxp3 曾被认为高度特异性表达于 CD4⁺CD25⁺Treg,与 Treg 在胸腺的成熟发育和功能维持均具有十分重要意义^[15]。但自 2007 年开始,Foxp3 逐渐被证实于人胰腺癌、人乳腺癌、肺癌、肝癌、前列腺癌等多种癌细胞中表达,使得人们对 Foxp3 的研究逐渐从 CD4⁺CD25⁺Treg 转移到肿瘤方面^[16]。进一步功能分析证明,Foxp3 作为转录阻遏物,可靶点作用于活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)/催化蛋白位点,通过调节细胞内多种信号途径,在转录水平调控细胞周期以及潜在肿瘤发生^[17-18]。但关于 Foxp3 与肿瘤发生的关系,目前还存在一定的争议。一方面,有学者认为 Foxp3 可促进肿瘤生长,在癌细胞中 Foxp3 的高表达往往预示着病情的恶化程度更高,可能与其逃逸免疫应答有关^[7]。另一方面,也有学者认为 Foxp3 为抑癌基因,由于其在癌细胞中表达降低,而无法抑制肿瘤的生长和转移^[19]。分析其可能原因为 Foxp3 作为 NFAT 和 NF- κ B 的协同抑制因子而抑制两者转录活性,从而调控相关基因表达,例如 IL-2、CLA-4 和 CD25。鉴于将野生型的 Foxp3 cDNA 转入乳腺癌细胞中后,可表现出癌细胞生长抑制的效应^[20],作者推测,在乳腺癌等肿瘤中检测到异常表达增高的是否为突变型的 Foxp3 基因和蛋白,从而发挥促进癌细胞生长的效果,这仍需进一步的研究和探讨。

综上所述,二甲双胍对乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖有抑制作用,并诱导其凋亡,其机制可能与 Foxp3 的基因和蛋白表达下调有关。这为二甲双胍在乳腺癌治疗方面的临床应用提供一定的理论研究基础。

参考文献:

- [1] Baur DM, Klotzsch J, Hamnvik OP, et al. Type 2 diabetes mellitus and medications for type 2 diabetes mellitus are associated with risk for and mortality from cancer in a German primary care cohort [J]. *Metabolism*, 2011, 60 (10): 1363-1371.
- [2] Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(20): 3297-3302.
- [3] Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together

with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19):7507-7511.

- [4] Sanchez-Alvarez R, Martinez-Outschoorn UE, Lamb R, et al. Mitochondrial dysfunction in breast cancer cells prevents tumor growth; understanding chemoprevention with metformin[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(1):172-182.
- [5] Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg H, et al. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17):8344-8350.
- [6] Katoh H, Zheng P, Liu Y. Signalling through Foxp3 as an X-linked tumor suppressor[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(11):1784-1787.
- [7] Kim M, Grimmig T, Grimm M, et al. Expression of Foxp3 in colorectal cancer but not in Treg cells correlates with disease progression in patients with colorectal cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e53630.
- [8] Redpath M, Xu B, van Kempen LC, et al. The dual role of the X-linked FoxP3 gene in human cancers[J]. *Mol Oncol*, 2011, 5(2):156-163.
- [9] Karanikas V, Speletas M, Zamanakou MA, et al. Foxp3 expression in human cancer cells[J]. *J Transl Med*, 2008, 6:19.
- [10] 郑龙轶, 邹大进. 二甲双胍对人肝细胞癌 SMMC7721 增殖的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(11):1261-1263.
- [11] Liu HY, Scholz C, Zang CB, et al. Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast Cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs in vitro[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(5):1627-1637.
- [12] Liu WH, Chang LS. Suppression of Akt/Foxp3-mediated miR-183 expression blocks Sp1-mediated Adam17 expres-

sion and TNF- α -mediated NF- κ B activation in piceatanol-treated human leukemia U937 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(5):670-680.

- [13] Meng LY, Liu HR, Shen Y, et al. Cochinchina momordica seed extract induces G2/M arrest and apoptosis in human breast Cancer MDA-MB-231 cells by modulating the PI3K/Akt pathway[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(12):3483-3488.
- [14] Jia T, Fu HY, Sun JT, et al. Foxp3 expression in A549 cells is regulated by Toll-like receptor 4 through nuclear factor-kappa B[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1):167-172.
- [15] Bandukwala HS, Wu Y, Feurer M, et al. Structure of a domain-swapped Foxp3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells[J]. *Immunity*, 2011, 34(4):479-491.
- [16] Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3[J]. *Immuno Rev*, 2011, 241(1):260-268.
- [17] Fiebich BL, Collado JA, Stratz C, et al. Pseudoephedrine inhibits T-cell activation by targeting NF- κ B, NFAT and AP-1 signaling pathways[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34(1):98-106.
- [18] Loizou L, Andersen KG, Betz AG. Foxp3 interacts with c-Rel to mediate NF- κ B repression[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):e18670.
- [19] Frattini V, Pisati F, Speranza MC, et al. FOXP3, a novel glioblastoma oncosuppressor, affects proliferation and migration[J]. *Oncotarget*, 2012, 3(10):1146-1157.
- [20] Zuo T, Wang L, Morrison C, et al. FOXP3 is an X-linked breast Cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene[J]. *Cell*, 2007, 129(7):1275-1286.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-07-28)

(上接第 3748 页)

compared with thoracotomy [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 138(2):419-425.

- [10] 杨迅, 吴捷, 陈奇勋, 等. 70 岁以上食管癌患者术后肺部并发症危险因素分析[J]. *中华老年医学杂志*, 2009, 28(1):33-36.
- [11] Nakamura M, Iwahashi M, Nakamura M, et al. An analysis of the factors contributing to a reduction in the incidence of pulmonary complications following an esophagectomy for esophageal cancer[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2008, 393(2):127-133.
- [12] Verhage RJ, Hazebroek EJ, Boone J, et al. Minimally invasive surgery compared to open procedures in esophagectomy for cancer: a systematic review of the literature[J]. *Minerva Chir*, 2009, 64(2):135-146.
- [13] Luketich JD, Alvelo-Rivera M, Buenaventura P, et al. Minimally invasive esophagectomy. Outcomes in 222 patients[J]. *Ann Surg*, 2003, 238(4):486-494.

[14] Smetana GW. Postoperative pulmonary complications: an update on risk assessment and reduction[J]. *Cleve Clin J Med*, 2009, 76(4):S60-65.

- [15] Agostini P, Cieslik H, Rathinam S, et al. Postoperative pulmonary complications following thoracic surgery: are there any modifiable risk factors? [J]. *Thorax*, 2010, 65(9):815-818.
- [16] Cooper L. Postoperative complications after thoracic surgery in the morbidly obese patient[J]. *Anesthesiol Res Pract*, 2011, 2011:865634.
- [17] 黄春, 汪斌, 向小勇, 等. 胸外科高龄患者应用大剂量盐酸氨溴索的临床效果[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2012, 28(3):171-173.
- [18] 洪涛, 闻大翔, 皋源, 等. 老年病人围术期呼吸力学变化与术后低氧血症的关系[J]. *上海第二医科大学学报*, 2004, 24(11):919-922.

(收稿日期:2014-05-15 修回日期:2014-06-09)