

黔产莪术油对直肠癌 SW1463 细胞株分泌 Toll 样受体及相关免疫因子的影响

许政旭¹, 朱诗国², 潘年松³, 罗俊^{2*}, 廖彬迅²

(1. 石阡县人民医院, 贵州 石阡 555100; 2. 贵州医科大学, 贵阳 550025;
3. 遵义医药高等专科学校, 贵州 遵义 563002)

[摘要] **目的:**通过研究黔产莪术油对直肠癌 SW1463 细胞中死亡因子受体 (Fas) 的蛋白表达及分泌的免疫因子 Toll 样受体 2 (TLR2), Toll 样受体 4 (TLR4), 白细胞介素-10 (IL-10), 癌基因 C-Raf 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 的影响, 探讨黔产莪术油对肿瘤细胞的免疫效应。**方法:**将水蒸气蒸馏提取的黔产莪术油, 配置成空白组, 黔产莪术油 80, 120, 160, 200 mg·L⁻¹ 组, 作用于直肠癌细胞 SW1463 细胞 24 h 后, 采用免疫酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测不同质量浓度黔产莪术油对 IL-10 水平的影响, 采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Fas, TLR2, TLR4, C-Raf, TGF- β_1 蛋白表达对直肠癌细胞 SW1463 的增殖抑制作用。**结果:**ELISA 检测发现, 与空白组比较, 莪术油组 IL-10 水平随着药物浓度的升高表达降低 ($F = 23.11, P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 与空白组比较, 莪术油组随着药物浓度的升高, TLR2, TLR4, C-Raf 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); Fas, TGF- β_1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:**黔产莪术油抑制 SW1463 细胞的作用免疫作用机制可能与下调 Fas/FasL 通路有关, 使得 Toll 样受体 TLR2, TLR4 蛋白表达下调, 导致相关因子 TGF- β_1 的表达下调, 从而使得细胞凋亡, 起到免疫增强作用。

[关键词] 黔产莪术油; SW1463; Toll 样受体; 死亡因子受体; 转化生长因子- β_1

[中图分类号] R22; R2-031; R285.5; R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0137-05

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2018050137

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171127.0932.034.html>

[网络出版时间] 2017-11-27 9:32

Effect of Guizhou Zedoary Oil on Toll Like Receptor and Related Immune Factors in SW1463 Cell Line

XU Zheng-xu¹, ZHU Shi-guo², PAN Nian-song³, LUO Jun^{2*}, LIAO Bin-xun²

(1. Shiqian People's Hospital, Shiqian 555100, China;

2. Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3. Zunyi Medical College, Zunyi 563002, China)

[Abstract] **Objective:** To Study the effect of Guizhou zedoary oil on death factor receptor (FAS) protein expression, Toll like receptor 2 (TLR2), Toll like receptor 4 (TLR4) and interleukin-10 (IL-10), C-Raf, transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1) in rectal cancer cells SW1463, and investigate the immune effect of Guizhou zedoary oil on tumor cells. **Method:** Guizhou zedoary oil extracted by steam distillation was divided into 80, 120, 160, 200 mg·L⁻¹ groups, and another blank group was also set up. After 24 h treatment on rectal cancer cell SW1463, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the different doses of Guizhou zedoary oil on the expression of IL-10; and Western blot method was used to detect Fas, TLR2, TLR4, C-Raf and TGF- β_1 protein expression levels and investigate its inhibitory effect on rectal cancer cells SW1463 proliferation.

[收稿日期] 20170604(002)

[基金项目] 贵州省科技计划项目(黔科合 LG 字[2011]006 号);贵州省社会发展项目(黔科合 SY(2008)3027 号)

[第一作者] 许政旭, 硕士, 药师, 从事临床药学与中药药理工作, Tel:15285137667, E-mail:1191588819@qq.com

[通信作者] * 罗俊, 博士, 教授, 从事中药药理与肿瘤药理研究, Tel:18685150822, E-mail:724730885@qq.com

Result: ELISA results showed that as compared with blank control group, IL-10 expression was down-regulated with the increase of concentration in Guizhou zedoary oil groups ($F = 23.11$, $P < 0.01$). Western blot results showed that the protein expression levels of TLR2, TLR4 and C-Raf were significantly decreased with the increase of drug concentration ($P < 0.01$), and the protein expression levels of Fas and TGF- β_1 were also decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The immune mechanism of Guizhou zedoary oil in inhibiting SW1463 cells may be associated with down-regulation of Fas/FasL pathway, down-regulation of Toll like receptor TLR2 and TLR4 protein expression, leading to the down-regulation of relate factor TGF- β_1 , so that cell apoptosis is achieved to enhance the immune function.

[Key words] Guizhou zedoary oil; SW1463; Toll receptor; Fas; transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1)

直肠癌是一种常见的恶性肿瘤,据美国 2012 年新发现在世界范围内结直肠癌(CRC)是第 3 大癌症死亡因素之一,发病数 140 万例,其中死亡 69.3 万例^[1]。莪术为姜科植物蓬莪术,广西莪术或温郁金的干燥根茎^[2]。莪术油因莪术产地,加工方法及提取方法的不同,化学组成差异显著。挥发油有直接抑制或破坏癌细胞,影响癌细胞核酸代谢,诱导肿瘤细胞凋亡,增强免疫监视作用^[3]。研究表明不同浓度的莪术油对多种体外培养的肿瘤细胞均有抑制作用^[4-6],但对直肠癌 SW1463 细胞报道极少。

Toll 样受体(TLR)可以识别病原相关模式分子和有害的内源性物质,诱发天然的免疫反应,肠道上皮细胞表达多种 TLRs,包括 TLR2, TLR4, TLR5, TLR9^[7],多种肿瘤中均表达,先天性免疫的病原相关分子模式识别受体 TLR2, TLR4, TLRs 可通过构建肿瘤微环境帮助逃逸肿瘤免疫^[8]。Toll 样受体是目前结直肠癌方面研究的热点,但是针对肿瘤细胞方面的研究较少。报道有黔产莪术挥发油可能通过下调血管生成因子的表达上调抑制性血管生成,达到抑制肿瘤血管的生成,抑制癌细胞的增殖^[9];死亡因子及其受体(Fas/FasL)通道可能与其诱导相关免疫因子有关^[10]。笔者在现有研究^[9-10]基础上,更深入对黔产莪术经水蒸气蒸馏法提取的挥发油进行研究,进一步检测 Toll 样受体 TLR2, TLR4, 白细胞介素(IL)-10, 癌基因 C-Raf, 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 等因子在细胞 SW1463 中的表达,探讨其对 SW1463 细胞凋亡的免疫作用机制。

1 材料

1.1 药物 黔产莪术来源于四川崇州引种的莪术种子,遵义绿普森农业有限公司在遵义市湄潭县种植并提供研究用样品(根茎),经遵义市食品药品检验所副主任药师冯华鉴定为广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* 的根茎,水蒸气蒸馏法提取莪术挥发

油,用聚山梨酯-80 溶解,配成 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 贮存溶液, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。

1.2 细胞 人直肠癌细胞株 SW1463 来源于美国 ATCC 细胞库,编号 CCL-234。

1.3 试剂 胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 1618862);DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司,批号 AAG203799);IL-10 酶联免疫试验(ELISA)试剂盒(武汉优尔生商贸有限公司,批号 L150724650);BCA 蛋白定量试剂盒,ECL 化学发光试剂盒(康为世纪有限公司,批号分别为 100121506,00101510);辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)(H+L)(北京中杉金桥公司,批号 109525);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔多克隆抗体(Proteintech 公司,批号 10494-1-AP);TLR2 兔多克隆抗体,TLR4 兔多克隆抗体(武汉博士德公司,批号分别为 286379,11CM248);Fas 和 TGF- β_1 兔多克隆抗体(美国 Santa 公司,批号分别为 D0214,#A087);C-Raf 兔多克隆抗体(美国 Assay Biotech 公司,批号 210879);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(Solarbio 公司,批号 20150811)。

1.4 仪器 ELx800-MV 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),KJ-210A 型振荡器(姜堰市康健医疗器械有限公司),2001HY-6003 型 CO_2 培养箱(美国 Thermo Forma 公司),011007 型超净工作台(苏州净化设备有限公司),ChemiDocTM XRS+ 型蛋白凝胶成像仪和 Image Lab 图像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),DYY-7C 型电泳仪及转膜仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 SW1463 细胞置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度下,用含 10% Gibco 胎牛血清(FBS)含 1% 青-链霉素混合液的 DMEM 培养液传代培养,实验用细胞均处于对数生长期。

2.2 IL-10 水平含量测定 将对数生长期的

SW1463 细胞消化并制备成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于 $25 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$ 培养瓶中,加 10% FBS 至 3 mL,待细胞铺满瓶底 80% 时,根据细胞抑制率实验结果,在细胞半数抑制率左右时进行分组,空白组(不含血清培养基),莪术油(80, 120, 160, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组,药物作用 24 h 后,收集细胞加入 RIPA 细胞裂解液(临用前加入 1% PMSF),冰浴裂解 30 min,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 以 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。按照 ELISA 试剂盒说明书设置反应体系于 96 孔板上, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h,检测液 A 100 μL $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,检测液 B 100 mL $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 0.5 h,底物 90 μL $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下出现蓝色加入终止液 50 μL 变黄色,450 nm 处测定吸光度 A,根据标准曲线计算出样本中 IL-10 的表达情况,每个样品设置 3 个复孔。

2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Fas, TLR2, TLR4, C-Raf, TGF- β_1 蛋白表达 收集药物处理 24 h 后的细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,用 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,小心吸取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度,取待测蛋白样品 30 μg ,行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜,3% BSA 封闭 1 h 后,加入一抗(1:100)和内参 GAPDH(1:10 000) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 震荡孵育过夜, TBST 漂洗 3 次,后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,常温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,膜上加入 ECL 化学发光试剂,在 ChemiDoc™ XRS + 凝胶成像仪上显色,并用 Bio-Rad Image Lab 图像分析各条带灰度值。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 莪术油对直肠癌细胞中 IL-10 水平的影响 细胞给药作用 24 h 后,与空白组比较,莪术油(80, 120, 160, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组中 IL-10 明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),且呈浓度依赖性。见表 1。

3.2 莪术油对直肠癌细胞中 TLR2, TLR4 蛋白表达的影响 细胞给药作用 24 h 后,与空白组比较,莪术油(80, 120, 160, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 TLR2, TLR4 蛋白表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。随着莪术油质量浓度的升高,对 SW1463 细胞的作用增强,对 TLR2, TLR4 蛋白表达的影响具有浓度依赖性。见图 1, 表 2。

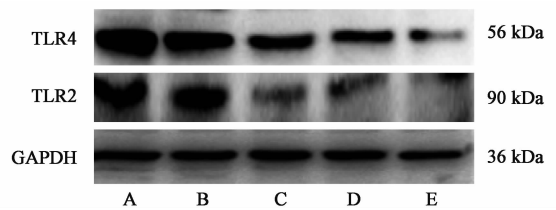
3.3 莪术油对直肠癌细胞中 Fas, TGF- β_1 蛋白表达

表 1 莪术油对 SW1463 细胞 IL-10 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of zedoary oil on IL-10 level in SW1463 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-10/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	636.40 \pm 16.81
莪术油	80	524.69 \pm 3.69 ¹⁾
	120	534.35 \pm 20.57 ¹⁾
	160	484.51 \pm 19.00 ²⁾
	200	408.89 \pm 45.75 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。



A. 空白组; B~E. 莪术油(80, 120, 160, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组(图 2, 3 同)
图 1 莪术油作用 SW1463 细胞后 TLR2, TLR4 蛋白表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of TLR2, TLR4 protein expression after treatment by zedoary oil

表 2 莪术油对 SW1463 细胞 TLR2, TLR4 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of zedoary oil on TLR2 and TLR4 protein expression in SW1463 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	TLR2/ /GAPDH	TLR4/ /GAPDH
空白	-	1.34 \pm 0.11	4.81 \pm 0.83
莪术油	80	1.03 \pm 0.15 ²⁾	3.31 \pm 0.30 ¹⁾
	120	0.59 \pm 0.26 ¹⁾	2.80 \pm 0.26
	160	0.48 \pm 0.24 ²⁾	1.94 \pm 0.28 ¹⁾
	200	0.39 \pm 0.21 ²⁾	1.48 \pm 0.39 ¹⁾

的影响 细胞给药作用 24 h 后,与空白组比较,莪术油(160, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 Fas 和 TGF- β_1 蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。见图 2, 表 3。

3.4 莪术油对直肠癌细胞中 C-Raf 蛋白的表达的影响 细胞给药作用 24 h 后,与空白组比较,莪术油(120, 160, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组 C-Raf 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。见图 3, 表 4。

4 讨论

研究表明,药物作用细胞 24 h 后,TLR2 和 TLR4 蛋白表达均降低,与文献报道一致^[11],提示莪术油具有免疫增强作用。由于 TLR2, TLR4 的激活诱导极强的免疫反应^[12],在早期的研究中, Toll 在抵御病原体的入侵中起着关键作用,体内研究 TGF-

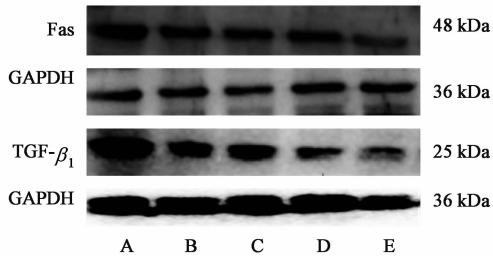


图 2 莪术油作用 SW1463 细胞后 Fas, TGF-β₁ 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of TGF-β₁ protein expression after treatment by zedoary oil

表 3 莪术油对 SW1463 细胞 Fas, TGF-β₁ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of zedoary oil on Fas and TGF-β₁ protein expression in SW1463 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Fas /GAPDH	TGF-β ₁ /GAPDH
空白	-	2.75 ± 1.38	1.33 ± 0.41
莪术油	80	2.53 ± 1.35	1.12 ± 0.20
	120	1.99 ± 0.93	0.80 ± 0.19
	160	1.58 ± 1.02 ¹⁾	0.46 ± 0.14 ¹⁾
	200	1.25 ± 0.96 ¹⁾	0.32 ± 0.16 ¹⁾

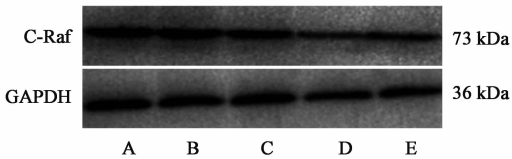


图 3 莪术油作用 SW1463 细胞后 C-Raf 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of C-Raf protein expression after treatment by zedoary oil

表 4 莪术油对 SW1463 细胞 C-Raf 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Effect of zedoary oil on C-Raf protein expression in SW1463 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	C-Raf/GAPDH
空白	-	0.71 ± 0.09
莪术油	80	0.57 ± 0.18
	120	0.39 ± 0.06 ²⁾
	160	0.26 ± 0.09 ²⁾
	200	0.15 ± 0.03 ²⁾

β₁ 在 TLRs 中有重要意义^[13], TLR4 参与肠道的固有免疫和获得性免疫,正因为 TLR4 与 Fas 配体 (FasL) 表达存在正相关性^[14], TLR2, TLR4 同时在 CRC 上皮细胞中稳定高表达,消化道肿瘤中, TLR2 的表达增加^[15]。在大量的研究资料中,对 TLR2 和 TLR4 蛋白的研究较多,但大都局限于选择人的癌组

织及其动物的组织中^[8,16],且在直肠癌细胞中鲜见报道。本课题组选择用体外培养的直肠癌细胞经药物作用后检测其蛋白的表达为出发点,蛋白均表达降低,因此 Toll 样受体在免疫应答方面起着关键性作用。

研究 IL-10 与 Toll 样受体发现,不同的 TLRs 对 IL-10 的表达是通过不同途径表现^[17]。IL-10 是一种多功能的负性调节因子,它是第一个确认其抑制 T 细胞,巨噬细胞等细胞功能和活性的细胞因子^[18],通过抑制抗原体呈细胞的抗原递呈功能,从而影响有效细胞免疫应答,还可抑制抗瘤 T 细胞,巨噬细胞和 NK 细胞的活性,影响免疫活性细胞功能性细胞因子的产生等,本实验检测 SW1463 直肠癌细胞中 IL-10 水平,发现莪术油对直肠癌细胞中 IL-10 有降低作用。C-Raf (Raf-1) 为一种丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 因子,它的激活伴随 MAPK 信号通路的活化,促进细胞周期失调,形成肿瘤^[19], C-Raf 是必不可少的一种酶,引起 MAPK 活化介导生存和生长信号的过度激活,导致癌细胞恶性增殖;因此, C-Raf 的阻断可能同时抑制肿瘤细胞的生存和血管形成^[20]。目前,对 Raf 靶向治疗的药物已有研究^[21],本研究中测定了 C-Raf 蛋白的表达,发现黔产莪术油对 C-Raf 蛋白具有抑制作用,也表明莪术油在 MAPK 通路中有一定的作用。

莪术油的抗肿瘤,增强免疫等活性已经引起人们的重视,通过对其药理、制剂、临床等方面的系统研究,莪术油是一个药理活性强、高效、安全的药物,研究黔产莪术油将会对后期莪术的应用奠定基础,也有利于黔产莪术的开发和后期的基础研究及临床实验。

[参考文献]

[1] Tae H R, Mathew M A, Misra S. Value of screening endoscopy in evaluation of esophageal gastric and colon cancers [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21 (33): 9693-9706.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 257-258.

[3] 黄罗生, 顾燕飞, 李红. 中药挥发油及芳香性药物研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (12): 1605-1611.

[4] 王德立. 中药莪术研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42 (11): 3240-3242.

[5] 吴海霞, 孙志明, 王勤. 莪术油的药理学研究及临床应用研究进展概况 [J]. 中国医药导刊, 2011, 13 (1): 79-83.

- [6] Aggarwal B, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(10) :1397-1421.
- [7] Philana F, Charlotte O D, Caitriona L, et al. Intestinal expression of Fas and Fas ligand is upregulated by bacterial signaling through TLR4 and TLR5, with activation of Fas modulating intestinal TLR-mediated inflammation [J]. *J Immunol*, 2014, 193 (12) : 6103-6113.
- [8] 郑燎原,张猛,李维平. Toll样受体与肿瘤发病机制相关性的研究进展 [J]. *中国神经肿瘤杂志*, 2012, 10 (4) :286-2290.
- [9] 朱诗国,许政旭,罗俊,等. 黔产莪术油对人直肠癌细胞血管生成因子表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(4) :152-158.
- [10] 许政旭,朱诗国,罗俊,等. 黔产莪术油对人直肠癌细胞株 SW1463 细胞增殖及免疫因子的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(13) :102-106.
- [11] 李航宇,孙宏治,李岩,等. TLR2 和 TLR4 在肝细胞癌中的表达及其与增值效应因子之间的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(27) :1-8.
- [12] 周立华,李军,邹娜殊,等. TLR2 和 TLR4 相关疾病与药物研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30 (7) :767-770.
- [13] Hiraku S, Makoto S, Hideki F, et al. TLR4 rather than TLR2, regulates wound healing through TGF- β and CCL5 expression [J]. *J Dermatol Sci*, 2014, 73(2) :117-124.
- [14] 程兆令,李雪梅,杨廷廷,等. 结直肠癌中 TLR4 的表达及其与 FasL、EGFR 的关系 [J]. *山东大学学报*, 2012, 50(5) :92-95.
- [15] Marcela A P, Juliana G O, Aline C T C, et al. TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(25) :7730-7741.
- [16] 郭云蔚,李永伟,尉秀清,等. TLR2 和 TLR4 在原发性肝癌中的表达 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24 (10) :1912-1915.
- [17] Maria T C, Joana G, Pedro F, et al. Differential post-transcriptional regulation of IL-10 by TLR2 and TLR4-activated macrophages [J]. *Eur J Immunology*, 2014, 44 (3) :856-866.
- [18] Moore K W, de Waal Malefyt R, Coffman R L, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19(1) :683-765.
- [19] 殷飞,赵雅娟,姚树坤. Raf-1 在肝细胞肝癌组织的表达 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(6) :618-622.
- [20] 王朝阳. EGFR, Raf-1, Akt 在食管鳞癌中的表达及其临床意义 [D]. 苏州:苏州大学, 2008.
- [21] Hood J D, Bednarski M, Frausto R, et al. Tumor regression by targeted gene delivery to be the neovasculature [J]. *Science*, 2002, 296 (5577) : 2404-2407.

[责任编辑 张丰丰]