

黄芪多糖对结肠癌 SW620 细胞增殖及凋亡作用的影响

阎力君^{*}, 洪涛, 雒江菡, 曹秀明, 刘微, 高原, 崔闻宇, 王福玲
(哈尔滨商业大学 药学院细胞与分子生物学研究所, 哈尔滨 150076)

[摘要] 目的:研究黄芪多糖对结肠癌细胞 SW620 增殖的影响,探讨其抗肿瘤机制。方法:体外培养的 SW620 细胞,分别给予黄芪多糖(0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 g·L⁻¹),培养 48 h 后,用噻唑蓝(MTT)比色法检测黄芪多糖对人结肠癌细胞 SW620 增殖的影响;用 1.0 g·L⁻¹ 黄芪多糖,体外培养 SW620 细胞 48 h 后,碘化丙啶(PI)单染检测药物处理后的肿瘤细胞周期,Annexin V/PI 双染检测药物处理后的肿瘤细胞凋亡率;分别加入 0.25,0.5,1.0 g·L⁻¹ 黄芪多糖,体外培养 SW620 细胞 48 h 后,通过蛋白免疫印记法(Western blot)检测 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3,Caspase-9 和细胞色素 C 的表达。结果:黄芪多糖能够抑制人结肠癌细胞 SW620 的增殖($P<0.05$, $P<0.01$),且呈浓度依赖效应;与空白组比较,黄芪多糖 1.0 g·L⁻¹ 处理组 G₂/M 期比例增加,早期凋亡率增加,并且晚期凋亡率和总凋亡率均增加($P<0.05$, $P<0.01$);与空白组比较,黄芪多糖 0.25,0.5,1.0 g·L⁻¹ 组 Caspase-3,Caspase-9,细胞色素 C 和促凋亡基因 Bax 表达量增加,Caspase-9 前体和抗凋亡基因 Bcl-2 表达降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:黄芪多糖对结肠癌细胞 SW620 具有显著的抑制增殖和诱导凋亡作用,其诱导凋亡机制可能是通过线粒体凋亡通路实现的。

[关键词] 黄芪多糖;抗肿瘤;结肠癌;SW620 细胞;线粒体途径;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)22-0097-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220097

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1404.058.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 14:04

Effect of Astragali Radix Polysaccharides on Proliferation and Apoptosis of Human Colon Cancer Cell Line SW620

YAN Li-jun^{*}, HONG Tao, LUO Jiang-han, CAO Xiu-ming, LIU Wei, GAO Yuan, CUI Wen-yu, WANG Fu-ling
(Institute of Cell and Molecular Biology, School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Astragali Radix polysaccharides on the proliferation of colon cancer cell line SW620, and to explore its anti-tumor mechanism. **Method:** SW620 cells were cultured with different concentrations of Astragali Radix polysaccharides (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g·L⁻¹) *in vitro* for 48 h, and then treated with thiazole blue colorimetry (MTT) to detect the contents of Astragali Radix polysaccharides on the proliferation of human colon cancer cells SW620. Propidium iodide (PI) was used to detect the tumor cell cycle after treatment, and Annexin V/PI double staining was used to detect the apoptotic rate of tumor cells, while SW620 cells were cultured with Astragali Radix polysaccharides (1.0 g·L⁻¹) for 48 h *in vitro*. The protein expressions of Caspase-3, Caspase-9, cytochrome C, Bax and Bcl-2 were detected by Western blot, while SW620 cells were cultured with Astragali Radix polysaccharides (0.25, 0.5, 1.0 g·L⁻¹) for 48 h *in vitro*. **Result:** The growth of SW620 cells was significantly inhibited by APS in a dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with control group, the ratio of G₂/M phase in treatment group of Astragali Radix polysaccharide 1.0 g·L⁻¹ was increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). The early apoptosis rates, the late

[收稿日期] 20170320(011)
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31370764);哈尔滨商业大学研究生创新科研项目(YJSCX2015-395HSD)
[通讯作者] ^{*} 阎力君,博士,教授,从事中药有效成分及活性研究,Tel:0451-84601846,E-mail:lijunyan226@163.com

apoptosis rates and the total apoptosis rates were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Bax/Bcl-2 ratio was significantly increased, and the expression of Caspase-9 was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expressions of activated Caspase-3, activated Caspase-9 and cytochrome C were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Astragali Radix polysaccharide could inhibit the proliferation of human colon cancer SW620 cells and induce the apoptosis of SW620 cells through mitochondrial pathway.

[**Key words**] Astragali Radix polysaccharides; anti-tumor; colon cancer; SW620 cell; mitochondrial pathway; apoptosis

结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤,在我国由于结肠癌而死亡的患者每年大约有 50 万~60 万,其中我国南部是结肠癌的高发地段,其死亡率高居第 4 位^[1]。目前结肠癌的发病机制尚不清楚,文献报道称结肠癌的发生涉及到多个过程和不同阶段,其与外界因素和机体状态均有关^[2]。结肠癌目前的主要治疗手段是放化疗和外科手术^[3],其中化疗多采用西药,因其较大的毒副作用,患者常常不良反应强烈,并且预后状态差^[4],因此最近几年越来越重视中药活性成分的研究。黄芪具有补气固表、益肺健脾等功效,黄芪中的皂苷类成分黄芪甲苷对结肠癌、乳腺癌、胃癌、肺癌等癌症都有治疗作用^[5];黄芪中另一类主要成分多糖,是一种天然活性成分,也具有多种药理作用^[6]。现有研究表明黄芪多糖主要药理作用有增强机体免疫力,抗肿瘤等;据报道黄芪多糖注射液可以明显减轻化疗的不良反 应^[7],而且黄芪多糖通过调控肿瘤组织中的 Notch1/3 的水平以及半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-8 的表达,以促进肺癌细胞的凋亡^[8]。黄芪多糖还能够促进肿瘤细胞启动凋亡程序,抑制肿瘤细胞的恶性增殖^[9]。尽管众多研究表明黄芪多糖能够抑制肿瘤细胞生长^[10],但关于黄芪多糖对结肠癌细胞 SW620 作用的研究鲜有报道。本文以结肠癌细胞株 SW620 作为研究对象,探讨黄芪多糖对结肠癌 SW620 增殖的影响及作用机制,为临床治疗结肠癌提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人结肠癌细胞株 SW620 由中国科学院上海细胞生物研究所提供。

1.2 药物及试剂 黄芪多糖由哈尔滨商业大学药学院提供,批号 161112;噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 M2128);Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)培养基,胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司,批号分别为 12100-046, 25200-072);胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号 sv30087.02);二甲基亚砷(DMSO,美国 Amresco 公司,批号 20110202);

Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(美国 Sigma 公司,批号 APOAF-20TEST);碘化丙啶(PI)周期检测试剂盒(美国 BD 公司,批号 550825);半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3,B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),Caspase-9 抗体,细胞色素 C(cytochrome C)(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 9661, 3498, 2772, 9502, 11940); β -肌动蛋白(β -actin,美国 Abcam 公司,批号 8226)。

1.3 仪器 INC153 型二氧化碳细胞培养箱(Memmer 五洲东方公司);BSA223S-CW 型分析天平(德国 Sartorius 公司);CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);5424R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);DB-20R 型紫外分光光度计(澳大利亚 Dynamica 公司);FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);ELx800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);Mini Protean Tetra Cell 型垂直电泳槽,Mini Trans-Blot Cell 型转膜槽,PowerPac™ Uniwersal Power Supply 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Fusion Fx5 型凝胶成像系统(北京五洲东方科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 MTT 比色法检测肿瘤细胞增殖 取对数生长期的人结肠癌细胞株 SW620,接种到 96 孔板内(每孔 8×10^3 个细胞),培养 24 h;弃培养液,按预设的实验分组方法加入不同质量浓度黄芪多糖(0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),每组设 6 个复孔培养 48 h;然后每孔加入 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL ,继续培养 4 h;然后弃掉上清液,每孔再加入 DMSO 200 μL ,振荡 10 min,用酶标仪检测 490 nm 处吸光度 A;计算细胞抑制率。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 取对数生长期的人结肠癌细胞株 SW620 接种于 60 mm 培养皿中,培养 24 h,弃培养液,加入 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芪多糖继续培养 48 h,收集细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次,弃上清,加入固定液 500 μL ,再加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI

10 μL,混匀,在室温避光处放置 10 min,之后在 1 h 内进行凋亡检测。

2.3 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期的 人结肠癌细胞株 SW620 接种于 60 mm 培养皿中,培养 24 h,弃培养液,加入 1.0 g·L⁻¹黄芪多糖继续培养 48 h,收集细胞,用 PBS 洗涤 1 次,取 5 × 10⁵ 个细胞,离心后,加入周期检测试剂盒溶液 A 250 μL,室温孵育 10 min,再加入溶液 B 200 μL,室温孵育 10 min,加入预冷的溶液 C 200 μL,避光室温冰浴 10 min,进行流式细胞仪检测。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 取对数生长期的 人结肠癌细胞株 SW620 接种于 60 mm 培养皿中,24 h 后换液,加入黄芪多糖 (0.25,0.5,1.0 g·L⁻¹)继续培养 48 h,收集细胞,冰上裂解 10 min 后,12 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清即为总蛋白。以考马斯亮兰法测定蛋白浓度后,取蛋白 30 μg 加上样缓冲液,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳结束后湿法转膜(PVDF 膜),然后用封闭液室温封闭 1 h,分别加入 Bax, Bcl-2, cytochrome C, Caspase-9, Caspase-3 抗体(1:1 000), 4 ℃ 孵育过夜,洗涤缓冲液(TBST)洗 3 次,继而与二抗抗体室温孵育 2 h,洗膜 3 次,发光液发光,显影,定影,X 光片经过凝胶成像系统扫描,并对各条带的灰度值进行分析,β-actin 作为内参,以 Bax, Bcl-2, cytochrome C, Caspase-9, Caspase-3 灰度值与 β-actin 灰度值比值表示各蛋白的相对表达量。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件对所得数据进行统计处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪多糖对肿瘤细胞增殖的影响 培养细胞于对数生长期,分别加入黄芪多糖 (0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 g·L⁻¹)继续培养 48 h。与空白组比较,随着黄芪多糖浓度的增加,SW620 细胞存活率逐渐降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。见表 1。

3.2 黄芪多糖对肿瘤细胞凋亡的影响 培养细胞在对数生长期时,加入黄芪多糖 (1.0 g·L⁻¹)继续培养 48 h。与空白组比较,黄芪多糖组 SW620 早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率均明显增加 (*P* < 0.05, *P* < 0.01),表明黄芪多糖可促进结肠癌细胞 SW620 的凋亡。见表 2。

3.3 黄芪多糖对肿瘤细胞周期的影响 培养细胞

表 1 黄芪多糖对结肠癌细胞 SW620 存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effect of Astragali Radix polysaccharides on SW620 cell viability($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	存活率/%
空白	—	100.00 ± 0.15
黄芪多糖	1.0	82.12 ± 1.34 ²⁾
	0.8	84.61 ± 1.31 ²⁾
	0.6	83.66 ± 1.51 ²⁾
	0.4	86.73 ± 1.40 ²⁾
	0.2	92.87 ± 1.52 ¹⁾
	0.1	92.87 ± 1.43 ¹⁾

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

表 2 黄芪多糖对结肠癌细胞 SW620 凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effect of Astragali Radix polysaccharides on SW620 cell apoptosis($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
空白	—	1.86 ± 1.75	5.50 ± 1.51	7.37 ± 1.32
黄芪多糖	1	5.33 ± 4.83 ¹⁾	32.30 ± 3.11 ²⁾	37.63 ± 1.58 ²⁾

在对数生长期时,加入黄芪多糖 (1.0 g·L⁻¹)继续培养 48 h。与空白组比较,黄芪多糖组 SW620 的 G₂/M 期比例显著增加 (*P* < 0.01),表明黄芪多糖对结肠癌细胞 SW620 具有周期阻滞作用,主要是以 G₂/M 期阻滞为主。见表 3。

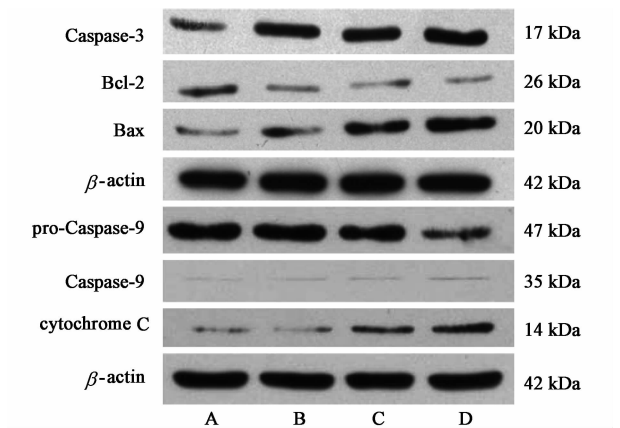
表 3 黄芪多糖对结肠癌细胞 SW620 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of Astragali Radix polysaccharides on SW620 cell apoptosis($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白	—	51.45 ± 2.22	42.79 ± 5.62	5.77 ± 3.4
黄芪多糖	1	18.69 ± 6.51 ²⁾	43.11 ± 0.40	38.21 ± 6.12 ²⁾

3.4 黄芪多糖对肿瘤细胞凋亡蛋白表达的影响 培养细胞在对数生长期时,加入黄芪多糖 (0.25,0.5,1.0 g·L⁻¹)继续培养 48 h。与空白组比较,黄芪多糖 (0.5,1.0 g·L⁻¹)处理的 cytochrome C, Caspase-9, Bax, Caspase-3 蛋白表达显著增高, pro-Caspase-9 和 Bcl-2 蛋白表达显著降低 (*P* < 0.01),表明黄芪多糖可能通过线粒体途径诱导肿瘤细胞 SW620 凋亡。见图 1,表 4。

4 讨论

近年来我国结肠癌的发病率和死亡率逐年增高,而其难以治愈的原因与细胞增殖的失控和



A. 空白组;B~D. 黄芪多糖(0.25,0.5,1 g·L⁻¹)组
图 1 结肠癌细胞 SW620 凋亡相关蛋白表达电泳
Fig.1 Electrophoresis of apoptosis-related protein expressions in SW620 cells

表 4 黄芪多糖对结肠癌细胞 SW620 凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Astragali Radix polysaccharides on apoptosis-related protein expressions in SW620 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	Caspase-3 /β-actin	Bcl-2 /β-actin	Bax /β-actin	pro-Caspase-9 /β-actin	Caspase-9 /β-actin	cytochrome C /β-actin
空白	-	0.277 ± 0.085	0.434 ± 0.136	0.142 ± 0.036	1.295 ± 0.031	0.078 ± 0.006	0.146 ± 0.002
黄芪多糖	0.25	0.634 ± 0.088 ²⁾	0.130 ± 0.005 ²⁾	0.272 ± 0.004 ²⁾	1.286 ± 0.021	0.098 ± 0.002	0.114 ± 0.001
	0.5	0.588 ± 0.021 ²⁾	0.146 ± 0.038 ²⁾	0.558 ± 0.084 ²⁾	1.053 ± 0.029 ²⁾	0.120 ± 0.003 ²⁾	0.456 ± 0.013 ²⁾
	1	0.714 ± 0.057 ²⁾	0.094 ± 0.088 ²⁾	0.690 ± 0.014 ²⁾	0.689 ± 0.021 ²⁾	0.273 ± 0.008 ²⁾	0.787 ± 0.027 ²⁾

比例显著增加,提示黄芪多糖可能通过阻滞 SW620 的 G₂/M 期,进而实现其对结肠癌细胞增殖的抑制。Annexin V/PI 双染法结果表明在黄芪多糖处理后,SW620 晚期凋亡率和总凋亡率均有所增加,与空白组比较具有显著意义,显示黄芪多糖具有显著的诱导结肠癌 SW620 细胞凋亡的作用。

细胞内在的凋亡通路中线粒体作为中心调控者,主要通过产生 cytochrome C,Smac 等,并将这些细胞因子释放到线粒体外,通过这些细胞因子执行其生理功能,而这些细胞因子的功能主要由 Bcl-2 家族蛋白实现^[14]。Bcl-2 家族蛋白在保持促凋亡基因(如 Bax 等)与抑制凋亡基因(如 Bcl-2 等)之间的平衡时发挥作用,在凋亡信号发出时,Bax 等向线粒体聚合,并且促使凋亡因子(如 cytochrome C)释放、聚集、形成凋亡体,引发凋亡^[15]。凋亡体形成过程中激活 Caspase-9 前体,从而引起下游 Caspase 家族(包括 Caspase-3)蛋白酶的激活^[16],由此细胞凋亡发生。因此,Bax 和 Bcl-2 之间的平衡将反映细胞是否发生凋亡,而 Caspase-9,Caspase-3 能够切实反映凋亡的发生与否。本研究结果表明黄芪多糖使 Bax/Bcl-2 增加,并且上调 cytochrome C 以及凋亡标

死亡途径的阻滞有着很大的关系,对于肿瘤的治疗可以从抑制增殖、阻滞细胞周期以及促进凋亡^[11]等手段实现。因此,找到一种能够抑制肿瘤细胞增殖,促进凋亡的天然药物尤为重要。黄芪作为中国传统的补气中药,近年来研究表明黄芪多糖的主要功能有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗炎、提高机体免疫力等作用^[12]。已有学者研究表明黄芪多糖对结肠癌细胞 COLO205 具有抑制增殖,促进凋亡的作用,且应用在临床化疗中^[13]。黄芪多糖作为抗肿瘤的辅助药物,其活性及作用机制的研究具有实际意义和临床价值。本研究结果表明黄芪多糖呈浓度依赖型抑制 SW620 细胞增殖。黄芪多糖处理 SW620 细胞 48 h 后,细胞 G₀/G₁ 期比例下降,S 期有所增加,G₂/M 期

志物蛋白 Caspase-9,Caspase-3 的表达,这说明黄芪多糖可能是通过线粒体途径诱导结肠癌细胞 SW620 凋亡。有关线粒体功能的深入研究以及实际应用日益增多,目前研究表明 Bax 低表达或 Bcl-2 过表达与临床的耐药性有直接关系^[17]。

综上所述,黄芪多糖可以通过阻滞细胞周期于 G₂/M,从而抑制结肠癌 SW620 细胞的增殖,通过线粒体途径促进肿瘤细胞发生凋亡。

[参考文献]

[1] Seshagiri S,Stawiski E W,Durinck S,et al. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer[J]. Nature,2012,488(7413):660-664.
[2] Rani I,Sharma B,Kumar S,et al. Apoptosis mediated chemosensitization of tumor cells to 5-fluorouracil on supplementation of fish oil in experimental colon carcinoma[J]. Tumour Biol,2017,39(3):1-11.
[3] Islam R,Chyou P,Ege H,et al. Primary colon cancer site as a predictor of bevacizumab effectiveness in metastatic colon cancer patients[J]. J Clin Oncol,2011,29(4):53-54.
[4] YIN L,JIANG L P,SHEN Q S,et al. NCAPH plays important roles in human colon cancer[J]. Cell Death

Dis, 2017,8(3):e2680.

[5]

XIE T,LI Y,LI S L, et al. Astragaloside IV enhances cisplatin chemosensitivity in human colorectal cancer *via* regulating Notch3 [J]. Oncol Res, 2016, 24 (6): 447-453.

[6]

郭浩杰,杨严格,安乐,等. 中药多糖的分子修饰及其药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46 (7): 1074-1080.

[7]

戎煜明,张蓓,吴慧瑜,等. 注射用黄芪多糖减轻Ⅱ期结肠癌化疗副反应临床观察 [J]. 中药材, 2011, 34 (4): 657-659.

[8]

ZHANG J X,HAN Y P,BAI C, et al. Notch1/3 and p53/p21 are a potential therapeutic target for aps-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma cell lines [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8 (8): 11254-12539.

[9]

孙舒玉,何小鹏,柴旺,等. 黄芪多糖对黑色素瘤小鼠调节性 T 细胞的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(12):176-178.

[10]

MA J,LIU H, WANG X. Effect of ginseng polysaccharides and dendritic cells on the balance of Th1/Th2 T helper cells in patients with non-small cell lung cancer [J]. J Tradit Chin Med, 2014, 34 (6): 641-645.

[11]

胡泽成. 青龙衣多糖对结肠癌 HCT-116 细胞增殖、凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (18): 136-139.

[12]

陈飞,何先元,周卯勤,等. 超声辅助提取筋骨草多糖及抗氧化性研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27 (3): 551-555.

[13]

郑学芝,李佳,王志刚,等. 黄芪多糖对 COLO205 人结肠癌细胞株抑制作用研究 [J]. 中国食物与营养, 2012, 18 (8): 68-70.

[14]

Kluck R M, Bossy-Wetzel E, Green D R, et al. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [J]. Science, 1997, 275 (5303): 1132-1136.

[15]

Ghibelli L, Diederich M. Multistep and multitask Bax activation [J]. Mitochondrion, 2010, 10 (6): 604-613.

[16]

Tait S W, Green D R. Mitochondria and cell signalling [J]. J Cell Sci, 2012, 125 (4): 807-815.

[17]

Maillet A, Yadav S, Loo Y L, et al. A novel osmium-based compound targets the mitochondria and triggers ROS-dependent apoptosis in colon carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2013, 4 (6): e653.

[责任编辑 张丰丰]