

自噬在高压氧预处理预防脊髓缺血再灌注损伤中的作用机制研究*

曾毅 张昊鹏 邓姣 王枫 董海龙 熊利泽[△]

(第四军医大学西京医院麻醉科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究自噬在高压氧预处理预防脊髓缺血再灌注损伤中的机制。方法:新生大鼠脊髓神经元原代培养,分为对照组(氧糖剥夺)和高压氧(HBO)预处理组。通过应用免疫组织化学、Western blot 分析两组 LC3- 与凋亡相关分子 Beclin-1, Bcl-2, Caspase-3 的表达变化。结果:发现重复高压氧预处理对氧糖剥夺诱导原代培养的脊髓神经元损伤具有明显的保护作用。免疫组化和 Western blot 显示与对照组相比高压氧预处理显著增加脊髓神经元细胞 Bcl-2 的表达,降低 Beclin-1, Caspase-3 以及自噬的特异性标记蛋白 LC3- 的表达。氧糖剥夺后对照组与高压氧组相比,LDH 释放量明显增多($P<0.05$)。结论:HBO 预处理通过调节自噬减轻缺血再灌注损伤,为 HBO 预处理神经保护提供一条新的作用机制。

关键词:自噬;高压氧;脊髓;缺血再灌注损伤

中图分类号:Q95-3 R614 R743 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)26-5036-05

The Neuroprotective Effect of Autophagy in the Hyperbaric Oxygen Pretreatment to Prevent Spinal Cord Ischemia Reperfusion Injury*

ZENG Yi, ZHANG Hao-peng, DENG Jiao, WANG Feng, DONG Hai-long, XIONG Li-ze[△]

(Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of autophagy in the hyperbaric oxygen pretreatment to prevent spinal cord ischemia-reperfusion injury. **Methods:** Neonatal rat spinal cord neurons were cultured. The neurons were divided into two groups: OGD (oxygen and glucose deprivation) and hyperbaric oxygen preconditioning (HBO) group. By the immunohistochemistry, Western blot analysis of two groups of Beclin-1, PI3K and apoptosis related molecules Bcl-2, of Beclin-1, LC3. Caspase-3 expression changes. **Results:** Repeated hyperbaric oxygen preconditioning on oxygen and glucose deprivation induced primary cultured spinal cord injury has a significant protective effect. Immunohistochemistry and Western blot showed that pretreatment with hyperbaric oxygenation compared with the control group significantly increase spinal cord neurons of Bcl-2 expression, reducing of Beclin-1, caspase-3 and the autophagy-specific marker protein LC3-II's expression. Control group after oxygen and glucose deprivation compared with the HBO group, the LDH release was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** HBO pretreatment by regulating autophagy reduce the ischemic reperfusion injury, at the same time provide a novel mechanism of neuroprotection of HBO pretreatment.

Key words: Autophagy; Hyperbaric oxygen; Spinal cord; Ischemia-reperfusion injury

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R614, R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)26-5036-05

前言

围手术期脊髓缺血损伤有别于临床常见的脊髓损伤,其发生时间有一定的可预见性。因此,实施早期干预措施以预防术中和术后脊髓缺血损伤的发生具有重要的临床意义。“缺血预处理”诱导“脊髓缺血耐受”现象的发现为脊髓保护研究开辟了全新的思路,但“缺血预处理”由于其操作局限性难以直接应用于围手术期脊髓保护。本课题组前期研究证实高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)预处理可以产生脊髓保护作用^[1-3],但目前的研究结果大多仅显示最终效应分子的变化,并没有提出 HBO 预处理诱导缺血耐受相关的信号通路和关键的作用靶点, HBO

预处理机制远未阐明。自噬是一种新的程序性细胞死亡,是细胞代谢及细胞器更新,维持自身稳态的重要机制。近来发现在缺血、炎症等病理条件下,自噬可被激活而参与损伤过程。Baba 最新的研究表明,在脊髓短暂的缺血再灌注损伤可以诱导自噬的发生,明确自噬的激活与细胞死亡密切相关^[4]。最新研究发现,神经组织在低氧或局灶性脑缺血中也会出现自噬的激活,同样参与了脑缺血保护中发挥重要作用^[5]。Itakura 等证实 PI3K 和 Beclin-1 在心肌缺血再灌注阶段自噬现象的诱导中起着重要的作用^[6]。因此本研究利用新生大鼠脊髓神经元原代培养,使用神经元离体高压氧预处理及氧糖剥夺模型,结合分子生物学

* 基金项目 陕西省科学技术研究发展计划项目(2011K12-01-02)

作者简介:曾毅(1972-)男,主治医师,博士,主要研究方向:中枢神经保护

电话:13991267646, E-mail: zengyi1014@163.com

△通讯作者:熊利泽,主任医师,教授,电话:029-84775337, E-mail: lxiong@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2012-03-15 接受日期:2012-04-10)

手段检测自噬分子 PI3K 和 Beclin-1 和凋亡相关蛋白 Bcl-2, Beclin-1, LC3, Caspase-3 的表达变化, 观察自噬体形成通路与凋亡信号通路的相互作用关系, 探讨自噬参与脊髓缺血再灌注损伤过程及 HBO 预处理的神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

原代大鼠皮层神经元培养 无菌条件下, 孕龄 11d~14d 的昆明小鼠断头处死, 剖宫取胎鼠 6~8 只, 暴露椎管和椎间孔, 在解剖显微镜下分离背根节, 剔除软脊膜和血管, 将其放入 D1-SGH (D1 为无钙、镁离子的 Puck 液, SGH 为蔗糖、葡萄糖和 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 缓冲液), 解剖液中清洗 2 次。将组织移入 0.125% 胰酶 +0.125% 胶原酶 +2mg/L EDTA 的复合消化液中, 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中作用 30min, 每隔 10min 轻轻吹打 30 次。消化结束后加入 500 μL FBS 终止消化的复合消化液中, 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中作用 30min, 每隔 10min 轻轻吹打 30 次。消化结束后加入 500 μL FBS 终止消化。将所有混合物用 200 目细胞筛过滤, 取过滤悬液于离心管, 300rpm 离心 3min, 小心去上清。用加入接种液将其制成单细胞悬液, 混匀将细胞接种于 Poly-D-lysine 处理过的 96 孔板 (1×10⁴ 个/孔) 和 100mL 培养瓶中 (2×10⁶ 个/瓶)。1h 后, 待神经元贴壁换为含 B27 的 Neurobasal 培养基培养。24h 后换液, 加入终浓度为 10 μM 阿糖胞苷。48h 全量换含 10% FCS 的 DMEM 培养液。以后每 3 天进行半量换液, 倒置显微镜下观察记录细胞生长状况。持续培养 8d。

1.2 方法

1.2.1 分组 原代培养的脊髓神经元随机分为氧糖剥夺对照组 (Control group) 和高压氧组 (HBO group), 两组后续检测均在 OGD 后 72h 进行。

1.2.2 高压氧预处理 参照 Rothfuss 等的方法进行^[7]。高压氧预处理采用 DWC450-1150 型动物实验氧舱。HBO 组培养原代神经元细胞 3d 后放置于舱中, 以含 98% O₂、2% CO₂ 的混合气体洗舱 10min, 然后在 15min 内加压至 0.35MPa 维持 2h, 其后在 20min 内将舱内条件恢复至正常, 连续进行 5d。对照组仅将神经元细胞于培养 3d 后, 每天放置于舱中不进行加压, 连续进行 5d。

1.2.3 新生鼠皮层神经元氧糖剥夺 (oxygen glucose deprivation OGD) 模型 两组神经元细胞在不同处理条件下培养 8d 后, 将培养液换为不含葡萄糖的 Eagle 培养液并将其置入密闭培养容器, 向其中通入 95% N₂/5% CO₂ 混合气体, 孵育 2h 后, 换含 25mmol/L 葡萄糖的正常培养液, 并恢复常氧培养。

1.2.4 细胞凋亡检测 所用试剂盒为 ApoScreen Annexin V Apoptosis Kit (SouthernBiotech Cat. No. 10010-09)。将 OGD 后 24h 对照组和 HBO 组神经元细胞, 用 10× 磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液浸洗细胞一次, 加入消化液 (0.1% 胰蛋白酶, 0.02% EDTA) 500 μL, 作用至细胞形态变圆, 间隙增大时, 停止消化。在冷的磷酸盐缓冲液中浸洗两次。用凝固缓冲剂 200 μL 反复吹打细胞, 取细胞悬液 100 μL 至 1.5mL 离心管, 避光冰浴 20~30min。加入 1× 凝固缓冲剂 380 μL, 在流式细胞仪上进行检测。

1.2.5 细胞损伤评估 用特异性 LDH (lactate dehydrogenase, LDH) 诊断试剂盒 (南京建成), 按照说明书采用化学比色法计算 LDH 漏出率。

1.2.6 免疫组化染色和阳性细胞计数 移出培养液, PBS 洗涤细胞 1 次。4% 多聚甲醛 4℃ 固定细胞 30min, 预冷 PBS 液洗细胞 3 次, 每次 5 分钟。4℃ 下 0.5% Triton-X100 通透化处理 5min, 再用预冷的 PBS 液洗细胞 3 次, 10% 羊血清于室温封闭 1 小时; 吸走封闭液, 分别加入一抗为 LC3- Beclin-1, Bcl-2, Caspase-3 的多克隆抗体 (1:800), 4℃ 孵育过夜。预冷的 PBS 洗细胞 3 次, 加入二抗 (1:500) 室温孵育 40min, PBS 洗细胞 3 次, 按二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒 (南京建成) 操作说明显色, 苏木素复染 30s, 自来水冲洗, 封片后显微镜下观察。每组取 6 个不同视野计算神经元数目。

1.2.7 Western blot 检测 OGD 后 72 小时分别进行细胞裂解收集蛋白。收集两组细胞总蛋白, 蛋白样品煮沸后经 10% SDS-PAGE 蛋白电泳后, 电泳分离后的蛋白电转至硝酸纤维素膜上 (Millipore, USA), 电转条件为恒流 350mA, 120min。将硝酸纤维素膜浸入 Blotto 封闭液中, 室温摇床上轻轻摇动 1.5 小时。加 5% 脱脂奶粉室温封闭 2h, 再加入用封闭液稀释的一抗 4℃ 孵育过夜。用 TBS-T 洗膜 3 次, 加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗 (羊抗兔 IgG) 室温孵育 2h, 最后用 Western Lightning®-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate (Perkin Elmer, NEL100001EA) 检测显影, 凝胶成像系统拍照。

1.3 统计学处理

各分组所得计量数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 ± 标准误表示, 两独立样本均数间的比较采用 t 检验, 多样本均数间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化

OGD 后 72h, 两组神经元爬片、固定、染色, 观察自噬的特异性标记蛋白 LC3- 与凋亡相关蛋白 Bcl-2, Beclin-1, Caspase-3 表达的变化情况 (图 1) 所示, 高压氧预处理组神经元细胞质中 Bcl-2 的表达显著增加同时 Beclin-1, Caspase-3 的表达明显降低; 自噬特异性蛋白 LC3- 在高压氧预处理组表达明显降低。

每组共选取 6 张爬片在 20 倍镜视野下计算阳性细胞数量, HBO 组和 Control 组相比, LC3- 与凋亡相关蛋白 Bcl-2, Beclin-1, Caspase-3 均有显著差异 ($P < 0.05$), 提示高压氧预处理显著增加脊髓神经元细胞 Bcl-2 的表达, 降低 Beclin-1, Caspase-3 以及自噬的特异性标记蛋白 LC3- 的表达 (图 2)。

2.2 Western blot 检测

Control 组 (n=6)、HBO 组 (n=6) Western blot 检测结果显示, 离体神经元 OGD 后与 Control 组相比, HBO 组神经元 Bcl-2 的表达显著增加同时 Beclin-1, Caspase-3 的表达明显降低; 自噬特异性蛋白 LC3- 在高压氧预处理组表达明显降低 (图 3)。

Western blot 结果进行光密度检测, 对不同蛋白质表达情况进行定量分析, 结果显示: HBO 组和 Control 组相比, Bcl-2 表达明显增高, HBO 预处理使得 LC3- 与凋亡相关蛋白 Beclin-1, Caspase-3 表达均较对照组下降并且有显著差异 ($P < 0.05$), 提示高压氧预处理显著增加脊髓神经元细胞 Bcl-2 的表达, 降

低 Beclin-1 ,Caspase-3 以及自噬的特异性标记蛋白 LC3- II 的表达。(图 4)。

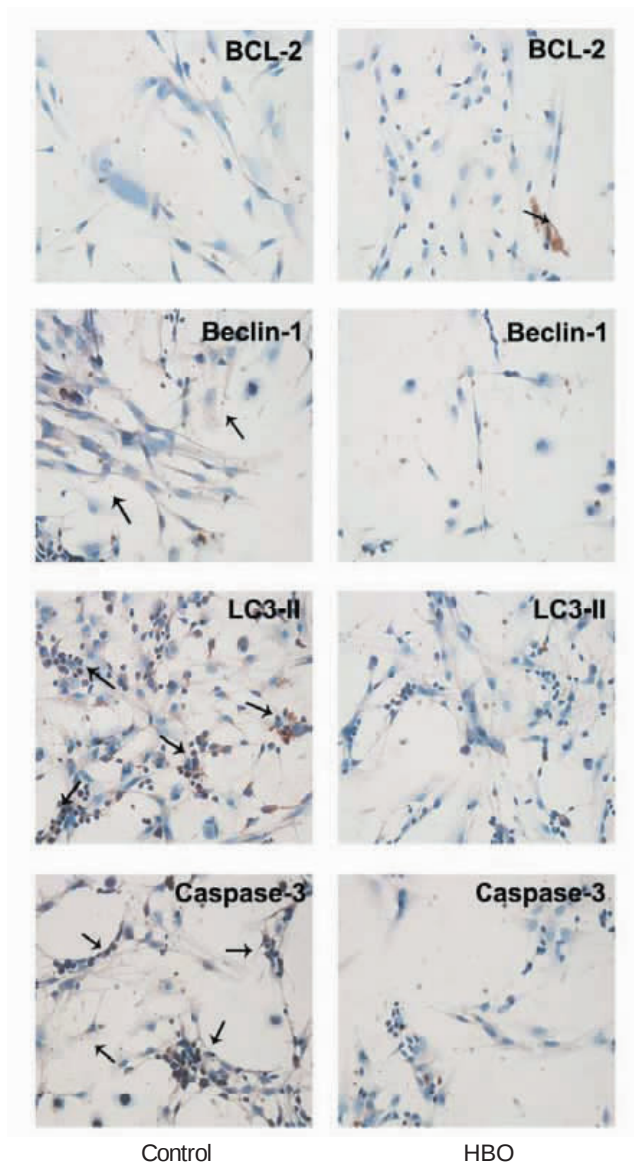


图 1 Control 组与 HBO 组免疫细胞化学染色结果

Fig.1 Control group and HBO group immunocytochemical staining results

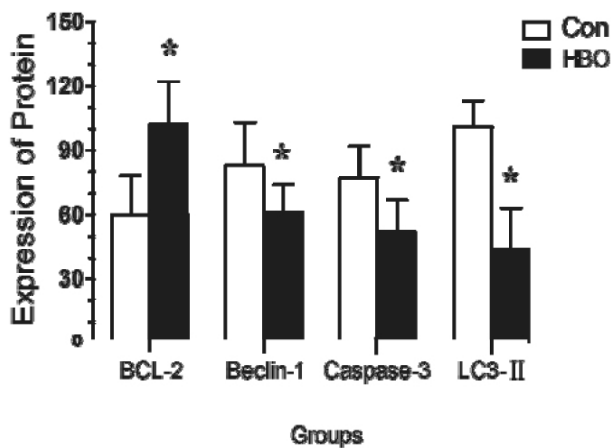


图 2 免疫细胞化学染色阳性神经元计数($\times 20$)($*P<0.05$ VS Con 组)

Fig.2 Count of Positive neurons ($\times 20$) ($*P<0.05$ compare with control group)

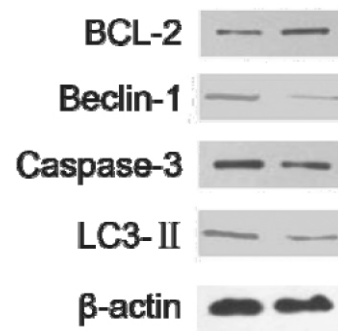


图 3 两组神经元 OGD 后相关蛋白 Western blot 结果

Fig.3 The results of two groups neurons after OGD related protein by Western blot

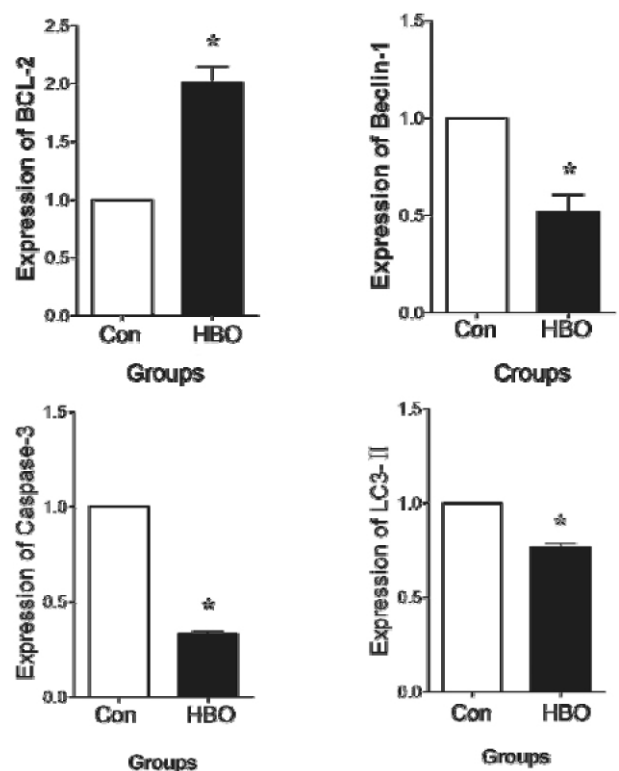


图 4 两组神经元 OGD 后相关蛋白 Western blot 结果光密度分析统计图($*P<0.05$ VS Con 组)

Fig.4 The results of two groups neurons after OGD related protein by Western blot ($*P<0.05$ VS Con)

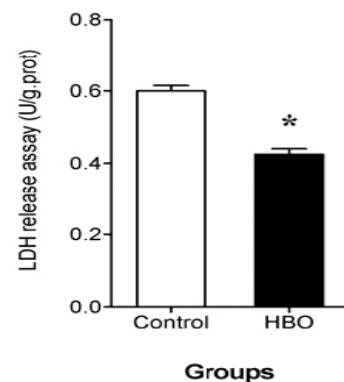


图 5 两组神经元 OGD 后 LDH 水平统计图($*P<0.05$ VS Con 组)

Fig.5 LDH level charts of two groups neurons after OGD ($*P<0.05$ VS Con)

2.3 细胞损伤评估

细胞 OGD 72h 后进行乳酸脱氢酶 LDH 检测,间接反应细胞损伤情况,通过对细胞悬液检测,HBO 组凋亡神经元较 Con 组明显减少,具有统计学差异($P<0.05$)提示 HBO 预处理可以抑制细胞 OGD 后发生的凋亡现象并对神经元产生保护作用,(图 5)。

2.4 细胞凋亡

细胞 OGD 72h 后进行流式细胞仪检测,观察细胞凋亡发生情况,通过 LDH 漏出率检测,HBO 组 LDH 释放量较 Con 组明显减少,具有统计学差异($P<0.05$)提示 HBO 预处理对神经元产生神经保护作用,可以诱导离体神经元对 OGD 产生耐受现象(图 6、7)。

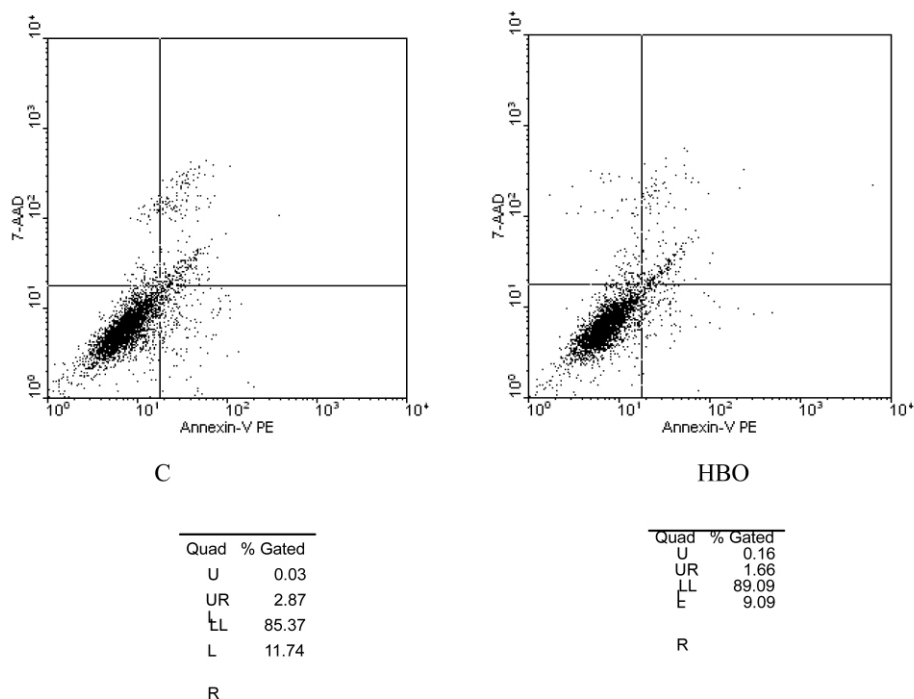


图 6 两组神经元 OGD 后流式细胞仪结果图

Fig.6 Flow cytometry results figure of two groups neurons after OGD

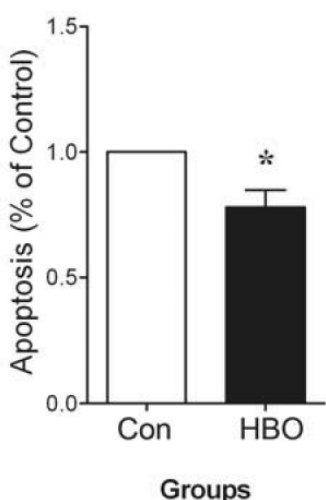


图 7 两组神经元 OGD 后流式细胞仪结果统计图(* $P<0.05$ VS Con 组)

Fig.7 Flow cytometry results figure of two groups neurons after OGD
(* $P<0.05$ VS Con)

3 讨论

本实验发现氧糖剥夺(OGD)处理原代培养的脊髓神经元可引起损伤,而重复高压氧预处理对这种损伤具有明显的保护

作用。免疫组化和 Western blot 显示与对照组相比,高压氧预处理显著增加脊髓神经元细胞 Bcl-2 的表达,降低 Beclin-1、凋亡发生的标志酶 Caspase-3 以及自噬的特异性标记蛋白 LC3-的表达。氧糖剥夺后对照组与高压氧组相比,LDH 释放量明显增多。

自噬(Autophagy)表现为细胞通过单层或双层膜包裹待降解物形成自噬体,然后运送到溶酶体形成自噬溶酶体并进行多种酶的消化及降解,以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。同时对维持细胞的自身稳态也有重要意义^[89]。然而,当这样的吞噬动作没有受到良好的调控时,细胞会因为过度的吞噬而走向死亡。所以 Autophagy 的平衡点是细胞生或死的关键点。大量研究证实,在缺血、炎症等应激状态下,自噬可以被激活且与细胞死亡密切相关^[10,11]。

近期的研究指出,自噬的作用将很大程度上取决于 Beclin-1 与 Bcl-2 之间的平衡关系,Bcl-2 的表达下调不仅可以诱发凋亡,还能通过激动 Beclin-1 来激活自噬,从而导致细胞死亡。已有的文献表明,HBO 预处理可以上调 Bcl-2 的表达^[12],而 Bcl-2 的上调又可以下调 Beclin-1,使自噬得到抑制,从而发挥缺血再灌注期的保护作用^[13]。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白,它主要通过和 Beclin-1 的相互作用来影响自噬,Bcl-2 和 Beclin-1 的平衡状态决定了自噬的作用。理论上认为,Bcl-2 表达下调不仅可以诱发

凋亡而且可以通过激活 Beclin-1 来激活自噬^[14,15]。实验研究也表明通过使缺血再灌注心肌过度表达 Bcl-2 而抑制了再灌注过程中心肌细胞凋亡及自噬性细胞死亡,从而减少了心肌损伤^[16,17]。最新的文献报道,短暂的脊髓缺血再灌注损伤同样可以诱导自噬现象的发生^[18]。我们的研究也显示高压氧预处理可以下调 Bcl-2 的表达^[9]。

实验研究表明脊髓缺血再灌注期, HBO 预处理可能通过调节自噬体形成及活性减轻缺血再灌注损伤。但是自噬体形成的相关分子 Beclin-1、PI3K 与凋亡信号通路相关分子 Bcl-2、caspase-3 的相互作用及其调节关系仍然需要进行深入的研究探讨。

参考文献(References)

- [1] Li Q, Li J, Zhang L, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen induces tolerance against oxidative injury via increased expression of heme oxygenase-1 in primary cultured spinal cord neurons[J]. Life Sci, 2007, 80: 1087-1093
- [2] Nie H, Xiong L, Lao N, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26: 666-674
- [3] Dong H, Xiong L, Zhu Z, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxia induces tolerance against spinal cord ischemia in rabbits[J]. Anesthesiology, 2002, 96: 907-912
- [4] Baba H, Sakurai M, Abe K, et al. Autophagy-mediated stress response in motor neuron after transient ischemia in rabbits [J]. J Vasc Surg, 2009, 50: 381-387
- [5] Yan W, Zhang H, Bai X, et al. Autophagy activation is involved in neuroprotection induced by hyperbaric oxygen preconditioning against focal cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res, 2011, 1402: 109-121
- [6] Itakura E, Mizushima N. Atg14 and UVRAG: mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes[J]. Autophagy, 2009, 5: 534-536
- [7] Rothfuss A, Stahl W, Radermacher P, et al. Evaluation of mutagenic effects of hyperbaric oxygen (HBO) in vitro[J]. Environ Mol Mutagen, 1999, 34: 291-296
- [8] Garber K. Autophagy. Explaining exercise[J]. Science, 2012, 335: 281
- [9] He C, Bassik MC, Moresi V, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis [J]. Nature, 2012, 481: 511-515
- [10] Shi CS, Shenderov K, Huang NN, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction [J]. Nat Immunol, 2012, 13: 255-263
- [11] Swanson MS, Molofsky AB. Autophagy and inflammatory cell death, partners of innate immunity[J]. Autophagy, 2005, 1: 174-176
- [12] Vlodavsky E, Palzur E, Feinsod M, et al. Evaluation of the apoptosis-related proteins of the BCL-2 family in the traumatic penumbra area of the rat model of cerebral contusion, treated by hyperbaric oxygen therapy: a quantitative immunohistochemical study[J]. Acta Neuropathol, 2005, 110: 120-126
- [13] Luo S, Rubinstein DC. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL[J]. Cell Death Differ, 2010, 17: 268-277
- [14] Liu L, Fang YQ, Xue ZF, et al. Beta-asarone attenuates ischemia-reperfusion-induced autophagy in rat brains via modulating JNK, p-JNK, Bcl-2 and Beclin 1[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 680: 34-40
- [15] Grishchuk Y, Ginot V, Truttmann AC, et al. Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons[J]. Autophagy, 2011, 7: 1115-1131
- [16] Dong Y, Undyala VV, Gottlieb RA, et al. Autophagy: definition, molecular machinery, and potential role in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2010, 15: 220-230
- [17] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Eat your heart out: Role of autophagy in myocardial ischemia/reperfusion[J]. Autophagy, 2008, 4: 416-421
- [18] Chen HC, Fong TH, Lee AW, et al. Autophagy is activated in injured neurons and inhibited by methylprednisolone after experimental spinal cord injury[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2012, 37(6):470-475
- [12] 郭花,薛辉.肝硬化动物模型研究进展[J].中国比较医学杂志, 2006, 16(8):499-501
Guo Hua, Xue Hui. Progress in Research on Animal Models of Hepatic Cirrhosis [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2006, 16(8):499-501
- [13] 朱宁川,陈宁.肝病肠道菌群失调与肠源性内毒素血症[J].中国微生物生态学杂志, 2006, 16(1):61
Zhu ning-chuan, Chen ning. Intestinal Microflora Dysregulation and Intestinal Endotoxemia [J]. Chinese Journal of Microecology, 2006, 16(1):61
- [14] 谢国旗,蒋建新,陈永华.肝星形细胞 CD 14 表达变化在内毒素肝损伤中的作用[J].中华医院感染学杂志, 2002, 12(5):344-346
Xie Guo-qi, Jiang Jian-xin, Chen Yong-hua, et al. Dynamic Expression of CD14 on Kupffer Cells in Endotoxin-induced Hepatic Injury [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2002, 12(5):344-346
- [15] Ivan Zanoni, Renato Ostuni, Giusy Capuano, et al. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation [J]. Nature, 2009, 9: 264-268
- [16] Oikawa K, Ohkohchi N, Sato M, et al. Elimination of Kupffer cells suppresses activation of nuclear factor kappa B and production of cytokines and eicosanoids in non-heart-beating donors[J]. Transplant Proc, 2001, 33:839-840
- [17] Lee YG, Lee SH, Lee SM. Role of Kupffer cells in cold/worm ischemia reperfusion injury of rat liver [J]. Arch Pharm Res, 2000, 23(6): 620-625
- [18] Ivan Zanoni, Renato Ostuni, Lorri R. Marek, et al. CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4[J]. Cell, 2011, 147(11):868-880
- [19] 王春妍,杨世忠,江海艳.急性肝损伤大鼠肠源性内毒素血症形成机理及其作用的实验研究 [J].临床肝胆病杂志, 2007, 23(2): 109-111
Wang Chun-yan, Yang Shi-zhong, Jiang Hai-yan. Study on formation mechanism and effect of intestinal endotoxemia in the rats with experimental acute liver injury [J]. Chinese Journal of Clinical Hepatology, 2007, 23(2):109-111
- [20] Urata K, Brault A, Rocheleau B, et al. Role of Kupffer cells in survival after rat liver transplantation with long portal vein clamping times [J]. Transpl Int, 2000, 13(6):420-427

(上接第 5035 页)