

# 紫花牡荆素抑制氧化应激诱导的 HUVEC 细胞凋亡

徐晓东<sup>1</sup>, 邵玲<sup>1</sup>, 邓长金<sup>1</sup>, 白军<sup>2</sup>

(1. 荆门市第一人民医院, 湖北省荆门市 448000; 2. 杭州市红十字会医院, 浙江省杭州市 310003)

[关键词] 紫花牡荆素; 氧化应激; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 研究紫花牡荆素(CAS)对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激诱导的 HUVEC 细胞凋亡的影响及其可能机制。**方法** 体外培养 HUVEC 细胞,在添加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激诱导之前先加入不同浓度的 CAS (5、10 和 20 μmol/L) 预孵 30 min,用 MTT 法观察各组细胞生长活性;用 AO/EB 染色和 FCM 法检测 HUVEC 细胞凋亡情况及其凋亡率;用 Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白表达活性。**结果** MTT 提示与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组相比较,CAS 呈浓度和时间依赖性增加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激诱导的 HUVEC 细胞的生长活性( $P < 0.05$ ),降低 HUVEC 细胞的凋亡数量及凋亡率( $P < 0.05$ );同时下调 Cytochrome C、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),激活 Bcl-2 蛋白表达( $P < 0.05$ ),而 Bax 蛋白表达不变( $P > 0.05$ ),Bcl-2/Bax 上升( $P < 0.05$ )。**结论** CAS 拮抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激诱导的 HUVEC 细胞凋亡可能与其调节内源性线粒体凋亡途径有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Protective Effect of Casticin on Apoptosis of HUVEC Cell Induced by Oxidative Stress

XU Xiao-Dong<sup>1</sup>, SHAO Ling<sup>1</sup>, DENG Chang-Jin<sup>1</sup>, and BAI Jun<sup>2</sup>

(1. First People's Hospital of Jingmen City, Jingmen, Hubei 44800, China; 2. Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310003, China)

[KEY WORDS] Casticin; Oxidative Stress; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effective of casticin(CAS) against human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative stress and its possible molecular mechanism. **Methods** HUVEC cells were cultured in vitro. The cells which would be induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were incubated in advance for 30 minutes with ONY and various concentration of CAS. Cells viability was measured by MTT assay, and its apoptosis-inducing effect were determined by AO/EB and FCM, meanwhile western blot assay was used to measure proteins related to apoptosis. **Results** CAS could increase the viability of HUVEC cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a dose and time-dependent manner compared with cells solo exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ). The number of apoptotic cells and the apoptotic rate of HUVEC cells treated with various concentration CAS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significantly decreased in a dose and time-dependent manner compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group ( $P < 0.05$ ), meanwhile the expression of Cytochrome-C, Caspase-9 and Caspase-3 protein were down-regulated ( $P < 0.05$ ), and protein level of Bcl-2 was activated ( $P < 0.05$ ), while the expression of Bax protein showed no change in the same treatment ( $P > 0.05$ ), and the ratio of Bcl-2/Bax expression level increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CAS could prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HUVEC cells apoptosis which might be correlated with mitochondria-controlled apoptotic pathway.

血管内皮细胞作为血流和血管壁之间的屏障,在维持心血管内环境稳定中起重要作用,而氧化应激和活性氧是内皮细胞损伤和心血管疾病发生发展的关键致病因子,研究表明活性氧诱导的氧化应

激可诱导内皮细胞凋亡<sup>[1]</sup>。紫花牡荆素(5, 3'-dihydroxy-3, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone, casticin, CAS)是一种从蔓荆子(vitex trifolia L)中提取的具有广泛药理活性的多甲基黄酮类化合物,药理学研

[收稿日期] 2013-07-12

[作者简介] 徐晓东,硕士,主治医师,研究方向为心血管药理学。邵玲,硕士,主治医师,研究方向为心血管药理学。通讯作者邓长金,硕士,主任医师,研究方向为心血管药理学,E-mail 为 jmsyxxd2013@126.com。白军,硕士,主治医师,研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。

究表明 CAS 具有抗炎、抗性激素、抗肿瘤作用、抗氧化等作用<sup>[2]</sup>,而 CAS 在心血管方面是否能有治疗作用尚未见文献报道,本研究将进一步验证 CAS 对心血管内皮细胞凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

HUVEC 细胞购自中国典藏,CAS 由南华大学肿瘤研究所提取、分离、纯化获得。RPMI-1640(Gibco 公司);新生小牛血清(杭州四季青公司);DMSO(Amresco 公司);MTT(Sigma 公司);过氧化氢( $H_2O_2$ )(恒瑞医药有限公司);兔抗 Bax 单克隆抗体、鼠抗 Bcl-2 单克隆抗体、鼠抗 Cytochrome-C 单克隆抗体、鼠抗 Caspase-9 和 Caspase-3 单克隆抗体、actin 抗体(Beyotime 公司)。

### 1.2 细胞培养及处理

用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基,置 37℃、 $CO_2$  体积分数为 5% 饱和湿度条件下培养。细胞贴壁生长,取对数生长期细胞用于实验<sup>[3]</sup>。实验分组:空白对照组加生理盐水;溶媒对照组加 DMSO,终浓度为 2%; $H_2O_2$  组加  $H_2O_2$ ,终浓度为 1 mmol/L;CAS 组在加入 1 mmol/L  $H_2O_2$  前 30 min 分别先加 CAS 使终浓度分别为 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ,阳性药物对照 ONY 组在加入 1 mmol/L  $H_2O_2$  前 30 min 加金粉蕨素并使其终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 1.3 MTT 比色测定

细胞以每孔 180  $\mu\text{L}$  (含  $4 \times 10^4$  个细胞)接种于 96 孔培养板,细胞贴壁后加入 20  $\mu\text{L}$  含不同受试物,分别再培养 24、48 和 72 h,再加入 MTT (5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$  继续培养 6 h,加 100  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解蓝色沉淀,用酶标仪(ELX-800)以 570 nm 波长检测吸光度(A)值,计算相对细胞活性抑制率(IR): $IR = (1 - A_{\text{实验组均值}}/A_{\text{空白对照组均值}}) \times 100\%$ <sup>[3]</sup>。按改良寇氏法求出  $IC_{50}$  值。以上实验重复 3 次。

### 1.4 AO/EB 双染色荧光显微镜观察

HUVEC 细胞以每孔 900  $\mu\text{L}$  (含  $4 \times 10^4$  细胞)接种于 24 孔培养板。培养 6 h,待细胞贴壁后加入 100  $\mu\text{L}$  不同受试物,培养 48 h 后,分别用 AO/EB 染色,340 nm 荧光激发,拍照,以上实验重复实验 3 次<sup>[3]</sup>。

### 1.5 碘化丙啶染色 FCM 分析

取 1% 小牛血清同步化处理 24 h 的 HUVEC 细胞,用含受试物的 10% 小牛血清的培养基继续培养 48 h,收集细胞,用冰 PBS 洗 2 遍,用 4℃ 的 70% 的

乙醇固定 24 h 后,碘化丙啶 4℃ 避光染色,流式细胞仪检测<sup>[3]</sup>。以上实验重复 3 次。

### 1.6 Western blot 印迹检测

取不同受试物作用 48 h 后 HUVEC 细胞,提取蛋白并用 30  $\mu\text{g}$  样品用 SDS-PAGE 电泳分离,分别用一抗和二抗孵 PVDF 膜 ECL 发光剂激发荧光,压片显影定影。结果用灰度扫描仪处理分析<sup>[3]</sup>。以上实验重复 3 次。

### 1.7 统计处理

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 13.0 软件行单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CAS 对氧化应激诱导的 HUVEC 细胞生长增殖活性的影响

同一浓度的 CAS 与  $H_2O_2$  共同孵育 HUVEC 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后,与  $H_2O_2$  组相比,HUVEC 细胞的生长活性明显提高( $P < 0.05$ );在同一时间段,经不同浓度的 CAS (5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 与  $H_2O_2$  共同孵育 HUVEC 细胞,与  $H_2O_2$  组相比,HUVEC 细胞的增殖活性明显提高( $P < 0.05$ );ONY 组和 CAS 20  $\mu\text{mol/L}$  组增强 HUVEC 生长活性相当( $P > 0.05$ );CAS 能显著改善  $H_2O_2$  氧化应激诱导 HUVEC 凋亡细胞生长活性,呈时间和剂量依赖性,作用 48 h 的半数抑制浓度  $IC_{50}$  值为 10.48  $\mu\text{mol/L}$  (图 1)。

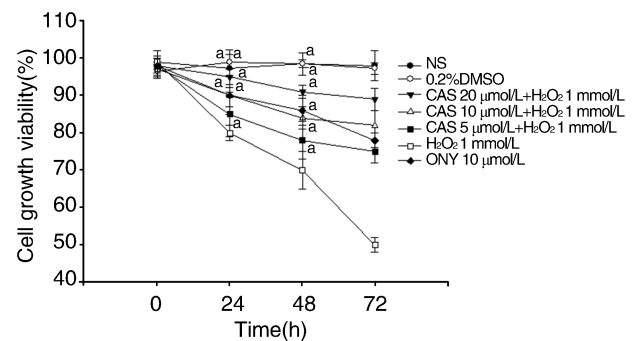


图 1. CAS 对 HUVEC 细胞生长增殖活性的影响 a 为  $P < 0.05$ ,与  $H_2O_2$  组比较。

Figure 1. The effect of CAS on the proliferation of the human HUVEC cells

### 2.2 CAS 对氧化应激诱导的 HUVEC 细胞凋亡形态的影响

$H_2O_2$  作用于 HUVEC 细胞 48 h 后,细胞呈现典型的凋亡形态学改变,细胞体积明显变小,核碎裂成

数个大小不等的黄绿色碎片;不同浓度的 CAS(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )与  $\text{H}_2\text{O}_2$  共同孵育 HUVEC 细胞,细胞凋亡数量明显减少,且随着 CAS 浓度的增大,凋亡细胞

数目逐步减少,提示 CAS 呈浓度依赖性抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化应激诱导 HUVEC 细胞凋亡;而阳性药物对照组 ONY 组细胞凋亡和 CAS 20  $\mu\text{mol/L}$  相当(图 2)。

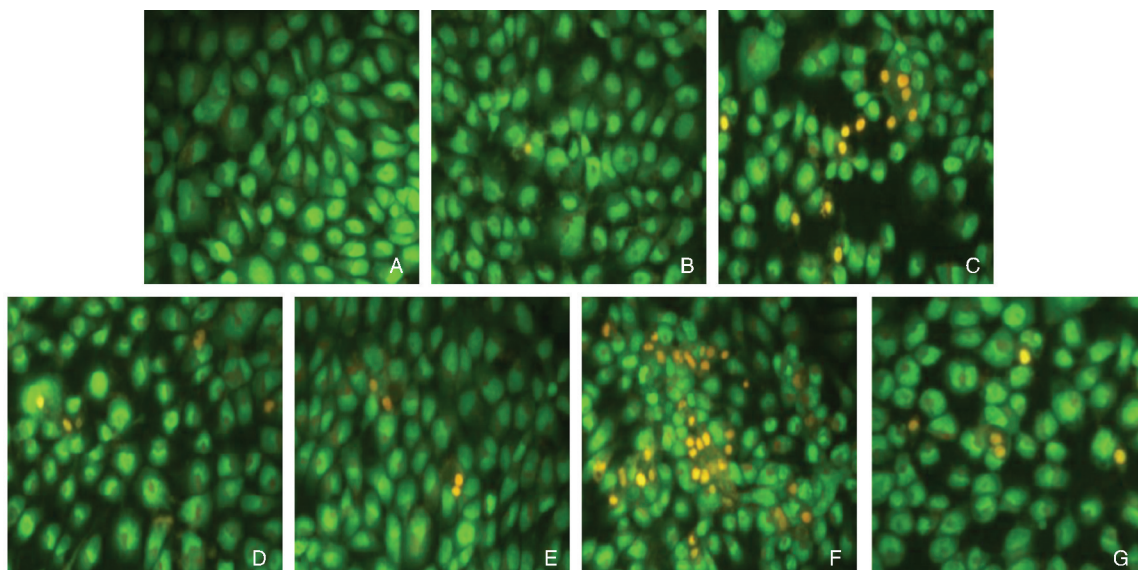


图 2. CAS 对氧化应激诱导的 HUVEC 细胞凋亡形态的影响 A 为 NS 组,B 为 0.2% DMSO 组,C 为 CAS 5  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组,D 为 CAS 10  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组,E 为 CAS 20  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组,F 为  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组,G 为 ONY 10  $\mu\text{mol/L}$  组。

Figure 2. The effect of CAS on the formation induced by oxidation stress of the human HUVEC cells

### 2.3 CAS 对氧化应激诱导的 HUVEC 细胞凋亡率的影响

经 1  $\text{mmol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 HUVEC 细胞 48 h 后,细胞出现典型的凋亡特征的亚二倍体峰,凋亡率为 48%;而经不同浓度的 CAS(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )与  $\text{H}_2\text{O}_2$  共同孵育 HUVEC 细胞 48 h 后,细胞凋亡

率分别为 30.8%、23.3% 和 16.6%,与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),CAS 各处理组之间比较差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ );而阳性药物对照组 ONY 凋亡率为 17.9%,与 CAS 20  $\mu\text{mol/L}$  组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ;图 3 和图 4)。

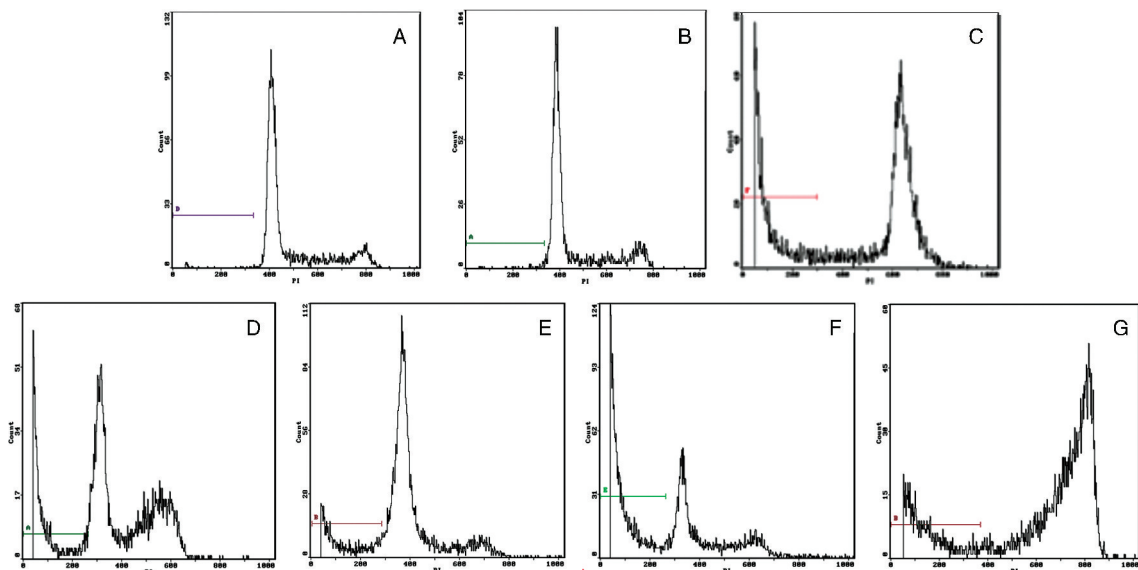
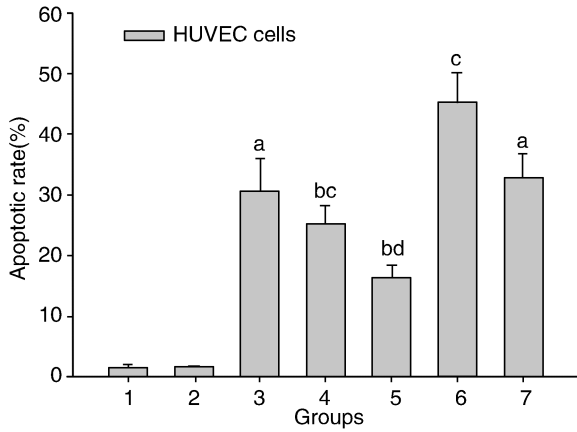


图 3. CAS 对氧化应激诱导的 HUVEC 细胞凋亡率的影响 A 为 NS 组,B 为 0.2% DMSO 组,C 为 CAS 5  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组,D 为 CAS 10  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组,E 为 CAS 20  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组,F 为  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组,G 为 ONY 10  $\mu\text{mol/L}$  组。

Figure 3. The effect of CAS on the apoptotic rate induced by oxidation stress of the human HUVEC cells



**图 4. CAS 对氧化应激诱导的 HUVEC 细胞凋亡率的影响** 1 为 NS 组, 2 为 0.2% DMSO 组, 3 为 CAS 5  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组, 4 为 CAS 10  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组, 5 为 CAS 20  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组, 6 为  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组, 7 为 ONY 10  $\mu\text{mol/L}$  组。a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组比较; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与 ONY 组比较。

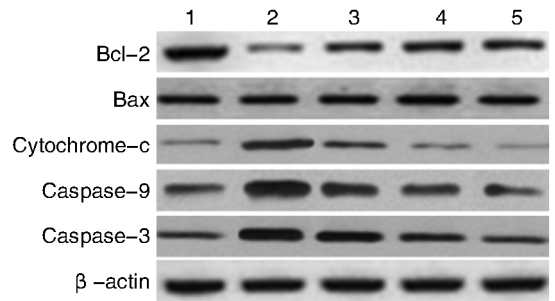
**Figure 4. The effect of CAS on the apoptotic rate induced by oxidation stress of the human HUVEC cells**

#### 2.4 CAS 对氧化应激诱导的 HUVEC 线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较, 经 1  $\text{mmol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 HUVEC 细胞 48 h 后, Bcl-2 蛋白表达下调和 Bcl-2/Bax 比值下降 ( $P < 0.05$ ); Cytochrome-C、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达上调 ( $P < 0.05$ )。而经不同浓度的 CAS (5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  共同孵育 HUVEC 细胞 48 h 后, 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组比较, Bcl-2 蛋白表达逐渐上调, 呈剂量依赖性 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2/Bax 比值上升 ( $P < 0.05$ ); 而 Cytochrome-C、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白逐渐表达下调, 呈剂量依赖性 ( $P < 0.05$ ), Bax 蛋白表达不受影响 ( $P > 0.05$ ; 图 5 和图 6)。

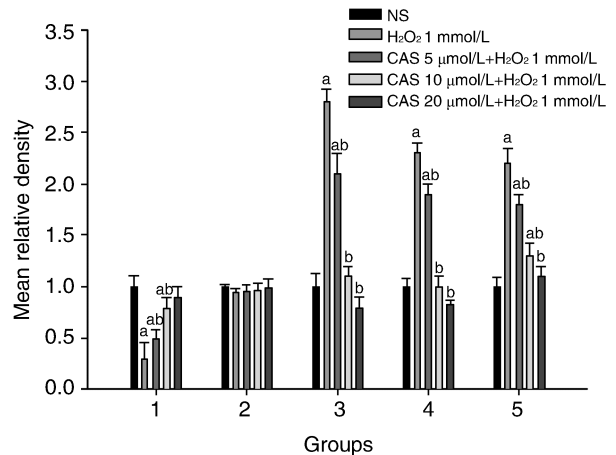
### 3 讨论

血管内皮细胞作为血流和血管壁之间的屏障, 直接面对血流的物理和化学作用, 最容易受到损伤, 影响其功能的正常发挥, 血管内皮细胞损伤和功能紊乱与心血管疾病的发生和发展密切相关, 研究表明血管内皮细胞损伤是触发动脉粥样硬化的早期事件, 而受损的内皮细胞凋亡是其功能紊乱的重要原因之一, 在动脉粥样硬化斑块内存在凋亡的内皮细胞, 而凋亡的内皮细胞脱落后促进血栓形成进而引起续发心血管疾病<sup>[4]</sup>。凋亡是活体内个别细胞的一种程序性死亡的表现形式, 是由体内内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致细胞主动性



**图 5. CAS 对氧化应激诱导的 HUVEC 线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响** 1 为 NS 组, 2 为  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组, 3 为 CAS 5  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组, 4 为 CAS 10  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组, 5 为 CAS 20  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\text{mmol/L}$  组。

**Figure 5. The effect of CAS on the expression of proteins related to mitochondrial apoptotic pathways induced by oxidation stress of the human HUVEC cells**



**图 6. CAS 对氧化应激诱导的 HUVEC 线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响** 1 为 Bcl-2, 2 为 Bax, 3 为 Cytochrome-C, 4 为 Caspase-9, 5 为 Caspase-3。a 为  $P < 0.05$ , 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  组比较。

**Figure 6. The effect of CAS on the expression of proteins related to mitochondrial apoptotic pathways induced by oxidation stress of the human HUVEC cells**

死亡方式, 凋亡在生物胚胎发生发育、成熟细胞新旧交替、激素依赖性生理退化、萎缩和老化以及自身免疫性疾病和肿瘤发生发展中, 都发挥不可替代的重要作<sup>[5]</sup>。研究表明氧化应激在动脉粥样硬化等血管性疾病中起重要作用,  $\text{H}_2\text{O}_2$  是活性氧家族中重要的一员, 可以体外诱导细胞凋亡; 紫外线等离子射线作用于细胞后, 可诱使细胞产生  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 进而诱导细胞发生凋亡<sup>[6]</sup>。抑制细胞凋亡, 保护血管内皮损伤, 维护其正常生理功能, 成为预防心血管疾病的热门靶点。紫花牡荆素 (CAS) 是一种从蔓荆子

中提取的具有广泛药理活性的多甲基黄酮类化合物,药理学研究表明 CAS 具有抗炎、抗性激素、抗肿瘤作用、抗氧化等作用<sup>[2]</sup>,而 CAS 在心血管方面是否能治疗作用尚未见文献报道,本研究将进一步验证 CAS 对心血管内皮细胞凋亡的影响。

细胞发生凋亡的同时伴随着生长活性的丧失,对整个细胞群而言,表现为生长速度降低甚至停止直至消亡<sup>[3]</sup>。本研究采用 MTT 法检测 HUVEC 细胞生长活性,发现 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用于 HUVEC 细胞后,随着作用时间的延长, HUVEC 细胞生长活性渐趋降低,而不同浓度的 CAS 呈时间和浓度依赖性增加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激诱导的 HUVEC 细胞生长增殖活性, CAS 能抑制经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激诱导的 HUVEC 细胞凋亡的发生,凋亡率随 CAS 浓度的增大而逐渐下降,作用效果与 ONY 保护血管内皮细胞的作用相当,提示 CAS 能拮抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激诱导 HUVEC 细胞的凋亡,对 HUVEC 细胞起到保护作用。Bcl-2 家族成员通过调控线粒体信号转导系统而调控内源性凋亡途径, Bcl-2/Bax 蛋白比值上调,阻止细胞色素 c 的释放<sup>[7,8]</sup>,而 Cytochrome-C 进入胞浆是细胞发生凋亡的关键因素, Cytochrome-C 一旦进入胞浆,就与 Apaf-1、ATP/dATP 结合成凋亡体复合物,凋亡体可以激活 Caspase-9,而 Caspase-9 可水解 Caspase-3 前体蛋白<sup>[9-10]</sup>,激活 Caspase-3,而 Caspase-3 是细胞凋亡的 executor,它可以直接降解细胞内的结构蛋白和功能蛋白引起细胞凋亡。本研究表明,不同浓度的 CAS 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共同孵育 HUVEC 细胞, CAS 呈时间和浓度依赖性增强 HUVEC 细胞生长活性,抑制 HUVEC 细胞凋亡,同时调控内源性线粒体凋亡途径的关键蛋白 Bcl-2 表达随 CAS 的浓度的增大而升高( Bcl-2/Bax 比值上调; Bax 蛋白表达没有受到影响),而 Cytochrome-C、Caspase-9、Caspase-3 表达降低,提示 CAS 增强 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 细胞生长增殖活性和抑制其凋亡可能与其调节线粒体凋亡途径相关。

综上所述, CAS 通过线粒体凋亡途径来提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激诱导的 HUVEC 细胞的生长增殖活性,抑制其凋亡的发生,提示 CAS 可能成为一种治疗动脉粥样硬化等心血管病的新型化疗药物,具有较大的开发价值。但目前的研究还仅限于体外实

验,其在体内对细胞的影响还有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 蒲丽娟, 刘义. 对乙酰氨基酚对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(9): 714-718.
- [2] Koh DJ, Ahn HS, Chung HS, et al. Inhibitory effects of casticin on migration of eosinophil and expression of chemokines and adhesion molecules in A549 lung epithelial cells via NF- $\kappa$ B inactivation[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(3): 399-405.
- [3] Jun Bai, Guihuang Tan, Li Chen, et al. Casticin combination with Cisplatin in sub-toxic concentration induced apoptosis of human ovarian cancer HO-8910 cells in vitro[J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2013, 12(1): 35-39.
- [4] 度勤慧, 朱炳阳, 廖端芳, 等. 金粉藏素抑制氧化应激诱导的血管内皮细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(3): 283-286.
- [5] Lodien G, Kopperud HM, Orstavik D, et al. Detection of leachables and cytotoxicity after exposure to methacrylate- and epoxy-based root canal sealers in vitro[J]. Eur J Oral Sci, 2013, 121(5): 488-496.
- [6] Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, et al. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates[J]. Redox Biol, 2013, 1(1): 304-312.
- [7] Hařdara K, Zamir L, Shi QW, et al. The flavonoid Casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action[J]. Cancer Lett, 2006, 242(2): 180-190.
- [8] Hsieh TC, Wu JM. Regulation of cell cycle transition and induction of apoptosis in HL-60 leukemia cells by the combination of Coriolus versicolor and Ganoderma lucidum[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(1): 251-257.
- [9] Young Park S, Jeong YJ, Kim SH, et al. Epigallocatechin gallate protects against nitric oxide-induced apoptosis via scavenging ROS and modulating the Bcl-2 family in human dental pulp cells[J]. J Toxicol Sci, 2013, 38(3): 371-378.
- [10] 白军, 谢宛玉, 曹建国, 等. 紫花牡荆素体外抑制人卵巢癌 HO-8910 细胞增殖和诱导凋亡的研究[J]. 现代妇产科进展, 2010, 19(4): 265-269.

(此文编辑 李小玲)