

OCT4 介导卵泡刺激素对永生化人卵巢上皮细胞株增殖、 凋亡和侵袭能力的影响 *

赵贵旭 王倩倩 孙姗姗 顾红琴 席晓薇[△] 张箴波 丰有吉

(上海交通大学附属第一人民医院妇产科 上海 200080)

摘要 目的 探讨 OCT4 基因对卵泡刺激素作用下的永生化人卵巢上皮细胞株(Moody 细胞)增殖、凋亡和侵袭能力影响。方法 :将不同浓度的 FSH(0、25、50、100mIU/ml)作用于 Moody 细胞 48 小时 ,应用 Western-blot 技术检测 OCT4 表达情况。采用慢病毒介导将重组质粒 OCT4 稳定转染至人卵巢上皮细胞株中 ,应用 Western-blot 法鉴定 OCT4 蛋白表达情况。FSH 以 50 mIU/ml 作为工作浓度 ,实验对象分为 4 组 :①siCon 组 ,转染空载体的阴性对照组 ;②OCT4 组 :稳定转染 OCT4 基因的 Moody 细胞组 ;③FSH+siCon 组 以 FSH 处理的 siCon 组 ;④FSH+ OCT4 组 以 FSH 处理的 OCT4 组。采用 MTT 比色法检测各组细胞的增殖情况 ,流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况 ,Transwell 侵袭实验检测各组细胞侵袭能力的变化。结果 :(1)随着 FSH 浓度的增加 ,Moody 细胞中 OCT4 蛋白表达逐渐增高 ,在 FSH 浓度为 50 mIU/ml 时达最高 ;(2) OCT4 基因成功转染至 Moody 细胞中 ,经 Western-blot 检测该基因在细胞中进行蛋白高表达 ;(3) FSH+ OCT4 组细胞增殖活性明显增高 ,同时凋亡率降低 ,与另外三组相比差异具有统计学意义($P<0.05$) ;(4)在 FSH 作用下 ,转染 OCT4 后明显增强了细胞的侵袭能力 ,与另外三组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 :OCT4 介导了 FSH 对人卵巢上皮细胞增殖、凋亡、侵袭活性的调控。

关键词 OCT4 卵泡刺激素 卵巢上皮细胞 增殖 凋亡 侵袭

中图分类号 :R737.31 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)08-1405-05

Effects of Follicle Stimulating Hormone on Proliferation, Apoptosis and Invasion of Immortalized Human Ovarian Epithelial Cells Through OCT4 Gene*

ZHAO Gui-xu, WANG Qian-qian, SUN Shan-shan, GU Hong-qin, XI Xiao-wei[△], ZHANG Zhen-bo, FENG You-ji

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai Jiaotong University Affiliated First People's Hospital, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of follicle stimulating hormone (FSH) on the proliferation, apoptosis, and invasion of immortalized ovarian epithelial cells (Moody) through OCT4 gene. **Methods:** The Moody cells were stimulated by FSH with the concentrations of 0,25,50,100 mIU/ml for 48h. The expression of OCT4 protein was detected by Western blotting. The recombinant plasmids were stably transfected into human ovarian epithelial cells by Lentiviral vector. Western blotting was used to detect the expression of OCT4 protein. And then the cells were stimulated with 50 mIU/ml FSH and were divided into 4 groups: ①siCon: si-Negative control transfected with empty vecot; ②OCT4: Moody cells transfected with OCT4; ③FSH+siCon: siCon group treated by FSH; ④FSH+OCT4: OCT4 group treated by FSH. The proliferation effects of the cells were detected by MTT assay, the apoptosis were examined by flow cytometry and the invasive and migrated ability were examined by Transwell assay. **Results:** The protein expression level of OCT4 treated with FSH of the concentration of 25~100 mIU/ml were all significantly higher than those without FSH treatment and was highest with the concentration of 50 mIU/ml. OCT4 gene was transfected into the Moody cells and Western blotting analysis revealed that the expression of OCT4 protein in stable transfected cells. The proliferation effects were significantly higher in the FSH+ OCT4 group and apoptosis rates were significantly lower in the FSH+ OCT4 group compared with other groups respectively ($P<0.05$). The number of invaded Moody cells was significantly higher in the FSH+ OCT4 group than other groups. **Conclusion:** OCT4 plays an important role in mediating FSH-dependent proliferation, apoptosis, invasion of human ovarian epithelial cells.

Key words: OCT4; Follicle stimulating hormone; Ovarian epithelial cells; Proliferation; Apoptosis; Invasion

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)08-1405-05

* 基金项目 国家自然科学基金项目(81172478)

作者简介 赵贵旭(1984-)男,硕士研究生,主要研究方向 妇科肿瘤、妇科腔镜

电话 :13524815101 E-mail zhao_198406@163.com

[△]通讯作者 席晓薇 E-mail xixiaowei66@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-11-12 接受日期 2011-12-05)

上皮性卵巢癌占卵巢恶性肿瘤的85%~90%,是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,其治疗效果差,病死率居妇科恶性肿瘤之首,且有关上皮性卵巢癌的发生、发展机制至今仍未很好了解。基于流行病学观察资料,现在形成以下几种学说:(1)持续排卵学说;(2)促性腺激素学说;(3)甾体类激素学说;(4)炎症学说。近年来,高卵泡刺激素致病学说引起妇科肿瘤研究者的关注。这一学说可以解释为何卵巢癌多见于围绝经期和绝经后妇女^[1,2],以及为何妊娠和口服避孕药(FSH持续低水平)可降低卵巢癌的发病危险^[3]。相关基础研究也证实,FSH可能通过降低卵巢上皮细胞凋亡率,从而促进细胞增殖,是卵巢癌发生的高危因素^[4]。OCT4基因是POU基因转录因子家族中的一员,主要表达于胚胎干细胞、生殖细胞以及未分化胚胎癌肿,近年研究发现OCT4基因也表达于多种成体干细胞中,如来源于乳腺、胰腺、肝和肾的干细胞^[5]以及毛囊干细胞^[6]、间充质干细胞^[7]和神经祖细胞^[8]等,其对于维持胚胎干细胞的多潜能性和自我更新具有重要的作用,已有学者证实OCT4在上皮性卵巢癌中呈明显高表达^[9]。我们在证实FSH可以促进OCT4表达的基础上,将OCT4基因稳定转染至Moody细胞中,并探索OCT4基因是否介导了FSH促进正常卵巢上皮细胞向肿瘤转化的恶性生物学行为。

1 材料与方法

1.1 药物与制剂

FSH, MCDB105和M199培养基购于Sigma公司;胎牛血清购于Gibco公司;脂质体lipofectamine2000购自Invitrogen公司;OCT4及GAPDH单克隆抗体及二抗均购自Cell Signaling公司;Transwell小室购自Costar公司;Matrigel基质购自BD Biosciences公司。

1.2 细胞培养

将细胞培养在含10%胎牛血清、100U/L青霉素和100U/L链霉素双抗的MCDB105/M199混合培养基中,置于37℃,5%CO₂培养箱中,以0.25%胰酶、0.02%EDTA消化、传代。

1.3 Western blot 检测不同浓度FSH作用下Moody细胞OCT4蛋白表达情况

取处于对数生长期70%密度的Moody细胞,无血清饥饿24小时后,经不同浓度的FSH(0、25、50、100mIU/ml)刺激48小时,收集细胞,用PBS液洗涤,以细胞裂解液冰浴处理30min。细胞裂解物经12000r/min离心5min后取上清,采用BCA法测定蛋白浓度。常规进行SDS-PAGE凝胶电泳后转印至PVDF膜,放入兔抗OCT4一抗(稀释比1:1000)和兔抗GAPDH一抗(稀释比1:1000)各3ml中,4℃过夜,洗膜,按照1:2000加入HRP标记的相应二抗,37℃孵育2h,洗膜后加入E-CL化学发光液,暗室显影2~3min后冲洗胶片,观察结果。

1.4 细胞转染

应用慢病毒介导的方法转染OCT4基因表达载体及空载体于Moody细胞中,嘌呤霉素筛选建立稳定表达OCT4的细胞系及空载体细胞系,PCR检测过表达mRNA情况,Western-blot检测蛋白表达水平,确定稳定转染细胞株,并扩大培养细胞株。

1.5 细胞增殖和凋亡情况的检测

(1)MTT实验:按 1×10^5 个/ml将四组细胞分别制成单细胞悬液,200 μ l/孔接种至96孔中,每组设4复孔。培养48h后,分别于每孔加入20 μ l MTT工作液,37℃继续孵育4h,终止培养。弃净孔内上清液,每孔加入200 μ l DMSO,室温震荡10min。实验重复3次,每次每组取4孔平均值。酶标仪测定490nm波长的吸光度值(OD值)。

(2)细胞凋亡检测:采用流式细胞仪法,按 5×10^5 个/ml将第一、第二组细胞分别制成单细胞悬液,各取2ml接种至6孔板中(每组细胞各接种2孔),向不同组细胞其中一孔加入FSH 50 mIU/ml后培养48h,利用流式细胞仪测定细胞凋亡情况。

1.6 体外侵袭实验

穿膜小室体外侵袭实验:用无血清培养基以1:4稀释Matrigel,以50 μ l/孔包被Transwell小室。取四组细胞,常规消化后用无血清培养基调整细胞浓度为 2.0×10^5 个/ml,将200 μ l各组细胞悬液移入小室内,小室植入24孔板内,在小室下层加入500 μ l含10%FBS的MCDB105和M199混合培养基,培养箱孵育24h,取出Transwell小室,用无菌棉签擦去上室面细胞及Matrigel,甲醛固定,结晶紫染色,在显微镜下计数5个高倍镜视野穿膜的细胞,求出每个视野平均穿膜细胞数,作为评价其侵袭能力的指标。

1.7 统计学方法

采用SPSS13.0软件对数据进行统计学处理,统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用t检验,2个以上样本均数的比较采用F检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FSH对Moody细胞OCT4蛋白表达的影响

经Western-blot方法检测,细胞在不同浓度FSH作用48小时后,OCT4蛋白表达量升高,并在50mIU/ml时达到顶点,发现FSH可以上调Moody细胞OCT4蛋白表达,结果见图1。

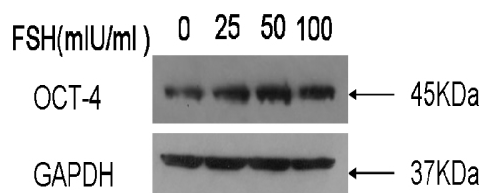


图1 Western blot 检测 FSH 上调 OCT4 蛋白表达情况
Fig.1 Western blot detect the expression of OCT4 protein

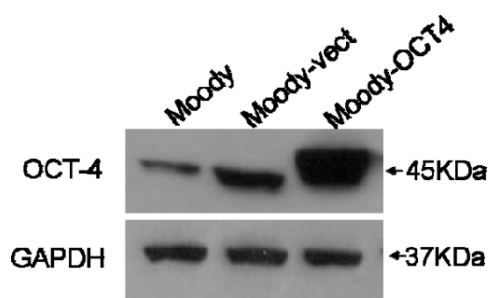


图2 Western blot 检测稳定转染株 OCT4 蛋白表达情况
Fig.2 Western blot detect the expression of OCT4 protein

2.2 稳定转染细胞株 OCT4 蛋白表达检测

采用 Western-blot 的方法对 OCT4 的稳定转染进行鉴定 , 结果显示 转染 OCT4 的 Moody 细胞 OCT4 蛋白呈高表达 , 且其表达量明显高于未转染和转染空载体组 结果见图 2。

2.3 转染 OCT4 后细胞在 FSH 作用下对增殖活性及凋亡的影响

(1)对增殖活性的影响 :MTT 结果显示 ,siCon 组的 OD 值

为 0.133 ± 0.01 ,低于 FSH+siCon 组的 0.163 ± 0.01 ($P<0.05$) ,FSH 对 Moody 细胞系具有促进增殖作用 ;在转染 OCT4 后发现细胞增殖活性也增加 ,OCT4 组的 OD 值为 0.165 ± 0.02 ,高于 siCon 组 ($P<0.05$) ;在转染 OCT4 基础上再应用 FSH 处理细胞 , FSH+OCT4 组 OD 值为 0.213 ± 0.01 均高于其他三组 ($P<0.05$) , 在提高 Moody 细胞 OCT4 表达后 ,FSH 对其促增殖作用增强 , 结果见图 3。

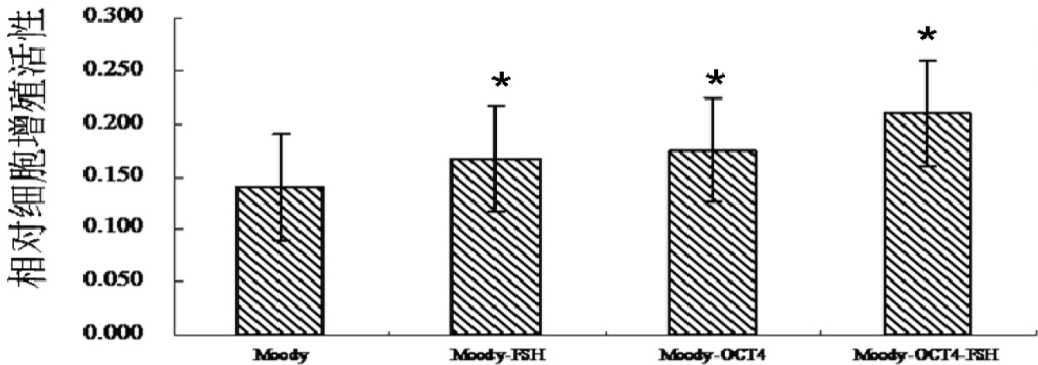


图3 MTT 法检测 OCT4 对 Moody 细胞增殖活性的影响(*p<0.05)
Fig.3 MTT assay detect the proliferation effects of cells

(2)对细胞凋亡的影响 :利用流式细胞仪检测细胞早期凋亡情况结果显示 :细胞早期凋亡率最高的是 siCon 组 ,其凋亡率为 3.11% ;其次是 FSH+siCon 组为 2.69%及 OCT4 组 2.22% ;

凋亡率最低的是 FSH+ OCT4 组 ,该组凋亡率为 1.95%。由此可见 ,FSH 可以抑制 Moody 细胞的早期凋亡率 ,而 OCT4 能够增强 FSH 这一作用 结果见图 4。

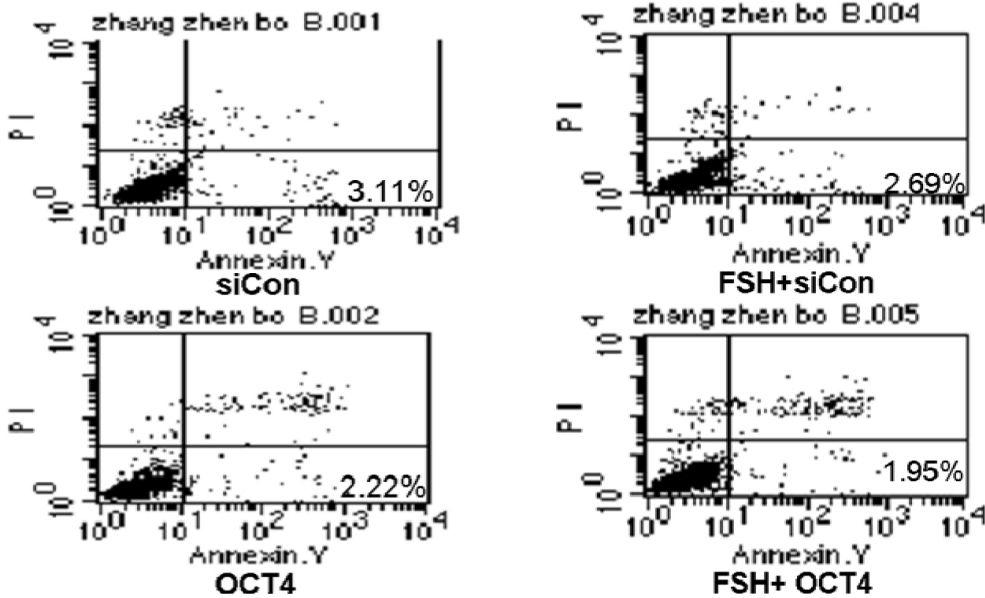


图4 流式细胞仪检测 OCT4 介导的 FSH 对 Moody 细胞早期凋亡的影响
Fig.4 Flow cytometry examine the apoptosis of Moody cells

2.4 对细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验结果显示 :FSH+ OCT4 组穿膜细胞数为 (110 ± 10) 个 ,siCon 组为 (25 ± 4) 个 ,OCT4 组为 (78 ± 12) 个 , FSH+siCon 组为 (42 ± 6) 个。细胞加入 FSH 前后及转染前后比

较 ,差异均有统计学意义 ($P<0.05$) ,其中穿膜数最多的为 FSH+ OCT4 组 ,表明 Oct4 在 FSH 作用下能明显促进细胞的侵袭能力 结果见图 5。

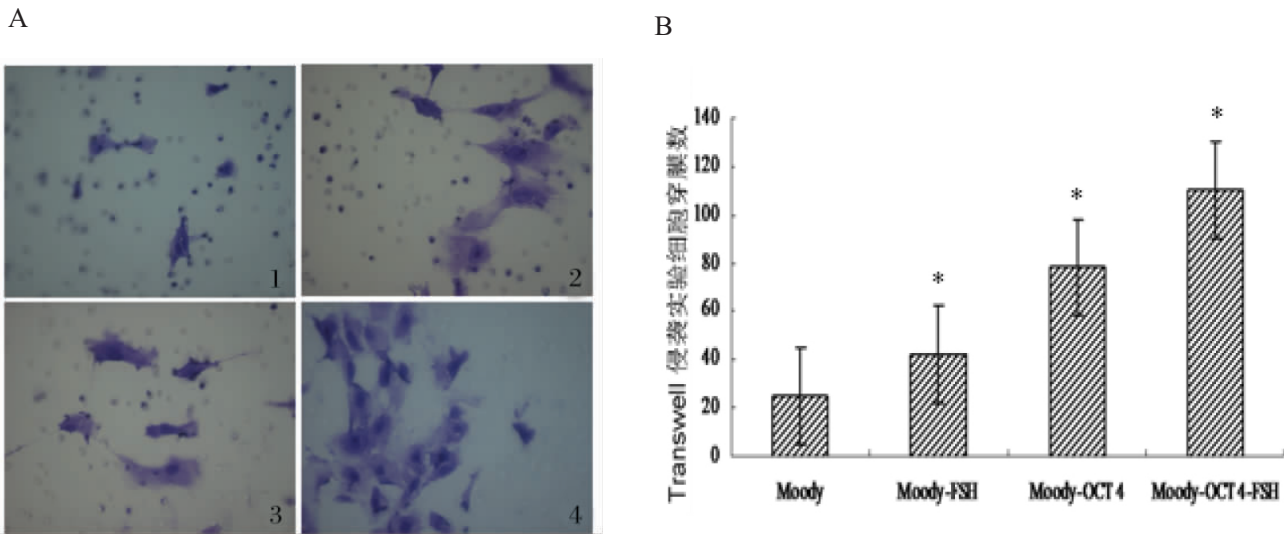


图 5 Transwell 法检测各组细胞的侵袭能力的变化

Fig.5 Transwell assay examine the invasive and migrated ability

A :显微镜下所见 Transwell 实验细胞穿膜情况(200×)1 siCon 组 2 OCT4 组 3 FSH+siCon 组 4 FSH+ OCT4 组.
B :各组细胞穿过 transwell 小室统计图(*P<0.05)

3 讨论

上皮性卵巢癌是威胁妇女生命和健康的主要恶性肿瘤之一,位居女性生殖道肿瘤死亡率之首,具有发病隐匿、易转移、预后差等特点。近年来,尽管医学发展日新月异,卵巢癌的治疗也综合了手术、化疗、放疗、免疫和热疗等多种方法,但由于难于早期发现,易于转移、多重耐药和药物的毒副反应,晚期卵巢癌患者的五年生存率仍然很低,徘徊在 50%以下。因此,对上皮性卵巢癌发生发展、侵袭转移机制进行研究,为改进其诊断方法和治疗手段提供依据就显得尤为重要。

卵泡刺激素是一种糖蛋白激素,能促进颗粒细胞增生,刺激类固醇生成,调节子细胞的发育和成熟,是下丘脑-垂体-性腺轴中的主要激素之一。Shushan 等^[4,10]研究发现 FSH 能够增加女性罹患卵巢上皮性肿瘤的风险,体外动物实验证实,FSH 可诱导老鼠卵巢上皮细胞的增殖^[11],抑制卵巢上皮细胞凋亡^[12],同时还可以提高卵巢恶性及交界性肿瘤 VEGF 表达水平,增加新生血管形成,促进肿瘤侵袭和转移^[13]。

OCT4 也被称为 OCT3、POU5F1、OTF3 或 OTF4,是 POU 转录因子家族中的一员。人 OCT4 基因位于 6 号染色体上(6p21.31),长度为 16.40kb,具有多个转录起始位点,可翻译成多种蛋白质。OCT4 基因主要表达于胚胎干细胞、生殖细胞、未分化胚胎瘤及部分成体干细胞中。相关文献报道,OCT4 在成体细胞内的异位表达可引起上皮的过度增生和肿瘤形成^[14],其可通过 Oct4/Tell/Akt1 途径,上调 Tell 癌基因增强 Akt1 的活性,从而促进肿瘤细胞增殖并抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞生长^[15];另有研究^[16]发现,肿瘤组织细胞分化和成熟与 OCT4 表达下调有关。最近 Zhang 等^[9]收集了 460 例各种卵巢癌上皮病变标本及 35 例健康输卵管上皮标本来比较 OCT4 表达情况,结果证实 OCT4 在从正常上皮(包括卵巢上皮和输卵管上皮)到良性和交界性囊腺瘤再到恶性肿瘤表达逐渐增多,恶性肿瘤中随着组织学 FIGO 分级水平增高 OCT4 表达量也增多。

这些研究均证实 OCT4 基因可能在卵巢癌的发生和发展中发挥重要作用。

FSH 与 OCT4 之间是否存在某种关联目前还未见报道。在本研究中,首先利用不同浓度的 FSH 刺激永生生化人卵巢上皮细胞株,应用 Western-blot 技术检测细胞 OCT4 蛋白表达改变情况,发现在 FSH 作用 48 小时后细胞 OCT4 表达增加,进而我们将 OCT4 稳定转染至 Moody 细胞株并进行验证后,进一步检验 OCT4 在 FSH 作用下对细胞株增殖、凋亡和侵袭能力的影响。我们发现转染 OCT4 后的细胞在 FSH 作用下增殖活性最强,单独转染 OCT4 和单独使用 FSH 刺激组增殖活性较未处理组也有所增强,但弱于 FSH 作用的转染组,该结果提示 OCT4 可能增强了 FSH 促进卵巢上皮细胞增殖的作用。同时检测凋亡结果显示 FSH 能够减少细胞凋亡,而在过表达 OCT4 后能进一步增强 FSH 的抑制凋亡的作用。Transwell 侵袭实验显示永生生化人卵巢上皮细胞穿膜细胞数极少,单独加入 FSH 或者转染 OCT4 能够增加穿膜细胞数,而加入 FSH 的同时过表达 OCT4 显著增加了穿膜细胞数。以上结果提示 OCT4 介导了 FSH 对卵巢上皮细胞株生物学行为的调控,在 FSH 促进细胞增殖,抑制凋亡,增强侵袭能力方面发挥了重要作用。

综上所述,由于卵巢癌发病机制是相当复杂且目前尚未明确,本次实验只是在 FSH 能促进卵巢癌发生,改变卵巢上皮细胞生物学特性的基础上对 OCT4 的功能进行了初步的探讨,但是在 FSH 作用及卵巢癌发生发展过程中,OCT4 究竟是起到了主要作用还是次要作用,是否还有其他基因共同参与,以及其与上下游基因和信号通路之间的相互作用,尚需进一步更加详尽而全面的探讨。

参考文献(References)

[1] Venn A, Watson L, Bruinsma F, et al. Risk of cancer after use of fertility drugs with in vitro fertilization [J]. Lancet, 1999, 354 (9190): 1586-1590

[2] Brekelmans CT. Risk factors and risk reduction of breast and ovarian

- cancer[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2003, 15(1): 63-68
- [3] Gnagy S, Ming EE, Devesa SS, et al. Declining ovarian cancer rates in U.S. women in relation to parity and oral contraceptive use[J]. Epidemiology, 2000, 11(2): 102-105
- [4] Ji Q, Liu PI, Chen PK, et al. Follicle stimulating hormone-induced growth promotion and gene expression profiles on ovarian surface epithelial cells[J]. Int J Cancer, 2004, 112(5): 803-814
- [5] Tai MH, Chang CC, Kiupel M, et al. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis[J]. Carcinogenesis, 20005, 26(2): 495-502
- [6] Yu H, Fang D, Kumar SM, et al. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles [J]. Am J Pathol, 2006, 168(6): 1879-1888
- [7] Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity[J]. Stem Cells, 2005, 23(8): 1105-1112
- [8] Okuda T, Tagawa K, Qi ML, et al. Oct-3/4 repression accelerates differentiation of neural progenitor cells in vitro and in vivo [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 132(1):18-30
- [9] Zhang J, Li YL, Zhou CY, et al. Expression of Octamer-4 in serous and mucinous ovarian carcinoma[J]. J Clin Pathol, 2010, 63(10): 879-883
- [10] Shushan A, Paltiel O, Iscovich J, et al. Human menopausal gonadotropin and the risk of epithelial ovarian cancer[J]. Fertil Steril, 1996, 65(1): 13-18
- [11] Stewart SL, Querec TD, Gruver BN, et al. Gonadotropin and steroid hormones stimulate proliferation of the rat ovarian surface epithelium [J]. J Cell Physiol, 2004, 198:119-124
- [12] Edmondson RJ, Monaghan JM, Davies BR. Gonadotropins mediate DNA synthesis and protection from spontaneous cell death in human ovarian surface epithelium [J]. Int J Gynecol Cancer, 2006, 16(1): 171-177
- [13] Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, et al. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(11): 5290-5296
- [14] Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues[J]. Cell, 2005, 121(3): 465-477
- [15] Hu T, Liu S, Breiter DR, et al. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis [J]. Cancer Res, 2008, 68(16): 6533-6540
- [16] Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors[J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2244-2250

(上接第 1425 页)

- [10] 杨永胜, 关键. 肺表面活性物质相关蛋白与呼吸系统疾病 [J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(3):413-415
Yang Yong-sheng, Guan Jian. Pulmonary surfactant associated protein and the disease of respiratory system [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2011, 16(3):413-415
- [11] 晋大鹏, 胡志帅, 陈书明. 肺表面活性物质相关蛋白 A 与肺部免疫防御研究进展 [J]. 生物学杂志, 2009, 26(2):54-56
Jin Da-peng, Hu Zhi-shuai, Chen Shu-ming. Advance on Protein A Pulmonary Surfactant-associated and Immune Defense in the Lung [J]. Journal of Biology, 2009 26(2):54-56
- [12] 崔纪云, 刘会娟, 龙成凤, 等. 肺表面活性物质相关蛋白 A、D 的研究进展 [J]. 山东医药, 2008, 48(28):112-113
Cui Ji-yun, Liu Hui-juan, Long cheng-feng, et al. The Research Advancement of Pulmonary surfactant associated protein A, D [J]. ShanDong Medical Journal, 2008, 48(28):112-113
- [13] Qian J ian-gang, Ling Wan-li. Determination of Blood ET-1 and Related Cytokines in Pediatric Patient with Bronchial Asthma [J]. J of Radioimmunology, 2005, 18: 89-91
- [14] 骆树新, 许西琳. 肺表面活性物质相关蛋白 A 与慢性阻塞性肺疾病 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(1):5-6
Luo Shu-xin, Xu Xi-lin. Pulmonary surfactant associated protein A in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2011, 25(1):5-6
- [15] Calkovska A, Mokra D, Calkovsky V. Lung surfactant alterations in pulmonary thromboembolism [J]. Eur J Med Res, 2009, 14(7):38-41
- [16] 邱晨, 史菲, 陈彩霞. 哮喘发作期肺表面活性物质对 T 细胞亚群的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(6):806-808
Qiu Chen, Shi Fei, Chen Cai-xia. Effect of pulmonary surfactant on T cell subsets during an asthmatic attack [J]. China Journal of Modern Medicine, 2005, 15(6):806-808
- [17] 郑艳辉, 旷寿金. 支气管哮喘与肺表面活性物质的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2003, 19(2):75
Zheng Yan-hui, Kuang Shou-jin. The Research Advancement of Bronchial asthma and pulmonary surfactant [J]. Hu Nan Journal of Traditional Chinese Medicine 2003, 19(2):75
- [18] Lacaze-Masmonteil T. Expanded Use of Surfactant Therapy in newborns [J]. Clin Perinatol, 2007, 34(1): 179-189
- [19] 汪隽瑛, 方凤, 刘枫, 等. 哮喘大鼠肺表面活性物质结合蛋白 A 的变化及其意义 [J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(11):1255-1257
Wang Jun-ying, Fang Feng, Liu Feng, et al. Changes of pulmonary surfactant-associated proteins A in asthmatic rats [J]. Academic Journal of Second Military, 2004, 25(11):1255-1257
- [20] Floros J, Thomas NJ. Surfactant protein genetics in community-acquired pneumonia: balancing the host inflammatory state [J]. Crit Care, 2011, 15(2):156
- [21] 王向红, 张中乐, 郑海燕, 等. 慢性哮喘豚鼠气道重塑血清电解质及主要脏器 / 体重的变化 [J]. 河南科技大学学报 (医学版), 2006, 24(4): 249-250
Wang Xiang-hong, Zhang Zhong-le, Zheng Hai-yan, et al. Changes of Electrolyte and Ratio of Organ and Body Weight in Airway Remodeling of Chronic Asthmatic Guinea Pig [J]. Journal of Henan University of Science & Technology (Medical Science), 2006, 24(4): 249-250